

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

8

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México



**“EVALUACION DEL AISLAMIENTO DE GARDNERELLA VAGINALIS
EN TRES CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION A
PARTIR DE 100 MUESTRAS DE EXUDADO VAGINAL”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

ANA GRACIA OSUNA CORRALES

**ASESOR: Q. F. B. MA. DEL SOCORRO PULIDO GARCIA
GUADALAJARA, JAL.,**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.



Q.F/B. ROSA MA. MUÑOZ SAUCEDO
PRESIDENTE
COMISION REVISORA DE TESIS.



ING. JUAN JOSÉ TRUJILLO DEL RÍO
DIRECTOR
ESC. CIENCIAS QUÍMICAS.

A DIOS:

Por permitirme llegar al
fin de una meta más.

A MIS PADRES:

Por su apoyo y confianza
y un reconocimiento a -
sus sacrificios para ha-
cer de mí lo que ahora -
soy.

A MIS HERMANAS:

Cuqui, Angélica, Eugenia,
Lilia, Mary y Norma, con-
carino.

A MIS AMIGAS:

Cecilia, Enriqueta, Leonor,
Loren, Luly, Mercedes y - -
Juany. gracias por su apoyo
que de alguna forma me brin
daron.

A MIS MAESTROS:

Bióloga Angeles Luján Cruz.
Q.F.B. Ma. del Socorro Pulido García.
Q.F.B. Yolanda Sánchez de la Puente.
Q.F.B. Araceli Escobedo Magayón.
Dr. Hugo Vicente Ralde.
Por sus valiosas enseñanzas a lo - -
largo de mi carrera.

AL DR. ALEJANDRO CRUZ LUNA

Por su gran ayuda para la
realización de esta tesis.

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes históricos	2
1.2. Taxonomfa y Nomenclatura	4
1.3. Aspectos Microbiológicos de <u>Gardnerella vaginalis</u> .	5
1.4. Aspectos clínicos y epidemiológicos de vaginitis.	8
1.5. Justificación y objetivo del trabajo.	10
2. MATERIAL Y METODO.	12
2.1. Procedencia de las muestras	13
2.2. Metodología microbiológica.	13
3. RESULTADOS.	20
4. DISCUSION.	28
5. CONCLUSIONES.	32
6. BIBLIOGRAFIA.	35

1. INTRODUCTION

1.1. Antecedentes Históricos.

Al investigar una descarga vaginal en una vaginitis no específica, existe controversia sobre el posible organismo que - la causa, quizá porque el criterio utilizado para definir este síndrome ha variado durante los últimos años, así como los medios para aislar al agente causal.

El diagnóstico clínico de una infección por Trichomonas vaginalis o Candida sp., regularmente no presenta ningún problema y un examen directo adecuado del exudado vaginal confirma dicho diagnóstico. Pero desafortunadamente existen muchas - enfermedades del tracto genital cuyo agente causal aún se desconoce y se refieren como "vaginitis bacteriana no específica" (14), sin embargo este término se le ha atribuido a un gran número de bacterias, no relacionadas entre sí, aunque dicha asignación no se acepte totalmente.

En algunos estudios, en muchos de los casos la literatura no reporta como germen causal a un organismo específico ya que se han registrado resultados variables y difíciles de correlacionar debido a la existencia de diversos métodos de cultivo y diferentes criterios para la identificación y aislamientos de estos microorganismos. A muchas bacterias se les involucra como causantes en los diferentes casos, de éstas, entre las más mencionadas se encuentran: varios estafilococos, estreptococos, bacterias coliformes, micrococos y difteroides, que pueden producir una vaginitis con características semejantes, con exudado genital idéntico, consistencia, color, olor y apariencia microscópica.

Durante muchos años el material vaginal ha sido estudiado, pero los resultados son variables y no hay forma de reportar - la relación de un organismo específico como el responsable.

En estudios posteriores (10) se observó la presencia al microscopio de pequeños bacilos pleomórficos gram negativos, - los cuales no desarrollaban bien en cultivos de rutina, lo que sugirió que éstos debieron ser inadecuados para el aislamiento de esta bacteria. Después se inocularon medios enriquecidos y se probaron diferentes condiciones en su incubación atmosférica, hasta que se aislaron unas colonias pequeñas brillantes, - transparentes cuyo estudio posterior al microscopio, mostraron bacilos similares a los vistos en el examen microscópico inicial. A este organismo se le asignó con el nombre de Haemophilus vaginalis (10).-(más tarde designada como Corynebacterium-vaginale y hoy reclasificada como Gardnerella vaginalis)-.

La infección vaginal causada por dicha bacteria, fue inicialmente descrita por Gardner y Dukes en 1954 (4). En 1955, - los mismos autores reportaron más detalles clínicos y estudios de laboratorio, en los cuales, el nombre de Haemophilus vaginalis fue propuesto para este agente etiológico.

Desde la primera descripción de Gardnerella vaginalis han aparecido en la literatura numerosos reportes que confirman su etiología. Entre ellos aparece el realizado por Lutz y Wurch - (4), quienes en 1954 reportaron la observación de bacilos pequeños gram negativos en exudados vaginales. En 1956, Lutz y col. (4) publicaron un estudio en el cual la clínica y el laboratorio dan resultados idénticos a los obtenidos por Gardner y Dukes.

Un estudio hecho por Brewer y col. (4) sostienen que Gardnerella vaginalis es patógeno, ellos están de acuerdo que la evidencia de su patogenicidad está dada por la predominancia - de este germen en la flora vaginal de pacientes con vaginitis bacteriana y por el hecho de que la leucorrea y vaginitis desaparecen cuando Gardnerella vaginalis se elimina del exudado.

Gardner y Dukes también observaron que este patógeno predomina en la uretra en un 90% de los esposos de mujeres infectadas mientras que esposos de mujeres no infectadas rara vez albergan a este organismo. Ellos indican que después de un tratamiento a la paciente, la reinfección puede reaparecer si el esposo no es tratado simultáneamente (4).

Otros investigadores como Edmunds (1959), Heltai (1959) y Gardner y Dukes (1959), reportaron los aspectos clínicos y bacteriológicos de Gardnerella vaginalis. Lutz, Grooten y Wurch - (1956), Pittman, Leopold (1956), Amies y Jones (1957) y Edmunds (1960), reportaron primeramente los aspectos bacteriológicos y taxonómicos de este organismo (7). A través de estos reportes, las descripciones de Gardnerella vaginalis han sido semejantes con alguna que otra diferencia.

1.2. Taxonomía y Nomenclatura.

La bacteria fue originalmente cultivada en agar sangre y clasificada como Haemophilus vaginalis, por su morfología de cocobacilos gram negativos. Más tarde se cultivó en un medio conteniendo únicamente caseína, carbohidratos, vitaminas, bases de ácido nucleico, sales y una pequeña cantidad de metales, lo que da la evidencia de que este organismo no puede ser miembro legítimo del género Haemophilus, debido que las especies de éste requieren hemina (factor X) y nicotidamina adenín dinucleótido (factor V) (8,9).

Zinneman y Turner han recomendado la reclasificación como Corynebacterium vaginale, basándose en su morfología y propiedades de tinción debido a que ciertas cepas dan una reactividad ligeramente positiva a la coloración de Gram (8).

Actualmente existen diferentes criterios para su clasifi-

cación. Recientes estudios taxonómicos han propuesto colocar a este organismo en un nuevo género, Gardnerella y han clasificado las características de este organismo realizando la más exacta identificación posible.

En el presente estudio nos referiremos a la bacteria como Gardnerella vaginalis, ya que consideramos que es la clasificación más adecuada.

1.3 Aspectos Microbiológicos de Gardnerella vaginalis.

1.3.1. Morfología bacteriana y colonial.

Gardnerella vaginalis, se describe de la siguiente manera de acuerdo a los estudios realizados por Gardner y Duker (1955), Zinneman y Turner (1963), (9): bacilos de 0.3 a 0.6 micrómetros de ancho por 1.0 a 2. micrómetros de largo, la forma de bastón la presenta hasta un cierto grado ya que aparecen generalmente como cocabacilos. Inmóvil, es predominantemente gram negativo, pero a menudo es gram variable; algunas veces es ligeramente gram positivo, especialmente en especímenes cínicos mucoides y cuando crece en medios que contengan suero. Se ha reportado que su pared celular asemeja a los organismos gram positivos. No se sabe que formen esporas o posean cápsula; es un organismo facultativo y sacarófilico que crece mejor al incrementar su atmósfera con CO₂, su temperatura óptima es de 36 a 37°C y su pH óptimo es de 6.5.

Su morfología colonial es muy clara, las colonias sobre el medio de almidón son blancas, compactas, con bordes enteros, convexas, de 0.5 a 2.0 mm. de diámetro y no crecen dentro del agar. En agar sangre las colonias son incoloras o grisáceas, enteras, convexas, como cabezas de alfiler, y se ha reportado que pueden producir alfa-hemólisis, beta-hemólisis o no producirla. En agar de Columbia Sangre humana al 5% una gran parte-

de ellas producen beta-hemólisis. (9).

1.3.2. Características Bioquímicas.

Gardnerella vaginalis, no actúa sobre gelatina, y la prueba del rojo de metilo es positiva si las cepas probadas crecen bien en caldo con dextrosa. Se desconoce que produzcan H_2S , indol o acetilmetilcarbinol.

No oxida el etanol, no digiere celulosa, ni forma almidón a partir de maltosa. No forman nitrito a partir de nitrato, pero algunos autores reportan reducción positiva (9). Crece en presencia de KCN, es catalasa negativo, oxidasa negativo, ureasa negativo, no descarboxila ornitina, lisina o arginina. Crece en presencia de 0.01% de telurito de potasio, pero no lo reduce.

Requiere particularmente proteosa peptona comerciales, como nitrógeno, vitaminas y fuentes de purina pirimidina. No requiere de hemina (factor X), nicotinamida adenin dinucleótido (factor V), sangre, suero o productos semejantes a estas sustancias (9).

Se comprobó que este organismo requiere de 5 vitaminas -- del complejo B: tiamina, riboflavina, ác. fólico, ác. nicotínico y biotina y una o más de las bases de los ácidos nucleicos. Algunos tipos de cepas requieren adenina. Esta bacteria ha crecido en medios semidefinidos que contienen enzimas digestivas de caseína, carbohidratos, vitaminas, sales y trazas de metales. Se desconoce que requieran aminoácidos. Fermentan dextrosa, maltosa, dextrina, almidón y glicógeno con producción de ácido, pero no de gas. Algunas cepas producen ácido débilmente a partir de arabinosa, xilosa, ramnosa, levulosa, galactosa, inulina, glicerol y sacarosa. No actúa sobre lactosa, manitol, trealosa, rafinosa, salicina, inositol, sorbitol o dulcitol. -

El principal producto volátil que forma a partir de dextrosa, maltosa y almidón es ác. acético (2, 8, 9).

1.3.3. Características antigénicas.

Se han reportado la composición de por lo menos 7 grupos-antigénicos por pruebas de precipitinas, las cuales comparten por lo menos un antígeno en común, el que se ha determinado -- por antiseros fluorescentes y aglutininas en tubo (9).

La identificación serológica no se le ha dado gran énfasis debido a que el antisuero comercialmente preparado no se encuentra disponible. Además en algunos estudios (8) se ha encontrado una ligera reacción cruzada entre una cepa de Gardnerella vaginalis y una de Corynebacterium cervicis.

1.3.4. Influencia del CO₂.

En algunos estudios realizados se indica un crecimiento bueno en condiciones aeróbicas. Pero bajo condiciones anaeróbicas estrictas existe una variación en cuanto a su crecimiento, dependiendo del método utilizado. Malone y colaboradores describen la presencia de cepas anaeróbicas estrictas de Gardnerella vaginalis (2).

Otros estudios parecen indicar que a medida que aumenta el CO₂ en la atmósfera, se incrementa tanto el desarrollo como el crecimiento de la bacteria.

1.3.5. Sensibilidad a Antibióticos.

Gardnerella vaginalis, es sensible a la lincomicina, cloramfenicol, cefalotina, tetraciclina, ampicilina, estreptomina. Existen reportes de su resistencia a la colimicina, ác. nalidixico y neomicina. (8).

La sensibilidad hacia la penicilina es variable, ya que algunos autores reportan algunas cepas de Gardnerella vaginalis, como resistentes (8), mientras que otros reportan sensibilidad a dicha droga (1). Todas las cepas de esta bacteria son resistentes a las sulfonamidas. Su sensibilidad hacia el metronidazol puede servir como rasgo para diferenciarla de otros organismos que pueden fermentar almidón y pueden ser confundidos morfológicamente con este organismo. Gardnerella vaginalis es susceptible a metranidazol a diferencia de las bifidobacterias (2).

1.4 Aspectos clínicos y epidemiológicos de vaginitis.

1.4.1. Flora normal vaginal.

Los primeros estudios acerca de la flora vaginal en mujeres adultas fueron reportados por Döderlein, quien enfatizó la predominancia de lactobacilos facultativos. Más tarde se adicionan a dicha flora, organismos aeróbicos facultativos (3).

Otros investigadores han utilizado técnicas anaeróbicas, y han demostrado la presencia de gérmenes sensibles al oxígeno en secreciones cervicales de hasta un 70 a un 80% en mujeres normales, lo que concluye que la flora normal vaginal se compone de diferentes tipos de organismos, desde aerobios, facultativos hasta anaerobios, entre los que podemos nombrar a géneros como: Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Corynebacterium, Bacteroides, Peptostreptococcus, Peptococcus y especies de Eubacterium.

1.4.2. Manifestaciones clínicas de vaginitis.

Después de que se ha descartado una vaginitis por Candida o Trichomonas vaginalis, se procede a la identificación del germen causal del cuadro clínico.

La descarga vaginal que se produce por infección de Gardnerella vaginalis, es regularmente gris, con un mal olor característico, su consistencia es homogénea, el pH se eleva generalmente a un rango de 5.0 a 5.5. Se observa irritación y rara vez eritema vulvovaginal (4).

Otra de las manifestaciones de esta vaginitis es la aparición de "células clue" en el exudado genital, que son células epiteliales vaginales o uretrales que poseen los bacilos adheridos a su superficie, aunque cabe decir que éste no es un parámetro absoluto. (9,13).

1.4.3. Patogenicidad de Gardnerella vaginalis.

En la literatura actual sobre Gardnerella vaginalis, existe aún gran controversia acerca de si este germen es en realidad un organismo patógeno o un constituyente normal de la flora vaginal. Aunque la mayor parte de los estudios tienden a --comprobar la tesis de Gardner y Dukes, de que si esta bacteria es la causa de las vaginitis llamadas "no específicas", muchos de los primeros estudios pueden ser cuestionados basándose en criterios dudosos empleados para su identificación.

Hasta en los métodos más precisos de laboratorio, la patogenicidad de Gardnerella vaginalis es difícil de valorar. Gardner y Kaufman (13), lo describieron como parásito estricto de la superficie, que altera la consistencia del exudado vaginal y eleva ligeramente el pH vaginal sin invadir los tejidos. Sin embargo su aparición ocasional en la corriente sanguínea en --asociación a sepsis neonatal ha sido reportada; la importancia de estas observaciones permanece aún para ser determinada.

Agregando a su ligero o ausente poder invasivo, la asociación frecuente de Gardnerella vaginalis con otros agentes presenta otro problema complicando la valoración o su relación --

con leucorrea.

Varios estudios han reportado la presencia de esta bacteria en asociación con Trichomonas vaginalis o con levaduras. - Su valoración como patógeno es más difícil cuando se encuentra dicho organismo en algunas mujeres sin síntomas o signos de -- una infección del tracto genital bajo (13).

Gardnerella vaginalis se ha reportado asociada en otras - infecciones como fiebre puerperal, uretritis no gonocócica. - se ha aislado de orina aspirada y en sangre periférica después de un aborto séptico (8). Además se ha visto que existe una relación entre bacterias anaerobias, principalmente cocos gram - positivos y este germen en "vaginitis no específica". (9).

1.5. Justificación y Objetivo del trabajo.

A Gardnerella vaginalis, se le ha estado involucrando como agente etiológico de "vaginitis no específica" desde hace - varios años, esto lo indican diferentes estudios, desde los -- primeros reportes hechos por Gardner y Dukes en 1954 (4). Sin embargo el significado del aislamiento del organismo como se - ha dicho anteriormente, ha sido controversial debido a que en mujeres asintomáticas se han encontrado cultivos positivos para esta bacteria.

De acuerdo a lo descrito, en mujeres asintomáticas se aisla en pequeñas cantidades mientras que en mujeres sintomáticas dicho aislamiento es predominante. Otros autores concluyen en la posibilidad de que Gardnerella vaginalis no sea un organismo patógeno sino que podría ser parte de la flora normal vaginal, sin embargo existe aún controversias acerca de su verdadero papel patógeno (13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Uno de los principales obstáculos para el estudio microbiológico de este organismo, es su aislamiento e identificación en el laboratorio clínico de diagnóstico.

En la bibliografía disponible, acerca de la metodología en el primoaislamiento de Gardnerella vaginalis existe gran discusión sobre el ambiente de incubación a los que deberán de ser sometidos los cultivos. Algunos estudios, indican la aparición de cepas anaeróbicas obligatorias de Gardnerella vaginalis (2) y parecen indicar que el crecimiento de dicho germen mejora y se incrementa en una atmósfera de absoluta anaerobiosis.

En el presente estudio evaluaremos el crecimiento de esta bacteria en tres ambientes de incubación; aeróbico, con CO_2 -- del 5% al 10%, y en anaerobiosis estricta, para que una vez -- concluido y definido en cuál de ellos se observa la mejor recuperación de este germen, pueda recomendarse y utilizarse en el laboratorio clínico de diagnóstico.

2. MATERIAL Y METODO

2.1. Procedencia de las muestras.

El trabajo de laboratorio se realizó con 100 muestras de exudado vaginal de pacientes que fluctuaron entre los 15 y 50 años de edad, remitidos a la Sección Microbiológica del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Dr. Angel Leño, para su estudio.

Para la inclusión de estos pacientes de este trabajo, se tomó como único parámetro clínico definitivo: la leucorrea.

2.2. Metodología Microbiológica.

2.2.1. Toma de muestra.

Se colocó el espejo vaginal, previa colocación de la paciente en posición ginecológica, se determinó el pH de la mucosa vaginal con tira reactiva y posteriormente se tomó la muestra de fondo de saco por medio de dos hisopos estériles. Con uno de ellos se practicaron dos frotis para la coloración Gram y se montó un examen directo; el segundo hisopo se introdujo en el medio de transporte y mantenimiento, Stuart.

2.2.2. Microscopía.

Se practicó el examen directo para descartar la presencia de Trichomonas vaginalis y células de levadura. Los frotis se tiñeron con la coloración de Gram para buscar la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) como indicativo de respuesta inflamatoria reportándolos de la siguiente manera:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESQUEMA 1. Número de polimorfonucleares (PMN) por campo (utilizando objetivo de inmersión -100 X-).

0 - 1	(1+)
1 - 5	(2+)
5 - 30	(3+)
Más de 30	(4+)

También se buscaron células epiteliales con numerosos cocobacilos gram negativos adheridos a su superficie, denominadas "células clue" o células de Gardner y Dukes; asimismo se evaluó la presencia, disminución o ausencia de la flora normal vaginal (Flora de Döderlein) como indicativo de reacción inflamatoria y clave de posible infección por Gardnerella vaginalis.

2.2.3. Primoaislamiento.

Del hisopo transportado en el medio de Stuart conteniendo las muestras, se sembraron placas de agar de Columbia (ác. nalidixico-colimicina) y se incubaron 48 horas a una temperatura de 37°C, en las siguientes condiciones atmosféricas de incubación:

a) Aerobiosis.

Las placas sembradas se colocaron en la estufa a 37°C, sin ningún otro requerimiento.

b) CO₂ del 5% a 10%.

Para este objetivo se requirió un recipiente hermético -- (brocal) y una vela, con la finalidad de obtener la atmósfera de CO₂ señalada mediante el consumo de oxígeno durante el proceso de combustión. (15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) Anaerobiosis estricta.

La atmósfera de anaerobiosis se consiguió siguiendo el método de CARLKIST, que viene a ser una modificación del método de BÜchner (17). Este sistema se basa en la absorción del oxígeno atmosférico a partir de una reacción química entre el ácido pirogálico y un álcali como el bicarbonato de sodio dando un pirogalato. Figura 1.

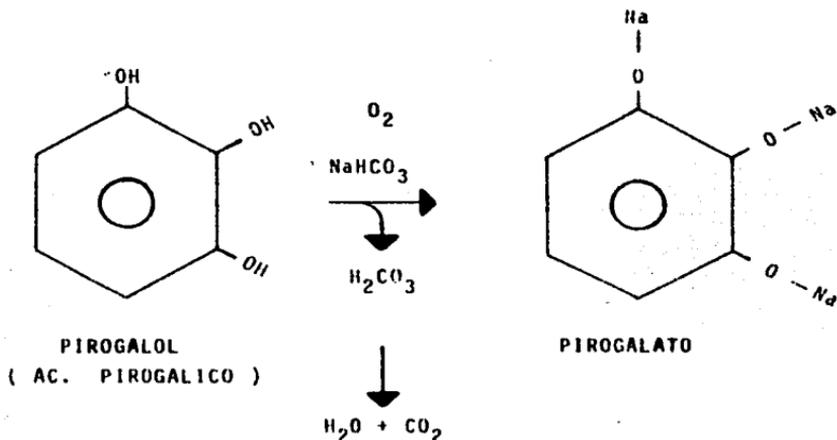


Fig. 1. Reacción química entre ácido pirogálico y bicarbonato de sodio.

El oxígeno (O_2) se transforma en CO_2 y CO y el álcali en exceso absorbe el CO_2 (17,18). Figura 2.

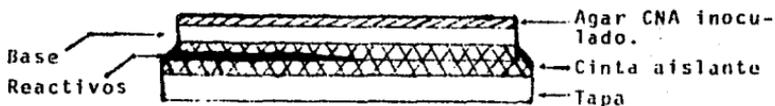


Fig. 2.- Placas anaeróbicas.

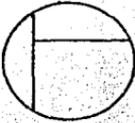
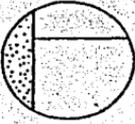
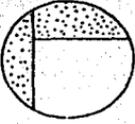
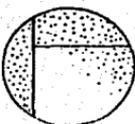
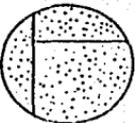
Posterior a las 48 horas de incubación se revisaron los medios de cultivo buscando el crecimiento de Gardnerella vaginalis, caracterizado por colonias pequeñas de 0.5 mm. a 2 mm. de diámetro, borde regular, convexas y brillantes, cuya cuantificación fue realizada de acuerdo al siguiente esquema:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

17

ESQUEMA No. 2. Cuantificación de las colonias por cruces.

Crecimiento	Sector I	Sector II	Sector III	
Negativo	No crecimiento	No crecimiento	No crecimiento	
1+ escasa cantidad	Colonias aisladas (3-30 col)	No crecimiento	No crecimiento	
2+ moderada cantidad	crecimiento confluyente (abun.col.)	Colonias aisladas	No crecimiento	
3+ abundante cantidad	crecimiento confluyente (abun.col)	crecimiento confluyente (abun.col.)	colonias aisladas	
4+ muy abund. cantidad	crecimiento confluyente	crecimiento confluyente	crecimiento confluyente (o muchas col. - aisladas)	

Después de encontrar colonias con dichas características, se procedió a practicar un frotis y teñirlo por el método Gram y comprobar la morfología de la bacteria: cocobacilos gram negativos, algunas veces ligeramente gram positivos.

2.2.4. Sistemas bioquímicos de identificación.

De las colonias que se encontraron sospechosas en el primoincubamiento, se efectuó la prueba de la Catalasa, cuyo fundamento es el siguiente:

a) Principio.

Probar la presencia de la enzima catalasa.

b) Propósito.

Para la diferenciación de Gardnerella vaginalis de otros organismos como: Diphtheroides sp., Neisseria sp., Acinetobacter sp. y Moraxella sp.

c) Bioquímica.

La enzima Catalasa se encuentra presente en bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen el sistema citocromo. Generalmente los organismos que no poseen este sistema, no contienen la enzima catalasa y por lo tanto son incapaces de descomponer el peróxido de hidrógeno. Este compuesto es producto del desdoblamiento de los azúcares y si se acumula es tóxico para la bacteria, provocando así su muerte.

Esta enzima se encarga de descomponer el peróxido de hidrógeno, produciéndose agua y liberación de oxígeno.

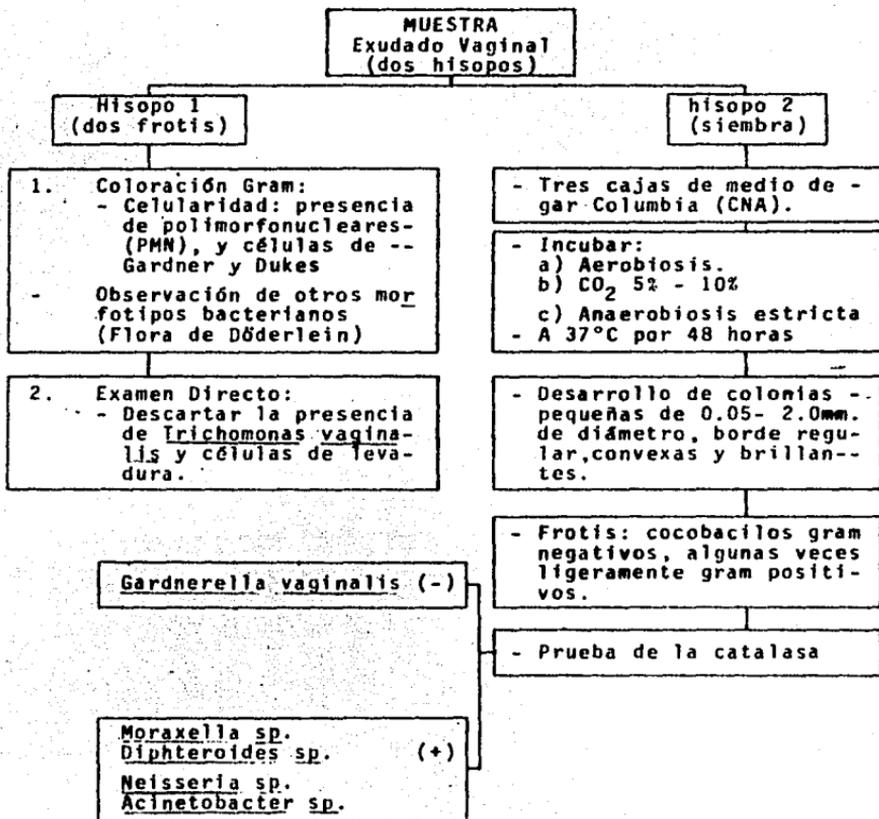
d) Procedimiento.

Se toma una parte de la colonia sin tocar el medio de cultivo, se coloca sobre una gota de peróxido de hidrógeno al 30%.

e) Resultados.

- Si se observan burbujas (liberación del gas) el organismo produce catalasa.
- Si no se observan burbujas, el organismo no es productor de catalasa. (6,16).

2.2.5. Esquema de trabajo.



3. RESULTADOS

De las 100 muestras que se procesaron en sólo 48 casos -- (48%) se aisló Gardnerella vaginalis, de los cuales 18 dieron resultados positivos en las tres condiciones atmosféricas, 18-casos (38%) lo hicieron en atmósfera de 5% al 10% de CO₂ y en anaerobiosis, mientras que dos casos (4%) crecieron sólo en atmósfera de 5% al 10% de CO₂ y los 10 casos restantes (20%) crecieron en estricta anaerobiosis. No obtuvimos ningún caso en que se aislara la bacteria únicamente en condiciones aeróbicas. (Tabla No. 1).

Posteriormente al primoaislamiento, se practicó la prueba de producción de catalasa cuyos resultados mostraron que ninguno de los 48 casos la produjeron, como muestra la tabla No.1.

Refiriéndonos al crecimiento por cuadrantes, el cual se evaluó según el esquema No. 2, en general fue semejante en las tres condiciones atmosféricas, (Tabla No. 1), no siendo así -- en el tamaño de las colonias, ya que aquí sí observamos variación.

Pudimos observar que al aumentar el CO₂ en la atmósfera de incubación, el desarrollo del organismo se incrementó, esto se notó por el tamaño de las colonias cuyo diámetro alcanzó -- los 2.0 mm., enfatizando que las colonias de mayor tamaño fueron las que se aislaron bajo una atmósfera de anaerobiosis estricta.

En el Gram que se practicó posteriormente a la identificación colonial, 10 de los 48 casos (20%) presentaron pleomorfismo, de estos 10 casos, tres crecieron en los tres ambientes de incubación, otros tres crecieron en atmósfera de 5% al 10% de CO₂ y anaerobiosis estricta como lo muestra la Tabla No. 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No. 1. Resultado del aislamiento de Gardnerella vaginalis, en 48 muestras (48% de los casos estudiados) de exudado vaginal bajo tres condiciones atmosféricas de incubación y la prueba de la Catalasa de las mismas.

No. Muestra	Atmósfera de Incubación			Prueba de la Catalasa
	Aero- biosis	CO ₂ 5% a 10%	Anaero- biosis	
1	-	-	3+	(-)
2	-	2+	2+	(-)
3	-	2+	-	(-)
4	-	-	2+	(-)
5	3+	3+	3+	(-)
6	3+	3+	3+	(-)
7	-	3+	3+	(-)
8	2+	2+	2+	(-)
9	1+	2+	2+	(-)
10	-	2+	2+	(-)
11	3+	3+	3+	(-)
12	2+	2+	2+	(-)
13	3+	3+	3+	(-)
14	-	2+	2+	(-)
15	-	3+	3+	(-)
16	2+	2+	2+	(-)
17	-	3+	3+	(-)
18	-	2+	2+	(-)
19	-	-	3+	(-)
20	-	-	3+	(-)
21	-	-	3+	(-)
22	3+	3+	3+	(-)
23	3+	3+	3+	(-)
24	-	2+	-	(-)

TABLA No.1(Continuación)

No. Muestra	Atmósfera de Incubación			Prueba de la Catalasa
	Aero- biosis	CO ₂ 5% a 10%	Anaero- biosis	
25	-	2+	2+	(-)
26	3+	3+	3+	(-)
27	2+	3+	4+	(-)
28	3+	3+	3+	(-)
29	-	2+	3+	(-)
30	-	3+	3+	(-)
31	-	3+	4+	(-)
32	-	2+	3+	(-)
33	3+	3+	3+	(-)
34	3+	3+	3+	(-)
35	2+	2+	3+	(-)
36	-	3+	3+	(-)
37	-	-	3+	(-)
38	-	3+	3+	(-)
39	2+	3+	3+	(-)
40	3+	3+	3+	(-)
41	-	-	3+	(-)
42	-	3+	3+	(-)
43	3+	3+	3+	(-)
44	3+	3+	3+	(-)
45	-	1+	1+	(-)
46	-	-	2+	(-)
47	-	2+	2+	(-)
48	-	3+	3+	(-)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

24

TABLA No. 2. Casos que presentaron diferentes grados de pleomorfismo en las diferentes atmósferas de incubación.

No. Muestra	Aislamiento en diferentes Atmósferas de Incubación		Anaero- biosis	Grados de Pleomorfismo
	Aero- biosis	CO ₂ 5% a 10%		
1	-	-	3+	Moderado
12	2+	2+	2+	Moderado
18	-	2+	2+	Moderado
19	-	-	3+	Moderado
20	-	-	3+	Moderado
27	2+	3+	4+	Moderado
31	-	3+	4+	Moderado
44	3+	3+	3+	Muy Pleom.
46	-	-	2+	Muy Pleom.
47	-	2+	2+	Muy Pleom.

Como se puede observar en la Tabla No. 2; ocho de estas cepas (80%) presentaron moderado pleomorfismo, mientras que -- dos de ellas (20%) mostraron cocobacilos muy pleomórficos, notando que las cepas que presentaron pleomorfismo, en su mayorfa (70%) se aislaron en atmósferas de 5% a 10% de CO₂ y en anaerobiosis, lo que podría sugerir que el incremento del primero en el medio de incubación favorece el pleomorfismo de --- *Gardnerella vaginalis*.

En cuando al hallazgo de leucocitos polimorfonucleares en mayor o menor proporción en el gram del exudado vaginal que -- fueron evaluados según el esquema No. 1 (indicado en el Capítulo de Material y Métodos), es posible relacionarlo con vaginitis causada por *Gardnerella vaginalis*, ya que como lo muestra la Tabla No. 3; diez de los casos (21%) aparecieron en tres --

cruces, 18 de los casos (38%) fueron reportados en dos cruces, once de los casos (23%) se reportaron en una cruz, tres de los casos (6%) se reportaron como escasos, un caso (2%) se reportó en cuatro cruces, en cuatro de los casos (8%) no aparecieron - polimorfonucleares y uno de ellos (2%) no se evaluó la leucorrea ya que no se efectuó el frotis.

Así mismo la mayoría de los casos en los que creció Gardnerella vaginalis presentaron en el gram del exudado vaginal - cocobacilos gram negativos en diferentes proporciones (Tabla - No. 3).

Los resultados mostraron que 12 de los casos (25%) aparecieron como escasos, 18 de los casos (38%) presentaron abundantes, 9 de los casos (19%) mostraron moderados, un caso (2%) -- presentó muy abundantes, 7 de los casos (14%) no presentaron - cocobacilos gram negativos y uno de los casos (2%), no se evaluó ya que no se efectuó el frotis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No. 3. Evaluación del hallazgo de leucocitos polimorfonucleares y cocobacilos gram negativos en el gram del exudado vaginal en los 48 casos en los que creció Gardnerella vaginalis.

No. Muestra	FROTIS		Aislamiento en las diferentes Atmósferas de incubación		
	CBGN	PMN.	Aero- biosis	CO ₂ 5% a 10%	Anaero- biosis
1	esc.	2+	-	-	3+
2	esc.	3+	-	2+	2+
3	-	esc.	-	2+	-
4	abund.	2+	-	-	2+
5	esc.	-	3+	3+	3+
6	abund.	1+	3+	3+	3+
7	abund.	3+	-	3+	3+
8	abund.	1+	2+	2+	2+
9	abund.	3+	1+	2+	2+
10	abund.	-	-	2+	2+
11	-	1+	3+	3+	3+
12	mod.	3+	2+	2+	2+
13	abund.	2+	3+	3+	3+
14	mod.	2+	-	2+	2+
15	-	2+	-	3+	3+
16	mod.	2+	2+	2+	2+
17	abund.	2+	-	3+	3+
18	esc.	-	-	2+	2+
19	esc.	1+	-	-	3+
20	abund.	2+	-	-	3+
21	esc.	2+	-	-	3+
22	mod.	2+	3+	3+	3+
23	abund.	esc.	3+	3+	3+
24	esc.	-	-	2+	-

CBGN. Cocobacilos Gram Negativos
PMN. Leucocitos polimorfonucleares.

TABLA No. 3 (Continuación)

No. Muestras	FROTIS		Aislamiento en las diferentes Atmósferas de Incubación		
	<u>CBGN</u>	<u>PMN</u>	Aero- biosis	CO ₂ 5% a 10%	Anaero- biosis
25	abund.	3+	-	2+	2+
26	-	esc.	3+	3+	3+
27	abund.	3+	2+	3+	4+
28	Muy ab.	3+	3+	3+	3+
29	Mod.	1+	-	2+	3+
30	esc.	1+	-	3+	3+
31	abund.	1+	-	3+	4+
32	abund.	3+	-	2+	3+
33	abund.	1+	3+	3+	3+
34	abund.	2+	3+	3+	3+
35	esc.	1+	2+	2+	3+
36	abund.	3+	-	3+	3+
37	esc.	1+	-	-	3+
⊕ 38	?	?	-	3+	3+
39	mod.	3+	2+	3+	3+
40	abund.	2+	3+	3+	3+
41	-	1+	-	-	3+
42	esc.	2+	-	3+	3+
43	mod.	2+	3+	3+	3+
44	mod.	2+	3+	3+	3+
45	mod.	2+	-	-	2+
46	esc.	2+	-	-	2+
47	-	2+	-	2+	2+
48	abund.	4+	-	3+	3+

⊕ Cepa en la que no enviaron frotis.

DISCUSSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar - que el aislamiento de Gardnerella vaginalis a partir de exudado vaginal se favoreció preferentemente por la incubación anaeróbica, ya que en ésta creció un total de 28 casos (58%) de -- los 48 totales, a su vez haciendo notar que de éstos, 18 (38%) crecieron también en 5% a 10% de CO_2 y en aerobiosis, y los 10 restantes (20%) crecieron en anaerobiosis estricta solamente, - confirmando así lo descrito por Malone (2) quien reportó cepas anaeróbicas estrictas de Gardnerella vaginalis.

Un dato muy importante sobre el crecimiento de esta bacteria en un ambiente de anaerobiosis, fue referente al tamaño de las colonias recuperadas, dado que se aislaron colonias de mayor diámetro comparado con los diámetros de las colonias que - crecieron en aerobiosis y 5% a 10% de CO_2 . En anaerobiosis estricta llegaron a recuperarse colonias de 2.0 mm. de diámetro, lo que se traduce como una ayuda para las pruebas posteriores de identificación bioquímicas en el laboratorio de diagnóstico.

El método que se eligió para obtener la atmósfera de anaerobiosis fue el de Carlkist, el cual se basa en la absorción - de O_2 atmosférico a partir de una reacción química entre el ác. pirogálico y bicarbonato de sodio (17,18). Este es un método - accesible para cualquier laboratorio ya que ofrece buenos resultados en el desarrollo de microorganismos anaeróbicos como en este caso las cepas de Gardnerella vaginalis.

Respecto a la atmósfera de incubación de 5% a 10% de CO_2 , obtuvimos una recuperación generosa, ya que 20 de los 48 casos totales crecieron en estas condiciones (42%), lo que indica - que la presencia de CO_2 favorece aunque no en su totalidad el desarrollo de Gardnerella vaginalis. El rango de las colonias - obtenidas bajo estas condiciones de incubación fue de un diámetro entre 0.5 mm. a 1.5 mm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo a lo reportado en este estudio la incubación aeróbica fue la que resultó menos conveniente ya que las cepas que crecieron en este ambiente que fueron 18 (38%) desarrollaron en colonias tan pequeñas que dificulta al laboratorista su posterior identificación. El rango que se obtuvo bajo estas condiciones fue de un diámetro entre menor de 0.5 mm. hasta 1.0 mm.

Pudimos notar también que las diferencias en los ambientes de incubación a los que fue sometida la bacteria no provocaron ningún cambio en cuanto a la consistencia o morfología colonial, ya que las colonias mantuvieron sus típicas características, siendo redondas, borde regular, convexas y brillantes.

Tanto el hallazgo de leucocitos polimorfonucleares (PMN), como de cocobacilos gram negativos (CBGN) en el frotis gram del exudado vaginal, en mayor o menor proporción como lo muestra la tabla No. 3, en el capítulo de resultados, es posible relacionar estos dos parámetros con vaginitis causada por Gardnerella vaginalis, ya que en 43 de los casos (90%) aparecieron leucocitos polimorfonucleares (PMN) en diferentes proporciones, así mismo 40 de los casos (84%) presentaron cocobacilos gram negativos en mayor o menor cantidad.

Refiriéndonos a las células "clue", como se mencionó anteriormente y de acuerdo a nuestros resultados creemos que es un parámetro inconstante ya que se observaron en el gram de solo ocho de los casos (17%) en los que creció Gardnerella vaginalis, por lo tanto su presencia es relativa; esto correlaciona con los estudios realizados por Akerlun y Mardh (13).

Otra de las observaciones en nuestro estudio fue el pleomorfismo que algunas cepas presentaron (tabla No. 2), pensa--

mos que pudo ser debido al incremento de CO_2 al que fue sometida la bacteria. Apareció también una cepa que mostró cierta -- pleorreactividad al Gram, apareciendo cocobacilos teñidos ligeramente gram positivos.

La prueba de la catalasa fue negativa en los 48 casos --- (48%) en los que creció Gardnerella vaginalis, (tabla No. 1), lo cual confirma una vez más que este organismo carece de tan importante enzima, no pudiendo así descomponer el peróxido de hidrógeno:

Tomando en cuenta los resultados del presente estudio, cabe señalar que la incidencia de vaginitis causada por Gardnerella vaginalis, fue muy notoria 48%, en comparación con la prevalencia de Candida que se aisló en un 8% y Trichomonas vaginalis que no creció en ninguno de los casos estudiados, como --- agente causal de vaginitis. Lo anterior se correlaciona con -- los estudios hechos por algunos autores (13), en cuyos resultados aparece en mayor proporción el aislamiento de Gardnerella vaginalis, en comparación a los aislamientos de otros agentes-causales como levaduras o Trichomonas vaginalis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C O N C L U S I O N E S

Puesto que la incidencia de vaginitis producida por Gardnerella vaginalis, es importante y uno de los principales obstáculos para su estudio microbiológico ha sido su aislamiento e identificación en el laboratorio clínico de diagnóstico y ayudado a la gran controversia sobre el ambiente de incubación a los que deberán de ser sometidos los cultivos, realizamos un estudio comparativo para demostrar cuál de las condiciones atmosféricas (aerobiosis, CO_2 de 5% al 10% y anaerobiosis) resultaba ser la más adecuada.

Concluimos que la atmósfera de incubación anaeróbica es la más adecuada para el aislamiento de Gardnerella vaginalis, dado que obtuvimos 28 casos (58%) de los 48 totales en los que creció la bacteria, de los cuales 18 (38%) crecieron también en 5% a 10% de CO_2 y aerobiosis y los 10 restantes (20%) crecieron en anaerobiosis estricta.

Sus ventajas fueron, primero que existen cepas anaeróbicas estrictas de este organismo (2), las cuales no desarrollan en aerobiosis o en 5% a 10% de CO_2 , y segundo por el tamaño de las colonias aisladas cuyo diámetro alcanzó los 2.0 mm., lo cual favorece su identificación y utilización por el laboratorista para las pruebas posteriores. Además el método que se eligió, el de Carlkist (17,18) es accesible para cualquier laboratorio ya que ofrece buenos resultados.

La atmósfera de 5% a 10% de CO_2 , se considera buena ya que incrementa el desarrollo de Gardnerella vaginalis, el único inconveniente sería, que las cepas anaeróbicas no crecieran en estas condiciones atmosféricas, pudiéndose reportar al médico un aislamiento negativo, lo que provocaría errores en cuanto al diagnóstico etiológico.

Definitivamente la incubación aeróbica no se recomienda -

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

para el aislamiento de Gardnerella vaginalis ya que en este estudio fue la menos efectiva, en estas condiciones obtuvimos 18 casos (38%) de los 48 totales. Otra de sus desventajas fue que se obtuvieron colonias muy pequeñas de un rango de menor de -- 0.5 mm. hasta 1.0 mm., lo que acarrea dificultades para su posterior identificación.

Se puede considerar que la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y cocobacilos gram negativos (CBGN), en diferentes proporciones en los frotis del exudado vaginal fueron dos parámetros que mostraron alguna relación con el aislamiento de Gardnerella vaginalis, ya que leucocitos PMN aparecieron en el 90% de los frotis y cocobacilos gram negativos -- (CBGN) se observaron en el 84% de los frotis (tabla No. 3).

La presencia de células "clue" en los frotis del exudado vaginal es un parámetro que se puede evaluar como relativo ya que en sólo ocho casos (17%) se pudieron observar.

El pleomorfismo presentado por algunas cepas (20%) puede correlacionarse con los incrementos de CO_2 ya que las cepas que mostraron dicha característica en su mayoría (14%) fueron aisladas en condiciones de 5% a 10% de CO_2 y anaerobiosis estricta (tabla No. 2).

Una vez más se confirma que Gardnerella vaginalis carece de la enzima catalasa ya que el 100% de los casos en los que se aisló la bacteria fueron catalasa negativos.

Creemos que buscar los requerimientos tanto nutritivos como condiciones de incubación para el mejor desarrollo de Gardnerella vaginalis es de gran ayuda para un buen aislamiento. Esperamos que este trabajo pueda aportar datos que pudieran -- ser tomados en cuenta por el laboratorio clínico de diagnóstico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. BIBLIOGRAFIA

1. Akerlund M., Mardh P.: Isolation and identification of Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis) in Women with infections of the lower genital tract. Acta Obstet.-Gynec. Scand. 53: 85-90, 1974.
2. Baley, R.K., J.T. Voss y R.F. Smith: Factors affecting -- isolation and identification of Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale). J. Clin. Microbiol. 9: 65-71, -- 1979.
3. Bartlett J. G., Onderdonk A.R., Drude E., Goldstin C., -- Anderka M., Alpert S., McCormac W. M.: Quantitative Bacteriology of the Vaginal Flora. J. of Infections diseases. - 136: 271-277, 1977.
4. Criswell, B.S., Ladwig, C.L., Gardner, H.L. y Dukes, C.D.: Haemophilus vaginalis: vaginitis by inoculation from culture. Obstet. Gynec. 33: 195, 1969.
5. Dattani, I.M., Gerken, A. y Evans, B.: Aetiology and management of non-specific vaginitis. Br. J. Vener. Dis. 58: - 32-35, 1982.
6. Davidsohn I., Henry J. B.: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. edición. Ed. Salvat Editores, S.A., Barcelona (España): 988, 1978.
7. Dukes, C.D. y Gardner, H. L.: Identification of Haemophilus vaginalis, J. Bact. 81: 277-283, 1961.
8. Dunkerlberg, W.E., Jr., Skaggs R., Kellogg, D.S., Jr.: Method for isolation and identification of Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis). Appl. Microbiol. 19: -- 47-52, 1970.

9. Dunkerlberg, W.E., Jr., Skaggs, R., Kellogg, D.S., Jr.: - A study and new description of Corynebacterium vaginale - (Haemophilus vaginalis). Am. J. Clin. Pathol. 53: 370-377 1970.
10. Gardner H. L., Dukes Ch. D. : Haemophilus vaginalis vaginitis. Am. J. Obst. & Gynec.: 962-976, 1955.
11. Greenwood, J. R. y Pickett, M. J.: Salient features of -- Haemophilus vaginalis. J. Clin. Microbiol. 9: 200-204, - 1979.
12. Jolly J. : Minimal criteria for the identification of --- Gardnerella vaginalis isolated from the vagina. J. Clin.- Pathol. 36: 476-478, 1983.
13. Josey, W.E., McKenzie W. J. y Lambe D. W.: Corynebacte--- rium vaginale (Haemophilus vaginalis) in women with leuko rrea. Am. J. Obstet. Gynecol. 126: 574-578, 1976.
14. Lancet: Haemophilus vaginalis in nonspecific vaginitis. - p. 459-460, 1978.
15. Lynch M. J., Raphael S. S., Mellor L. D., Spare P. D., - Inwood M.J.: Métodos de laboratorio. 2a. edición. Ed. In- teramericana, México, p. 923, 1972.
16. Mac Faddin, J. F.: Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd. ed. (Williams & Wilkins). Baltimo- re/London, p. 51-58, 1980.
17. Salle, A. J.: Fundamental Principles of Bacteriology. 5th Edition. McGraw-Hill book Company Inc.; páq. 333, 1961. - New York.

TESIS CON
LLA DE ORIGEN

18. Sebaid, M. Tacquet, A. and Bricout F.: Técnicas en Bacteriología. Tomo 2, Anaerobiosis. Micobacterias. Virología. JIMS, primera edición.
19. Spiegel C. A., Amsel R., Eschenbach D., Schoenknecht F., Holmes K. K.: Anaerobic bacteria in non specific vaginitis. The New England J. of Med. 303 (11): 601-606, 1980.
20. Tabaqchali S. Wilks M. y Thin, R.M.: Gardnerella vaginalis and anaerobic bacteria in genital disease. Br. J. Venereol. Dis. 59: 111-115, 1983.
21. Tollen P. A., Amsel F., Hale J. y King K.: Selective differential human blood bilayer media for isolation of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. J. Clin. Microbiol. 15 (1): 141-147, 1982.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN