



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INCIDENCIA DE HAEMOPHILUS VAGINALIS (CORYNEBACTERIUM VAGINALE) COMO CAUSANTE DE VAGINITIS Y CERVICOVAGINITIS.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

MARIA GEORGINA RAMOS OCHOA



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Prof. Oscar Amor Dodero.

VOCAL Prof. Leonor Martínez Soto

SECRETARIO Prof. Eida Peniche Quintana.

1er SUPLENTE Prof. Olga Velázquez - Madrazo.

2do SUPLENTE Prof. Marisol López López.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

U.N.A Facultad de Química.

SUSTENTANTE:

María Georgina Ramos Ochoa.

ASESOR DEL TEMA:

Prof. Leonor Martínez Soto.

A mis maestros y asesores

Prof. Oscar Amor Dodero

Prof. Leonor Martínez Soto

Prof. Eida Peniche Quintana

A mis padres

I N D I C E

INTRODUCCION.

I.- GENERALIDADES.

A).- Descubrimiento

B).- Taxonomía

C).- Descripción del género

D).- Descripción de Haemophilus vaginalis

E).- Patogenia

F).- Asociación con otros gérmenes

G).- Incidencia

II.- MATERIAL Y METODOS.

A).- Medios de cultivo

B).- Métodos de identificación

III.- RESULTADOS Y T.

IV.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

V.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

El objeto de este estudio es conocer la incidencia con que se presenta el organismo Haemophilus vaginalis en vaginitis y cervicovaginitis llamadas no específicas; se piensa que es el agente causante de vaginitis transmitidas venéreamente. Ha sido también asociado con uretritis no gonocócica, fiebre puerperal y leucorrea.

Este organismo puede ser de gran importancia, sin embargo casi nunca es aislado e identificado en los cultivos vaginales debido a que se requieren métodos y medios especiales para su aislamiento e identificación.

Por lo tanto se trata de aislarlo en los diferentes casos de vaginitis y cervicovaginitis y, entre los diversos agentes causantes de éstas, ver cual es la incidencia de Haemophilus vaginalis.

I.- GENERALIDADES.

A).- Descubrimiento.

El organismo Haemophilus vaginalis fue descrito primeramente por Leopold (14) en 1953, trabajando en Estados Unidos, quien reportó el aislamiento de pequeños bacilos anaerobios Gram negativos en la orina de 53 de 965 hombres con prostatitis leve y en 16 de 58 muestras cervicales en casos de cervicitis; pero no procuró hacer un aislamiento directo de la uretra.

Leopold (14) sugirió una estrecha relación de este organismo con el género "HAEMOPHILUS" pero no dió nombre a su especie.

Hasta 1953 pocos autores habían mencionado la presencia de un bacilo anaerobio Gram negativo en la vagina, con la excepción de bacilos coliformes y bacilos Ducreyi.

En 1944, Peoo (14) mencionó haber descubierto muchos "diplococos" pequeños Gram negativos en casos de uretritis masculina.

Leibovitz (14) describió un organismo que estaba asociado con una alta incidencia de lesiones exteriores en genitales masculinos en las tropas americanas en Japón (1951-1952), el cual tenía gran número de características que lo hacían similar a Haemophilus vaginalis.

Hughes y Carpenter (14) describieron un bacilo pequeño Gram negativo no identificado en algunos estudios bacteriológicos-

de secreciones de 216 pacientes con uretritis masculina, todos diagnosticados clínicamente como "gonorrea resistente a penicilina". Estos quizá pudieron ser casos de uretritis por Haemophilus vaginalis.

Los franceses Lutz y Murch (9) en 1954, observaron que numerosos bacilos pequeños Gram negativos se presentaban en muchos casos donde había flora vaginal mixta.

Gardner y Dukes (10) en 1954-1955, en Texas, describieron éste organismo que según ellos era la causa de un 90% de vaginitis de las llamadas "no específicas, y lo llamaron Haemophilus vaginalis. Ellos caracterizaron la asociación del organismo con el epitelio vaginal.

Haemophilus vaginalis parasita la superficie de las células epiteliales vaginales de acuerdo con estos investigadores.

La formación resultante de células epiteliales con muchos bacilos ligados a la superficie constituye las "células de inditio" o "células en ovillo" de Gardner y Dukes (9), cuando se observa la preparación en fresco del exudado vaginal.

Los bacilos no se ven muy claramente en preparaciones teñidas debido quizá a la Gram negatividad tanto de células epiteliales como de las bacterias que las parasitan.

La característica más marcada, es la gran cantidad de bacilos libres en el exudado, adyacentes a las células epiteliales-

y a los leucocitos presentes.

Dunkelberg (6) propone llamar a ésta característica, de acuerdo a la asociación entre células epiteliales y Haemophilus vaginalis, "organismos GDSP" que significa "frotis fenómeno de Gardner y Dukes".

Puede observarse fácilmente en montajes y tinciones de material clínico apropiado.

Sin embargo, Haemophilus vaginalis no es una causa primaria de uretritis masculina o bien ocurre secundariamente con otros factores etiológicos que aún no han sido determinados. Cuando ocurre en uretritis masculina se observa en el frotis el "fenómeno de Gardner y Dukes" (6) idéntico al que se observa en pacientes femeninos.

Amies y Jones, Ray y Maughan (9), en 1956 reportaron en Oregon, Estados Unidos, los resultados de una investigación en 447 mujeres, de las cuales 68 (15.2) tenían Haemophilus vaginalis.

Reportaron también frotis de secreción uretral de hombres como "positivos para Haemophilus vaginalis".

En 1956, Lutz, Murch y Grooten (9) reportaron que el microorganismo crecía en agar sangre de carnero dando una pequeña colonia hemolítica y lo nombraron "Haemophilus vaginalis hemolyticus". Brewer, Halpern y Thomas (9) en 1957, reportaron una investigación en 211 casos ginecológicos, de los cuales 89 mostraron H. vaginalis.

B).- Taxonomía.

Zinnemann y Turner (6) acordaron que el organismo Haemophilus vaginalis era una especie de Corynebacterium.

Reyn, Birch-Andersen y Lepage (6) investigaron la ultraestructura de Haemophilus vaginalis y creyeron que estaba más estrechamente relacionada al género Corynebacterium o Butyribacterium que al Lactobacillus o Haemophilus.

La descripción y clasificación de Haemophilus vaginalis - está basada en el concepto de que el organismo requiere sangre o factores de suero para su crecimiento.

De acuerdo con el "Subcomité de la Taxonomía de Haemophilus", ningún organismo puede ser admitido en el género a menos que requiera hemina (factor X), NADH (factor V) u otras sustancias coenzimáticas.

El organismo fue originalmente cultivado en agar sangre y clasificado como Haemophilus vaginalis; pero se ha demostrado que este organismo no puede ser un miembro legítimo de la familia Haemophilus pues no requiere de ninguno de los factores antes mencionados.

Los nombres Propionibacterium y Butyribacterium han sido excluidos porque los productos terminales de fermentación no son apropiados.

El género Acetobacter pudo ser excluido porque Haemophi -

lus vaginalis no se cultiva en medio que contenga 10% de alcohol etílico.

No se incluye en el género Lactobacillus debido a morfología y tinciones.

Zinnewann y Turner (6) propusieron que la designación Corynebacterium vaginale era la más apropiada, basados en morfología y tinción de Gram.

Su tesis está fuertemente apoyada por el descubrimiento de Ryan y asociados (9) de que Haemophilus vaginalis tiene pared celular septada, más parecida a los organismos Gram positivos que a los Gram negativos.

En principio se pensó que Haemophilus vaginalis era predominantemente Gram negativo, pero hay un constante descubrimiento de algunos Gram positivos.

Un problema muy importante que aún queda es la reacción negativa a catalasa.

Bred y asociados (6) plantean que todas las especies descritas de Corynebacterium son catalasa positiva, y esto excluiría a Haemophilus vaginalis, el cual es catalasa negativa.

Skerman (6) no hace mención de la catalasa en su descripción del género.

Según Dunkelberg (7), la mayoría de organismos Gram positivos o Gram variable, o parecidos a difteroides no clasificados aislados por él de especímenes vaginales son catalasa negativa. El piensa que solo por la característica de catalasa, no se excluiría a Haemophilus vaginalis del género.

Bred y asociados (6) hacen una lista de otras características del género Corynebacterium:

"Son bacilos pequeños rectos o ligeramente curvos con segmentos teñidos irregularmente y algunos gránulos. Frecuentemente muestran formas agrupadas infladas, no móviles, Gram positivos, algunas células jóvenes pierden el colorante fácilmente. Gránulos invariablemente Gram positivos".

Haemophilus vaginalis reúne todos estos criterios en algún grado. Haemophilus vaginalis quizá se muestra Gram positivos y con moderada morfología Coryneforme en el aislamiento primario, pero en subcultivos en medio sin suero, la Gram negatividad se incrementa y la morfología Coryneforme se vuelve mínima. La catalasa es negativa.

Edmunds (9) reportó que algunas muestras aisladas de Haemophilus vaginalis fueron positivas para peroxidasa; en cambio Dunkelberg (7) reportó que todas sus muestras fueron negativas para la misma prueba.

Vickerstaff y Cole (6) examinaron 4 de las muestras de Edmunds (GP1, GP2, GP6, GP7) y la muestra tipo 594 (NATC 10287) para -

reacciones bioquímicas y componentes de la pared celular.

La muestra GP1 no fermentó maltosa, dextrosa ni almidón, lo cual puede indicar que no puede ser un aislado de Corynebacterium vaginale.

Las muestras GP2 y GP7 produjeron catalasa, por lo tanto tampoco pueden ser Corynebacterium vaginale.

El análisis de la pared celular reveló que una de cada muestra de Corynebacterium hoffmani, Corynebacterium xerosis y Corynebacterium diptheriae contienen ácido diaminopimélico y arabinosa, -- mientras que las muestras GP6 y 594 no contenían ninguno de los anteriores. La 594 contenía 6-dioxilactosa en común con algunas muestras de Corynebacterium cervix.

Dunkelberg (6) reconoce el análisis de la pared celular aplicado a la taxonomía pero mantiene que el género Corynebacterium -- está compuesto por organismos cuya principal relación es morfológica -- antes que bioquímica.

Zinnesmann y Turner (6) han recomendado reclasificación de Corynebacterium vaginale en bases a morfología y propiedades de coloración. Debido a que tienden a la ambivalencia con la tinción de Gram, ellos sugirieron que era el género Corynebacterium, pero han aceptado el nombre Haemophilus vaginalis.

Hasta que la cuestión de la taxonomía de éste organismo --

haya sido resuelta satisfactoriamente, continuaremos usando el nombre comunmente aceptado de Haemophilus vaginalis.

C).- Descripción del género "Haemophilus".

Son parásitos estrictos, crecen solo con la presencia de ciertas sustancias accesorias de crecimiento. La mayoría de los miembros de este género son habitantes normales de membranas mucosas del tracto respiratorio superior del hombre. Pueden causar invasiones primarias y secundarias.

Son causa común de sinusitis, conjuntivitis, epiglotitis-aguda, laringitis obstructiva, neumonía, meningitis.

Ocasionalmente responsables de endocarditis bacteriana subaguda.

Una especie, Haemophilus ducreyi, es el agente etiológico del chancro.

Han sido descubiertos en expectoración, fluido cerebrospinal, sangre y muestras tomadas directamente de lesiones.

Son bastoncitos diminutos Gram negativos, algunas veces - casi cocoides, pleomórficos.

Pueden mostrar manchas bipolares.

No móviles.

No esporulados.

Las cápsulas, si se ven están deformadas.

Aerobios o anaerobios facultativos.

Necesitan factores V y X para su crecimiento.

Crece en Agar sangre de conejo y cuyo.

Crecen en Agar enriquecido de Fildes o Agar de Levinthal-
(BBL).

pH óptimo.- 7.6.

Temperatura óptima.- 37°C.

Rango de temperatura de crecimiento.- 25 - 40°C.

Las colonias son no pigmentadas, iridiscentes, mucoides, -
translúcidas y opacas.

La mayoría de las especies muestran "satelitismo" con *Es-*
tafilococo y *Neisseria*.

Tienden a autolisarse.

Haemophilus ducreyi es la especie que presenta más difi-
cultades de cultivo, logrando desarrollo cuando se incrementa la can-
tidad de CO₂.

Características bioquímicas.- Tienen reacciones variables
de fermentación.

Produce nitritos de nitratos (excepto *Haemophilus ducreyi*).

Producción de indol variable. Dos especies hemolizan san-
gre.

Identificación serológica.- Puede deformarse la cápsula -
de *Haemophilus influenzae* y son identificadas por hinchamiento capsu-
lar o pruebas de precipitina.

No se utilizan pruebas de patogenicidad en animales.

Son 7 las especies de Moraxilla comunmente
aisladas en el hombre:

Especie	Se aísla de
<u>H. influenzae</u> <u>H. parainfluenzae</u> <u>H. hemolyticus</u> <u>H. parahemolyticus</u>	Expectoración bronquial
<u>H. influenzae</u>	Fluido cerebroespinal, orina
<u>H. aegypticus</u>	Conjuntiva
<u>H. influenzae</u>	Sangre, pus
<u>H. aphrophilus</u>	Sangre, pus
<u>H. ducreyi</u>	Lesiones chancroides

Reacciones de las especies de Haemophilus y
factores accesorios de crecimiento.

Organismo	Factor de crecimiento		Reacción		
	X	Y	Indol	Nitrato	Hemólisis
<u>H. influenzae</u>	•	•	• o -	•	-
<u>H. parainfluenzae</u>	-	•	• o -	•	-
<u>H. segypticus</u> *	•	•	-	•	-
<u>H. haemolyticus</u>	•	•	• o -	•	•
<u>H. parahemolyticus</u>	-	•	• o -	•	•
<u>H. aphrophilus</u>	•	-	-	•	-
<u>H. ducreyi</u>	•	-	-	-	leve

* hemaglutina células rojas fuertemente, Haemophilus influenzae produce hemaglutinación moderada.

• requiere factor X solamente cuando crece bajo incremento de CO₂.

D).- Descripción de Haemophilus vaginalis.

Bacilos de 0.3 a 0.6 por 1.0 a 2.0 micras de largo. Mejor descritos como cocobacilos.

Las formas agrupadas se presentan en grado moderado.

No móviles.

Predominantemente Gram negativos pero pueden tener Gram variable.

Algunas veces Gram positivos en especímenes mucoides clínicos y cuando se cultivan en presencia de suero.

La pared celular septada es más parecida a la de organismos Gram positivos.

No encapsulados.

No esporulados.

Facultativos.

Sacarolíticos.

Crecen usualmente con incremento de CO₂.

Temperatura máxima de crecimiento.- 36 - 37°C.

pH óptimo.- 6.5

No tienen acción en gelatina.

Prueba positiva en rojo de metilo (si se prueba la muestra en un buen cultivo en caldo dextrosa).

No se sabe que produzcan H₂S.

No produce indol.

No produce acetilmetilcarbinol.

No oxida el etanol.

No digiere celulosa.

No forma almidón a partir de maltosa.

No produce nitritos a partir de nitratos.

Crecen en presencia de KCN.

Algunas muestras reducen levemente la leche torriacol.

catalasa negativa.

Peroxidasa variable.

Ureasa negativa.

Muestran anillos de inhibición en Agar-Peptona si se coloca una gota de H_2O_2 en el centro de la caja.

Crece en presencia de 0.01% de Telurito de potasio pero no lo reduce.

Algunas células muestran uno o más gránulos de volutina - por la tinción de Albert.

La mayoría de las células muestran cuerpos centrales y - subterminales por tinción de Burdon (2). Esta es negativa después de lavar las células con solventes.

Tienen requerimientos particulares de Proteosa-peptona, - Nitrógeno-Vitaminas y bases de purina-pirimidina.

No requiere hemina (factor X).

No requiere NAD (factor V).

No requiere sangre, suero o sustancias parecidas a coenzimas.

Pueden requerir 5 vitaminas del complejo B: Tiamina, Riboflavina, Acido nicotínico, Acido fólico y Biotina; y una o más bases-
Acidos nucleicos.

No requiere aminoácidos para su crecimiento.

Fermentan dextrosa, maltosa, dextrina y glicógeno con producción de ácido pero no de gas.

Algunas muestras producen ácido debilmente en: arabinosa, xilosa, ramosa, levulosa, galactosa, inulina, glicerol y sacarosa.

No actúan sobre: lactosa, manitol, trealosa, rafinosa, se
licina, inositol, sorbitol y dulcitol.

El principal o único producto volátil que se obtiene a -
partir de dextrosa, maltosa y almidón es el ácido acético.

En diferentes medios la morfología colonial puede ser dis
tinta: En medio de almidón las colonias aparecen blancas, compactas, -
con bordes enteros, convexas, de 0.5-2.0mm. de diámetro y no crecen -
dentro del agar.

En agar sangre las colonias aparecen sin color o ligera -
mente grises, enteras, convexas, como puntos de alfiler y variablemen
te reportadas como del tipo alfa, beta hemolíticas o no hemolíticas.

el organismo se compone por lo menos de 7 grupos antigéni
cos según pruebas de precipitina y contiene por lo menos un antigéno-
común determinado por antisuero fluorescente y pruebas de aglutina -
ción en tubo.

Forma las llamadas "células de indicio" o "células en ovi
llo" de Gardner y Dukes (10).

Según Gardner y Duker (10), Haemophilus vaginalis es la causa del mayor número de vaginitis de las llamadas "no específicas" o de las infecciones de la vagina llamadas "por bacterias mixtas".

Edmunds (9) ha descubierto una asociación entre el aislamiento de éste organismo, usualmente en grandes cantidades, y la presencia de fiebre puerperal y leucorrea.

Según Gardner (10), cualquier paciente cuya actividad ovárica sea normal, que tenga un flujo vaginal homogéneo, gris, maloliente, con pH entre 5.0 - 5.5, solo ocasionalmente espumosa y que no presente Trichomona vaginalis, es probable que tenga una vaginitis por Haemophilus vaginalis.

Los síntomas irritativos y cambios de espesor, semejantes al eritema en tejido vulvovaginal se observan muy raramente, ya que el organismo parasite en la superficie y no invade tejido vivo.

Se piensa también que Haemophilus vaginalis es el causante de vaginitis causadas venéreamente. Puede descubrirse asimismo en muestras uretrales de hombres sospechosos de padecer gonorrea (asociado a uretritis no gonocócica); en éstos casos el frotis muestra leucocitos, no así cuando se trata de mujeres.

Ha sido también aislado de sangre cuando se presenta un aborto séptico.

F).- Asociación con otros gérmenes.

Haemophilus vaginalis son pequeños microorganismos pleo -
mórficos similares a Neisseria y presentan las siguientes caracterís-
ticas en común:

- a).- Son Gram negativos.
- b).- Se presentan en grupos.
- c).- Tienen una asociación venérea.
- d).- Se presentan en secreciones uretrales.
- e).- Crecen mejor bajo incremento de CO₂.
- f).- Están íntimamente asociados con tejidos de células -
particulares del huésped.

Lutz (9) (1957) sugirió que había una estrecha relación -
entre Haemophilus vaginalis y Trichomonas vaginalis, ya que sus experi-
mentos se encontraban ambos organismos en el 28% de los casos.

En casos de fiebre puerperal, Haemophilus vaginalis está-
ocasionalmente asociado con los siguientes gérmenes patógenos:

- Streptococcus pyogenes.
- Streptococcus anaerobios.
- Haemophilus influenzae.
- Staphylococcus aureus.
- Escherichia coli.
- Strptococcus faecalis.

En muy pocos casos puede estar asociado con levaduras.

Con frecuencia está también asociado con organismos P P - L O ; (organismos parecidos a pleuroneumoniae), dependiendo del pH de la secreción vaginal, siendo ésta asociación más fuerte en el rango - de pH entre 5 - 6.5.

Las siguientes tablas de Edmunda (6) dan una idea más clara de la asociación de Haemophilus vaginalis con otros organismos:

TABLA 1

Asociación de Haemophilus vaginalis con otros patógenos reconocidos de acuerdo al grado de fiebre puerperal.

	Temperatura		
	99-99.4° F	Más de 99-99.4 ó 99.5-99.9° F	100° F ó +
No de casos	17	16	12
No de positivos para <u>Haemophilus vaginalis</u>	10(59%)	11(69%)	11(92%)
No de positivos para <u>Haemophilus vaginalis</u> asociado con otros patógenos reconocidos.	2	1	0

Otros patógenos reconocidos son:

Streptococcus pyogenes

Streptococcus anaerobius

Haemophilus influenzae

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Streptococcus faecalis

TABLA II

Relación de Haemophilus vaginalis
con otros patógenos.

	No de casos	No con <u>H. vaginalis</u>	% de positivos
<u>Trichomonas vaginalis</u> presentes	14	3	21
Levaduras presentes	18	2	11
Otros patógenos reconocidos	41	10	24
Levaduras ausentes	213	88	41

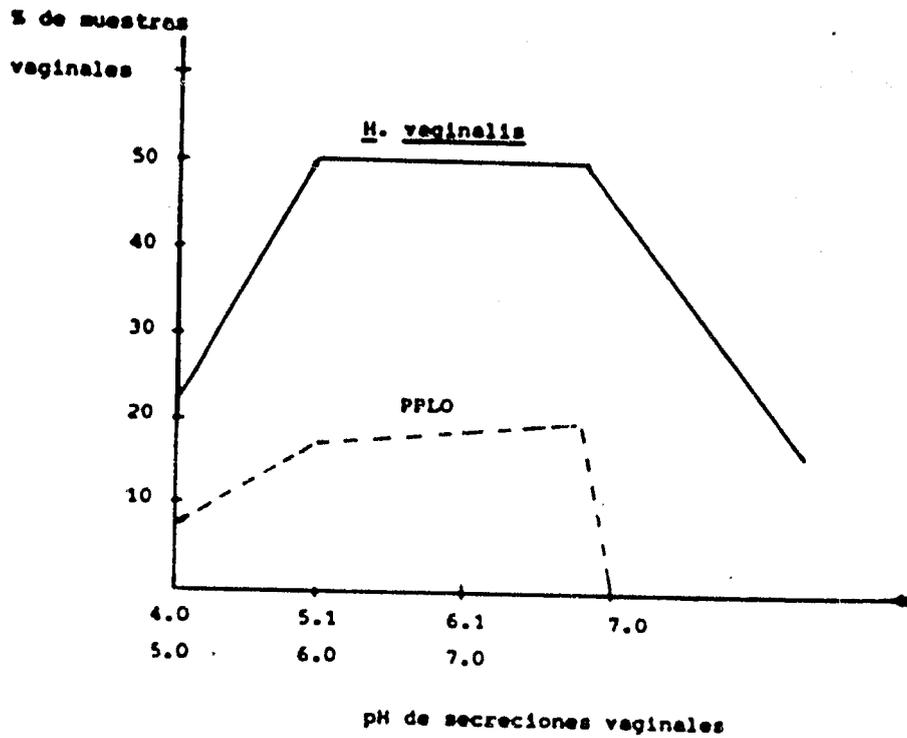
TABLA III

Relación de aislamientos de H. vaginalis y PPLO
con el pH de la secreción vaginal.

	pH			
	4.0 - 5.0	5.1 - 6.0	6.1 - 7.0	7.0
No de casos	74	46	100	8
No con <u>H. vaginalis</u>	16(21.6%)	22(48%)	47(47%)	2(25%)
No con PPLO	7(9.4%)	9(19.64%)	25(25%)	0

PPLO.- organismos parecidos a pleuroneumonias.

pH y frecuencia de aislamiento de PPLO asociado
con Haemophilus vaginalis.



G).- Incidencia.

Haemophilus vaginalis se presenta en forma considerable - mente asintomática entre mujeres, como demostró Dunkelberg (6).

Esto es una buena evidencia de que ocurre asintomáticamente en el tracto urinario inferior en un alto porcentaje de hombres.

Gardner y Dukes (10) lo cultivaron en 91 de 101 esposos - cuyas esposas estuvieron infectadas con ésta bacteria.

Las esposas tuvieron vaginitis leves pero los esposos fueron asintomáticos.

Gardner y Dukes (10) (1964-65) investigaron 602 casos obstétricos y 579 ginecológicos y de un total de 1181, el 23.9% resultaron positivos para Haemophilus vaginalis (11.3% en casos ginecológicos y 10.6% en obstétricos).

En el mismo estudio, de 138 casos diagnosticados como "vaginitis bacteriana", 92% fueron atribuidos a Haemophilus vaginalis.

Edmunds (9) estudió 240 casos de mujeres que sufrían vaginitis y los dividió como sigue:

1).- Grupo Antenatal (AN).

44 mujeres normales embarazadas, estos casos fueron tomados como casuales y consistía principalmente en mujeres con 2 1/2

a 5 1/2 meses de gestación. Todas tuvieron un leve flujo vaginal.

2).- Grupo Fiebre Puerperal (PP) :

45 mujeres cuya temperatura oral rebasaba los 99° F durante la primera semana después del parto, sin cualquier explicación obvia tales como absceso en el seno, infección urinaria, trombo - sis venosa.

3).- Grupo Control Puerperal (PC).

26 mujeres con temperatura normal en el mismo hospital constituyeron el grupo PC, su temperatura estaba por debajo de los 99° F durante la primera semana después del parto.

4).- Grupo Ginecológico (G) :

41 mujeres en edad reproductiva, quienes se atendieron en clínicas y en uno de los hospitales, sufrían de leucorrea y/o erosión cervical o cervicitis.

5).- Grupo Control Ginecológico (GC) :

42 casos de la misma categoría de las anteriores, — excepto que éstas sufrían de alguna otra condición que las antes mencionadas, usualmente de debilidad del fondo pélvico.

6).- Grupo Post-Menopáusico (PM) :

Se separaron éstos casos de los del grupo (G), debido a los cambios en secreción vaginal y flora que se presentaba en la menopausia. Las 18 mujeres de éste grupo sufrían de algunas condiciones que tiene el grupo (G).

7).- Grupo Control Post-Menopáusico (PMC) :

14 casos, al igual que en grupo PM, excepto que estos casos sufrían de debilidad del fondo pélvico.

8).- Casos Misceláneos :

6 mujeres postnatales con leucorrea, vistas seis semanas después y tres casos de muestras vaginales de niñas muy jóvenes

Fue tomada en cuenta flora tipo, células, infección por levaduras y trichomoniasis.

El diagnóstico de Haemophilus vaginalis se basó principalmente en los cultivos y no en los frotis, aunque fue posible por lo general determinar por adelantado el diagnóstico viendo el gran número de bacilos Gram negativos.

Para aislar organismos parecidos a Pleuroneumoniae (PPLO) se utilizó acetato de talio en agar sangre y acetato de talio en agar plasma.

Haemophilus vaginalis fue reconocido, después de 48-72 hs de incubación por su diminuta colonia hemolítica.

Se incluyeron solamente aquellos organismos que se definieron como Gram negativos, aunque en el frotis vaginal y más tarde en cultivos fluidos, se notó la tendencia a ser Gram positivos en algunas tinciones.

La presencia o ausencia de otros organismos también fue notada.

RESULTADOS :

El número total de aislamientos de los diferentes organismos en cultivos o su detección en frotis está dada como sigue : (excluyendo al Bacilo de Doderlain), en orden descendente de frecuencia (los porcentajes están entre paréntesis).

Durante la investigación no fueron aislados Streptococcus pyogenes o Neisseria g.

Sería visto que, aparte de Staphylococcus albus, Haemophilus vaginalis fue el organismo más común, seguido de bacilos difteroides, PPLO y otros organismos.

Se confirmó que era raro que apareciera Haemophilus influenzae en muchas muestras vaginales, solo se aisló de una mujer en edad reproductiva (un caso de fiebre puerperal).

Nombre del organismo	No de aislamientos
<u>Staphylococcus albus</u>	157 (63.6 %)
<u>Haemophilus vaginalis</u>	95 (38.1 %)
Difteroides	64 (25.9 %)
PPLD	45 (18.4 %)
Bacilos coliformes	40 (16.2 %)
<u>Streptococcus anaerobios</u> *	35 (14.2 %)
<u>Streptococcus no hemolyticus</u>	32 (12.9 %)
<u>Streptococcus faecalis</u>	18 (7.3 %)
Monilia o levaduras	15 (6.1 %)
<u>Streptococcus viridans</u>	13 (5.3 %)
<u>Trichomona vaginalis</u>	8 (3.2 %)
Bacilos anaerobios Gram (-)	7 (2.8 %)
<u>Staphylococcus aureus</u>	4 (1.6 %)
Bacilos o grupo <u>subtilis</u>	3 (1.2 %)
<u>Haemophilus influenzae</u>	2 (0.8 %)
<u>Cl. welchii</u>	1 (0.4 %)
No total de muestras examinadas	247

* Incluyendo Streptococcus microaerofilicos y Veillonella.

Incidencia comparativa en los diferentes grupos clínicos:

Hubo una alta incidencia de Haemophilus vaginalis en el grupo fiebre puerperal (PP) del 71%. Luego viene el grupo ginecológico (G) con 43%, sigue el grupo postmenopáusico (PM) con 39% y los 3 grupos control de 31-21%.

Incidencia de Haemophilus vaginalis en los diferentes grupos.

	No de casos en el grupo	No de positivos con <u>H.vaginalis</u>	% de posi- vos.
Grupo fiebre puerperal	45	32	71.1%
Grupo control	26	8	30.8%
Grupo antenatal	44	12	27.3%
Grupo ginecológico	42	18	42.8%
Grupo control ginecológico	42	9	21.4%
Grupo postmenopáusico	18	7	38.9%
Grupo control postmenopáu- sico	14	4	28.6%
	231	90	38.9%

II).- MATERIAL Y METODOS.

A).- Medios de Cultivo.

Para cultivar y aislar Haemophilus vaginalis pueden utilizarse los siguientes medios:

Medio de Mantenimiento.

Medio PSD (Peptona-almidón-dextrosa) con 0.8% de agar en tubos inclinados.

Medio Descarboxilasa.

Proteosa peptona No. 3 (DIFCO)	-----	2%
Maltosa	-----	0.7%
Aminoácidos	-----	1.0%
(L-lisina, L-arginina o L-ornitina).		
Púrpura de bromocresol (1.6%)	-----	0.6 ml/l.
Rojo de cresol (0.2%)	-----	3.0 ml/l.

El pH se ajusta a seis antes de meter a autoclave.

Medio de Telurito de Potasio.

Telurito de potasio ----- 0.01% que se añade a placas con PSD agar.

Medio para Oxidación por Etanol.

Proteosa peptona No. 3	-----	1.5%
NaCl	-----	0.5%
Alcohol etílico	-----	10.0%

El pH se ajusta a 6.8 antes de esterilizar.

El alcohol estéril se añade al medio posteriormente.

Las cajas se incuban 48 horas a 37°C para obtener crecimiento.

Medio de Fermentación.

Proteosa peptona No. 3	-----	2.0%
Púrpura de bromocresol	-----	1.0 ml/l.
Agar	-----	0.5%
Carbohidratos	-----	1.0%

(El carbohidrato se pone en autoclave en solución al 10% y se mezcla con el medio después de enfriar a 55°C).

El pH se ajusta a 6.8 antes de meter al autoclave.

Se colocan 10 ml de medio por tubo, los cuales se sellan con tapón de rosca. Después de inocular los tubos se incuban a 37°C durante 72 horas.

Medio Cianuro de Potasio.

El cianuro de potasio en solución al 0.5% se añade al caldo PSD, se ajusta el pH a 7.4 antes de esterilizar. Los tubos se incuban a 37°C durante 72 horas.

Medio de Nitrato.

Proteosa peptona No. 3	-----	1.5%
Almidón	-----	1.0%

Dextrosa	-----	0.2%
Na_2HPO_4	-----	0.1%
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-----	0.1%
KNO_3	-----	1.0%

Después de incubar, los tubos que muestren buen crecimiento se prueban diariamente durante 10 días para la presencia de nitritos con nitrato de sodio.

Como controles positivos se utilizan organismos coliformes.

Medio para H_2S .

PSD 0.8% de agar, al cual se le añade 0.8% de sulfato de sodio y 0.04% de cistina.

Se colocan tiras de papel filtro seco sobre el medio.

Después de siete días el crecimiento se coloca sobre 0.5-ml de HCl 2N para observar si se presenta liberación de H_2S .

Medio para Tolerancia de NaCl.

Se utilizan placas de PSD agar conteniendo proteosa-peptona No. 3, al cual se le añade 6.0% de NaCl.

Medio para Tolerancia a Bilis.

Se utilizan placas de PSD agar al cual se le añade 2.0% de bilis bovina deshidratada (DIFCO).

Según Dunkelberg (7), otros medios convenientes serían — los siguientes:

Medio de Transporte.

Proteosa-peptona No. 3 (DIFCO) ----- 1.5% en agua destilada.

El caldo se ajusta a pH 6.8 antes de esterilizar y se colocan 2 ml en cada tubo, los cuales se tapan perfectamente con tapón de rosca.

Medio de Aislamiento.

PSD (peptona almidón dextrosa No. 3) fue preparado por — Dunkelberg y Mc Veigh (7) para cultivo de Haemophilus vaginalis en — placa.

Proteosa peptona No. 3	-----	20 %
Almidón o fécula soluble	-----	1 %
Dextrosa	-----	0.2 %
Na_2HPO_4	-----	0.1 %
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-----	0.1 %
Agar	-----	1.5 %

Al hacer un litro, añadir fécula a 100 ml de agua fría y — mezclar.

Añadir el agua caliente conteniendo fécula a 400 ml de agua hirviendo y añadir el agua restante (500 ml) e ingredientes.

Ajustar el pH a 6.8, esterilizar por 15 minutos a 121°C , — enfriar a aproximadamente 55°C y colocar en cada placa de 20 a 25 ml.

Medio de Conservación.

El medio de conservación es el mismo que el de aislamiento, excepto que se usa 0.8% de agar. Se colocan de 6 a 10 ml dentro de los tubos y se almacena en el refrigerador.

Antes de usarse, el medio se funde en agua caliente y se inclina.

Se inocula haciendo estrías múltiples en la superficie -- del medio inclinado. Este medio se usa también para probar la presencia de catalasa.

Medio de Fermentación.

Proteosa Peptona No. 3	-----	2	%
Agar	-----	0.5	%
Púrpura de bromocresol	-----	1.0	ml/l.
(1.6% del colorante en alcohol etílico)			
Carbohidrato	-----	1.0%	(dextrosa,- maltosa).

Agua destilada 90 ml para 100 ml de medio.

Se hacen soluciones individuales de carbohidratos añadiendo 10 g de azúcar a 100 ml de agua destilada.

Se pone en autoclave la peptona y soluciones de azúcares-- separadamente por 15 minutos a 121°C, enfriar a 55°C y mezclar 10 ml de la solución de azúcar con 90 ml de la solución peptona-agar.

Con pipeta estéril se colocan 10 ml de medio completo den

tro del tubo estéril con tapa atornillable.

Dunkelberg (8) hizo crecer también al organismo en placas de agar-chocolate sangre de carnero incubando a 37°C durante 24 horas en atmósfera de C₂ al 10% en casos de secreciones uretrales.

Edmunds (9) lo hizo crecer en agar-sangre de Cassman (Cassman 1947). El medio de Cassman agar fue descrito por Leopold (14) - - (1953) y se le añadió 5% de sangre de conejo desfibrinada.

Se cultiva bien en agar sangre estéril en atmósfera de — CO₂ al 10% a 37°C.

Platt (6) recomienda como satisfactorio para crecimiento los medios agar-sangre de Cassman, agar-sangre de carnero y agar suero de levadura en 5-10% de CO₂ a 37°C.

Recomienda también el caldo fluido de tioglicolato que da colonias "como balones inflados" en 48-72 horas a 37°C.

B).- Métodos de Identificación.

Estas características se toman en cuenta para hacer una identificación presuntiva basándose en lo siguiente:

Dificultad de los organismos para crecer en agar con nutrientes.

Los efectos benéficos al incrementar el CO₂ durante el crecimiento.

Carencia de satelitismo alrededor de Staphylococcus aureus en agar sangre.

La tinción donde se observa la morfología de los organismos de las placas de cultivo.

El frotis directo y teñido del exudado proporciona información vital.

En exudados uretrales, el cultivo y la observación microscópica son idénticos a aquellos vistos en casos de vaginitis debida a Haemophilus vaginalis, así como de mujeres asintomáticas portadoras del microorganismo, excepto que los frotis de hombres muestran leucocitos.

El descubrimiento de muchas células epiteliales asociadas con gran número de bacilos Gram negativos o cocobacilos, sugiere que se trate del "frotis fenómeno de Gardner y Dukes" (GDSP) (8).

El sitio de ocurrencia no es solo vagina sino también uretra.

El reconocimiento del "GDSP" como "células de indicio" o "células de oville" en frotis y las características de la tinción de Gram serían de valor práctico clínico para facilitar la clasificación de los exudados genito urinarios asociados con Haemophilus vaginalis en ambos sexos.

En un estudio realizado por Edmunds (9), la identificación se basó en lo siguiente:

Se fijaron frotis por calentamiento y se tizaron por Gram usando alcohol como decolorante.

Para diagnóstico de Haemophilus vaginalis la confiabilidad se tuvo en los cultivos antes que el frotis, aunque en algunos casos fue posible determinarlo por adelantado, viendo el gran número de pequeños bacilos Gram negativos.

Para el cultivo se utilizó un medio consistente de:

2% de agar peptona de Evans con la adición de 5% de digerido de caballo y 6% de sangre citratada de conejo.

El digerido fue preparado por la adición de pancreatina sobre carne de caballo molida, como lo descubrió Levinthal en 1931.

Haemophilus vaginalis fue reconocido después de 48 - 72 horas de incubación por su diminuta colonia hemolítica y se diferenció de otros organismos que también crecieron, por reacciones específicas y por frotis que fueron examinados para observar la presencia -

de "células de indicio".

El cultivo se hizo a partir de un exudado vaginal o cervical a 37°C durante 48 horas en aerobiosis o anaerobiosis, se resiembra en agar sangre y si hay aparición en 48 horas de colonias hemolíticas diminutas, aparentemente lisas, constituidas por bacilos Gram negativos, pequeños, delgados, pleomórficos, los cuales no crecen en medios ordinarios, indicarán la presencia de Haemophilus vaginalis.

En infección por Haemophilus vaginalis, el exudado es -- prácticamente siempre gris, de mal olor y en contraste con las características de una secreción vaginal normal, es homogénea en consistencia.

Dunkelberg (8) diferenció a Haemophilus vaginalis de difteroides vaginales no identificados (no clasificados) por medio de -- morfología colonial, sensibilidad a peróxido de Hidrógeno, catalasa, y fermentación de carbohidratos particulares (dextrosa, maltosa, almidón, PSD).

Método que se siguió en éste trabajo para el aislamiento e identificación.

Este estudio se basó en la rutina que se sigue para cualquier muestra de exudado vaginal:

Después de tomar la muestra con espejo vaginal, (excepto cuando se trata de niñas o mujeres vírgenes, que se toma superficialmente con hisopo), se siembra en los siguientes medios:

EMB o ENDO, 110 o manitol sal agar, gelosa sangre, gelosa-chocolate, Nickerson o Biggy (para desarrollo de Candida albicans); - más aparte se sembró en proteosa peptona No 3 (DIFCO) que puede considerarse como específico para desarrollo de Haemophilus vaginalis.

La muestra del exudado se toma con dos hisopos estériles; con uno de ellos se siembra en gelosa chocolate y proteosa peptona, - posteriormente con el mismo hisopo se hace un frotis en un porteobjeto para después tefirlo por Gram y finalmente se introduce en un tubo de ensaye con solución salina para hacer un examen en fresco.

Con el otro hisopo se siembra en los medios restantes, se aislan todos por estría (con excepción del Biggy que se preparó en tubo inclinado) y se incuba como sigue :

Gelosa chocolate y proteosa peptona en campanas con una - vela encendida dentro para mantener atmósfera de CO_2 al 10% durante - 48 - 72 horas a $37^{\circ}C$.

Los medio EMS o ENDO, 110 o manitol sal agar y gelosa sangre se incuban durante 24 horas a 37°C y Biggy o Nickerson que se incuban durante 48 horas.

Lo más pronto posible después de tomadas las muestras se lee el examen en fresco, principalmente para búsqueda de Trichomonas vaginalis.

Se tiñen posteriormente los frotis por tinción de Gram, en éste, se puso especial atención a las muestras en que se sospechaba la presencia de Haemophilus vaginalis (células con gran cantidad de bacilos cortos Gram negativos).

III.- RESULTADOS.

Por ser un poco difícil de aislar e identificar, comunmente los laboratorios no reportan Haemophilus vaginalis.

Se estudiaron un total de 363 muestras de las cuales 98 - se consideraron positivas para Haemophilus vaginalis.

En 18 casos, Haemophilus vaginalis creció en gelosa sangre apareciendo unas colonias muy pequeñitas, planas, con una zona de hemólisis alrededor también pequeña, para comprobar que se trataba de Haemophilus vaginalis se hicieron frotis que se tificaron por Gram, porque en muchos otros casos similares se trataba de contaminaciones, levaduras o aún Bacilo de Döderlein.

En 9 casos creció también Haemophilus vaginalis en gelosa chocolate, aquí crecieron también colonias muy pequeñitas, no muy transparentes, primero se hicieron frotis, antes de hacer la prueba de las oxidasas para descartar la presencia de Neisseria "g", pues en algunos casos crecían dos o tres diferentes tipos de colonias.

No en todos los casos creció Haemophilus vaginalis en proteosa peptona No 3 (DIFCO) pero se tomaron en cuenta también los casos positivos en gelosa sangre y gelosa chocolate.

En los casos en que por frotis, crecimiento en proteosa peptona, gelosa sangre y gelosa chocolate y por frotis de las colonias de estos medios fueron positivos para Haemophilus vaginalis, se les -

hizo prueba para inhibición por H_2O_2 al 3% en gelosa sangre, inoculando la caja con la colonia y colocando una gota de la solución, después de incubar durante 48 horas se logra ver una zona pequeña de inhibición.

20 de las muestras que ya se consideraban positivas para Haemophilus vaginalis se conservaron en tubos con medio proteosa peptona y después se sembraron en proteosa peptona No 3 con 0.01% de KCN (1.0 ml de KCN al 5% en 48 ml de caldo proteosa), dando buen crecimiento.

Los resultados pueden apreciarse en las siguientes tablas.

TABLA I

No total de muestras estudiadas	363
No de muestras positivas para <u>Haemophilus vaginalis</u>	98 ----- 26.9%
De esas 98 muestras, la incidencia en % de otros microorganismos asociados con <u>Haemophilus vaginalis</u> son:	
Muestras con Bacilo de Döderlein asociado con <u>Haemophilus vaginalis</u>	26 ----- 26.5%
Muestras con <u>Candida albicans</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u>	16 ----- 17.2%
Muestras con <u>Trichomonas vaginalis</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u> asociadas con <u>H. vaginalis</u>	14 ----- 14.2%
Muestras con <u>Escherichia coli</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u>	7 ----- 7.1 %
Muestras con <u>Staphylococcus aureus</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u>	4 ----- 4.08%
Muestras con <u>Proteus morganii</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u>	3 ----- 3.06%
Muestras con <u>Proteus vulgaris</u> asociadas con <u>Haemophilus vaginalis</u>	1 ----- 1.02%

TABLA II

Incidencia de microorganismos en relación
con los promedios de edad.

Edad promedio	% de <u>Haemophilus vaginalis</u>	% de microorganismos asociados
5 - 10	2.04	1.3
11 - 20	7.14	4.1
21 - 30	50.0	50.0
31 - 40	27.5	33.3
41 - 50	10.2	9.7
51 - 60	2.04	1.3
61 - 70	1.0	0

El % total de microorganismos asociados con los 98 casos positivos para Haemophilus vaginalis fue de 72%, incluyendo los siguientes microorganismos:

Bacilo de Döderlein

Escherichia coli

Proteus morganii

Proteus vulgaris

Staphylococcus aureus

Candida albicans

Trichomonas vaginalis

TABLA III

Incidencia de Haemophilus vaginalis
en abortos según la edad.

Edad promedio (pacientes en edad reproductiva)	No de abortos	% de <u>Haemophilus vaginalis</u>
10 - 20	0	0
21 - 30	13	37.5
31 - 40	15	43.2
41 - 50	5	14.4
51 - 60	1	2.8

98 casos positivos para Haemophilus vaginalis de los cuales 34 (34.6%)
habían tenido abortos.

No de pacientes con diferentes diagnósticos

Edad	Leucorrea	Vulvovaginitis	Cervicovaginitis	Vaginitis inespecífica	Vaginitis
10 - 15	1	1	0	0	0
16 - 20	3	1	0	1	2
21 - 25	7	2	7	1	1
26 - 30	17	1	7	4	2
31 - 35	6	3	3	2	0
36 - 40	6	1	2	1	3
41 - 45	4	0	1	0	0
46 - 50	2	0	2	1	0
51 - 55	1	0	0	0	1
56 - 60	0	0	0	0	0
61 - 65	0	0	0	0	0
66 - 70	0	0	0	0	0
Total	48	9	22	10	9

El diagnóstico predominante fue leucorrea seguido por cervicovaginitis, sobre todo en mujeres en edad reproductiva (20-30 años)

De los 98 casos positivos para Haemophilus vaginalis estuvieron asociados con leucorrea 44.8%, 29.5% asociados con mujeres - preñadas, 37.7% con cervicovaginitis, vulvovaginitis y vaginitis y 10.2% con vaginitis no específica.

IV.- CONCLUSIONES.

- 1.- La identificación y aislamiento del microorganismo Haemophilus vaginalis es compleja, no está bien comprendida ni determinada su afinidad tintoreal ni su morfología.
- 2.- Taxonómicamente está disputado, siendo llamado por algunos autores Corynebacterium vaginale.
- 3.- El crecimiento fue bueno en el medio utilizado, proteosa peptonada No 3 (DIFCO), aunque también se dieron casos en que creció mejor en gelosa sangre y gelosa chocolate.
- 4.- Los frotis teñidos por Gram mostrando las células epiteliales vaginales con muchos bacilos ligados a la superficie ("células de indicio", "indicadoras" o "células en ovillo"), fueron de gran ayuda para un diagnóstico presuntivo de Haemophilus vaginalis.
- 5.- La mayoría de las muestras que fueron positivas para Haemophilus vaginalis se presentaron en mujeres en edad reproductiva.
- 6.- Puede presentarse en mujeres sin evidencia de vaginitis.
- 7.- La relación con el número de abortos no fue muy definida, presentándose el microorganismo en 34.8% de los casos de mujeres que habían tenido abortos.

V.- BIBLIOGRAFIA.

1).- Barchet S.

A New Look at Vaginale Discharges
Obstet Gynecol 40:615-17 Oct 72.

2).- Burdon y Williams.

Haemophilus vaginalis (Vaginitis)
Microbiologia Pag. 575.

3).- Carney F.E.

Haemophilus vaginalis Septicemia
Obstet Gynecol 41: 78-9 Jan 73.

4).- Common B. 66:917

Haemophilus vaginalis
Obstet Gynecol 1959.

5).- Criswell Sue B. et al.

Haemophilus vaginalis: Vaginitis by Inoculation
from Culture
Obstet Gynecol Vol. No. 2 Feb 1969.

6).- Dunkelberg W. E. Jr. et al.

A Study and New Description of Corynebacterium
vaginae (Haemophilus vaginalis)
Amer J. Clin. Path. 53. -7 Mar 70
Ind. Med. Jun 70.

- 7).- Dunkelberg W. E. Jr. et al.
Method for Isolation and Identification of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*)
Appl. Microbiol. 19:47-52 Jan 1970
Ind. Med. Vol. 11 1970.
- 8).- Dunkelberg W. E. Eoolvin M.
Haemophilus vaginalis Relative to Gonorrhoea and
Male Urethritis
Military Medicine Nov 1973.
- 9).- Edmunds P. M.
Haemophilus vaginalis. Its association with Puer-
peral Pyrexia and Leucorrhoea
Journal of Obstet and Gynec. 12:917-25.
- 10).- Gardner H. L. Dukes C. D.
Haemophilus vaginalis Vaginitis
Am. J. Obstet Gynecol. 69:962-976, 1965.
- 11).- Lepage S. P.
Haemophilus vaginalis and Its Role in Vaginitis
Acta. Pathol. Microbiol.
Scand 52:34-52, 1961.
- 12).- Lewis J. F. et al.
Diagnosis of *Haemophilus vaginalis* by Papanicolaou
Smears

Techn. Bull. Med. Techn. 59:34-7 Feb 1969.

13).- Jewetz E.

Microbiologia Medica

El Manual Moderno 5a. Ed. Pag. 253, 1973.

14).- Lewis J. P. et al.

Incidence of Haemophilus vaginalis

Amer. J. Obstet Gynecol 103:843-6 Mar 15, 69.

15).- Platt M.S.

Neonatal Haemophilus vaginalis (Corynebacterium
vaginalis) Infection

Clin. Pediatr. (Phila) 10:513-6 Sept 71

Ind. Med. Vol. 11 Jan 72.

16).- Reganey C. et al.

Puerperal Fever with Haemophilus vaginalis Septicemia

J.A.M.A. 225:1621-3 Sept 24 1973

Ind. Med. Vol. 11 Nov 73.

17).- Todd Sanford.

Diagnóstico Clínico por el Laboratorio Salvat Ed.

5a. Ed. 1976. Pags. 807, 833.