



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA.
"ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"

BUSQUEDA DE *Atopobium vaginae* EN MUESTRAS
CERVICOVAGINALES DE PACIENTES EMBARAZADAS
CON CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE VAGINOSIS
BACTERIANA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
PERINATOLOGIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA.

PRESENTA:

DRA. DONAJÍ LUNA HERNÁNDEZ.

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN.

DR. ENRIQUE SEGURA CERVANTES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO CASANOVA ROMÁN.

COTUTORES:

QPB GRACIELA VILLEDA GABRIEL.

M EN C. JESUS REYNA FIGUEROA.



México D.F.

Febrero 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA.
"ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"

BUSQUEDA DE *Atopobium vaginae* EN MUESTRAS
CERVICOVAGINALES DE PACIENTES EMBARAZADAS CON
CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE VAGINOSIS
BACTERIANA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
PERINATOLOGÍA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA.

PRESENTA:

DRA. DONAJÍ LUNA HERNÁNDEZ.



México D.F.

Febrero 2010

DEDICATORIA.

A mis padres, maestros y amigos por su apoyo durante el trayecto de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS.

Al Instituto Nacional de Perinatología por la oportunidad de cursar la especialidad en sus instalaciones y de las enseñanzas aportadas por el personal integrante.

Al personal del laboratorio de Microbiología (Maricarmen, Mary, Lupita, Magda y en especial a Chelita) por el apoyo proporcionado durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE.

CONTENIDO.

ÍNDICE GENERAL.....	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1-4
A. Antecedentes	5-6
B. Definiciones	7
C. Justificación	8
D. Planteamiento del problema	9
E. Hipótesis	10
F. Objetivos	10
II. METODOLOGÍA.	
A. Material y métodos	11
B. Lugar de estudio	11
C. Tipo de estudio	11
D. Criterios de selección	12
E. Calculo de la muestra	12
F. Desarrollo	13-16
III. RESULTADOS	17-21
IV. DISCUSIÓN	22-23
V. CONCLUSIONES	24
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	25-27
VII. ANEXOS.	
Anexo 1. Criterios de Nugent.....	28
Anexo 2. Tinción de Gram	29
Anexo 3. Pruebas bioquímicas para <i>Atopobium vaginae</i>	30

I. INTRODUCCION.

La mujer en edad reproductiva puede tener hasta 100 millones de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de secreción vaginal. ¹

Los *Lactobacillus acidophilus* productores de peróxido de hidrógeno controlan la multiplicación de las bacterias colonizadoras vaginales y, con ello, el equilibrio del microecosistema vaginal. ²

La flora cervicovaginal es un ecosistema dinámico que varía de un día a otro. La administración de antibióticos, así como procesos quirúrgicos son condiciones que propician cambios notorios en el equilibrio microbiológico de la vulva, la vagina y el cérvix. El uso de antibióticos profilácticos o terapéuticos puede ocasionar la selección de algunos microorganismos resistentes.

Recientemente se está evaluando el papel de *Atopobium vaginae*, en la producción de Vaginosis bacteriana y aunque su importancia hasta ahora es incierta, se ha descrito su resistencia a medicamentos comúnmente utilizados para su el tratamiento. ³⁻⁵

La VB es una entidad nosológica muy importante desde el punto de vista epidemiológico y clínico, debido a las repercusiones en la esfera reproductiva, sexual y perinatal de la mujer, la prevalencia de VB sintomática oscila de 10-40% dependiendo de la población estudiada, es 3 veces más común en mujeres de raza negra que las de raza blanca. ⁶

No está considerada como una infección de transmisión sexual, por que se presenta también en mujeres que no han iniciado vida sexual. Sin embargo se ha asociado con ciertos hábitos sexuales como sexo oral, múltiples parejas sexuales, duchas vaginales, sexo durante la menstruación y actividad sexual lésbica. La VB, es una condición común de etiología pobremente entendida, que se caracteriza por alteraciones en la flora vaginal. ⁷

Se ha involucrado en muchas complicaciones clínicas las cuales incluyen susceptibilidad a infecciones de transmisión sexual, endometritis, endometritis postaborto, Enfermedad Pélvica Inflamatoria (EPI), incrementa el riesgo de adquirir y transmitir infección por VIH, parto prematuro, ruptura prematura de membranas,

peso bajo al nacer, corioamnionitis, infección de líquido amniótico, parto pretérmino, y complicaciones en el recién nacido.⁸⁻¹⁰

El parto pretérmino (nacimiento antes de la semana 37 de gestación) es la principal causa de bajo peso al nacer, y la segunda causa de mortalidad infantil en los Estados Unidos, de 9.4% a 11.6%.⁸

La lista de factores de riesgo y marcadores de riesgo para parto pretérmino es larga, e incluye situación socioeconómica baja, bajo peso al nacimiento, ganancia ponderal materna inadecuada durante el embarazo, parto pretérmino previo, historia de problemas de infertilidad, tabaquismo, gestaciones múltiples, infecciones del tracto genital y vaginal, factores cervicales, factores miométriales, problemas con las membranas fetales, y estrés; al igual que la ruptura prematura de membranas, la cual ocurre en 3% de los embarazos, y es responsable de una tercera parte de todos los nacimientos pretérmino afectando aproximadamente a 120,000 mujeres en los Estados Unidos cada año. Y está asociada a una alta morbilidad y mortalidad materna y perinatal. Para muchos de estos factores no se conoce alguna intervención exacta, aunque ya se han establecido algunos protocolos de manejo.

La asociación de infecciones vaginales, cervicales y embarazo ha sido documentada desde hace muchos años, se ha relacionado con trabajo de parto prematuro (APP) de un 5-10%, también se han relacionado con ruptura prematura de membranas (RPM) y en amnionitis con membranas íntegras.¹¹

VB es un factor de riesgo clave, ya que se ha establecido su fuerte asociación con APP y RPM, y es de las causas potencialmente prevenibles y tratables si se diagnostican a tiempo, lo cual puede ayudar a reducir en una pequeña parte las tasas de mortalidad en estas patologías.¹²

El sobre crecimiento característico de anaerobios y micoplasmas en VB están asociados con efectos adversos en el tracto reproductivo, particularmente en mujeres embarazadas. Estas bacterias aisladas en mujeres embarazadas con VB también son aisladas en un gran porcentaje en sitios que normalmente son estériles tales como líquido amniótico, el corión, la placenta y el útero. Estas bacterias pueden pasar de la vagina a través del cérvix a la cavidad uterina en mujeres embarazadas y no embarazadas. Por lo tanto se requiere una revisión cuidadosa de los organismos

involucrados para adecuar las recomendaciones de tratamiento y reducir el riesgo de complicaciones.^{13,14}

En los años recientes, se han incluido en la literatura médica algunos microorganismos que hasta hace poco eran desconocidos o que se mencionaban muy rara vez, como *Atopobium vaginae*.

El hábitat de los anaerobios está limitado a zonas corporales del ser humano donde la tensión de oxígeno es baja. El diagnóstico microbiológico de los anaerobios requiere de una metodología especial. Dentro de las principales dificultades para identificar las bacterias son: Cambios taxonómicos y los costos.^{15,16}

Atopobium vaginae se ha detectado y asociado como uno de los participantes de la VB, y en abscesos tubo-ováricos posterior a una fertilización *in vitro* y en mujeres Postmenopausicas.^{17,18}

Las células del epitelio vaginal secretan Interleucina 6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) en respuesta a *A. vaginae* y *G. vaginalis*, pero no por *Lactobacillus crispatus*. *A. vaginae* induce el incremento de niveles e IL-6 y copias de IL-8 también incrementa las copias para el péptido antimicrobiano defensin peptidasa *beta 4*. Esta respuesta inmune innata requiere bacterias vivas capaces de sintetizar proteínas en contacto directo con células del epitelio vaginal.¹⁹

Cobra importancia la búsqueda de *A. vaginae* ya que muchas especies recientemente reconocidas tienen un significado clínico desconocido ya que en aislamientos descritos en los casos de absceso tubo-ovárico reportan que fueron encontrados a ser altamente resistente a metronidazol.³⁻⁵

La aplicación de métodos de cultivo independientes, tales como 16SrDNA, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han identificado nuevas especies de bacterias en VB que no fueron detectados por cultivo y han facilitado la investigación. Dentro de los microorganismos más encontrados se ha demostrado *A. vaginae* como el más común en mujeres con VB y flora vaginal anormal.¹⁶

El cultivo y la identificación de los patógenos a partir de muestras tomadas de pacientes con una presunta infección es el método más confiable aunque no el método más rápido para el diagnóstico. Es posible obtener resultados más rápidamente mediante métodos que emplean un volumen pequeño de sustrato con

un inóculo abundante, utilizando sistemas modificados de bioquímicas convencionales como lo es el Sistema API (Sistemas de identificación de bacterias que asocian una galería bioquímica miniaturizada y una base de datos). Este sistema incorpora 20 reactivos disecados en cavidades plásticas dentro de las cuales se coloca una suspensión del organismo en estudio, con un inóculo abundante. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante adición de reactivos.²⁰

La interpretación de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación, y el reconocimiento se consigue mediante un software de identificación.

El sistema de identificación API ® 20 A (bioMérieux ®) SA, Paris Francia. Permite estudiar rápida y fácilmente 21 caracteres destinados a la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias.²¹⁻²³

RESUMEN.

INTRODUCCIÓN:

La mujer en edad reproductiva puede tener hasta 100 millones de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de secreción vaginal, los *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Peptococcus* ven favorecida su multiplicación gracias a la fermentación del glucógeno, que constituye su fuente energética.

La vaginosis bacteriana es una de las infecciones más frecuentes del aparato genital de mujeres con vida sexual activa en edad reproductiva, en México Vaginosis Bacteriana ocupa el segundo lugar de las infecciones cervicovaginales que cursan con flujo vaginal; Se ha asociado con resultados adversos en el embarazo, puede causar aborto del primer trimestre, ruptura prematura de membranas, y en casos más graves se asocia a enfermedad pélvica inflamatoria.

Recientemente se está evaluando el papel de *Atopobium vaginae*, en la producción de Vaginosis bacteriana y aunque su importancia hasta ahora es incierta, se ha descrito su resistencia a medicamentos comúnmente utilizados para tratamiento.

OBJETIVO: Conocer la frecuencia de *Atopobium vaginae* en muestras cervicovaginales con criterios microbiológicos intermedios y vaginosis bacteriana en pacientes embarazadas en el Instituto Nacional de Perinatología.

MATERIAL Y MÉTODOS: En el período comprendido del 1º de noviembre de 2008 al 30 de Junio de 2009 se realizó un estudio transversal, observacional de alcance descriptivo, en pacientes embarazadas que acudieron a la toma de exudado cervicovaginal al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Perinatología.

RESULTADOS: Se incluyeron un total de 1576 pacientes que acudieron a la toma de muestras, de las cuales 250 cumplieron criterios de Vaginosis bacteriana, y de las cuales 41 fueron sometidas a sistema de identificación API ® 20 A (bioMérieux ® SA, Paris Francia).

CONCLUSIONES: En nuestro la frecuencia de VB fue de 16.02% distribuida en los diferentes trimestres del embarazo. No se identifico *Atopobium vaginae* por sistema de identificación API ® 20 A (bioMérieux ® SA, Paris Francia).

A. Planteamiento del problema.

La asociación de infecciones vaginales, cervicales y embarazo ha sido documentada desde hace muchos años; El conocimiento de los microorganismos productores de VB es un factor clave, para el tratamiento adecuado de esta patología, ya que se ha establecido su fuerte asociación con APP y RPM, y es de las causas potencialmente prevenibles y tratables si se diagnostican a tiempo, ayudando a reducir en una pequeña parte las tasas de mortalidad en estas patologías.

¿Es *Atopobium vaginae* un microorganismo frecuente en las pacientes embarazadas con VB en el Instituto Nacional de Perinatología?

A. Antecedentes.

En EUA, la VB ocupa el primer lugar de las infecciones cervicovaginales que cursan con flujo transvaginal, la candidosis vulvovaginal ocupa el segundo y la tricomoniasis el tercero. En México, la candidosis vulvovaginal ocupa el primer lugar y VB el segundo.² En estudios realizados en el Hospital Juárez de México, se reporta una prevalencia de VB de 20-30%.²⁴

Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa con factores como la edad, el inicio de vida sexual activa, el número de relaciones sexuales por semana, el número de parejas sexuales y el embarazo; En el estudio del Hospital Juárez se utilizó el sistema API 20E de Biomeriux para identificación de enterobacterias, pruebas de hipurato e hidrólisis de almidón, para la identificación de *G vaginalis*, y los métodos descritos por Insenberg y D' Amato para la identificación de microorganismos Gram positivos. La frecuencia de infección por cada germen fue *G vaginalis*, 22.65%, *Candida spp*, 19.13%, *C albicans*, 7.8%, *T vaginalis*, 15%, *Streptococcus* del grupo D, 11.78%, *Streptococcus B haemolyticus*, 4.59%, *E coli*, 13.46%, *Klebsiella ssp*, 2.0%, además de otras enterobacterias menos frecuentes como *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp*, *M morganii* y *P mirabilis*. El 2.9% presentó anaerobios siempre asociados con *G. vaginalis*. Se aislaron *Neisseria spp* y *N. weaveri* en 0.15% de las muestras.²⁴

En otro estudio realizado por Toca y cols. En el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 Centro Médico Nacional La Raza. Se informó que la prevalencia de VB es significativamente mayor en pacientes con APP, lo cual concuerda con lo referido en la literatura mundial. *Candida albicans*, *Gadnerella vaginalis*, *E coli* y *Klebsiella sp*. fueron los microorganismos más frecuentes.²⁵

La relación entre VB e infección del tracto genital superior, es difícil demostrar por la naturaleza invasiva de los procedimientos, muchos estudios han demostrado que los microorganismos del tracto genital superior encontrados en VB contribuyen al riesgo de presentar Enfermedad Pélvica Inflamatoria y endometritis.

Goteborg (en Suecia) aisló un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, que fue la primera cepa indicadora de *Atopobium vaginae* la CCUG 389534, obtenida del exudado vaginal de una mujer con VB asintomática. A partir de ésta cepa se han

descrito otras 8 (CCUG 42099, CCUG 44116, CCUG 44258, CCUG 44125, CCUG 44061, PB2003/009-T1-4, PB 2003/017-T1-2, PB2003/189-T1-4), inclusive ya se describió la existencia de un segundo genotipo, cuya secuencia del gene del rRNA 16S se diferencia en 23 sitios.^{16,18}

El género *Atopobium* fue reclasificado por Collins y Wallbanks en 1992. Previamente se habían descrito 3 especies, las cuales se les había agrupado dentro de la especies de Lactobacilos: *Atopobium minutum* (*Lactobacilos minutus* Hauduroy et en 1937), *Atopobium rimae* (*Lactobacilos rimae* Olsen en 1991) y *Atopobium parvulum* (*Streptococcus parvulus* Weinberg et. Al 1937), aislados de abscesos periodontales (2). En 1999 otras dos especies de *Atopobium* se identificaron: *Atopobium fossor* y *Atopobium vaginae* descrito por Rodriguez et al. (De un exudado vaginal de una paciente con VB sintomática).¹⁵

Atopobium vaginae es un bacilo Gram positivo que produce ácidos orgánicos (acido láctico, ácido acético y acido fórmico), fermentadores de la glucosa, que se agrupan en pares o en pequeñas colonias y son anaerobios facultativos.

Se ha detectado a *A. vaginae* recientemente por medio de la reproducción del rRNA-gene 16S por análisis del polmorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción del gene del rRNA 16S (T-RFLP), por PCR específico, desnaturalizando el fragmento por electroforesis.^{16,18}

B. Definiciones.

Diagnóstico clínico de VB: Es la presencia de 3 de los 4 criterios de Amsel en mujeres no embarazadas y 2 de 4 en mujeres embarazadas los cuales consisten en la presencia de flujo transvaginal blanco grisáceo, fétido, PH >4.5, si se agrega KOH al 10% a la secreción vaginal se genera un olor ocre a pescado, en las extensiones en fresco se observan las células clave que son células epiteliales vaginales cubiertas por pequeños cocobacilos.

Diagnóstico microbiológico: es el método actualmente utilizado en el laboratorio está basado en la tinción de Gram de acuerdo a los criterios de Nugent considerado el “Gold estándar” en el diagnóstico de VB, aunque pronto podría ser substituido por otras técnicas más sencillas y específicas en el cual una puntuación de 0-3: normal, 4-6: intermedia y 7-10 es diagnóstico de VB ANEXO 1.

Definición operacional de VB: Para la realización de este estudio se considero vaginosis bacteriana la presencia de 4-10 criterios de Nugent en frote cervicovaginal.

A. Objetivos.

a. Objetivo General;

Conocer la frecuencia de *Atopobium vaginae* en cultivos cervicovaginales de pacientes embarazadas con criterios microbiológicos de VB en la tinción de Gram en el Instituto Nacional de Perinatología.

b. Objetivos específicos;

1. Determinar la frecuencia de VB mediante criterios de Nugents en muestras cervicovaginales de pacientes embarazadas en el Instituto Nacional de Perinatología.
2. Identificar los microorganismos presentes en VB en muestras cervicovaginales de pacientes embarazadas en el Instituto Nacional de Perinatología.

B. Hipótesis.

a. Hipótesis de investigación.

Atopobium vaginae es una bacteria anaerobia facultativa que frecuentemente se aísla en cultivos cervicovaginales de pacientes embarazadas con VB en el Instituto Nacional de Perinatología.

C. Justificación.

La VB, es una condición común de etiología pobremente entendida, que se caracteriza por alteraciones en la flora vaginal, se ha involucrado en muchas complicaciones clínicas las cuales incluyen susceptibilidad a infecciones de transmisión sexual, endometritis, endometritis postaborto, parto prematuro, ruptura prematura de membranas, peso bajo al nacer, corioamnioitis, parto pretérmino, amenaza de parto pretérmino y complicaciones en el recién nacido. La asociación de infecciones vaginales, cervicales y embarazo ha sido documentada desde hace muchos años.

El conocimiento de los microorganismos que recientemente se han relacionado con VB es un factor clave para su tratamiento adecuado, siendo VB de las causas potencialmente prevenibles y tratables si se diagnostican a tiempo, ayudando a reducir en una pequeña parte las tasas de mortalidad por APP y RPM.

II. METODOLOGIA:

A. Material y métodos.

En el período comprendido del 1º de noviembre de 2008 al 30 de junio de 2009 se realizó un estudio transversal, observacional de alcance descriptivo, en pacientes embarazadas que acudieron a la toma de exudado cervicovaginal al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Perinatología las que en base a los criterios microbiológicos de Nugent se diagnosticaron como frote intermedio y VB, las cuales se sembraron en agar chocolate, agar sangre de carnero, agar sangre humana, y agar papadextrosa, las cuales posteriormente fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas en búsqueda de *Atopobium vaginae*.

B. Lugar de estudio.

El presente trabajo se llevó al cabo en el Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”, SSA en los servicios de Microbiología.

C. Tipo de estudio.

Estudio transversal, prospectivo, observacional, descriptivo.

D. Criterios de selección.

a. Criterios de inclusión.

1. Pacientes embarazadas que acudan a la toma de cultivo cervicovaginal al laboratorio de microbiología del 1° de noviembre de 2008 al 30 de Junio de 2009.
2. Pacientes con diagnóstico microbiológico de muestras cervicovaginales intermedias o de VB en base a los criterios de Nugent.
3. Pacientes que aceptaron participar en el estudio.

b. Criterios de exclusión.

1. Pacientes con sangrado transvaginal por cualquier causa.
2. Pacientes que hayan tenido relaciones sexuales en las 24hrs previas a su cita.
3. Pacientes con tratamientos antimicrobianos VO o IV en los últimos 3 días y en las ultimas 24hrs por vía transvaginal.
4. Pacientes con alguna complicación grave del embarazo (APP, trastornos de la coagulación)
5. Pacientes que no acepten la toma de la muestra.

E. Calculo de la muestra.

Muestra por conveniencia elegida por criterios.

F. Desarrollo.

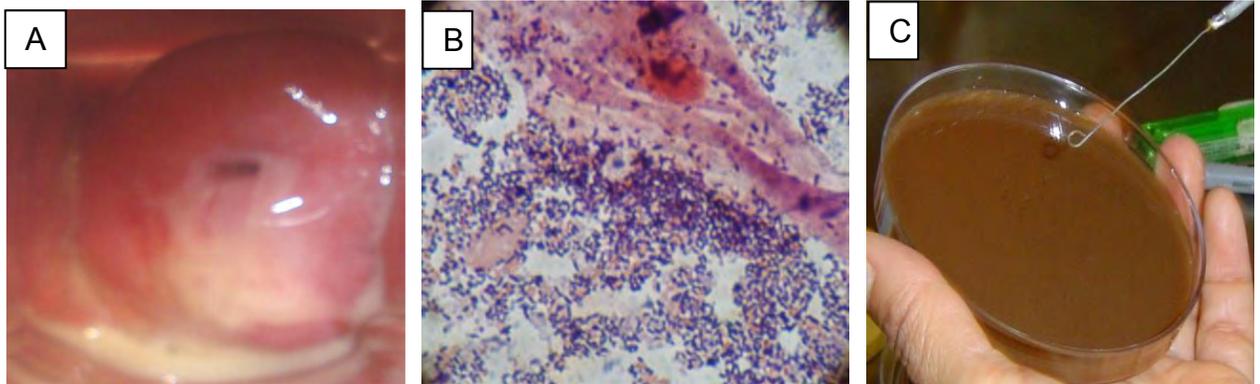
a. Material.

1. Espejos vaginales desechables.
2. Hisopos de algodón.
3. Tubos con medios de transporte Stuart para las muestras.
4. Laminilla con frote en fresco de exudado cervicovaginal.
5. Cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina.
6. Agar sangre de carnero.
7. Agar chocolate.
8. Agar sangre humana.
9. Agar papa dextrosa.
10. Microscopio óptico (Carl Zeis, *Axiostar Plus*).
11. Reactivos sistema API ® 20 A bioMérieux ® SA París Francia.

b. Método.

El estudio se llevó en 5 fases, en la primera fase se realizó la toma de muestras de las pacientes embarazadas que acudieron al laboratorio de microbiología para realización de estudios cervicovaginales, a las cuales previa colocación de espejo vaginal desechable se procedió a realizar la toma de sus estudios solicitados más una laminilla con frote directo de la secreción cervicovaginal y un hisopo extra el cual se colocó en medio de transporte Stuart, se fijó la laminilla de vidrio al calor y posteriormente se le realizó tinción de Gram (Anexo 1) para después interpretar mediante microscopía óptica con objetivo de 100x buscando alteraciones en el mismo utilizando los criterios de Nugent (Anexo 2), los que completaron una puntuación de 4 a 6 (alteraciones intermedias) y de 7-10 (VB) interpretación que se llevo en el laboratorio de microbiología bajo la supervisión de una Química Parasito Bióloga experta, se eligió la muestra de Stuart y se procedió a sembrar en placas de agar chocolate, agar sangre de carnero, agar sangre humana, y agar papadextrosa, posteriormente se dejaron incubando a 37°C en estufa en un ambiente de CO₂ al 5% durante 48h, las cuales se revisaron a las 48h. (Figura 1)

FIGURA 1

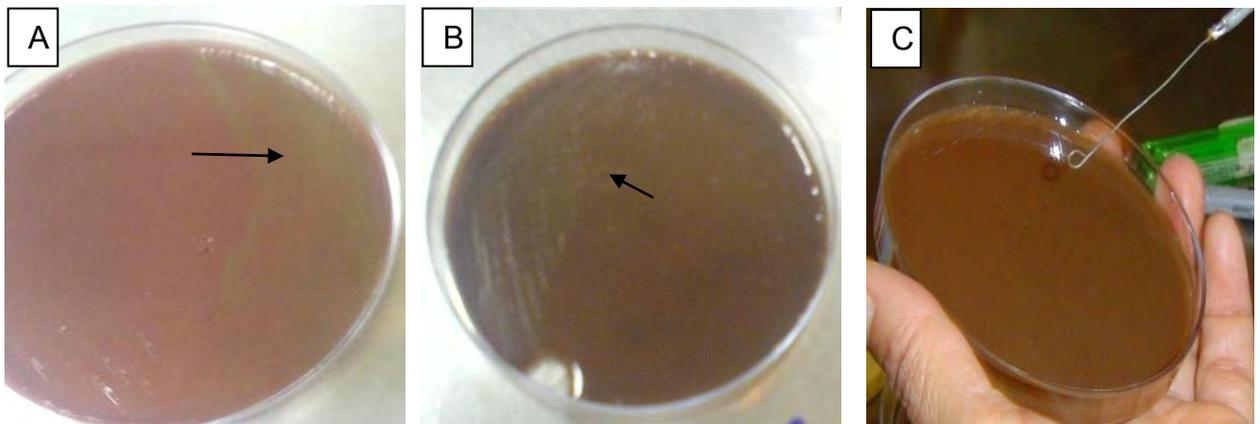


A

A. Toma de muestra cervicovaginal, B. frote teñido con tinción de Gram, C: estría en agar chocolate.

Durante la segunda fase se procedió a revisar las placas sembradas, de las que se obtuvieron crecimiento se procedieron a identificar colonias y se realizaron siembras en agar chocolate las cuales se incubaron a 37°C en estufa en un ambiente de CO₂ al 5% durante 48h. Figura 2.

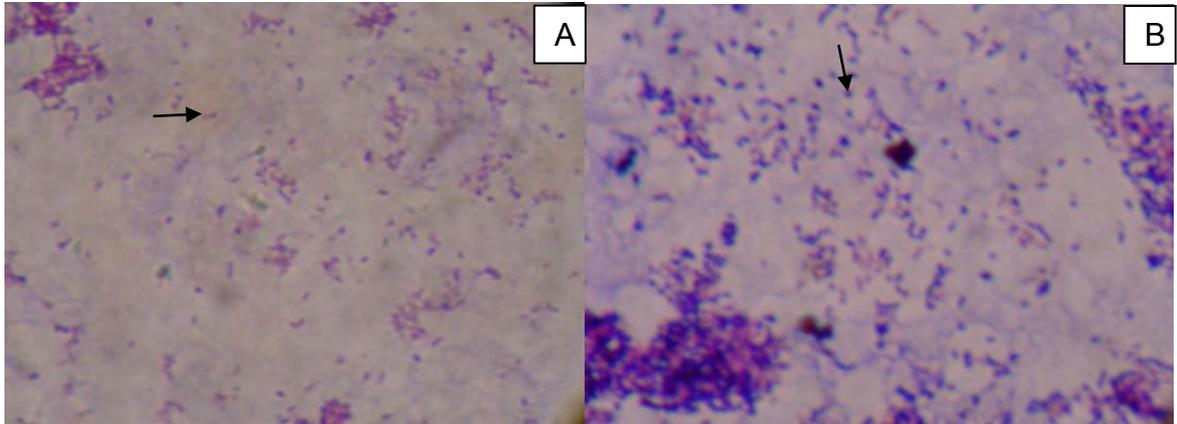
FIGURA 2



A y B crecimiento de colonias puntiformes, con bordes bien definidos, C. resiembras de las colonias en Agar chocolate por estría masiva.

Tercera fase: Una vez aisladas las diferentes morfologías coloniales se hace tinción de Gram a cada una de ellas, de las colonias que presentaron la morfología de cocobacilos grampositivos (CBGP). FIGURA 3.

FIGURA 3.

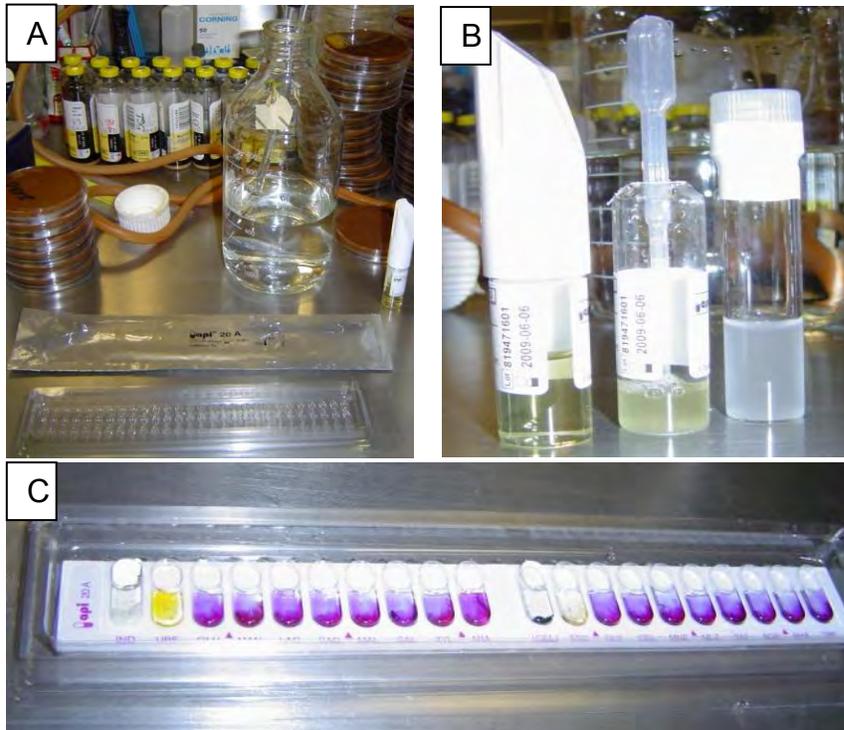


A y B muestran frotos teñidos con tinción de Gram las cuales muestran CBGP.

Durante la cuarta fase: De las muestras que cumplieron las características descritas en la fase anterior, se les realizó la identificación mediante el Kit de sistema de identificación API ® 20 A (bioMérieux ®) SA, Paris Francia.

El sistema es inoculado con una suspensión bacteriana, ajustada al 3 de MacFarlan, el panel se mete a una cámara húmeda, se incuba a 37°C en una estufa de CO₂ y se lee en 48hrs; Si el microorganismo coincide con las pruebas características de *Atopobium vaginae* se da como positivo y si no con ayuda de las tablas de identificación incluidas en el sistema se identifica el microorganismo. Figura 4 y Anexo 3.

FIGURA 4.



A. Equipo para Identificación bioquímica. B. muestra ya preparada al punto 3 de MacFarland. C. muestra aplicada al sistema API 20.

En la quinta fase de las muestras que no cumplieron la morfología de CBGP, se procedió a realizar la identificación por métodos diferentes (HNYD y tubo germinativo).

III. RESULTADOS.

Del 1° de Noviembre de 2008 al 30 de junio del 2009 se tomaron 1576 muestras de pacientes embarazadas, de las cuales 250 muestras cumplieron con los criterios de Nugents. 85 muestras (34.0%) correspondieron a pacientes de entre 10-20 años, 79 muestras (31.6%) fueron de pacientes de 21 a 30 años, 75 muestras (30.0%) de 31-40 años, y 11 muestras (4.4%) de 41-50 años, como se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1.

EDAD

Intervalo	Frecuencia	Porcentaje
10-20	85	34.0
21-30	79	31.6
31-40	75	30.0
41-50	11	4.4
Total	250	100.0

La edad gestacional de las pacientes fue de 22 pacientes (8.8%) primer trimestre, 109 (43.6%) segundo trimestre y 119 (47.6%) tercer trimestre, como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2.

SEMANAS DE GESTACION.

Intervalo sem.	Frecuencia	Porcentaje
1-13	22	8.8
14-26	109	43.6
26-40	119	47.6
Total	250	100.0

De las 250 muestras que cumplieron los criterios de Nugents 186 (74.4%) se calificaron con una puntuación de 4-6 y 64 (25.6%) con una puntuación de 7-10, las cuales variaron en los diferentes grupos de edades y trimestres de gestación como se muestra en el cuadro 1 y Grafica 1.

De las 250 muestras que cumplieron los criterios del estudio para vaginosis bacteriana solo 31 muestras (12.4%) presentaron crecimiento de BGP por lo que estas cantidad de muestras fueron sometidas a sistema de identificación API ® 20A (bioMérieux ® SA Paris Francia), método utilizado para aislamiento de anaerobios estrictos.

De las 250 muestras 9 (3.6%) corresponden a una calificación de Nugent de 4-6 puntos y 22 (8.8%) a Nugent de 7-10 puntos como se muestra en el cuadro 2.

CUADRO 1.

EDAD, SEMANAS DE GESTACION Y CRITERIOS DE NUGENTS

Count			S.E.G			Total
C.N			1-13	14-26	26-40	
4-6	EDAD	10-20	2	30	35	67
		21-30	5	31	25	61
		31-40	8	22	22	52
		41-50	0	1	5	6
		Total	15	84	87	186
7-10	EDAD	10-20	0	6	12	18
		21-30	3	6	9	18
		31-40	4	13	6	23
		41-50	0	0	5	5
		Total	7	25	32	64

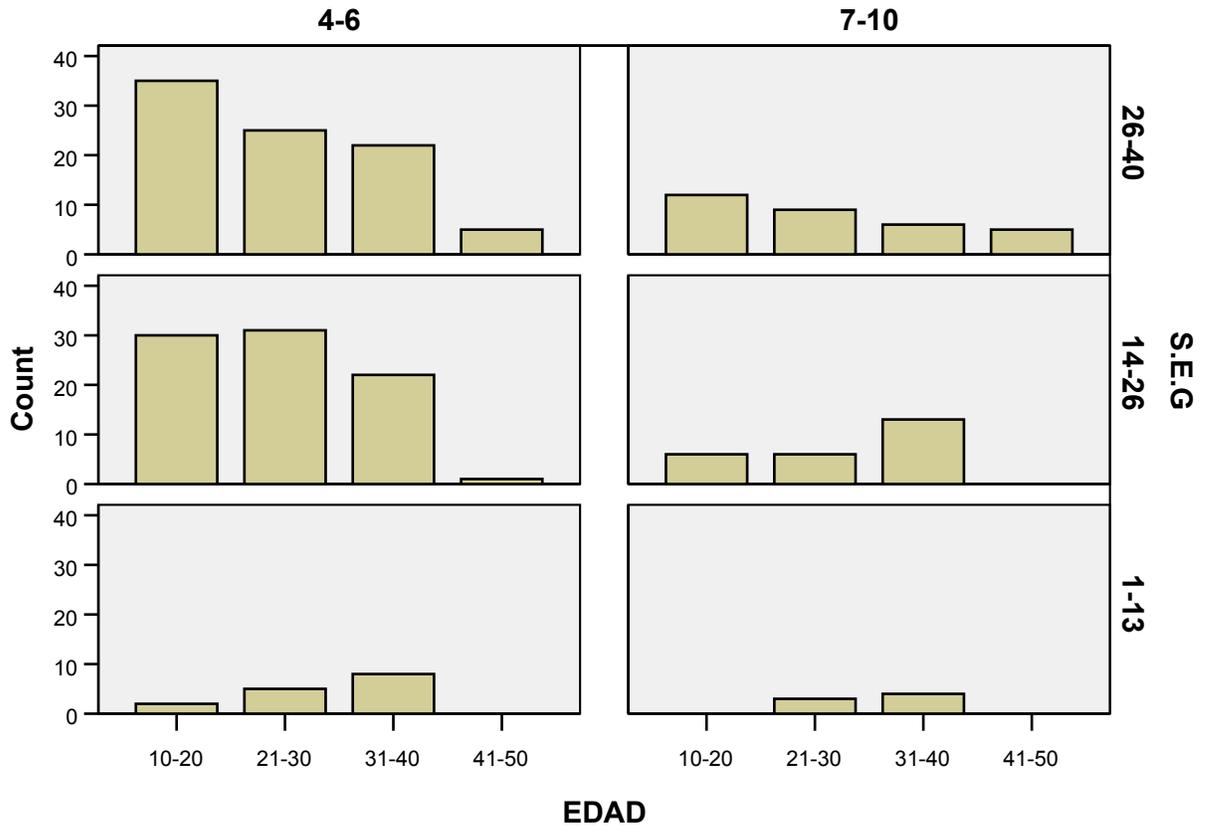
S.E.G: Semanas de gestación.

C.N: Criterios de Nugent.

GRAFICA 1

EDAD, SEMANAS DE GESTACION Y CRITERIOS NUGENTS

C.N



S.E.G. Semanas de Edad Gestacional.

Grafica que muestra la relación entre las semanas de edad gestacional y los criterios de Nugent y la edad de las pacientes incluidas en el estudio.

CUADRO 1

SEMANAS DE GESTACION, CRITERIOS NUGENT Y API

API			C.N		Total
			4-6	7-10	
SI	S.E.G	1-13	5	3	8
		14-26	7	10	17
		26-40	2	14	16
	Total	14	27	41	
NO	S.E.G	1-13	10	4	14
		14-26	77	15	92
		26-40	85	18	103
	Total	172	37	209	

S.E.G: Semanas de gestación.

C.N: Criterios de Nugent.

API: Prueba de Identificación Bioquímica.

Las bacterias aisladas por sistema de identificación bioquímica API ® 20 A (bioMérieux ® SA) Paris, Francia, en las 250 muestras de pacientes con VB fueron: *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptoestreptococcus*, y *Veillonella parula*. Como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3
MICROORGANISMOS AISLADOS POR SISTEMA API® 20 A.

MICROORGANISMO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Negativo</i>	24	58.53
<i>Eubacterium lentum</i>	5	12.19
<i>Peptoestreptococcus</i>	6	14.63
<i>Veillonella parvula</i>	2	4.87
<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Eubacterium lentium</i>	3	7.31
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Peptoestreptococcus</i> ,	1	2.43
Total.	41	100

De las 41 muestras se aislaron por medio de tubo germinativo *Candida albicans* en 2 muestras y *Candida sp.* en otras 2, y por Sistema de identificación HNID® Reino Unido; se aisló *Gardnerella vaginalis* en todas las muestras.

No se encontró ningún aislamiento positivo para *Atopobium vaginae* en las muestras analizadas.

IV. DISCUSION.

La asociación de infecciones vaginales, cervicales y embarazo ha sido documentada desde hace muchos años, se ha relacionado con trabajo de parto prematuro de un 5-10%, también se han relacionado con ruptura prematura de membranas y en amnioitis con membranas integra. ^{12,13}

En el Instituto Nacional de Perinatología el 20% de las muestras tomadas en el laboratorio de microbiología corresponden a pacientes embarazadas con sospecha de VB.

La prevalencia de VB en mujeres embarazadas varía de acuerdo a las poblaciones estudiadas. Entre mujeres en cuidados prenatales de rutina en Scandinavia se ha reportado de 8% (24-34 semanas) a 23.7% (8-17 semanas), en Estados Unidos de 16 % (23-26 semanas) a 42% (22-24 semanas) en un establecimiento de alto riesgo, en Japón 13.6%, en Indonesia 18% (14-26 semanas), en Australia 26.5% (16-26 semanas) y en Africa 51% (edad gestacional no estadificada). ²⁶

En México, un estudio realizado en mujeres de bajo riesgo reveló una prevalencia de VB del 32% en la población en general y de 15-30% en mujeres en edad reproductiva. ^{27,28}

El grupo de pacientes incluidas en nuestro estudio reportamos una frecuencia de VB de 16.02% de los cuales 8.8% se presentó en el primer trimestre, 43.6% en el segundo trimestre y 47.6 % en el tercer trimestre, semejante a lo reportado en la literatura mundial en establecimientos de alto riesgo.

En los años recientes, se han incluido en la literatura médica algunos microorganismos que hasta hace poco eran desconocidos o que se mencionaban muy rara vez, uno de ellos es *Atopobium vaginae* que es un Bacilo Gram Positivo que produce ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico), fermentadores de la glucosa, que se agrupan en pares o en pequeñas colonias y son anaerobios facultativos, el cual se ha detectado y asociado como uno de los participantes de la VB, y en abscesos tubo-ováricos posterior a una fertilización *in vitro*. ^{15,29}

En nuestro estudio del 16.2% de pacientes que cubrieron los criterios de Nugents para VB en ninguna de las muestras se aisló *A. vaginae* por sistema de identificación bioquímica API ® 20 A (bioMérieux ® SA Paris Francia).

A. vaginae tiene un significado clínico desconocido y la importancia que cobra su investigación es que en aislamientos descritos en los casos de absceso tubo-ovárico reportan que fueron encontrados a ser altamente resistente a metronidazol.⁵

En nuestro país no se cuentan con estudios donde se haya aislado este microorganismo, y tampoco de su significado clínico, en Estados Unidos se ha detectado a *A. vaginae* recientemente por medio de la reproducción del rRNA-gene 16S por análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción del gene del rRNA 16S (T-RFLP), por PCR específico, desnaturalizando el fragmento por electroforesis.^{16,30}

Se ha encontrado una fuerte asociación entre diferentes bacterias como *G. vaginalis* y *Bacteroides*, especies de *Prevotella* y *Mobiuncus* y *Atopobium vaginae* como productores de VB, en estudios recientes utilizando métodos moleculares.

En nuestro estudio los microorganismos aislados por sistema de identificación bioquímica API ® 20 A (bioMérieux ® SA Paris Francia), fueron: *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptoestreptococcus*, *Veillonella parvula*, *Candida albicans*, y *Candida sp* todos asociados a *G. vaginalis*.

III. CONCLUSIONES.

- 1.El porcentaje de VB encontrada el grupo de pacientes estudiadas fue de 16.02% de los cuales 8.8% se presentó en el primer trimestre, 43.6% en el segundo trimestre y 47.6 % en el tercer trimestre.
- 2.La frecuencia de VB con criterios de Nugents de 4-6 fue de 74.6% y con criterios de 7-10, 25.6%.
- 3.Por el método de sistema de identificación API ® 20 A (bioMérieux ® SA Paris Francia), no se identifico *Atopobium vaginae* en las muestras estudiadas en el Instituto Nacional de Perinatología.
- 4.Los microorganismos aislados fueron *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptoestreptococcus*, *Veillonella parvula*, *Candida albicans*, *Candida sp* y todos asociados a *G. vaginalis*.
- 5.Es necesario la utilización de otros métodos diagnósticos (Reacción en cadena de la polimerasa) para la identificación de *A. vaginae* por considerarlo un microorganismo de difícil crecimiento en medios de cultivo.

III. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Schwiertz A, Taras D, Rusch K, Rusch V, Thriwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints?, *Ann Clin Microb Antimicrob*, 2006;5:1-7.
2. Casanova RG *Vaginosis Bacteriana En: Infecciones de Transmisión Sexual*, Casanova RG, Ortiz IFJ, Reyna FJ (ed) México DF, Editorial Alfil, 2004:163-180
3. Ferris M, Masztal A, Aldridge K, Fidel P, Martin D, Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis, *BMC Infect Dis*, 2004;4:1-2
4. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, Vaneechoutte M, Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae* *BMC Infect Dis* 2006;6:1-6.
5. Bradshaw C, Tabrizi S, Fairley C, Morton A, Rudland E, and Garland S, The Association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with Bacterial Vaginosis and Recurrence after Oral Metronidazole Therapy, *JID*, 2006;194:828–36.
6. Flynn RO, Bacterial vaginosis: many questions-any answer?. *Curr Opin Pediatr*, 2005; 17:473-9.
7. Tabrizi SN, Fairley CK, Bradshaw CS, Garland SM. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in Virginal Women, *Sex Transm Dis*, 2006; 33:663-5.
8. Koumans EH, Markowitz LE, Hogan V. Indications for Therapy and Treatment Recommendations for Bacterial Vaginosis in Nonpregnant and Pregnant Women: A Synthesis of Data; *CID* 2002;35 (2):152-171.
9. Romanik M, Friedek D, Wojciechowska-Wieja A, Martirosian G. *Atopobium Vaginae*: Characterization and association with pathogenesis of bacterial vaginosis, *Ginekol Pol*, 2006;77: 398-403.
10. Haggerty C, Hillier S, Bass D, Ness R. Bacterial Vaginosis and Anaerobic Bacteria Are Associated with Endometritis, *CID*, 2004;39:991-95.
11. Murtha A, Sinclair T, Hauser E, Swamy G, Herbert W, Heine R. Maternal Serum Cytokines in Preterm Premature Rupture of Membranes, *Obstet Gynecol*, 2007;109(1):121-7.

12. Canavan T, Simhan H, Cartis S. An Evidence-Based Approach to the Evaluation and Treatment of Premature Rupture of Membranes: Part I, *Obstet Gynecol Surv.* 2004;59(9):669-76.
13. Canavan T, Simhan H, Cartis S. An Evidence-Based Approach to the Evaluation and Treatment of Premature Rupture of Membranes: Part II, *Obstet Gynecol Surv.* 2004;59(9):678-89.
14. McCormack WM. Vulvovaginitis y cervicitis En: *Enfermedades Infecciosas Principios y Practica*; Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (ed) 6ª edición, Editorial Elsevier Churchill Livingstone 2006;2:1365-7.
15. Rodriguez J, Collins M, Sjöden B, Flasen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *IJSystem Bacter*, 1999;49:1573-76.
16. Ferris M, Masztal A, Martin D, Use of Species-Directed 16S rRNA Gene PCR Primers for Detection of *Atopobium vaginae* in Patients with Bacterial Vaginosis, *J Clin Microbiol*, 2004;42(12):5892-94
17. Geißdörfer W, Böhmer C, Pelz K, Schoerner F, Bogdan Ch. Tuboovarian Abscess Caused by *Atopobium vaginae* following Transvaginal Oocyte Recovery, *JCM*, 2003;41(6):2788-90.
18. Burton J, Devillard E, Candieux P, Hammond J, Reid G, *Detection of Atopobium vaginae* in Postmenopausal Women by Cultivation-Independent Methods Warrants Further Investigation, *JCM*, 2004;42(4):1829-31.
19. Casanova RG *Atopobium vaginae* y *Candida glabrata* En: *Clinicas de Perinatología y Reproducción Humana*, Pérez PG, Ortiz IJ (ed) México DF, Elsevier:117-122.
20. Lata S. Avances de la Bacteriología Médica el Sistema API, *Rev Med Hond*, 1995; 63(2):79-80.
21. Summanem P, Jousimies H. Comparative Evaluation of Rapid ANA and API 20A for identification of Anaerobic Bacteria, *J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998;7(6):771-75.
22. Murray P, Weber C, Niles A. Comparative Evaluation of Three Identification Systems for Anaerobes, *JCM*, 1985;22 (1):52-5.
23. Appelbaum P, Kufmann C, Keifer J, Venbrux H. Comparison of Three Methods for Anaerobe Identification, *JCM*, 1983;18(36):614-21.

24. Flores R, Rivera R, García E, Arriaga M. Etiología de la infección cérvicovaginal en pacientes del Hospital Juárez de México, *Sal Púb Méx*, 2003; 45(5):694-97.
25. Toca L, Becerril A, González Z. Prevalencia de vaginosis bacteriana en amenaza de parto prematuro, *Asoc Mex Bioq Clín*, AC 2004;29(1):100-1.
26. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Bacterial Vaginosis in Pregnancy to Prevent Preterm Delivery: Recommendation Statement, *Ann Intern Med*, 2008;148 (3):214-39.
27. Canto-de Cetina T, Polanco L, Fernández V, Cupul G. Prevalencia de vaginosis bacteriana en un grupo de mujeres de una clínica de planificación familiar, *Gac Méd Méx*, 2002;138 (1):24-30.
28. Flores R, Martínez R, Llaca J. Prevalencia de Vaginosis Bacteriana en una Clínica Universitaria, *RESPYN*, 2003; 4:1-5.
29. Brotman R, Erbeling E, Jamshidi R, Klebanoff M, Zenilman J, Ghanem K. Findings Associated with Recurrence of Bacterial Vaginosis among Adolescents Attending Sexually Transmitted Diseases Clinics, *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2007;20:225-31.
30. Ferris M, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, Martin D. Cultivation-Independent Analysis of Changes in Bacterial Vaginosis Flora Following Metronidazole Treatment, *J Clin Microbiol*, 2007;45(3):1016-18.

III. ANEXOS.

ANEXO 1

DIAGNOSTICO DE VAGINOSIS BACTERIANA POR CRITERIOS DE NUGENT (CRITERIOS DE LABORATORIO CON TINCION DE GRAM "GOLD STANDARD")

SCORE	Morfotipos Lactobacillares	<i>Gardnerella</i> y <i>Bacteroides spp.</i> <i>Morfotipos.</i>	Bacilos curvos Gram variable.
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ o 2+
2	2+	2+	3+ o 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

La cuenta de Morfotipos son el número promedio visto con aceite de inmersión.

El menor peso se le da al a los bacilos curvos Gram variable.

Score total: Lactobacillos+ *G. vaginalis*+ *Bacteroides spp.*+ bacilos curvos. 0, no hay morfotipos presentes; 1, <1 morfotipo presente; 2, 1-4 morfotipos presentes; 3, 5-30 morfotipos presentes; 4, 30 o más morfotipos presentes. Morfotipo de bacterias son contadas y clasificadas como normal (0-3 puntos).

ANEXO 2

TINCIÓN DE GRAM.

a. DEFINICION.

Es un método de identificación de bacterias mediante una tinción específica. Desarrollado por el médico danés Hans Christian Joachim Gram en 1884.

b. INDICACIONES.

Se realiza en muestras en las que se requiere identificar la morfología celular bacteriana así como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

c. DESCRIPCION DE LA TECNICA.

1. Cubrir el frote con cristal violeta y dejarlo actuar durante un minuto. Escurrir el colorante y lavar con un chorro suave de agua.
2. Cubrir el frote con la solución de lugol durante un minuto y enjuagar con un chorro suave de agua.
3. Colocar el frote en forma vertical y decolorar añadiendo gota a gota el alcohol durante 45 a 60 segundos.
4. Cubrir el frote con safranina y dejarla actuar durante un minuto. Escurrir el colorante y lavar con un chorro suave de agua.
5. Dejar secar al aire.

d. LECTURA:

La lectura del frote se hace al microscopio, utilizando el objetivo de inmersión. Se observa el color de las células anotando el color que tienen estas (MORADO O ROJO), su forma: BACILOS O COCOS y agrupación: aisladas, en pares, en cadenas, en racimo o en tétradas.

ANEXO 3.

PRUEBAS BIOQUIMICAS QUE DISTINGUEN A *Atopobium vaginae* de otras especies de *Atopobium*.

Producción de Enzimas.	<i>A . vaginae</i>	<i>A . minutum</i>	<i>A . parvulum</i>	<i>A . rimae</i>
Fosfatasa acida	+	-	+	+
Alanina arilamidasa	-	-	+	-
Arginina dihidrolasa	+	+	-	-
Arginina arilamidasa	+	+	+	-
Histidina arilamidasa	+	-	-	-
β-Galactosidasa	-	-	+	-
Leucina arilamidasa	+	-	+	-
Prolina arilamidasa	+	+	-	-
Acido piroglutamico arilaminidasa	-	v	+	+
Glycine arylamidase	+	-	+	-
Serina arilamidasa	+	-	-	-
Tyrosina arilamidasa	-	-	+	-

International Journal of Systematic Bacteriology, 1999.