



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

Instituto Nacional de Perinatología

“Isidro Espinosa de los Reyes”

**Identificación de *Gardnerella vaginalis* en pacientes
gestantes mediante la
electroforesis en gel con gradiente de
desnaturalización en comparación con el
cultivo vaginal.**

T E S I S

Para obtener el Título de

ESPECIALISTA EN

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA

DR. ALBANI CAMPANARIO MARIO EMILIANO

DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARÍA

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA**

DR. HERNANDEZ GUERRERO CESAR A.

TUTOR DE TESIS





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN:

DR. VALENTÍN IBARRA CHAVARRÍA
DIRECTOR MÉDICO
PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DR. GOMEZ SÁNCHEZ ENRIQUE
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. HERRERIAS CAÑEDO TOMAS
JEFE DEL AREA DE URGENCIAS Y TOCOCIRUGIA
TUTOR CLINICO DE TESIS

DR. HERNANDEZ GUERRERO CESAR A.
JEFE DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
TUTOR DE TESIS

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1 INTRODUCCION

CAPITULO 2 MATERIAL Y METODOS

CAPITULO 3 RESULTADOS

CAPITULO 4 DISCUSIÓN

CAPITULO 5 APENDICES

CAPITULO 6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CAPITULO 7 CURRICULUM VITAE

Palabras clave: Vaginosis bacterina , Gardnerella vaginalis , cultivo vaginal , electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizacion, parto pretermino.

RESUMEN

Objetivo: Establecer si la capacidad de la técnica para identificación de *Gardnerella vaginalis* por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) en pacientes embarazadas atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER) es superior a la técnica de cultivo actualmente utilizada.

Material y métodos: se procesaron 38 muestras cervico vaginales de pacientes obstétricas que fueron atendidas en la consulta externa de infectología en el INPerIER en el periodo comprendido entre marzo 2004 a marzo 2007. En dicha consulta se valoraron los criterios de Amsel y se tomaron muestras de secreción vaginal para la realización de un frotis con tinción de gram, cultivo vaginal y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Se compararon la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y predictivo negativo del cultivo vaginal para la detección de *Gardnerella vaginalis* y para DGGE. Finalmente se compararon los resultados de la detección de *G. vaginalis* por DGGE con los obtenidos por el Gold estándar, los criterios de Amsel.

Resultados: se obtuvieron para la prueba de cultivo valores de sensibilidad del 10.5%, especificidad del 78.9%, VPP del 46.8 %, y VPN 33.3% mientras que para la prueba con DGGE los valores fueron de 21%, 89.4%, 53.1% y 66.6% respectivamente.

Conclusión: Los valores buscados para comparar ambas pruebas diagnósticas se inclinan a favor la detección de *Gardnerella vaginalis* por DGGE y evidencian la falta de sensibilidad del cultivo.

ABSTRACT

Objective: to establish if the capacity of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is superior than the capacity of traditional vaginal cultures to identify *Gardnerella vaginalis* in pregnant patients that are being followed in the National Institute of Perinatology "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPerIER).

Material and methods: It had been analyzed the vaginal samples of 38 pregnant patients that were attended in the external consult of INPerIER between March 2004 and March 2007. In this consult, the Amsel's criteria had been applied for the diagnosis of bacterial vaginosis. Vaginal secretion samples have been taken too for the application of the Gram stain, to cultivate it and applied DGGE technique. We compared sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for both, vaginal culture and DGGE technique for the detection of *Gardnerella vaginalis*. We also compared these results with the Gold standard, the Amsel's criteria.

Results: for the vaginal culture we obtained a sensitivity of 10.5%, a specificity of 78.9%, PPV of 46.8% and a NPV of 33.3%. For DGGE we obtained values of 21%, 89.4%, 53.1% and 66.6% respectively.

Conclusions: with these values it appears that DGGE is a better technique for the detection of *Gardnerella vaginalis* and corroborate the lack of sensitivity of the vaginal cultures for this purpose.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

INFECCIONES VAGINALES

Los síntomas vaginales son una de las causas más frecuentes por las que una paciente acude a la consulta ginecológica. Las infecciones vaginales pueden tener importantes consecuencias en términos de dolor, malestar, función sexual, autoestima, se asocian a otras infecciones de transmisión sexual y se relacionan a efectos reproductivos adversos tanto en las pacientes embarazadas como las no embarazadas. (1)

La vaginitis se define como un espectro de condiciones que causan síntomas vulvovaginales como prurito, irritación y flujo vaginal. Las causas más comunes son la vaginosis bacteriana en el 22-50%, candidiasis vulvovaginal en el 17-39% y tricomoniasis en el 4-35%. El 72% de las pacientes con vaginitis, pueden no ser diagnosticadas de forma adecuada por lo inespecífico de la sintomatología o ausencia de la misma. (1)

EL CONTROL DE LA MICROFLORA VAGINAL POR PARTE DE LOS LACTOBACILOS

Se sabe que la microflora vaginal normal consiste en un mezcla de organismos aerobios y anaerobios entre los que se puede encontrar *Streptococcus*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y *Lacto bacilos*, los cuales son acidorresistentes y cuya función es participar en el control del crecimiento de otros micro organismos mediante la producción de ácido láctico, manteniendo el pH vaginal entre 3.8 y 4.5. Con el aumento de los estrógenos durante la pubertad, la cantidad de glucógeno en la pared vaginal aumenta, transformándose a glucosa y posteriormente a ácido láctico. Esto mantiene el característico pH bajo de la vagina. A esta producción de ácido láctico se le agrega otras secreciones acidas del huésped. Además interfieren con la adhesión bacteriana a las células epiteliales vaginales y producen otras sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano tales como la acidolina, las bacteriocinas y los inhibidores parecidos a bacteriocinas. (2 - 3)

Sin embargo, fuera del cambio en el pH vaginal, que hasta ahora parece ser el mecanismo más sustentable para el control del desarrollo de la vaginosis bacteriana, se han postulado otros mecanismos por los cuales los lactobacilos pudieran interferir con el desarrollo de un micro ambiente favorable para el desarrollo de vaginosis bacteriana. Entre estos se encuentra la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), al cual se le conocen sus propiedades antibacterianas.(3) Cerca del 60% de las especies de lactobacilos producen

H₂O₂, entre estas encontramos a *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus* y *L. casei*.(3-4) Sin embargo este mecanismo no ha sido del todo comprendido, ya que aunque la mayor parte de las pacientes sanas tienen lacto bacilos productores de H₂O₂, también se han encontrado, en las mismas concentraciones en mujeres que padecen vaginosis bacteriana. Los estudios in vitro sugieren que las concentraciones de H₂O₂ necesarias para dañar a *Gardnerella vaginalis* son también inhibitorias para los lactobacilos y que su producción es mayor en ambientes aeróbicos, los cuales son diferentes a los anaeróbicos encontrados en la vagina. Debido a esto la participación de H₂O₂ como mecanismo de defensa vaginal in vivo aun no es del todo claro. (3 -4-5)

Es así que los factores que alcalinizan el pH vaginal favorecen el crecimiento de anaerobios, los cuales crean una cascada de cambios en la microflora vaginal que llevan a la presencia de lo que conocemos hoy como vaginosis bacteriana. (3)

VAGINOSIS BACTERIANA

La vaginosis bacteriana es la causa más común de vaginosis aguda representando de un 15 a 50% de los casos.(2) Fue descrita por primera vez por Gardner y Dukes en su artículo “ *Haemophilus vaginalis* vaginitis ”, en donde se encontró evidencia retrospectiva de que era necesario más de un agente infeccioso para establecer el diagnóstico.(4) En 1963, el bacilo fue reclasificado como *Corynebacterium vaginalis* y finalmente renombrado como *Gardnerella vaginalis* en 1980 en honor a Gardner. (3)

Se caracteriza por ser un síndrome polimicrobial en el que las poblaciones de Lactobacilos vaginales, usualmente dominantes en la vagina de las mujeres sanas, son reemplazados por una mezcla de organismos entre los que encontramos a *Gardnerella vaginalis*; *Prevotella* (bacteroides), cocos anaeróbicos gram positivos como las especies de *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* y a veces especies de *Mobiluncus curtisi*.¹ Estos microorganismos pueden estar presentes en la vagina de manera habitual, pero cuando ocurre el desequilibrio, la concentración de lactobacilos disminuye y la de *Gardnerella vaginalis* alcanzan 10⁸ a 10¹¹ UFC/gm.(6)

Sin embargo, los postulados de Koch para establecer la causalidad de la enfermedad no han podido ser aplicados de manera completa a ningunos de los microorganismos antes mencionados para establecer cual de estos es el responsable del desarrollo y sostén de la infección. (3)

Factores de riesgo para infección por *Gardnerella vaginalis*

Los factores de riesgo para presentar vaginosis bacteriana incluyen el tener más de una pareja sexual, haber cambiado de pareja sexual en los 30 días previos así como el uso de duchas vaginales mensuales o en los 7 días previos. La ausencia de lactobacilos productores de H₂O₂ también se considera un factor de riesgo para el desarrollo de la infección, esto es más frecuente en mujeres de raza negra. (2) (Tabla 1)

Tabla 1. Factores de riesgo para vaginosis bacteriana.

<i>Factores de riesgo para vaginosis bacteriana</i>	<i>OR (95% IC)</i>
<i>Antecedentes de vaginosis bacteriana</i>	<i>2.4 (1.8 - 3.2)</i>
<i>Antecedentes de otras infecciones cervicovaginales</i>	<i>1.5 (1.1 - 2.0)</i>
<i>Más de una pareja sexual</i>	<i>1.8 (1.1 - 2.9)</i>
<i>Uso de ropa interior ajustada más de una vez a la semana</i>	<i>1.5 (1.0 - 2.2)</i>
<i>Uso de duchas vaginales ocasional</i>	<i>1.3 (1.0 - 1.7)</i>
<i>Uso de duchas vaginales más de una vez a la semana</i>	<i>2.0 (1.0 - 3.9)</i>
<i>Uso de antibioticoterapia un mes previo</i>	<i>1.7 (1.1 - 2.6)</i>

OR= Odds ratio
(7)

Otros factores de riesgo estudiados, pero de los cuales no se ha encontrado que sean significativos son : el número de nacimientos , el estado menopausico , la frecuencia de relaciones sexuales un mes antes de la revisión , uso de anticonceptivos hormonales orales , uso de dispositivo intrauterino , uso de métodos de barrera y diabetes.(7)

Cuadro clínico de la vaginosis bacteriana

Clásicamente se describe como un cuadro caracterizado por secreción grisácea homogénea, descarga con olor a pescado. Sin embargo, solo el 50% de las pacientes con vaginosis bacteriana son sintomáticas, por lo que para su diagnóstico, se recomienda la utilización de otros criterios paraclínicos y microbiológicos. (2)

PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Criterios de Amsel

Estos criterios, descritos por primera vez en 1983, se usan para el diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana. Para que se cumplan deben de estar presentes con por lo menos tres de los siguientes criterios:

1. *descarga vaginal homogénea y delgada*
 2. *pH vaginal >4.5*
 3. *olor a aminas al aplicar hidróxido de potasio (KOH) al 10 %*
 4. *presencia de células clave en la preparación en fresco*
- (8)

Descarga Vaginal

Se describe como un cuadro caracterizado por secreción flujo homogéneo, no viscoso, adherente, sin detritos y aumentado en volumen con respecto a las secreciones vaginales que se observan normalmente, con olor a pescado. Sin embargo, solo el 50% de las pacientes con vaginosis bacteriana son sintomáticas. (2 -9)

Olor a aminas

Chen et al, demostraron la producción de aminoácidos y ceto ácidos, especialmente el piruvato, por *Gardnerella vaginalis* durante su crecimiento en el medio complejo de peptona, almidón, y dextrosa. Estos cultivos mixtos obtenidos de pacientes con vaginosis bacteriana se produjeron aminas volátiles como la putresina y la cadaverina, presumiblemente de la descarboxilización de arginina y lisina respectivamente. Los cultivos puros de *Gardnerella vaginalis* no demostraron la producción de estas aminas volátiles, por lo que algunos de los microorganismos asociados a la infección las deben de producir. Se especula que intervienen en la patogénesis de la enfermedad irritando y dañando el epitelio vaginal. (3)

El característico olor a aminas se obtiene al agregar a una muestra de la secreción vaginal de estas pacientes 2 gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 10%, la prueba se considera positiva cuando se detecta el característico olor a pescado. (3)

pH

Se ha postulado que los microorganismos anaerobios vinculados con la enfermedad a través de la producción de metabolitos alcalinos de aminas y amonio, pueden elevar el pH del ambiente vaginal, lo que favorece el

crecimiento de G. vaginales. El pH vaginal se encuentra > 4.5 en el 97 % de las pacientes con esta entidad. (2)

Para la toma de pH vaginal se recomienda usar un cotonete aplicándolo a la pared vaginal lateral a una distancia media entre el introito y el cervix y posteriormente ponerlo en contacto con la tira reactiva que nos dará el pH vaginal. Si por el contrario la muestra es tomada en el fondo de saco vaginal posterior, esta puede salir alterada con un aumento de pH provocado por la secreción cervical alcalina (pH 6). Se deben de descartar otros factores que favorezcan la alcalinización de las secreciones vaginales tales como el semen, la sangre, moco cervical, periodo menstrual, infección por *Tricomonas* y el uso de duchas vaginales. (10)

Frotis en fresco

En el caso de la vaginosis bacteriana el frotis en fresco nos muestra células clave, que son células del epitelio vaginal con coco bacilos adheridos a ellas, estas deben de estar en una proporción igual o mayor al 20%. (2)

Criterios de Amsel modificados

Se ha buscado simplificar los criterios de Amsel debido a que no todos los clínicos cuentan con el material o el entrenamiento necesario para el examen de la muestra en fresco. Al respecto Simoes y colaboradores evaluaron la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de las diferentes combinaciones de estos cuatro criterios encontrando (Tabla 2).

Como se observa en la (tabla 2) el $\text{pH} > 4.5$ y la presencia de células clave o la descarga vaginal + células claves tienen valores de sensibilidad y especificidad cercanos a los de los criterios de Amsel. Sin embargo estas combinaciones aun incluyen la valoración de la presencia de células clave, por lo que éste autor concluye que se puede hacer un diagnóstico con la combinación de dos criterios diferentes a la valoración microscópica y que ésta se aplicará solo en los casos borderline, en la sospecha de otra infección concomitante o en el caso de infecciones de repetición. (8)

Tabla 2. Criterios de Amsel modificados

<i>Criterio</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>
<i>Amsel (3 criterios)</i>	97	90	74	99
<i>pH vaginal >4.5</i>	97	79	57	99
<i>Olor aminas</i>	83	85	61	94
<i>Células claves</i>	93	86	65	98
<i>Descarga vaginal</i>	97	26	27	96
<i>pH+aminas</i>	83	92	76	95
<i>pH+descarga vaginal</i>	93	82	60	98
<i>pH+células clave</i>	90	94	82	97
<i>Aminas+ células clave</i>	89	94	80	97
<i>Aminas +descarga vaginal</i>	83	87	66	95
<i>Descarga vaginal + células clave</i>	90	92	77	97

Cifras expresadas en porcentajes

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

(8)

Criterios de Nugent

En la tinción gram podemos observar normalmente un predominio de bacilos gram positivos considerado como el morfotipo de los lactobacilos, a diferencia de lo que se observa en la vaginosis bacteriana en la que se detecta un aumento de la proporción de cocos, bacterias de formas variables y una disminución o ausencia de lacto bacilos. (2)

Esta tinción de gram puede ser evaluada mediante la escala de puntuación estandarizada de Nugent (Tabla 3), en esta se asigna una puntuación acorde con tres morfotipos observados (bastones gram positivos

(lacto bacilos), bastones gram negativos o variables (*Gardnerella vaginalis* o bastones anaerobios) y *Mobiluncus sp.* (10)

Tabla 3 .Criterios de Nugent

<i>Puntuación</i>	<i>Significado</i>
0-3	<i>Flora normal</i>
4-6	<i>Flora intermedia</i>
7-10	<i>Vaginosis bacteriana</i>

(2)

La sensibilidad de esta prueba es de 62% al 100% y VPP 76% a 100%.(11) Estos criterios fueron validados para mujeres embarazadas por Hiller et al (12).

Cultivo

Aunque los cultivos para *Gardnerella vaginalis* constituyen un método altamente sensible, este no se recomienda porque en un 60% de las pacientes en las que se obtienen resultados positivos no manifiestan síntomas clínicos de la enfermedad .Se reporta una sensibilidad 92%, especificidad 69%, valor predictivo positivo 41% y un valor predictivo negativo 97%. (13) A esto hay que agregar que el tiempo necesario para obtener el resultado no es práctico si se desea iniciar un tratamiento inmediato. (14 - 6)

Otras pruebas

Existen en el mercado algunas pruebas que miden la actividad de ciertas enzimas relacionadas con los microorganismo identificados en las pacientes con vaginosis bacteriana tales como QuikVue Advance (actividad de inmunopeptidasas) o el OSOM BV Blue (actividad de sialidasa) a los que se les asigna sensibilidades del 90 % y especificidades de >95% en promedio. (1-2) También se proponen pruebas rápidas por hibridación de DNA (Affirm VPIII) al cual se le asigna valores de sensibilidad del 71 al 98%. (14) Estas pruebas tienen un alto porcentaje de falsos positivos. . Es importante reconocer que las muestras que aparecen como falsas positivas para los criterios de Amsel, resultan sugestiva de vaginosis bacteriana con la tinción de gram, lo que demuestra lo difícil que es establecer la utilidad de nuevas pruebas diagnosticas debidas a la calidad de los estándares de oro actuales.Existen algunos estudios que evalúan este tipo de método incluyendo DNA de dos especies de *Mobiluncus* y a *Gardnerella vaginalis*. Establecen una sensibilidad del 78.4%, especificidad del 95.6%, VPP del 82.9% y un VPN del 94.2% para pacientes obstétricas y no obstétricas. (14 - 11)

Otra de las formas de diagnóstico de infección por *Gardnerella vaginalis* es por medio del frotis de *Papanicolaou (PAP)*, no es la finalidad de dicho estudio hacer el diagnóstico de este tipo de infecciones, pero en muchas ocasiones se encuentra como hallazgo. Karani calculó un sensibilidad de 59.4%, una especificidad de 83.3%, un valor predictivo positivo de 67.3% y valor predictivo negativo de 78%. Este pobre resultado está dado por tres principales razones. La primera es que este estudio no fue diseñado para valorar la patología en cuestión, en segundo lugar la toma del PAP es en el cervix, y la vaginosis bacteriana es una enfermedad esencialmente vaginal y por último, existen diferencias en la interpretación ya que para el frotis de Papanicolaou se utiliza un aumento de 400 veces, mientras que para la tinción gram se utiliza una magnificación de 1000. (10)

PCR de la secuencia nucleótida 16S de las secuencias ribosomales (rDNA)

Las comunidades bacterianas pueden ser identificadas sin necesidad de cultivarlas mediante la caracterización de sus secuencias ribosomales (rDNA), esta técnica tiene la ventaja de poder detectar microorganismos resistentes a ser cultivados.

La aplicación intencionada de esta técnica en pacientes con vaginosis bacteriana en un estado *no gravídico* encontró que las pacientes sin diagnóstico de VB tuvieron de 1 a 6 especies bacterianas, con un promedio de 3.3 por muestra, de estas, los lactobacilos representaron el 83 al 100% de las clonas. Por otro lado, las mujeres con diagnóstico de vaginosis bacteriana realizado mediante los criterios de Amsel, tuvieron una mayor biodiversidad con 9 a 17 especies de bacterias, con un promedio de 12.6 por muestra, siendo significativamente mayor que en el grupo de control ($p < 0.001$). Además, en estas pacientes se describieron bacterias anteriormente no identificadas con 35 nuevas especies representando el 58% del total de las clonas.

De estas 35 nuevas especies, tres de ellas fueron únicamente detectadas en las pacientes con vaginosis bacteriana. Se nombraron de manera provisional por el investigador como bacterias asociadas a vaginosis bacteriana (*BVAB*)1, 2 y 3. Tanto *BVAB*1 como *BVAB*2 y *BVAB*3 están relacionadas filogenéticamente al grupo de *Clostridios* pero sin tener secuencias conocidas para alguna de las especies contenidas en el *GenBank*.

*BVAB*1 fue encontrada en el 41% de las muestras con diagnóstico de vaginosis bacteriana, y en estas muestras representó el 66% del total de las clonas. *BVAB*2 fue encontrada en el 89% de las muestras y *BVAB*3 fue encontrada en el 41% de las pacientes, sin embargo ambas no fueron predominantes a diferencia de *BVAB*1. Por lo que estas tres bacterias

resultaron ser muy específicas como indicadores de VB. Las combinaciones entre ellas que mejoraron la especificidad y la sensibilidad respecto a su uso individual, fueron las de *BVAB1 + BVAB3* y *BVAB2 + megasfera* respectivamente. También cabe mencionar que en 2 de las pacientes sin diagnóstico de vaginosis bacteriana se encontraron combinaciones de estas tres bacterias y que a los pocos meses después, desarrollaron la enfermedad. (Tabla 4)

Tabla 4 .Bacterias encontradas con la técnica de PCR

<i>Bacteria detectada por PCR</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>
BVAB1	40.7	97.8
BVAB2	88.9	95.7
BVAB3	40.7	97.8
Gardnerella V.	100	41.3
Atopobium	96.3	80.4
BVAB1 y BVAB3	33.3	100
BVAV2 y Mega esfera	100	91.3

Cifras expresadas en porcentajes
(15)

Aunque en este estudio *Gardnerella vaginalis* estuvo presente en el 100% de las pacientes con VB, también estuvo presente en el 59% de las pacientes sin vaginosis bacteriana. No se pudo encontrar un agente único en todas las muestras de pacientes con VB, pero sin una asociación de ellos, a diferencia de lo anterior las muestras de las pacientes sin diagnóstico de VB mostraron una flora vaginal homogénea, muy similar a la descrita por medios de cultivos tradicionales.

Al estudiarse estas nuevas especies bacterianas mediante técnica de FISH, las tres bacterias resultaron tener forma de bastón, aunque morfológicamente diferentes, fácilmente distinguibles de otras especies asociadas a vaginosis bacteriana y se encontraron adheridas a las células epiteliales vaginales en una forma parecida a las de las células claves. (15)

Con lo anterior aun no se puede señalar a un único microorganismo como responsable de la entidad conocida como vaginosis bacteriana, probablemente se trate de una entidad en la que el nicho vaginal es alterado por un grupo de bacterias metabólicamente interdependientes. (15)

Otras pruebas con PCR han tratado de combinar no solo el *DNA 16s* de especies de *Mobiluncus*, sino también para otras regiones blanco de DNA como *nanH* para *Bacteroides fragilis* y la región del espaciador interno del DNA ribosomal para *Gardnerella vaginalis*. Con esta combinación se obtuvo una sensibilidad de 78.4%, una especificidad de 95.6%, un VPP de 82.9% y VPN de 94.2%. Al hacer la comparación con la escala de Nugent, se encontró una correlación del 100%. Su alto valor predictivo negativo le permite a ésta prueba colocarse como una alternativa para un tamizaje prenatal. (11)

TRATAMIENTO

El tratamiento de la vaginosis bacteriana consiste en antibióticos y medidas higiénico dietéticas. Se recomienda iniciar tratamiento en mujeres sintomáticas. La CDC (Control Disease Center) recomienda los siguientes esquemas terapéuticos:

- 1.- Metronidazol (dosis) vía oral por 7 días, el cual es tan efectivo como su administración vía vaginal por 5 días, con una cura sintomática del 80% y por medios microbiológicos del 70% al mes de tratamiento comparado con el tratamiento con placebo.

La dosis única de metronidazol ya no se recomienda como régimen alternativo por su alto índice de fallo de hasta 50%.

- 2.-El tratamiento con crema vaginal de clindamicina al 2% por 7 días es tan efectivo como el metronidazol vía oral. La presentación vía oral de 300mg, con tomas cada 12 hrs por 7 días también es recomendable

En las pacientes que reciben el tratamiento, la vaginosis bacteriana puede recurrir hasta en el 30 % de los casos en un periodo de 3 meses. La causa probable para esta situación probablemente sea la reinfección desde fuentes exógenas como las parejas sexuales o la falla de los lacto bacilos para recolonizar la vagina. El tratamiento a la pareja sexual no ha demostrado ser protector para prevenir estas recaídas. (1-2)

En el caso específico de la paciente embarazada, los estudios concuerdan que se debe de dar tratamiento en la paciente sintomática, sin embargo, en la paciente no sintomática, aun no es clara la utilidad de este. Algunos estudios concuerdan que en las mujeres con alto riesgo de parto pretérmino, existe una utilidad en la búsqueda y tratamiento de infecciones asintomáticas, sin embargo otros estudios no han encontrado beneficio alguno en estas prácticas. (1)

Esta falta de eficacia de tratamiento antibiótico para prevenir parto pretérmino, puede deberse a:

- Que en muchos de los estudios se asignan pacientes entre las 34 y 37 semanas de gestación, cuando se ha demostrado que a estas semanas de gestación no es una de las causas principales.
- La lisis bacteriana puede liberar endotoxinas, las cuales a su vez pueden aumentar la respuesta inflamatoria.
- El pobre entendimiento que se tiene sobre el rol inmunológico que tiene la infección en el parto pretérmino y las posibles bases genéticas de estas respuestas. (16)

COMPLICACIONES DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

La vaginosis bacteriana se asocia a un mayor riesgo de infecciones de otras partes del tracto genital incluyendo endometritis posterior a un evento obstétrico, enfermedad pélvica inflamatoria, infecciones de herida quirúrgica, aumento de riesgo de aborto espontáneo y disminución del éxito de la fertilización invitro. (2)

INFECCIONES VAGINALES Y PARTO PRETERMINO

El parto pretérmino se define como aquel que ocurre antes de la semana 37 y posterior a la semana 20 de gestación. Este es uno de los principales problemas en la obstetricia hoy en día. Cerca del 10% de todos los embarazos son pretérminos; la prematurez es responsable del 70% de la mortalidad peri natal y casi la mitad de la morbilidad neurológica a largo plazo, en especial en recién nacidos menores de 32 semanas de gestación o peso menor a 1500grs. (17)

El 20% de los partos pretérminos resultan de una decisión médica de interrumpir un embarazo por causa materna o fetal, el 80% restante resulta como un acontecimiento espontáneo producido por múltiples causas. En el caso específico de las infecciones vaginales, se estima que esta representa el 20 a 25 % de las causas. (17)

La sospecha de la relación entre el parto pretérmino y la infección, no fueron sustentadas con suficiente evidencia microbiológica sino hasta finales de 1977, cuando se pudieron cultivar estos microorganismos del líquido amniótico de pacientes con membranas amnióticas íntegras. (17)

Esta relación entre infecciones y parto pretérmino no es consistente a lo largo del embarazo, ya que se presenta sobre todo en embarazos menores de 30 semanas de gestación y es rara entre las 34 y 36 semanas de gestación. Así tenemos que entre los embarazos de las 24 a 28 semanas de gestación se estima que las infecciones están relacionadas con el 70% de los partos pretérminos, entre las 28 a 32 semanas de gestación el 40% y en el 16% entre las 32 a 36 semanas de gestación. (16)

No está claro el momento en el que la infección vaginal asciende a la cavidad uterina ya que se han encontrado en muestras endometriales de mujeres no embarazadas datos de endometritis crónica asociada a vaginosis bacteriana. Por lo anterior es posible que la instalación de la infección se previó o en el momento de la concepción. (17)

En las pacientes con parto pretérmino con membranas amnióticas íntegras, los microorganismos que con más frecuencia se aíslan son *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *peptostreptococos* y especies de *bacteroides*, todos los anteriores considerados como organismos de baja virulencia. Los microorganismos frecuentemente relacionados con infecciones del tracto genitourinario de mujeres no embarazadas, *Neisseria gonorrhoeae* y *Clamidia trachomatis*, son raramente encontradas en úteros grávidos con membranas íntegras, mientras que los microorganismos comúnmente asociados a corioamnioitis e infecciones neonatales tales como *estreptococo del grupo B* y *Echerichia coli*, son raramente aislados. (19)

El mecanismo por el que se trata de explicar el porqué las infecciones vaginales pueden desencadenar un parto pretérmino nos dice que al producirse una invasión del espacio coriodecidual, en una forma ascendente desde la vagina. Se inicia la producción de mucinasas, sialidasas, las cuales alteran la barrera protectora de moco que evita el ingreso de microorganismos hacia el útero. Cuando dichas bacterias ingresan a la cavidad uterina se desencadenan una reacción inflamatoria con la producción consecuente de citocinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral Alfa, Interleucina Alfa 1, Beta 1, Interleucina 6, Interleucina 8, fosfolipasas y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos entre otros. Todo lo anterior deriva en la producción de prostaglandinas en el amnios, el corión, la decidua y el miometrio además de favorecer la infiltración y activación de neutrófilos así como la producción de

metaloproteasas. Las prostaglandinas, derivadas del ácido araquidónico, estimulan la actividad uterina, mientras que las metaloproteasas alteran la estructura molecular de la membrana amniótica con lo que ocurre un debilitamiento de estas estructuras y favoreciendo así el parto pretérmino y la ruptura prematura de membranas. (16-17-18)

Cuando se busca por medio de PCR microorganismos relacionados con infecciones vaginales en el líquido amniótico de pacientes que tuvieron parto pretérmino, estos se encuentran en 30 a 55% de las muestras. (18)

En el Instituto Nacional de Perinatología IER, la incidencia de parto pretérmino es de 5.4 % aproximadamente, dicha incidencia ha aumentado en los últimos años. (Tabla 5)

Tabla 5 .Incidencia de parto pretérmino en el INPerIER

<i>Año</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>
<i>Incidencia</i>	<i>0.29</i>	<i>1.02</i>	<i>1.85</i>	<i>3.4</i>	<i>4.6</i>	<i>5.7</i>	<i>5.4</i>

Departamento de estadística INPerIER

VAGINOSIS BACTERIANA Y EMBARAZO

Las infecciones del tracto genital inferior en la mujer embarazada se asocian a parto pretérmino. La vaginosis bacteriana, presente en el 9 a 23% de los embarazos, por lo que se considera un factor pronóstico para la presentación de parto pretérmino y la ruptura prematura de membranas (RPM). Por lo anterior se ha propuesto la búsqueda de esta entidad en el segundo trimestre del embarazo y su tratamiento como medida preventiva. (20)

Sin embargo se ha observado que las mujeres en las que se detecta vaginosis bacteriana en el primer trimestre tienden a tener peor pronóstico que aquellas en las que se detecta por primera vez en los trimestres posteriores. Aunque todavía no se ha descrito exactamente el por qué de esta asociación, se piensa que la infección puede interferir en la vigilancia inmunológica durante la gestación (20)

Cuando se obtiene en un frotis con técnica gram y se usa la puntuación de Nugent >4 para el diagnóstico de vaginosis bacteriana en pacientes

embarazadas, se obtienen los OR para parto pretérmino (< 36.6 semanas de gestación) representados en la Tabla 6.

Tabla 6 .Riesgo para parto pretérmino en pacientes con vaginosis bacteriana

<i>Escala de Nugent</i>	<i>< 9.6 SDG</i>	<i>24 -26 SDG</i>
<i>Flora Normal (4-6)</i>	<i>OR 3.25 IC 95%(1.7 - 6.0)</i>	<i>OR 2.29 IC 95% (1.2 – 4.2)</i>
<i>Vaginosis bacteriana (7 -10)</i>	<i>OR 2.44 IC 95%(1.2 – 4.7)</i>	<i>OR 1.19 IC 95% (0.5 – 2.5)</i> <i>NS</i>

OR: Odds ratio

SDG: semanas de gestación

NS: no significativo (20)

Lo que sugiere que la presencia de vaginosis bacteriana en periodos tempranos del embarazo implica un peor pronóstico, si se tiene en cuenta como desenlace al parto pretérmino. (3)

Se debe de tener en cuenta también que no todas las mujeres con diagnostico de VB tienen una infección del tracto genital superior y que por lo tanto no todas tienen un parto pretérmino, de hecho, la proporción de estas mujeres que presentan este desenlace es de 30% aproximadamente.(2-17)

ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE DESNATURALIZACION

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), es una técnica de trazado molecular que consiste en la separación de las cadenas de ADN dependiendo de su punto de desnaturalización. Fue reportada inicialmente por S.G. Fischer y L. Lerman en 1983. (21)

La técnica se fundamenta en el hecho que un fragmento de ADN de doble cadena puede ser desnaturalizado por medios físicos o químicos (urea y formamida). El punto de desnaturalización del fragmento de ADN aumentará con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, esta suele ser más rápida cuando la secuencia contiene grandes cantidades de Guanina (G) y Citosina (C). En el momento en que esta desnaturalización ocurre, si la cadena estaba migrando en una electroforesis en gel de poliacrilamida, esta se enlentece o se detiene. De esta forma es posible diferenciar dos cadenas de ADN con el mismo tamaño, pero con diferentes secuencias. (21)

Al aplicar esta técnica el fragmento de DNA que contiene el gen ribosomal bacteriano de la subunidad 16S, podemos definir los diferentes grupos taxonómicos bacterianos y así diferenciar a las diferentes poblaciones en una muestra determinada, también llamadas "huellas". Muchas de las bacterias detectadas de esta forma, no son cultivables. (22)

JUSTIFICACION

Los síntomas vaginales son una de las causas más frecuentes de consultas ginecológicas. Estas pueden tener importantes consecuencias en términos de dolor, malestar, función sexual, auto imagen y se asocian a otras infecciones de transmisión sexual a si como efectos reproductivos adversos tanto en las pacientes embarazadas como las no embarazadas. (1)

En el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes se encontró que la infección por *Gardnerella vaginalis* estuvo presente en el 34.1% de las adolescentes embarazadas, en el 30.4% de las pacientes adultos embarazadas y en el 25.5% de las pacientes adultos no embarazadas. La técnica por cultivo que se utiliza para la identificación de *Gardnerella vaginalis* tiene el inconveniente de presentar hasta un 60% de falsos positivos, por lo que es necesario reevaluar este método de diagnóstico microbiológico en su aplicación para vaginosis bacteriana, ya que esta alta tasa de falsos positivos conlleva a un sobre diagnostico y sobre tratamiento de las pacientes.

Se sabe que las infecciones vaginales están relacionadas con la aparición de parto pretérmino que representa uno de los principales problemas en la obstetricia hoy en día. El parto pretérmino se presentó en el 5.4 % de los embarazos atendidos en el instituto durante el periodo 2006. Cerca del 10% de todos los embarazos son pretérminos, de estos el 20% son resultado de una decisión médica de interrumpir un embarazo por causa materna o fetal, el 80% restante resulta como un acontecimiento espontáneo producido por múltiples causas.(17) En el caso específico de las infecciones vaginales, se estima que esta representa el 20 a 25 % de su etiología.(17) La prematures es responsable del 70% de la mortalidad peri natal y casi la mitad de la morbilidad neurológica a largo plazo. La morbilidad asociada a prematures es responsable 50 al 75% del total de la morbilidad de los recién nacidos. (23)

De lo anterior se desprende la importancia de buscar nuevos métodos capaces de describir de una manera más precisa la microflora vaginal en la paciente embarazada y así prevenir las complicaciones médicas, económicas y sociales que tienen las enfermedades cervicovaginales en el embarazo.

CAPITULO 2 MATERIAL Y METODOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer la capacidad del método de biología molecular (PCR-DGGE) para la detección de *Gardnerella vaginalis* en la secreción vaginal de las mujeres embarazadas atendidas en el INPerIER y compararlo con la técnica usada actualmente para su identificación: el cultivo cervico vaginal.

Objetivos específicos:

- Desarrollar y validar el método de PCR-DGGE para la identificación de *Gardnerella vaginalis* a partir del exudado vaginal.
- Comparar la capacidad para la detección de *Gardnerella vaginalis* por los métodos de PCR-DGGE y del cultivo vaginal.
- Identificar otros microorganismos que están ó no involucrados en la vaginosis bacteriana por medio de la técnica por PCR-DGGE.
- Describir la presencia de microorganismos no cultivables aun no identificados en las pacientes con vaginosis bacteriana.

HIPÓTESIS

La detección de *Gardnerella vaginalis* por la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es más sensible y específica que los medios de cultivos con los que se realiza la identificación microbiológica actualmente en el INPerIER en las mujeres embarazadas que llevan su control prenatal en el servicio de consulta externa.

HIPOTESIS NULA

La detección de *Gardnerella vaginalis* por la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) no es más sensible ni específica que los medios de cultivos con los que se realiza la identificación microbiológica actualmente en el INPerIER en las mujeres embarazadas que llevan su control prenatal en el servicio de consulta externa.

TOMA DE LAS MUESTRAS

Población en estudio

Durante su primera consulta en el servicio de consulta externa de obstetricia se informó a las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del protocolo de estudio actual, y se solicitó su participación. En caso de aceptar participar en él y posterior a la firma de la carta de consentimiento informado, fueron enviadas a la consulta de primera vez del servicio de infectología 15 días después. En esta consulta se tomaron las muestras correspondientes para la realización de frotis, tinción de gram, cultivo vaginal y técnica de DGGE. Al terminar la toma de la muestra se realizó la exploración ginecológica restante. Todas las tomas de muestra y exploración vaginal en busca de datos de infección vaginal fueron realizadas o supervisadas por la misma persona.

Obtención de material biológico

Se colocó a la paciente en posición de litotomía en el consultorio. Posteriormente se colocó un espejo vaginal lubricado con solución fisiológica estéril y mediante la introducción de cinco hisopos estériles se tomaron muestras de la secreción vaginal del fondo de saco posterior. Estos fueron utilizados para las diferentes técnicas de identificación microbiológica utilizadas en el INperIER y para la nueva técnica de DGGE.

El primero se colocó en un tubo (16x15mm) que contenía 2 ml de solución salina (0.85%) y sirvió para la identificación de Tricomonas, levaduras, células guía y cuenta de leucocitos.

El segundo hisopo sirvió para la identificación en frote de morfotipos mediante la tinción de Gram. Después de fijar la muestra en el portaobjetos, se exponen a cristal violeta y después se agrega yodo para la formación de complejo con el pigmento principal y se observa bajo el microscopio con un aumento de 10x.

Identificación del microorganismo por cultivo bacteriológico

El tercer hisopo se depositó en medio HBT (Human – Blood- Tween) base de agar columbia (DIBICO), adicionado con sangre humana al 5% colicistina y ácido nalidixico para el crecimiento de *Gardnerella vaginalis*. Para el crecimiento de *Streptococos del grupo B* y *Listeria monocytogenes* se utilizo el medio HBT adicionado con sangre de carnero. Las muestras fueron incubadas a 37C y se reviso su crecimiento a las 48 y 72 hrs. La determinación preliminar de estreptococos del grupo B fue mediante la prueba de CAMP (Christie,Atkins, Mundi-Petersen).

El cuarto hisopo fue para el crecimiento e identificación de *Mycoplasma hominis*. Para ésto se utilizó un caldo que contiene arginina, en el cuál se busca la formación de colonias en forma de “huevo estrellado”. Las muestras se incuban a 37c y se revisa su desarrollo a las 16 a 24 hrs. Posteriormente, se pica una colonia y se estira en placas con agar E incubándose en una jarra en condición atmosférica parcial a CO2 y se revisa su crecimiento en 72 hrs. Para el crecimiento de *Ureaplasma urealiticum* se utilizó un caldo que contenía urea y se incubó a 37C, se observó en busca de crecimiento a las 72 hrs.

El quinto hisopo se depositó en el medio de transporte modificado Stuart (DIBICO). Las muestras se sembraron en cajas de cultivo que contenían agar de papa dextrosa y agar de Mac Conkey buscando el crecimiento de *Candidas* y *Echerichia coli*. Se incubaron a 37C y fueron revisadas a las 16 y 24 hrs. en busca de crecimiento de dichos microorganismos.

Después de la identificación morfológica de cada una de las bacterias, se prosiguió a la realización de las pruebas bioquímicas, las cuales consistieron en la fermentación de carbohidratos, prueba de la catalasa y la oxidasa.

Para la identificación de *Candidas*, éstas se sembraron en suero humano y se incubaron a 37C, en el caso de que se observara crecimiento de hifas (tubo germinativo) se catalogaban como *Candida albicans* , en caso de no observarse , se definían como *Cándida spp.*

Identificación de los microorganismos por medio de la PCR- DGGE. Obtención y extracción de DNA.

Cada muestra de los exudados cérvico vaginales se depositó en tubos independientes de polipropileno (Falcon, Becton-Dickinson) que contenían 1 mL del reactivo de DNAzol (Invitrogene). La extracción del DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las muestras se agitaron vigorosamente por 1 minuto, se les adicionaron 500 µl de etanol absoluto mezclándose por inmersión (tres veces) y se dejan en hielo por 1 minuto. Se observó la precipitación del DNA y el sobrenadante se decantó cuidando de no

tirar el DNA. A continuación se eliminaron las impurezas de sales mediante la adición de 500 μ l de etanol a diferentes concentraciones (90, 75 y 60%), en cada caso, las muestras se agitaron suavemente por inmersión y se centrifugaron a 12,000 rpm durante tres minutos. Se decantó el etanol y se seco la muestra. Finalmente, las muestras de DNA se resuspendieron en 50 μ l de hidróxido de sodio (8mM).

Para comprobar la eficiencia de la extracción del DNA se tomaron 5.0 μ l de cada muestra y se analizaron en gel de agarosa al 1% en las siguientes condiciones. Cada muestra de DNA, se mezcló con 2.0 μ l de amortiguador de corrimiento 2x (azul de bromo fenol 2%, xilen cianol 2%, glicerol 100% y 2.5 ml agua milli-Q) y para el corrimiento electroforético se utilizó un amortiguador TBE 1x (Tris 0.89M, Borato 0.89M y EDTA 0.020M) a 60 Volts (Pac 3000, Bio-Rad) por 30 min. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 μ g/ml) por 10 min. Se observaron las bandas de DNA, en un tras iluminador de luz ultravioleta. La imagen se digitalizó y se imprimió para su registro.

Amplificación del DNA mediante técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se usó la región variable 3 del gene 16S rDNA bacteriano que comprende de la posición de los nucleótidos 341 al 534, usando a los iniciadores (forward 3'→5') GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG y (Reverse 3'→5') ATT ACC GCG GCT GCT GG La mezcla de PCR se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 0.2 ml en un termociclador (Techne, modelo FTGrad 20). Cada tubo de PCR contenía amortiguador 1x (Invitrogen), $MgCl_2$ (2 mM), dNTP's (0.8 mM), iniciadores (40 pmol), 5U de Taq polimerasa (InvitroGene) y agua de Milli-Q (Millipore) toda la reacción con un volumen de 25.0 μ l. Las condiciones de amplificación fueron de 92°C por 5 minutos a seguida de 35 ciclos (desnaturalización 92°C por 45 segundos; alineamiento 55°C 30 por segundos; amplificación 72°C por 45 segundos) y una extensión final de 72°C por 7 min.

Al finalizar la reacción se tomaron 5.0 μ l de las muestra del DNA amplificado para su visualización en geles de agarosa al 1% en las condiciones antes descritas. En todos los casos se observó un tamaño de 233 pares de bases, que es el que corresponde con el reportado para esta región. El resto de la amplificación (20.0 μ l) se utilizó para la electroforesis en gradiente de desnaturalización (DGGE).

Identificación de microorganismos mediante la técnica electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

La preparación del gradiente de desnaturalización así como la electroforesis se hicieron de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial para el sistema de detección universal D-Code (BioRad) partiendo de una mezcla al 100% de solución (7 M urea y 40% formamida). La concentración de poliacrilamida fue del 8%, y el gradiente de desnaturalización fue de 20 a 70%. Para la polimerización del gel se añadieron 13 μ l de N, N, N', N'-tetramethylethylenediamina (TEMED, Sigma) y 50 μ l de persulfato de amonio al 10% (Bio-Rad).

El DNA amplificado (20 μ l) se mezcló con 6 μ l de amortiguador de corrimiento 2x (0.25 mL azul de bromo fenol [2%], 0.25 mL xilen cianol [2%], 7.0 mL glicerol y 2.5 mL de agua destilada). Los geles se corrieron a 60 V en el amortiguador TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) a una temperatura constante (60°C) por 16 h. Después del corrimiento electroforetico los geles se tiñeron con el reactivo de Vistra Green (Amersham Biosciences) a una dilución 1:1000 en regulador de TAE (1x) por 60 min. Las bandas se visualizaron en transiluminador de luz ultra violeta. Las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador Epichemi Darkroom (UVP). .

Determinación de pH

Para la toma de pH vaginal se usó un cotonete aplicándolo a la pared vaginal lateral a una distancia media entre el introito y el cervix y posteriormente se puso en contacto con la tira reactiva que indico el pH de la secreción así recolectada.

TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, transversal, analítico y retrospectivo

CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO

- En relación al método de observación: transversal
- En relación al tipo de análisis : descriptivo
- En relación a la temporalidad: retrospectivo.

UNIVERSO, LUGAR Y DURACIÓN

Se tomaron muestras de secreción vaginal de 200 pacientes en la consulta externa del servicio de obstetricia del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes entre marzo 2004 y marzo 2007 que cumplían con los criterios de inclusión del estudio y que aceptaron participar en él. De éstas, se procesaron hasta este corte, las muestras de 38 pacientes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

Criterios de inclusión

- Pacientes embarazadas con rangos de edad entre los 12 y los 45 años que llevaran su control prenatal en el INPerIER.
- Pacientes con edades gestacionales de 14-35 semanas de gestación.
- Pacientes con embarazo único
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento antibiótico 15 días previos a su consulta de primera vez en el servicio de Infectología.
- Pacientes que no utilicen desodorantes vaginales.
- Pacientes que acepten estar en el protocolo

Criterios de exclusión

- Pacientes con edades menores de 12 años o mayores 45 años.
- Pacientes con edades gestacionales menores de 16 semanas de gestación a o mayores de 35 semanas de gestación.
- Pacientes con embarazo múltiple
- Pacientes que utilicen desodorantes vaginales.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico 15 días previos a su primera consulta con el servicio de Infectología.
- Pacientes que no acepten participar en el protocolo de investigación.

Criterios de eliminación

- Pacientes en los no se haya podido tomar o procesar la muestra de exudado vaginal.

VARIABLES EN ESTUDIO

Variables independientes:

- Cultivo vaginal
- Técnica electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) aplicado a la secreción vaginal.

Variables dependientes:

- Detección de *Gardnerella vaginalis*

Ambos tipos de variables pertenecen al grupo de variables cualitativas nominales y dicotómicas.

DEFINICIONES OPERATIVAS

- *Gardnerella Vaginalis*: bacteria en forma de bacilo gram variable, anaerobia facultativa, no encapsulada, no móvil y pleomórfica .(6)
- *Vaginosis bacteriana*: La vaginosis bacteriana es la causa más común de vaginosis aguda representando de un 15 a 50% de los casos. **¡Error! Marcador no definido.** Se caracteriza por ser un síndrome polimicrobial en el que las poblaciones de *Lactobacillus vaginales*, usualmente dominantes en la vagina de las mujeres sanas, son reemplazados por una mezcla de organismos entre los que encontramos a *Gardnerella Vaginalis*; *Prevotella* (bacteroides), cocos anaeróbicos gram positivos como las especies de *Peptostreptococos*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* y a veces especies de *Mobiluncus curtissi*. (3)
- *Cultivo cervico vaginal* : método diagnóstico que consiste en colocar una muestra de secreción vaginal en un medio nutritivo específico , se incuba en condiciones específicas posterior a lo cual se observa si existe crecimiento o no de un microorganismo determinado.(6)
- *La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)*: es una técnica de trazado molecular que consiste en la separación de las cadenas de ADN dependiendo de su punto de desnaturalización. (21)
- *Sensibilidad*: proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es positiva en pacientes que tienen la enfermedad o trastorno. (24)

- *Especificidad*: proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es negativa en pacientes que no tienen la enfermedad o trastorno.(24)
- *Valor predictivo positivo*: proporción de las veces que un paciente con una prueba de diagnóstico positiva sí tienen la enfermedad que se está investigando. (24)
- *Valor predictivo negativo*: proporción de las veces que un paciente con una prueba de diagnóstico negativa no tienen la enfermedad que se está investigando.(24)
- *Criterios de Amsel*: criterios, descritos por primera vez en 1983, se usan para el diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana. Para que se cumplan deben de estar presentes con por lo menos tres de los siguientes criterios:
 - ✓ *descarga vaginal homogénea y delgada*
 - ✓ *pH vaginal >4.5*
 - ✓ *olor aminas al aplicar hidróxido de potasio(KOH) al 10 %*
 - ✓ *presencia de células clave en la preparación en fresco* (8)
- *Flujo vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana*: flujo homogéneo, no viscoso, adherente, sin detritos y aumentado en volumen con respecto a las secreciones vaginales que se observan normalmente.(9)

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizo estadística descriptiva, analizando los resultados obtenidos mediante medidas de tendencia central; se calculo, con tablas de 2x2 la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.Las diferencias entre proporciones se analizaron por medio de las pruebas no paramétritas de Ji cuadrada apoyándonos en el programa informático SPSS 10.0 para Windows.

ASPECTOS ETICOS

A todas las pacientes incluidas en este estudio, se les notificó verbalmente y por escrito el propósito de esta investigación, los procedimientos que se realizarían, los riesgos del mismo y la confidencialidad de los resultados. El protocolo fue aceptado previo a su realización por el comité de bioética del INPerIER. El riesgo para la paciente se considero como mínimo.

CAPITULO 3

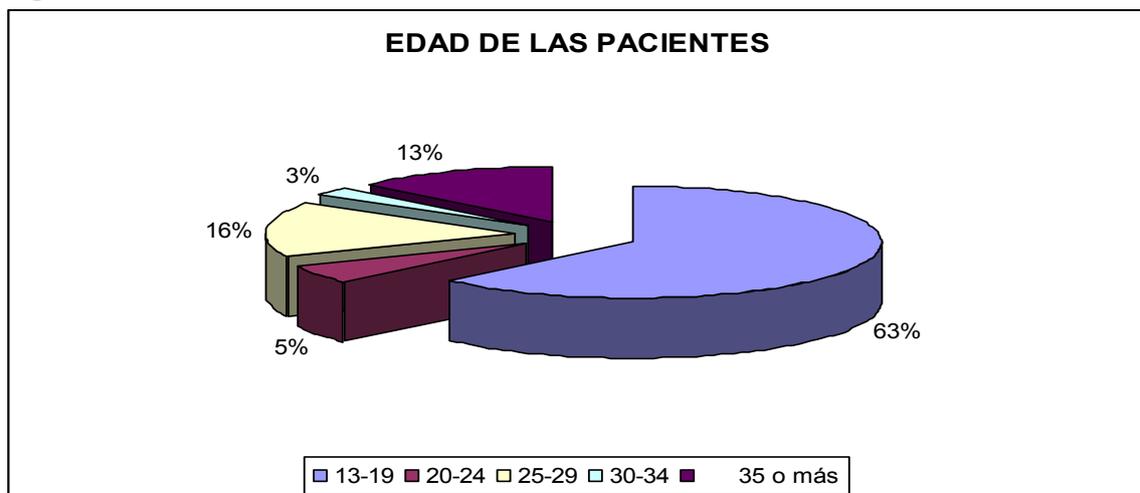
RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA

Se realizo la valoración clínica y microbiológica de 200 mujeres que fueron atendidas en la consulta obstétrica de primera vez en el INperIER entre marzo del 2004 y marzo del 2007. De las cuales se procesaron las muestras de 38 ellas hasta el momento de este corte.

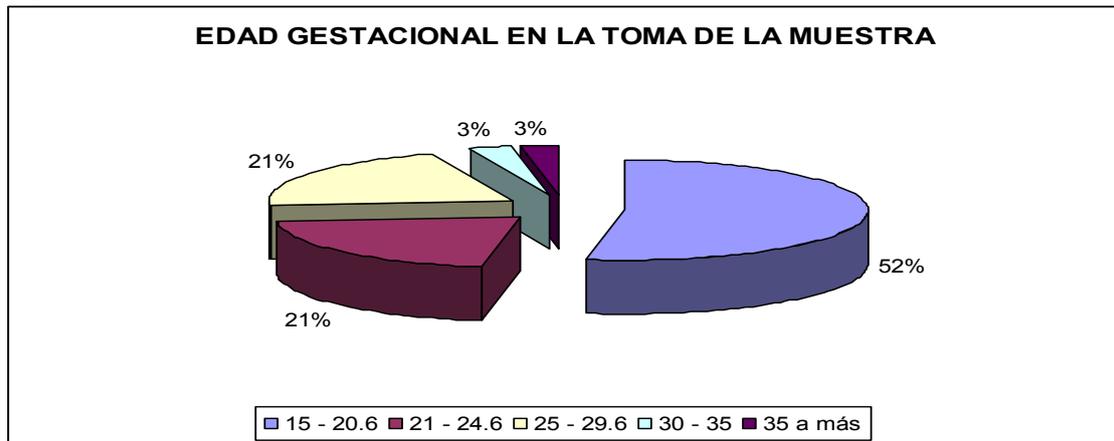
La edad promedio del grupo en estudio fue de 21.6 ± 1.32 años (13- 41 años). Se agruparon en 5 rangos que se distribuyeron de la siguiente forma: de 13 a 19 años en 24 (63.2%) , 20 a 24 años en 2 (5.3%), entre 25-29 años se encontró a 6 (15.8%) , entre los 30 y 34 años se encontró solo 1 (2.6%) y de 35 años o más , a 5 (13.2%) de las pacientes.(Figura 1)

Figura 1



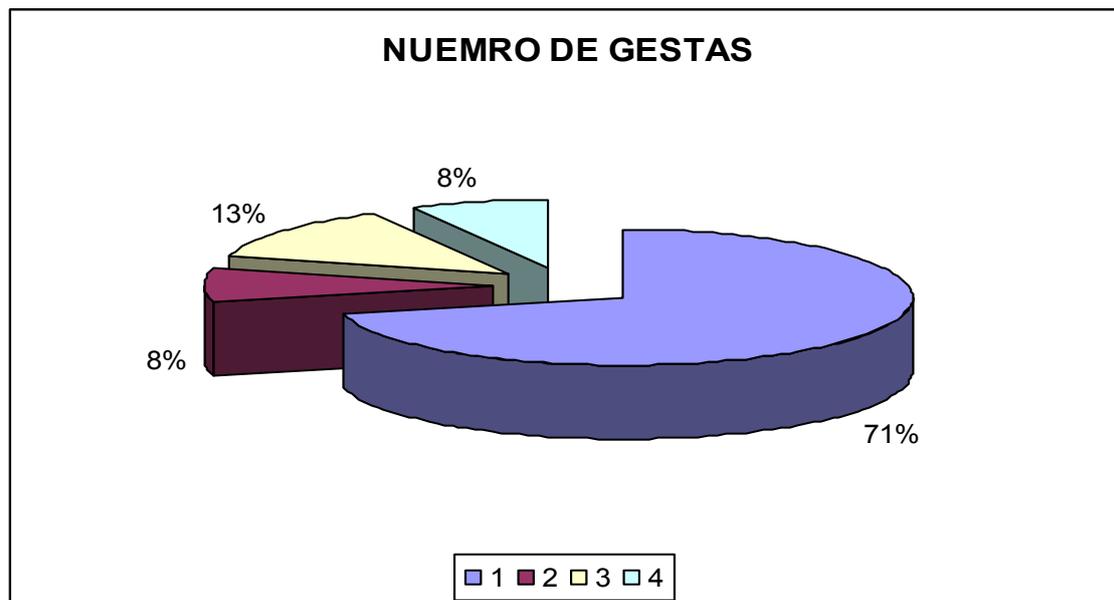
Todas las pacientes cursaron con embarazo único. La edad gestacional promedio del grupo fue de 18.6 semanas de gestación (SDG). Veinte pacientes (52%) cursaron con un embarazo entre las 15 y 20 (SDG), 8 pacientes (21.1%) tenían entre 21 y 24.6 (SDG), la misma proporción guardo el grupo de entre 25 y 29.6 (SDG), 1 (2.6%) paciente entre las 30 y 35 (SDG), igualando a la población incluida en el rango de 35 SDG o más. (Figura 2)

Figura 2



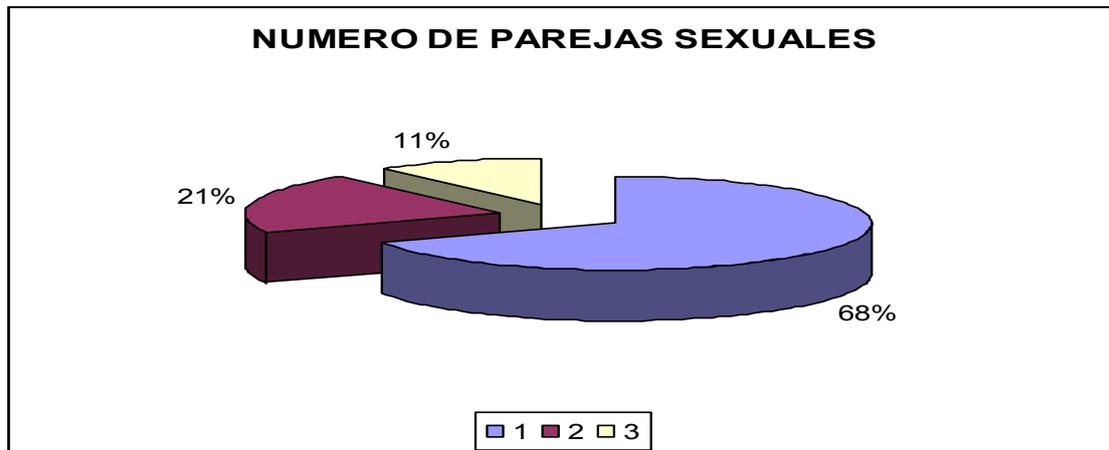
El número de gestas por paciente fue de 1.6 ± 1.8 (1-5). Veintisiete (71.1%) pacientes cursaban con su primer embarazo mientras que 3 (7.9%) eran secundigestas y 5 (13.1%) se encontraron en su tercer embarazo. Solo 3 pacientes tuvieron 4 o más embarazos. (Figura 3)

Figura 3



Hubo en promedio 1.42 ± 1.1 (1-3) parejas sexuales, 26 (68.4%) pacientes tenían solo una pareja sexual, 8 (21.1%) tenían 2 parejas sexuales y 4 (10.5%) tenían 3 o más parejas sexuales. (Figura 4)

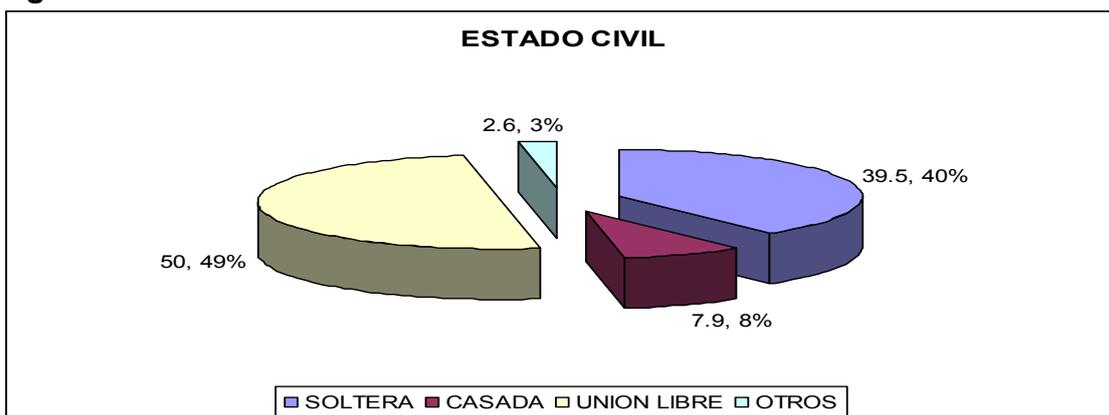
Figura 4



Las pacientes refirieron un inicio de vida sexual a los $16.8 \pm .49$ (13-23) años teniendo que a los 13 años hubo 4 (10.5%) casos , a los 14 años 5 (13.2 %), a los 15 años 7 (18.4%) , a los 16 años 5 (13.2%) , a los 17 años 4 (10.5%) , a los 18 años 1 (2.6%) , a los 19 años 4 (10.5%) , a los 20 años 3 (7.9%) , a los 21 años 1(2.6%) , a los 22 años 1(2.6%) y a los 23 años 3(7.9%) pacientes .

En lo que al estado civil se refiere, 15 (39.5%) de las pacientes refirieron ser solteras, tres (7.9%) de las pacientes fueron casadas y el 19 (50%) en unión libre. (Figura 5)

Figura 5



Se interrogó a las pacientes durante su consulta de primera vez en el servicio de infectología, acerca de sintomatología vulvovaginal. Treinta (78.9%) de ellas refirieron tener dicha sintomatología. Durante la exploración física se realizo búsqueda intencionada de flujo vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana, encontrándose en 28 (73.3%) pacientes. Al momento de la toma

de las muestras para las técnicas microbiológicas se realizó prueba de KOH al 10 % resultando positiva en 11 (28.9%) pacientes y al medir el pH vaginal, éste se encontró por arriba de 4.5 en 14 (36.8%) pacientes. (Figura 6-7-8)

Figura 6

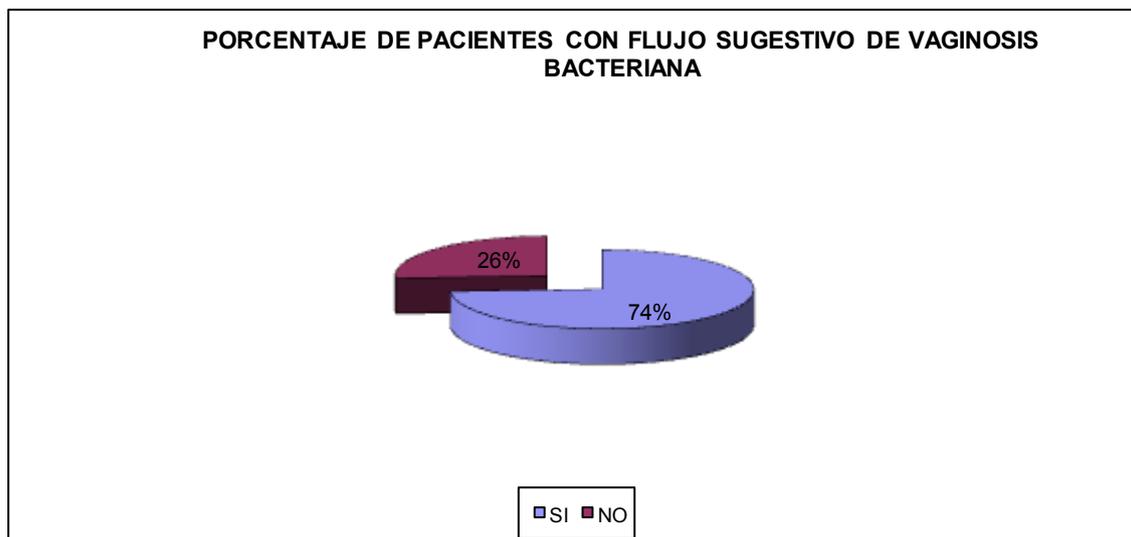


Figura 7

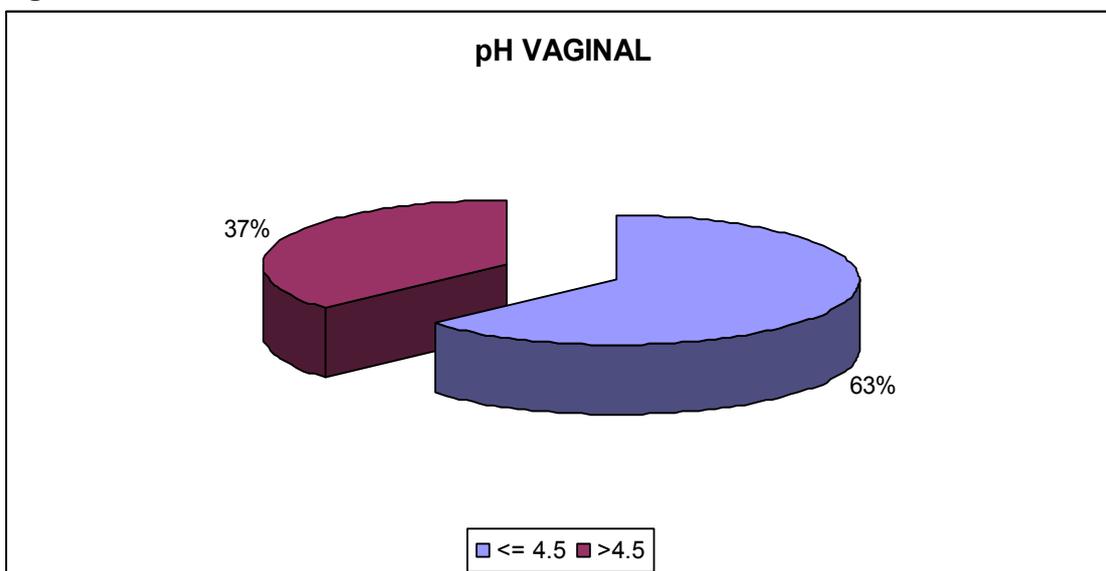
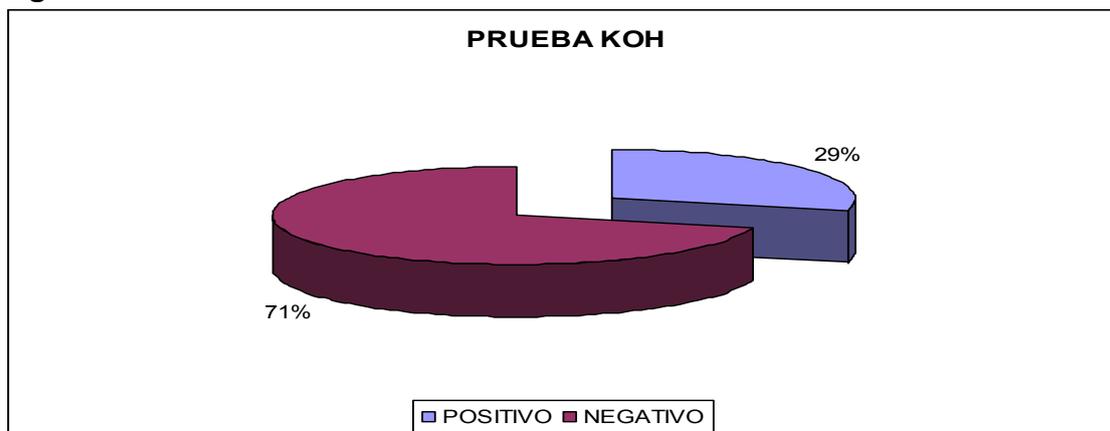


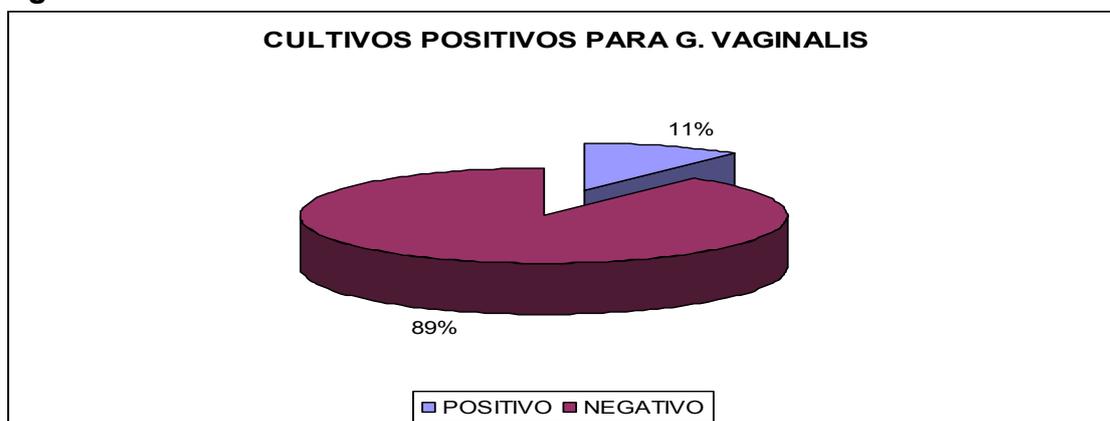
Figura 8



Para definir las pacientes con vaginosis bacteriana se aplicaron los criterios de Amsel los cuales se cumplieron en 5 (13.1%) pacientes.

Los cultivos cervico vaginales resultaron positivos para los siguientes microorganismos: *Gardnerella vaginalis* en 4 (10.5) pacientes, para *Echerichia coli* en 1 (2.6%) y para *Micoplasma hominis* en otra (2.6%) de los cultivos. (Figura 9)

Figura 9



Ninguna de las pacientes presentó parto pretérmino o RPM antes de las 37 SDG, solo 3 embarazos, presentaron ruptura espontánea de membranas posterior a las 37 SDG. Una paciente presentó un aborto a la semana 20 de gestación. La edad promedio en la que se interrumpió el embarazo fue a las $38.5 \pm .53$ (20-40.5) (Tabla 7)

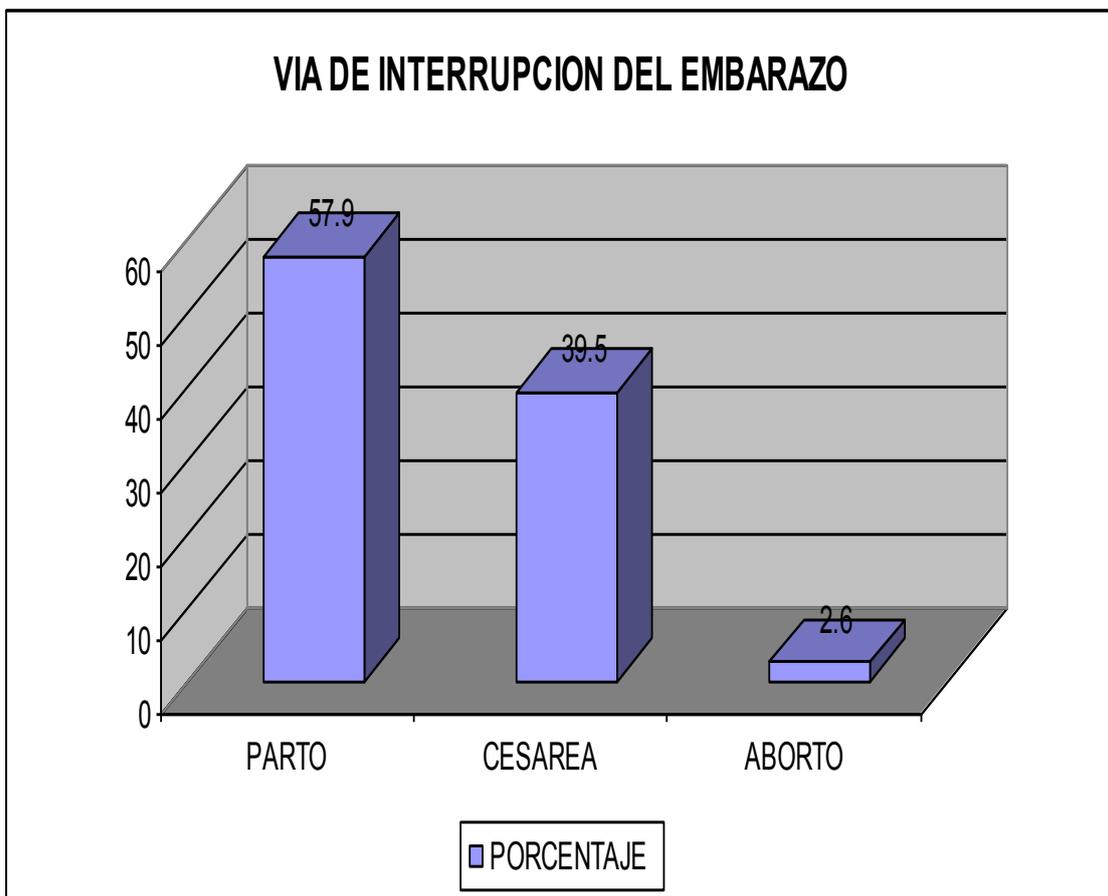
Tabla 7.

Rango de edad gestacional al momento de interrumpir el embarazo		
Edad gestacional	Frecuencia	Porcentaje
20-36.6 SDG	1	2.6
37 SDG o más	37	97.4
Total	38	100.0

SDG: semanas de gestación

La vía de resolución fue la vaginal en 22 (57.9%) de los casos, cesárea en 15 (39.5%) de los casos y un embarazo se resolvió por inducción de trabajo de aborto. (Figura 10)

Figura 10



DETERMINACION DE LOS VALORES DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE GARDNERELLA VAGINALIS Y OTROS 5 MICROORGANISMOS SELECCIONADOS MEDIANTE LA TECNICA DGGE.

Debido a que esta técnica no se había implementado anteriormente en el instituto, se realizó previo al procesamiento de las muestras del protocolo, una estandarización del método mediante el análisis de una muestra control que incluía secuencias nucleotídicas de las 6 cepas de microorganismos que se identificaron por este procedimiento: *Urea plasma urealyticum*, *Estreptococo del grupo B*, *Peptostreptococcus asaccharolyticum*, *Prevotella melaninogenicus*, *Lactobacillus casei*, *Gardnerella vaginalis*. (Figura 1) Se realizaron 16 experimentos independientes para calcular el índice de migración de cada uno de los microorganismos, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación. (Tabla 8).

Figura 1. Productos de amplificación mediante técnica PCR y de movilidad electroforética de las cepas de referencia mediante la técnica DGGE.

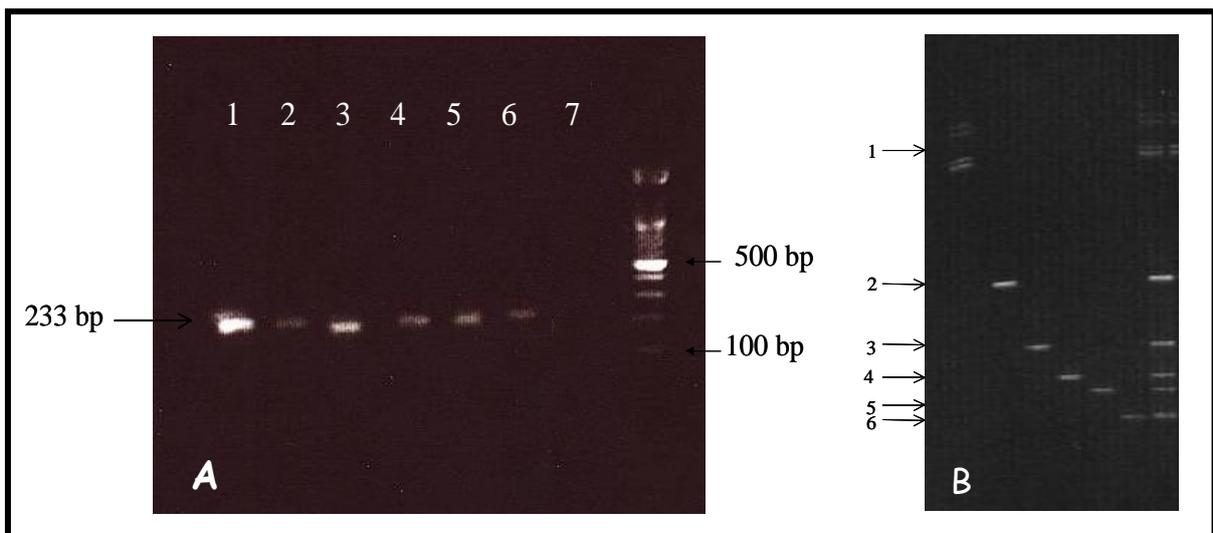


Fig.1A Técnica de amplificación por PCR A.- Carril 1) *Ureaplasma urealyticum*; carril 2) *Estreptococo del grupo B (EGB)*; carril 3) *Peptoestreptococcus asaccharolyticum*; carril 4) *Prevotella melaninogenicus*, carril 5) *Lactobacillus casei*; carril 6) *Gardnerella vaginalis*; carril 7) control negativo; carril 8) marcador de 100 pares de bases.

Fig 2A B.- Migración diferencial de las cepas de interés mediante la técnica DGGE 1.- *Ureaplasma u.* 2.- EGB. 3.- *Peptostreptococcus a.* 4.- *Prevotella m.* 5.- *Lactobacillus c.* 6.- *Gardnerella v.* Carril extremo derecho muestra la separación electroforética la mezcla de los microorganismos antes descritos.

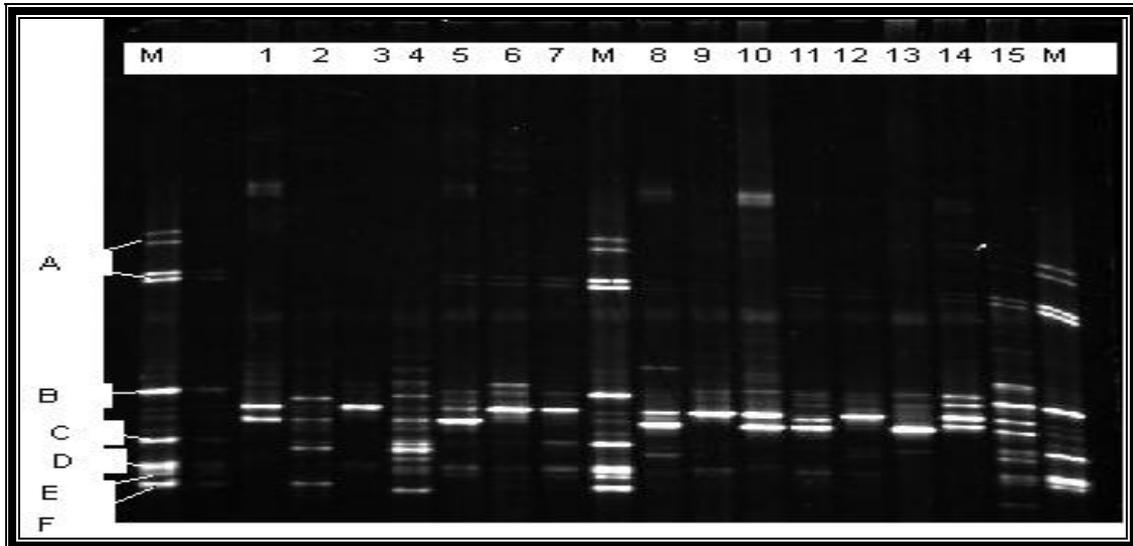
Tabla 8. Valores de movilidad electroforética obtenidos mediante DGGE

Microorganismo	Ind. Ref. Med \pm DE	CV %	GC %
1. <i>U. urealyticum</i>	0.270 \pm 0.0375 0.334 \pm 0.0351	13.88 9.28	40.85
2. <i>Streptococcus B</i>	0.5630 \pm 0.0535	9.50	52.0
3. <i>P. asaccharolyticum</i>	0.6830 \pm 0.0565	8.27	51.0
4. <i>P. melaninogenicus</i>	0.7370 \pm 0.0533	7.23	54.0
5. <i>L. casei</i>	0.756 \pm 0.0578	7.64	52.0
6. <i>G. vaginalis</i>	0.8060 \pm 0.0612	7.59	58.03

Departamento de biología celular INPerIER

Una vez estandarizando estos índices se procedió a colocar las muestras de nucleótidos de la región 16s ribosomal de cada una de las 38 pacientes en el gel de agarosa para realizar la migración electroforética comparándolas con el control. En la figura (II) se muestra una imagen representativa de este procedimiento encontrando en el carril "M" la muestra control y en los demás carriles, las muestras de las pacientes amplificadas por PCR. De esta forma se comparan los índices de migración pudiéndose identificar aquellos microorganismos de los que conocemos dicho índice. En caso de no conocerse, se debe de extraer el material genético en cuestión del gel, amplificarlo por técnica de PCR, secuenciarlo y comparar dicha secuencia con las que se encuentran en las diferentes bibliotecas genéticas

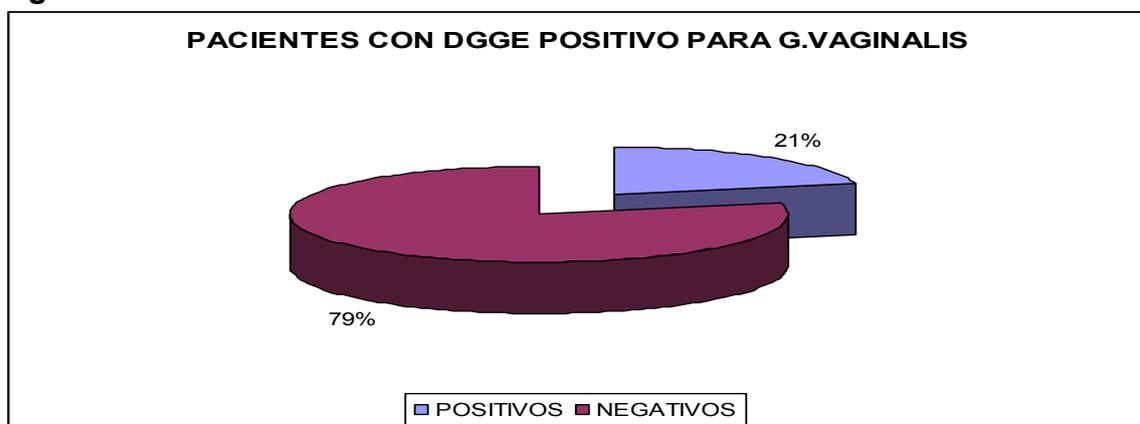
Figura II. Representación de muestras analizadas por DGGE



Marcador de migración electroforética de cepas de referencia (Carril M) (A) *Ureaplasma urealyticum*; B) Estreptococo del grupo B; C) *Peptoestreptococcus asaccharolyticum*; D) *Prevotella melaninogenicus*; E) *Lactobacilius casei*; F) *Gardnerella vaginalis*. Carriles 1 al 15: muestras de exudado vaginal posterior a su amplificación por PCR y procesadas por la técnica de DGGE.

Por medio de la técnica de DGGE, se detecto *Gardnerella vaginalis* en 8 (21.1%) pacientes (Figura 13), *estreptococo B hemolítico* en 15 (39.5%), *E. coli* en 3(7.9%), *Micoplasma hominis* en 7 (18.4%), *peptoetreptococo* en 8 (21.1 %), para *prevotella* en 11 (28.9%) y para *ureaplasma uraliticum* en la misma cantidad de casos.

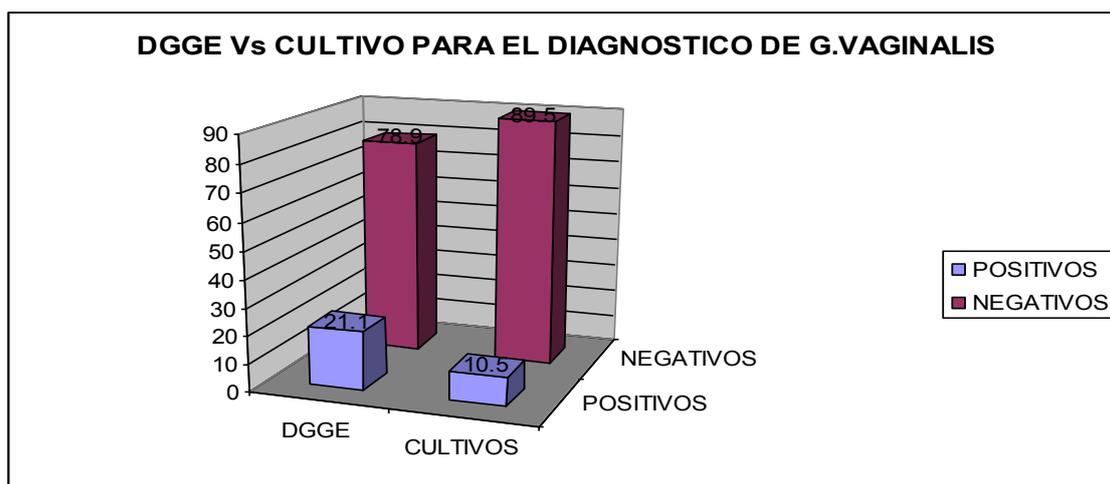
Figura 13



DETECCION DE GARDNERELLA VAGINALIS POR AMBAS TECNICAS.

Se detectó *Gardnerella vaginalis* por la técnica de cultivo cervico vaginal en 4 (10.5%) pacientes, mientras que por la técnica de PCR-DGGE en 8 (21,1%) pacientes. (Figura 14)

Figura 14



Los resultados obtenidos por ambos métodos microbiológicos para la detección de *Gardnerella vaginalis* arrojaron los siguientes resultados:

Tabla 9. Capacidad del cultivo vaginal para detección de *Gardnerella vaginalis* en pacientes obstétricas

Parámetros	Valor
Sensibilidad	10.5%
Especificidad	78.9%
Valor predictivo negativo	33.3%
Valor predictivo positivo	46.8%

Con una valor de Ji cuadrada de 2.4 con una $p \geq 0.115$ (no significativa)

Tabla 10. Capacidad de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para la detección de *Gardnerella vaginalis* en pacientes obstétricas.

Parámetros	Valor
Sensibilidad	21.0%
Especificidad	89.4%
Valor predictivo negativo	66.6%
Valor predictivo positivo	53.1%

Con una Ji cuadrada de 0.89 y una $p \geq 0.34$ (no significativa)

Las variables evaluadas en este estudio se sometieron a la prueba de asociación de Ji cuadrada encontrándose las siguientes asociaciones con el cultivo vaginal positivo para *Gardnerella vaginalis*:

Tabla 11. Cultivo vaginal asociado a variables poblacionales y de la muestra.

Variable	Valor de p	Variable	Valor de p
Edad	$p \geq 0.625$	pH vaginal > de 4.5	$p \geq 0.110$
Número de parejas sexuales	$p \geq 0.395$	Prueba KOH positiva	$p \geq 0.326$
Edad de inicio de vida sexual	$p \geq 0.923$	Para la presencia de criterios de Amsel modificados	$p \geq 0.564$
Edad gestacional al momento de la toma.	$p \leq 0.048$	Asociación con otros microorganismos detectados en los cultivos	$p \leq 0.007$
Flujo vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana	$p \geq 0.206$	Vía de resolución del embarazo	$p \leq 0.002$

Las variables asociadas a cultivo vaginal positivo para *Gardnerella vaginalis* que presentaron una p significativa ($p \leq 0.05$) fueron la edad gestacional al momento de la muestra vaginal ($p \leq 0.048$), la vía de resolución del embarazo ($p \leq 0.002$) y la presencia de los otros microorganismos encontrados en los cultivos vaginales ($p \leq 0.007$).

Cuando se sometieron las mismas variables a la prueba de asociación de Ji cuadrada en búsqueda de asociaciones entre éstas y la positividad de la prueba para DGGE se obtuvo:

Tabla 12. DGGE asociado a variables poblacionales y de la muestra.

Variable	Valor de p	Variable	Valor de p
Edad	$P \geq 0.392$	pH vaginal > de 4.5	$p \geq 0.305$
Número de parejas sexuales	$P \geq 0.376$	Prueba KOH positiva	$p \geq 0.548$
Edad de inicio de vida sexual	$P \geq 0.272$	Para la presencia de criterios de Amsel modificados	$p \geq 0.435$
Edad gestacional al momento de la toma.	$P \geq 0.172$	Asociación con otros microorganismos detectados en los cultivos	$P \geq 0.141$
Flujo vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana	$P \geq 0.318$	Vía de resolución del embarazo	$p \geq 0.308$

DETECCION DE OTROS MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON VAGINOSIS BACTERIANA

Aunque no era la finalidad primaria de este proyecto de tesis, se realizo la detección de otros microorganismos asociados a vaginosis bacteriana y a otras infecciones vaginales. Dichos microorganismos fueron: *estreptococo del grupo B*, *Echerichia coli*, *Micoplasma Hominis*, *Peptoestreptococo asacharaliticum*, *Prevotella melaninogenica* y *ureaplasma urealiticum*. Como en el caso de *Gardnerella vaginalis* se compararon ambos métodos de detección.

En el caso de los cultivos cervico vaginales solo se aislaron 2 microorganismos diferentes a *Gardnerella vaginalis* en 2 pacientes diferentes. (Tabla 13)

Tabla 13. Cultivos cervico vaginales con microorganismos diferentes a *Gardnerella vaginalis*

Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje
<i>Echerichia coli</i>	1	2.6
<i>Micoplasma Hominis</i>	1	2.6

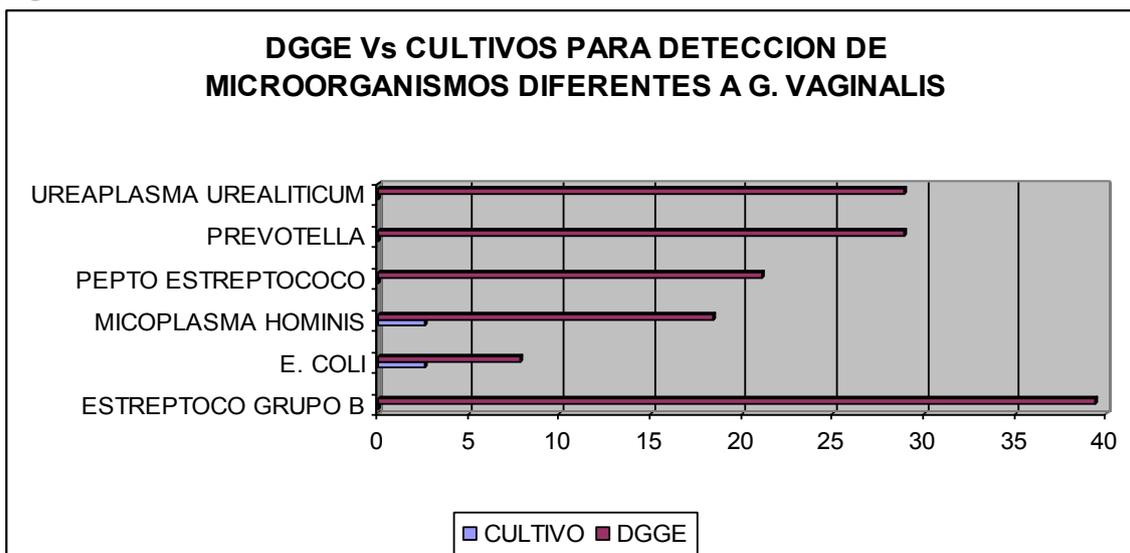
Cuando se hace la comparación con los resultados encontrados por el método de DGGE, volvemos a encontrar una mayor variedad de bacterias que las que nos reporta el cultivo cervico vaginal, y en una mayor cantidad de pacientes. (Tabla 14) y (Figura 15)

Tabla 14. DGGE con microorganismos diferentes a *Gardnerella vaginalis*

Microorganismo	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Estreptoco grupo b</i>	15	39.4
<i>Echerichia coli</i>	3	7.8
<i>Micoplasma hominis</i>	7	18.4
<i>Peptoestreptococo</i>	8	21.05
<i>Prevotella</i>	11	28.9
<i>Ureaplasma urealiticum</i>	11	28.9

DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

Figura 15



DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

Al calcular la capacidad de la prueba para la detección molecular de cada microorganismo y compararla con el método microbiológico actualmente utilizado tenemos que:

Tabla 15. Capacidad de ambas técnicas para la detección de otros microorganismos diferentes a *Gardnerella vaginalis*

<i>Streptococo grupo B</i>	S	E	VPP	VPN
Cultivo	2.6	60.5	6.25	38.3
DGGE	39.4	97.3	93.7	61.6

<i>E. coli</i>	S	E	VPP	VPN
Cultivo	2.6	92.1	25	48.6
DGGE	7.8	97.3	75	51.3

<i>Mycoplasma Hominis</i>	S %	E %	VPP %	VPN %
Cultivo	2.6	81.5	12.5	45.5
DGGE	18.4	97.3	87.5	54.4

<i>Peptoestreptococo asacharaliticum</i>	S	E	VPP	VPN
Cultivo	2.6	78.9	11.1	44.7
DGGE	21.05	97.3	88.8	55.2

<i>Prevotella melaninogenica</i>	S	E	VPP	VPN
Cultivo	2.6	71.05	8.3	42.1
DGGE	28.9	97.3	91.6	57.8

<i>Urea plasma urealiticum</i>	S	E	VPP	VPN
Cultivo	2.6	71.05	8.3	42.1
DGGE	28.94	97.3	91.6	57.8

S: sensibilidad

E: especificidad

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

DETECCION DE OTROS MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES

Hasta el momento, se han encontrado y pareado las secuencias ribonucleicas de 13 bandas que no están dentro de los índices de migración de los 6 microorganismos buscados en el estudio y que además, han sido reconocidas por otros autores como bacterias no cultivables, o que no se encuentran regularmente en el tracto vaginal. Tabla 16

Tabla 16 .Microorganismos no cultivables encontrados.

Microorganismo	Autores	Vinculo para localización de la secuencia	Publicación
Bacteria No cultivable	Wertz,J.T. Isaacs Cosgrove,N. Holzman,C. Marsh,T.L.	EF366658	The microbial community of the vaginal tract is dynamic under conditions of apparent stress No publicado
<i>Megasphaera sp.</i> No cultivable	Zhou,X. Bent,S.J. Schneider,M.G. Davis,C.C. Islam,M.R. Forney,L.J.	AY271948	Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods Microbiology 150 (Pt 8), 2565-2573 (2004)

<i>Prevotella sp.</i> No cultivable	Fredricks,D.N. Fiedler,T.L. Marrazzo,J.M.	AY738677	Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis N. Engl. J. Med. 353, 1899-1911 (2005)
<i>Leptotrichia amnionii</i>	Thilesen,C.M. Nicolaidis,M. Lokebo,J.E. Falsen,E. Jorde,A.T. Muller,F.	EF218612	<i>Leptotrichia amnionii</i> , an Emerging Pathogen of the Female Urogenital Tract J. Clin. Microbiol. 45 (7), 2344-2347 (2007)
Bacteria No cultivable	Wertz,J.T. IsaacsCosgrove,N. Holzman,C. Marsh,T.L.	DQ855283	The microbial community of the vaginal tract is dynamic under conditions of apparent stress No publicado
<i>Acidaminococcus intestinalis</i>	Jumas-Bilak,E. Carlier,J.-P. Jean-Pierre,H. Mory,F. Teyssier,C. Gay,B. Campos,J. Marchandin,H.	EF366668	<i>Acidaminococcus intestinalis sp. nov.</i> isolated from human clinical samples No publicado
<i>Megasphaera sp.</i>	Fredricks,D.N. Fiedler,T.L. Marrazzo,J.M.	EF028684	Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacteria Vaginosis N. Engl. J. Med. 353, 1899-1911 (2005)
Bacteria No cultivable	Wertz,J.T. Isaacs-Cosgrove,N. Holzman,C. Marsh,T.L.	AY738672	The microbial community of the vaginal tract is dynamic under conditions of apparent stress No publicado
<i>Aeromicrobium fastidiosum</i>	Yoon,J.H Lee,S.T Park,Y.H.	EF365637	Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus Nocardioides and related taxa based on 16S rDNA sequences Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 1, 187-194 (1998)
Bacteria no cultivable	Wertz,J.T. Isaacs-Cosgrove,N. Holzman,C Marsh,T.L.	AF005022	The microbial community of the vaginal tract is dynamic under conditions of apparent stress No publicada

Bacteria no cultivable	Wertz,J.T. Isaacs-CosgroveN. Holzman,C. Marsh,T.L.	EF366664	The microbial community of the vaginal tract is dynamic under conditions of apparent stress No publicada
<i>Selenomonas genomosp</i>	Lillo,A. Ashley,F.P. Palmer,R.M. Munson,M.A. Kyriacou,L. Weightman,A.J. Wade,W.G.	EF366663	Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets Oral Microbiol.Immunol. 21 (1), 61-68 (2006)
<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	Zozaya-Hinchliffe,M. Martin,D.H. Ferris,M.J.	AY341820	Development of real time PCR assays for the detection and quantification of bacterial species associated with bacterial vaginosis No publicada

GenBank

CAPITULO 4

DISCUSION

En el presente estudio se incluyeron 38 pacientes a las que se les realizo una valoración ginecológica y microbiológica en búsqueda de datos de infección vaginal por *Gardnerella vaginalis*. El 63.2% de los casos se encontraron entre los 13 y los 19 años de edad, con un inicio de vida sexual a los $16.8 \pm .49$ años.

El 71% de ellas fue primigesta. El rango de edad gestacional en el que se encontró al 52% de las pacientes fue de las 15 a las 20 semanas de gestación. El 92.1 % de las pacientes llagaron al término del embarazo y el 57.9% de ellas tuvieron una resolución del mismo vía vaginal. No se presentaron rupturas prematuras de membranas antes de las 37 semanas de gestación.

La mayoría de las pacientes se encontraron en la etapa de la adolescencia y los inicios de la vida adulta. Hay que resaltar que esta es la población con la mayor incidencia de vaginosis bacteriana en nuestra institución siendo responsable del 34% de las infecciones vaginales y por lo tanto es una de las poblaciones que más se beneficiaría de nuevas técnicas diagnosticas para la detección de *Gardnerella vaginalis*. El hecho de que 2/3 partes de la población estudiada estén comprendidas en este rango de edad puede haber influido en la ausencia de parto pretérmino o RPM. Estas pacientes carecen de muchos de los factores de riesgo tales como raza, desnutrición, antecedentes de parto pretérmino, inadecuado control prenatal, trabajo extenuante, estrés personal, anemia, tabaquismo, bacteriuria, infección cervico vaginal, anomalías cervicales y uterinas etc. Se debe hacer énfasis en que el 71% de las pacientes eran primigestas, y como se sabe, es el principal factor de riesgo para parto pretérmino es el antecedente del mismo. (16-17-20)

No se encontró asociación entre la edad de inicio de la vida sexual, el número de parejas ó número de gestas con los resultados de ambas pruebas. (Graficas 3 y 4)

Se encontraron valores estadísticamente significativos cuando se buscó la asociación entre la vía de resolución del embarazo y la positividad de los cultivos positivos para microorganismos diferentes a *Gardnerella vaginalis*, encontrándose valores de $p \leq 0.002$ y $p \leq 0.007$ respectivamente. Sin embargo, en la literatura no se ha establecido una relación entre la positividad de la detección por cultivo de este microorganismo y la elección de la vía de resolución. En este estudio predominó el nacimiento por vía vaginal,

presentándose en el 57.9% de los casos y como no se presentaron trabajos de parto pretérminos, no hubo relación entre las complicaciones de la infección vaginal con la conveniencia de alguna de las dos vías de resolución acorde a la edad gestacional.

En cuanto a la asociación observada con la presencia de cultivos diferentes a *Gardnerella vaginalis*, se sabe que la infección por éste microorganismo puede estar asociada a otras infecciones de transmisión sexual (6-9), sin embargo, solo 2 cultivos resultaron positivos para otro tipo de patógeno. El primero para *Echerichia coli* y segundo para *Micoplasma hominis* representando el 6.9% de los cultivos.

Cuando se aplicó la misma prueba para buscar asociaciones entre la positividad de DGGE para *Gardnerella vaginalis* y las variables ya comentadas, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. (Tabla 12)

La razón por lo que la toma de la muestra se realizó en el momento del primer contacto con la paciente fue para buscar las edades gestacionales más tempranas posibles, ya que el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* en etapas tempranas del embarazo se asocia a un peor pronóstico que en etapas tardías si se tienen en mente desenlaces como el parto pretérmino y la ruptura prematura de membranas.(16) En este estudio solo se presentó una pérdida a las 20 semanas de gestación, sin haberse establecido hasta ahora una causa conocida. No se presentaron partos pretérminos ni ruptura espontánea de membranas antes de las 37 semanas de gestación. La ausencia de estos desenlaces puede haberse debido al número de pacientes estudiadas hasta el momento. Ninguna de las 38 pacientes tenía antecedente de parto pretérmino, que como ya se mencionó, es el principal factor de riesgo para presentar esta condición. Otro factor que pudo haber influido radica en que a todas las pacientes en las que se detectaron datos clínicos o microbiológicos de infección vaginal, se les administró tratamiento médico y se les dio seguimiento estrecho a través de su embarazo por el servicio de infectología además de sus consultas obstétricas programadas de acuerdo a la Norma que nos rige. (24) También, debemos de tomar en cuenta la realización de cultivos sin una sospecha diagnóstica, lo cual no se realiza de manera rutinaria en el Instituto, y su posible influencia en un tratamiento oportuno en las 5 pacientes que resultaron positivas para estos y su tratamiento posterior. Su uso indiscriminado es controversial en población de riesgo bajo o intermedio, en población de alto riesgo algunos autores favorecen esta práctica. (20)

Al buscarse la asociación entre la edad gestacional a la que se tomó la muestra y la positividad para *Gardnerella vaginalis* en cultivo vaginal, se encontró una $p \leq 0.048$ estadísticamente significativa. Aunque concuerda con lo

reportado en la literatura (16) se deberá esperar a tener una población cuantitativa y cualitativamente representativa de la población del Instituto para corroborar esta asociación y establecer la fuerza de la misma.

Debido al diseño del estudio, de tipo retrospectivo, no se contó con los resultados obtenidos por la identificación microbiológica mediante la técnica por DGGE antes de la finalización de los embarazos y por lo tanto no se inició ningún tratamiento en base a dichos resultados. Debido a estas circunstancias no es posible valorar el efecto de los mismos en el resultado perinatal. Además, como se discute más adelante, aun no se determinaron los rangos de normalidad o anormalidad de esta prueba para definir enfermedad por un microorganismo determinado, por lo que de haberse contado con dichos resultados, no se hubiera iniciado tratamiento en los casos positivos ya que aún se está en la fase de evaluación de la capacidad de la prueba para detectar determinados microorganismos y falta por definir que resultados se pueden interpretar como sugestivo de enfermedad y cuales como no concluyentes de enfermedad. Esto sin embargo, se realizara en las siguientes fases con lo que podremos no solo evaluar la capacidad de la prueba para detectar "enfermedad", sino que también podremos evaluar los efectos microbiológicos del tratamiento actualmente indicado y utilizado para vaginosis bacteriana en estas pacientes.

La vaginosis bacteriana es la entidad infecciosa ginecológica más común. Su incidencia es aun mayor durante el embarazo. (1-18) A pesar de esto, la manera en la que se realiza el diagnóstico se dificulta por el hecho que hasta el 50% de las pacientes son asintomáticas.

Para la evaluación clínica, se utilizaron los criterios de Amsel definiéndose vaginosis bacteriana con la presencia de 3 de los 4 criterios. El 78.9% de las pacientes refirió sintomatología vaginal sugestiva de cervicovaginitis al momento de su entrevista en la consulta de infectología de primera vez. Mientras se realizó la exploración ginecológica y la toma de las muestras de secreción vaginal, se observó descarga vaginal sugestiva de vaginosis bacteriana en el 73.7% de las pacientes, siendo el criterio de Amsel más frecuente. La prueba de KOH al 10% fue positiva en el 28.9% de las pacientes. Se demostró un pH vaginal $>$ a 4.5 en el 63% de las pacientes. No se encontraron muestras con células guía. De esta manera se definió un diagnóstico clínico en 5 pacientes, de las cuáles solo una fue positiva para cultivo vaginal y otra para la técnica por DGGE.

La utilización de los criterios de Amsel para el diagnóstico de éste síndrome en el consultorio implica el contar con KOH al 10 %, microscopio etc. (8) Una vez sospechada la entidad, la confirmación de la misma por medios microbiológicos posee una utilidad muy limitada ya que hasta el 60% de los

cultivos que se reportan como positivos para *Gardnerella vaginalis* pueden llegar a ser falsos positivos (6) El Gold estándar para el diagnóstico de vaginosis bacteriana reportado en la literatura internacional es hasta ahora el descrito por Nugent (2), sin embargo, en México el gold estándar continúa siendo los criterios de Amsel. En el INPerIER como en muchas otras instituciones, los ginecoobstetras, no cuentan con los medios (KOH 10% o microscopios) en sus consultorios, tiempo suficiente y entrenamiento adecuado para poder evaluar de manera completa y apropiada las secreciones vaginales en las pacientes obstétricas y aplicar de esta forma los criterios de Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. Por consecuencia, el clínico se apoya en los medios laboratoriales para complementar una sospecha diagnóstica, lo que en términos prácticos y reales implica la toma de cultivo cervico vaginal, en base al cual y aunado a la evolución de la paciente, se decide el inicio de manejo farmacológico. En el caso de que la paciente se refiera sintomática se decide iniciar tratamiento farmacológico empírico y se solicita un cultivo de control para confirmar y documentar el éxito terapéutico en términos microbiológicos.

Es en base a este razonamiento, por lo que se decide aplicar una técnica nueva en la identificación de microorganismos relacionados con la vaginosis bacteriana con el propósito de establecer la utilidad que tienen los medios de identificación microbiológica en los que nos apoyamos en la actualidad para hacer o confirmar diagnósticos microbiológicos, inicio de terapéuticas y valoración parcial de los resultados de las mismas.

La comparación se realizó con el Gold estándar utilizado en el INPerIER, los criterios de Amsel, y con el medio paraclínico con el que se cuenta actualmente: el cultivo cervico vaginal. Se realizó diagnóstico de vaginosis bacteriana con los criterios originales de Amsel cuando se cumplieron 3 de 4 criterios. De esta manera se identificaron 5 pacientes, de las cuales solo una fue positiva para *Gardnerella vaginalis* por cultivo y otra lo fue por DGGE. Podemos observar que a pesar de aplicar una técnica con mayor capacidad para detectar el microorganismo como lo es el método por DGGE, la relación entre la identificación de *Gardnerella vaginalis* y lo que clínicamente consideramos vaginosis bacteriana es pobre. Esta falta de asociación con la "enfermedad" ya ha sido descrita por varios autores. (2-18) Sin embargo, mientras no se identifique de manera categórica a otro agente diferente a *Gardnerella vaginalis* para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, tendremos que seguir buscando nuevas técnicas que nos permitan no solo su aislamiento, sino que también podamos aislar la microflora que la acompaña. Es por esto que se decidió describir la aplicación de esta técnica en este microorganismo en especial. Esta decisión no estuvo basada únicamente en dicha relación, sino también, en el hecho de que hoy en día las pruebas paraclínicas que se utilizan para apoyar el diagnóstico de vaginosis bacteriana tienen que ver con su identificación directa o indirectamente, ya sea sola o acompañada de

algunas de las bacterias asociadas, y por lo tanto son los parámetros con los que podemos realizar nuestras comparaciones.

No se realizó comparación con el gold estándar utilizado en otros países (criterios de Nugent) (2) por que aunque si se realizan frotis con tinción gram en las muestras cervicovaginales, estas no se clasifican en base a estos criterios en el laboratorio de microbiología y por lo tanto no fue posible su análisis en este sentido.

Por ultimo, si lo comparamos con el método de diagnóstico microbiológico con el que cuenta el INPerIER en este momento para su identificación, a pesar de las limitaciones ya conocidas entre las tenemos una tasa de falsos positivos de hasta el 60% nos vemos obligados poner sobre la mesa dos grandes preguntas. En base a los resultados preliminares obtenidos en este estudio y a lo reportado en la literatura en pacientes no embarazadas debemos cuestionar en primer lugar el papel etiológico y diagnostico de *Gardnerella vaginalis* dentro de la vaginosis bacteriana. En este protocolo se demostró que a pesar de esta capacidad de los cultivos de sobre diagnosticar vaginosis bacteriana por métodos microbiológicos, logramos por la técnica PCR-DGGE detectar a *Gardnerella vaginalis* en cultivos que se reportaron como negativos y en pacientes sin criterios clínicos de vaginosis bacteriana. La segunda pregunta que nos debemos formular, y que la técnica por PCR-DGGE puede ayudarnos a contestar, es: el tratamiento farmacológico que actualmente administramos, exactamente sobre quién actúa. Nos debemos formular esta cuestión porque existen reportes de que algunos de los fármacos actualmente utilizados, no eliminan en todos los casos a *Gardnerella vaginalis*, pero que si existe una curación clínica. La pregunta continua en el aire, ¿hay algún microorganismo específico que inicia toda la cascada de acontecimientos que hoy llamamos vaginosis, con uno solo basta para iniciarlo, necesitamos la conjunción de algunos de ellos específicamente, realmente sobre quién actúa el tratamiento farmacológico recomendado?

Teniendo en cuenta la capacidad de identificación microbiológica de ambas pruebas, tenemos que la técnica por DGGE detectó una mayor cantidad de pacientes con G. vaginales que la técnica por cultivo, encontrándose por este medio 4 pacientes con *Gardnerella vaginalis*, la mitad de las detectadas por DGGE. Con los datos anteriores se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para el cultivo fueron de 10.5%, 78.9%, 33.3% y 46.8% respectivamente. Mientras que los valores encontrados para DGGE fueron de 21.05%, 89.4%, 66.6% y el 53.1%. A un debemos de esperar a que se complete el procesamiento de las 200 muestras tomadas para el calculo final.

La técnica por DGGE, a pesar de que es más sensible para la detección no solo de *Gardnerella vaginalis*, sino de otros microorganismos, comparada con el cultivo vaginal que utilizamos en la actualidad, también es más costosa y sobre todo el tiempo necesario para procesar las muestras es mayor. Tomando en cuenta lo anterior y a reserva de los resultados finales de este estudio cuando se procesen todas las 200 muestras obtenidas, no será práctico cambiar los cultivos vaginales actuales por la detección por DGGE, ya que no sería útil para la paciente o el clínico tener resultados en tiempos tan prolongados para tomar una decisión terapéutica ni solventar los costos que esto implicaría. Por esto es que se planeó dividir el estudio en tres fases con la finalidad de solventar esta situación:

La *primera fase* la constituye el aislamiento de los microorganismos conocidos y no conocidos mediante la aplicación de esta técnica en pacientes con vaginosis bacteriana, que como se explica anteriormente tiene una capacidad superior a los cultivos actualmente utilizados. Este protocolo está incluido en el inicio de esta fase.

La *segunda fase* constituye la búsqueda de asociaciones entre los diferentes microorganismos identificados en la primera fase. Las asociaciones entre dichos microorganismos pretenden ser realizadas en las pacientes con vaginosis bacteriana, parto pretérmino o ruptura prematura de membranas. Con lo anterior se busca comparar los ambientes microbiológicos asociados a estas patologías que actualmente solo conocemos por medio de las técnicas microbiológicas. De esta manera confrontar con los resultados de las pruebas moleculares las hipótesis que hoy tratan de explicar parte de la etiología y fisiopatología de estos eventos en la mujer gestante.

La *tercer* y última fase se encargará de diseñar un Kit de pruebas Multiplex que incluya a la asociación de los microorganismos más representativa de la vaginosis bacteriana identificada previamente en la segunda fase, y así contar con un método diagnóstico más preciso para la identificación de pacientes obstétricas con vaginosis bacteriana que sean atendidas en un segundo o tercer nivel de atención médica por los factores de riesgo identificados en ellas para presencia de parto pretérmino y ruptura prematura de membranas entre otras.

Este estudio surge en un inicio por el conocimiento que se tiene en la actualidad de la pobre capacidad de los medios que se utilizan en el INPerIER y otros hospitales para detectar agentes patógenos vaginales que potencialmente pueden alterar el desenlace perinatal en las pacientes que conforman la población a la que se le brinda asistencia. Como sabemos las infecciones son responsables del 20 al 25 % de los casos de parto pretérmino. (17) En muchas ocasiones las pacientes que llegan buscar atención al Instituto

por esta causa, no presentan factores de riesgo evidente y al realizarse el protocolo de estudio para esta entidad se toman cultivos cervico vaginales en los que no se encuentran datos de infección en muchas de ellas. Si al finalizar la primera fase del estudio se confirma por PCR – DGGE la hipótesis de la pobre capacidad de los cultivos para identificar estos microorganismos, se deberá de rechazar el uso de los mismos a favor de técnicas más sensibles como la PCR.

En el caso específico de la vaginosis bacteriana, sabemos que esta entidad se comporta como un síndrome en el que se altera el equilibrio de la flora vaginal y por lo tanto empieza a haber un predominio de ciertas bacterias que en otras condiciones no alterarían el pronóstico del embarazo.(20) *Gardnerella vaginalis* aunque es una de las bacterias más representativas de esta entidad, no es la única, es más, esta presente en un gran número de muestras de pacientes que no cumplen los criterios de Amsel. Actualmente se están llevando a cabo estudios en los que se trata de identificar mediante técnicas de PCR en pacientes **no embarazadas** microorganismos diferentes a los ya conocidos, no cultivables por el momento y que su detección pudieran ser igual o más sensible para definir vaginosis bacteriana por descripción microbiológica.(15) Hasta el momento, no se ha descrito un estudio similar en pacientes **embarzadas** que nos permita confirmar y comparar lo encontrado en pacientes no gestantes. La finalidad de estos estudios tiene como objetivo identificar a los microorganismos más sensibles para el diagnóstico de vaginosis bacteriana en mujeres gestantes, con la finalidad de desarrollar un Test-Multiplex que identifique mediante la técnica por PCR una combinación de microorganismos que nos dieran los valores más altos posibles para identificación de las pacientes con esta entidad, ya que como se ha discutido, los métodos actuales no solo carecen de esta capacidad de detección sino que además tienen una alta tasa de falsos positivos (18-6). Esta prueba no solo sería más sensible, si no que los resultados definitivos podrían estar en un lapso de 24 hrs o menos a comparación de las 48 hrs que actualmente tenemos que esperar el resultado por cultivo, ayudando al clínico a determinar en un menor tiempo, si el tratamiento que se instituyó es el adecuado o debe ser modificado

Las bacterias mostradas en la Tabla 16 son una muestra de la capacidad que tiene esta técnica para ver más allá de lo que hasta hoy hemos podido saber por medio de los métodos de cultivos microbiológicos. Esto es fundamental ya que, como se ha desarrollado en el presente trabajo, estos han resultado insuficientes para explicar los problemas infecciosos que afectan a la mujer embarazada y por lo tanto al binomio entero. Es así, que en la búsqueda de estas respuestas se desarrollan técnicas más sensibles para la identificación microbiológica pero que, como toda técnica nueva, acarrea un mayor costo y tiempo para su simplificación y aplicación a gran escala. Sin embargo como se propuso en párrafos anteriores, la tercer fase del proceso esta encaminada a utilizar los resultados de esta exhaustiva descripción de la

microflora de pacientes con vaginosis bacteriana para su aplicación en técnicas utilizadas hoy en día que tienen la capacidad de detectar múltiples bacterias en una sola muestra y en un tiempo y costo razonable si se tiene en mente su aplicación en pacientes que ameriten un tercer, y tal vez, un segundo nivel de atención.

Por último, es importante recalcar que la presencia de infecciones cervicovaginales no es la única causa por la que se presenta la amenaza de parto pretérmino, y por lo tanto mejorando la detección de los microorganismos involucrados no se van a prevenir todos los casos. Sabemos que existen otros factores asociados que tienen que ver con predisposición de la paciente a desencadenar reacciones inflamatorias desproporcionadas al estímulo, tales como polimorfismos de la Interleucina B, también existen causas no infecciosas que deberán ser abordadas de la manera apropiada. (21)

CONCLUSIONES

- El cultivo cervico vaginal que se utiliza hoy en día como apoyo diagnóstico para vaginosis bacteriana carece de las cualidades necesarias para formar parte de el arsenal diagnóstico del ginecoobstetra.
- Aun falta conocer mucho acerca de la microflora vaginal en pacientes embarazadas con vaginosis bacteriana.
- La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es un método molecular prometedor que será de utilidad para conocer este micro ambiente y así poder diseñar pruebas diagnósticas más sensibles que tengan un impacto real en el manejo de la paciente embarazada con vaginosis bacteriana.
- Al conocer dicho nicho vaginal será posible poner a prueba los tratamientos que actualmente utilizamos en estas pacientes y proponer otros mejores.
- Aun falta mucho tiempo para concluir las tres fases en las que se ha diseñado este proyecto, sin embargo, dada la relación entre las infecciones vaginales y el parto pretérmino es de interés general el desarrollo de tecnologías que nos permitan una mejor comprensión de esta problemática y por lo tanto una mejor capacidad de afrontar sus efectos en la mujer embarazada por sus potenciales repercusiones tanto a nivel salud como a nivel económico y social.
- Este tipo de esfuerzos no deben de estar aislados, ya que como sabemos, los procesos infecciosos no son la única causa de parto pretérmino y por lo tanto deben de crearse y sostenerse otras líneas de investigación en forma paralela que complementen este punto en particular o aborden las demás etiologías de la principal causa de morbi-mortalidad neonatal a nivel mundial: el parto pretérmino.

ANEXOS

México DF. a __/__/__

“Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes”

Carta de consentimiento informado

Por medio de la presente la paciente _____ con expediente número _____ autoriza la toma de muestras de exudado vaginal para la realización de cultivos y para la aplicación de la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización para la búsqueda de *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos.

- Se me explica la finalidad de este estudio para propósitos de investigación, los riesgos que este implica para mi y mi bebe, así como la gratuidad del mismo.
- Entiendo que los resultados de este estudio serán confidenciales y que tendré acceso a los mismos en caso de solicitarlo.
- Tengo el derecho a renunciar a mi participación en cualquier momento que así lo decida y esto no condicionará mi estancia y atención en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Yo _____ acepto participar en este protocolo de estudio.

Paciente

Testigo 1

Testigo 2

Testigo 3

GLOSARIO DE TERMINOS

- *Gardnerella Vaginalis*: bacteria en forma de bacilo gram variable, anaerobia facultativa, no encapsulada, no movil y pleomórfica .(6)
- *Vaginosis bacteriana*: La vaginosis bacteriana es la causa más común de vaginosis aguda representando de un 15 a 50% de los casos. **¡Error! Marcador no definido.** Se caracteriza por ser un síndrome polimicrobial en el que las poblaciones de *Lactobacillus vaginales*, usualmente dominantes en la vagina de las mujeres sanas, son reemplazados por una mezcla de organismos entre los que encontramos a *Gardnerella Vaginalis*; *Prevotella* (bacteroides), cocos anaeróbicos gram positivos como las especies de *Peptostreptococos*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* y a veces especies de *Mobiluncus curtissi*. (3)
- *Cultivo cervico vaginal* : método diagnóstico que consiste en colocar una muestra de secreción vaginal en un medio nutritivo específico , se incuba en condiciones específicas posterior a lo cual se observa si existe crecimiento o no de un microorganismo determinado.(6)
- *La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)*: es una técnica de trazado molecular que consiste en la separación de las cadenas de ADN dependiendo de su punto de desnaturalización. (21)
- *Sensibilidad*: proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es positiva en pacientes que tienen la enfermedad o trastorno. (24)
- *Especificidad*: proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es negativa en pacientes que no tienen la enfermedad o trastorno.(24)
- *Valor predictivo positivo*: proporción de las veces que un paciente con una prueba de diagnóstico positiva sí tienen la enfermedad que se está investigando. (24)
- *Valor predictivo negativo*: proporción de las veces que un paciente con una prueba de diagnóstico negativa no tienen la enfermedad que se está investigando.(24)
- *Criterios de Amsel*: criterios, descritos por primera vez en 1983, se usan para el diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana. Para que se cumplan deben de estar presentes con por lo menos tres de los siguientes criterios:
 - ✓ *descarga vaginal homogénea y delgada*
 - ✓ *pH vaginal >4.5*
 - ✓ *olor aminas al aplicar hidróxido de potasio(KOH) al 10 %*

✓ *presencia de células clave en la preparación en fresco (8)*

Flujo vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana: flujo homogéneo, no viscoso, adherente, sin detritos y aumentado en volumen con respecto a las secreciones vaginales que se observan normalmente.(9)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACOG Practice Bulletin. Vaginitis. *Obstet Gynecol* 2006; 107 (5): 1195-1206.
2. Eckert, Linda O. Acute Vulvovaginitis. *New England J Medicine* september 2006; 355: 1244-52.
3. Pybus V., Onderdonk A.B. Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes and infection* 1999; 1: 285-92.
4. Seit S., Das A., Sharma M. Inhibition of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli. *Int J Gynecol* 2006; 93:158-59.
5. Gardner L., Dukes D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "Nonspecific" vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69 (5): 962-76.
6. Manoj K, Biswas. Bacterial Vaginosis. *Clinical Obstet Gynecol* 1993; 1 : 166-76.
7. Chiaffarino F., Parazzini F., De Besi P., Lavezzari M. Risk factors for bacterial vaginosis .*EJOG* 2004; 117: 222-26.
8. Simoes J. A., Discacciati M.G., Brolazo E.M., Portugal P.M., Dini D.V. Clinical Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *Int J Gynecol* 2006; 94: 28-32.
9. Esenbach A., Hiller Sharon, Critchlow Cathy, Stevens Claire, De Rouen Timothy , K. King. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 819-28.
10. Karani A, De Vuyst, Luchters S., Othigo J., Mandaliya K, Chersich M.F., Temmerman M . The Pap smear for detection of bacterial vaginosis. *Int J Gynecol* 2007; 03-10.
11. Mana Obata-Yasuoka. A Multiplex Polymerase Chain Reaction- Based Diagnostic Method of Bacterial Vaginosis. *Obstet Gynecol* 2002; 4 : 759-64.
12. Hiller L. , Krohn A., Nugent P., Gibbs S. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166 (3) :938-44.
13. Krohn A., Hiller L., Eschenbach A. Comparison of Methods for Diagnosing Bacterial Vagios among Pregnant Women. *J Clin Microbiol* 1989; 27(6):1266-71.

14. Witt Armin, Petricevic Ljubormin, Kaufmann Ulrike, Gregor Hubertus, Kiss Herbert. DNA Hybridization Test: Rapid Diagnostic Tool for Excluding Bacterial Vaginosis in Pregnant Women with Symptoms Suggestive of Infection. *J. Clin. Microbiol* 2002; 40(8): 3057-59.
15. Fredericks N., Fiedler Tina, Marrazzo Jeanne. Molecular Identification of Bacteria associated with Bacterial Vaginosis. *New England J Medicine* 2005; 353(18): 1899-1911.
16. Alex C., M. Ramin. From Concept to Practice: The Recent History of Preterm Delivery Prevention. Part II: Subclinical Infection and Hormonal Effects. *Am J Perinatol* 2006; 22 (2): 75-84.
17. Goldenberg Robert L., Hauth J C, Andrews W W. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *New England J Medicine* 2000; 342 (20): 1500-07.
18. William W. Andrews, John C. Hauth , Robert L. Goldenberg. Infection and Preterm Birth. *A J Perinatol* 2000; 17(7): 357-63.
19. Laura L., Ronald Gibbs. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190 : 1493-502.
20. Brunilla Guerra, Ghi Tullio, Quarta Simona, Morselli-Labate, Lazzarotto Tiziana, Pilu Gianluigi, Rizzo Nicola. Pregnancy outcome after early detection of bacterial vaginosis. *EJOG* 2005;128 : 40-45.
21. <http://ddgehelp.blogspot.com>
22. Burton J., Cadieux P., Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic installation. *Applied Environ Microbiol* 2003; 69 (1):97- 101.
23. Robert K. Creazy. Maternal-fetal medicine, 5ta edición, Saunders;2004.p:623-62
24. Beth Dawson- Saunders. Bioestadística médica, 2ª edición, Manual Moderno; 1999. p: 275-294.
25. Norma del Instituto Nacional de Perinatología. INPer .2003. p:15-18