



11217
66
ZE

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DIAGNOSTICO DE *GARDNERELLA VAGINALIS*.
POR MEDIO DE LA DETERMINACION DE
L-PROLINA AMINOPEPTIDASA.

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN:

GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

SILVIA ANGELICA GORDILLO RODRIGUEZ

ASESOR: DR. ERNESTO CALDERON JAIMES

MEXICO ,D.F. 1995.



Universidad Nacional
Autónoma de México



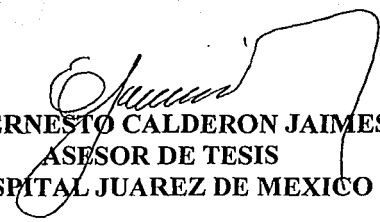
UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

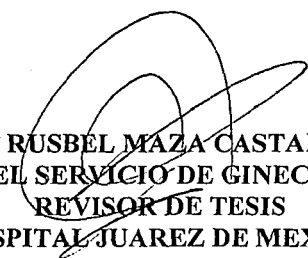
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

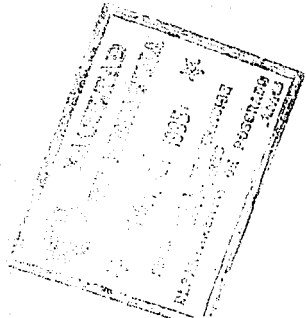
**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LOS
SERVICIOS DE CONSULTA EXTERNA
E INVESTIGACION MICROBIOLÓGICA
DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO**




DR. ERNESTO CALDERON JAIMES
ASESOR DE TESIS
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO




DR. RUBEL MAZA CASTAÑON
JEFE DEL SERVICIO DE GINECOLOGIA
REVISOR DE TESIS
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO






DR. ROBERTO RISCO CORTES
JEFE DE LA DIVISION DE GINECOLOGIA
TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO



DR. JORGE A. DEL CASTILLO MEDINA
JEFE DE LA DIVISION DE ENSEÑANZA
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO



DR. AQUILES AYALA RUIZ
DIRECTOR DE INVESTIGACION Y
ENSEÑANZA
HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

**CON TODO MI CARIÑO DEDICO ESTA
TESIS A MIS PADRES POR SU APOYO
Y COMPRESION.**

ANTONIO Y CARMEN

**POR SU APOYO INCONDICIONAL EN
LOS MOMENTOS DIFICILES A MIS
HERMANOS.**

**YOLANDA, LOURDES
ANTONIO, JORGE Y LUIS**

**A MI ASESOR POR SU CONFIANZA,
APOYO, DEDICACION Y POR
BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE
HABER CUMPLIDO UNA META MAS
EN MI VIDA.**

DR. E. CALDERON JAIMES

**A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO
POR SU COLABORACION Y APOYO.**

**MYRIAM, ROBERTO,
ELVIA Y ROCIO.**

INDICE

TITULO	1
ANTECEDENTES	1
Identificación y características de <i>G. vaginalis</i>	3
a) Características de las colonias	3
b) Métodos para aislar	6
c) Pruebas diferenciales	9
d) Composición, estructura y productos tóxicos	10
e) Superficie de adhesión	15
Susceptibilidad a agentes quimioterápicos	18
a) Nitroimidazoles e Imidazoles	18
b) Beta lactamasas y carbapenem	22
c) Amoxicilina	23
d) Eritromicina, tetraciclina, clindamicina quinolonas	24
Requerimientos para el crecimiento	25
Epidemiología y tipo	26
Relación genética	27
Significado de <i>G. vaginalis</i> en Vaginosis Bacteriana	28
a) Criterios diagnósticos	28
b) Flora vaginal endógena	29
c) Flora asociada a Vaginosis Bacteriana	32
Conclusiones de cultivo	33
Conclusiones al microscopio	34
Conclusiones de pruebas bioquímicas	37
Etiología polimicrobiana	38
Transmisión de bacterias asociadas a Vaginosis Bacteriana	40
Tracto urogenital masculino	44
Sangre	46
Respuesta inmunológica	46
Conclusiones	48

Pruebas bioquímicas	49
Hongos productores de L-prolina aminopéptidasa	
TABLA 1	51
TABLA 2	52
TABLA 3	53
Bacterias productoras de L-prolina aminopéptidasa	
TABLA 4	54
TABLA 5	55
TABLA 6	56
MATERIAL	57
REACTIVOS	58
EQUIPO	59
METODO	60
EVALUACION DE PH	60
TINCION DE GRAM	61
LIBERACION O PRESENCIA DE AMINAS	61
EXAMEN EN FRESCO	61
MEDIOS MICROBIOLOGICOS	62
PRUEBAS DE L- PROLINA AMINOPEPTIDASA	64
CRITERIOS DE SELECCION	65
CRITERIOS DE EXCLUSION	65
RESULTADOS	
a) ESQUEMA 1:	66
PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO	
b) ESQUEMA II:	
PACIENTES CON CULTIVO NEGATIVO	67
c) ESTANDAR DIAGNOSTICO IDEAL	68
d) CUADRO 1:	71
CRITERIOS CLINICOS VS CULTIVO	
e) CUADRO 11:	73
L-PAP VS CRITERIOS CLINICOS	
f) CUADRO 111:	75
L-PAP VS CULTIVO	

g) GRAFICA 1: INCIDENCIA	77
h) GRAFICA 11: CRITERIOS CLINICOS VS CULTIVO +	78
i)GRAFICA 111: L-PAP + Y CULTIVO POSITIVO Y CRITERIOS CLINICOS POSITIVOS	79
j) GRAFICA IV : L-PAP + VS CRITERIOS CLINICOS	80
k) GRAFICA V: L-PAP + VS CULTIVO POSITIVO	81
DISCUSION	84
BIBLIOGRAFIA	87

ANTECEDENTES

La vaginosis Bacteriana (VB) es una de las infecciones vaginales más comunes, la cual recientemente a cobrado importancia por la asociación de infecciones del tracto genital superior.

Diferentes interpretaciones en el significado clínico de *G. Vaginalis* han surgido, la tinción de Gram y su posición toxonómica a generado controversias.

Primeramente fué reconocida por Leopold, este organismo fué nombrado *Haemophilus vaginalis* por Gardner y Duker en 1955 por ser un bacilo Gram-negativo, se aisló exitosamente en agar sangre más no en otros medios de agar, se creyo que era el responsable de la leucorrea vaginal característica. La ausencia de requerimiento de factores X y Y (hemin y NAD) que son necesarios para el crecimiento de especies *Haemophilus*, la tendencia a retener el cristal violeta en la tinción de Gram y de algunos *Corynebacterium* toman características sugestivas de este organismo y pudiera estar asociado con el género *Corynebacterium*. Fué referido como *Corynebacterium vaginalis* por Zinnemann y Turner (128). Dos

largos estudios taxonómicos publicados en 1980 (82-174) analizaron datos obtenidos por una variedad de métodos bioquímicos de hibridación DNA-DNA y de microscopía electrónica. El principal estudio reveló que el *Haemophilus vaginalis* forma diferentes taxoespecies similares al género establecido Gram-positivo o Gram-negativo. La necesidad para un nuevo género fue por Greenwood y Pickett (52) quienes propusieron el nombre de *G. Vaginalis*.

En esta revisión se usó el nombre de *G. vaginalis* para el organismo que anteriormente se le había llamado *Haemophilus vaginalis* o *Corynebacterium vaginalis* en la literatura temprana. Fue relevante la mención del tipo de especie. Greenwood y Pickett designaron 594 especies de Gardner y Dukes como *Gardnerella vaginalis* y fueron depositados en la colección de cultivos como ATCC 14018.

La *Gardnerella vaginalis* se asoció al síndrome vaginal que tempranamente fue llamada vaginitis no específica por la ausencia de reconocer agentes causantes de vaginitis, tales como *T. vaginalis* y especies de *Candida*. Hasta su muerte en 1982, Gardner mantuvo el término de vaginitis no específica incluyendo sólo estas condiciones sin asignar etiología, la vaginitis por *Gardnerella vaginalis* es precisamente definida como infección vaginal específica. La substitución de el término Vaginosis Bacteriana fue recomendado

por que, el término vaginitis sugiere reacción inflamatoria de el epitelio vaginal que usualmente está ausente. Este síndrome además recibe otros 15 nombres.

El rol patogénico de *Gardnerella vaginalis* es controvertido. En medios y métodos inadecuados conduce a fallas tempranas para detectar pequeños microorganismo en cultivos de agar sangre. Este es ahora una gran apreciación de *Gardnerella vaginalis* como causa de infecciones extravaginal.

Los resultados de cultivos anaeróbicos por investigadores fueron a ciegas para el complejo ecológico de vaginas sanas y enfermas este deficit ecológico de VB reveló una etiología polymicrobiana incluyendo a la *G. vaginalis*, *Mycoplasmas* y varias bacterias anaeróbicas.

IDENTIFICACION Y CARACTERISTICAS DE GARDNERELLA VAGINALIS

CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS

La *Gardnerella vaginalis* es un bacteria Gram negativo o Gram variable, pequeña, pleomórfica, no movil, no posee flagelos, endosporas o capsula típica. En las muestras de secreción vaginal, la

tinción de Gram de *G. vaginalis* es variable (positivo o negativa). La morfología celular en la preparación de papanicolaou pueden verse áreas no agrupadas, periféricas en la célula epitelial.

El estado fisiológico de la bacteria afecta esta morfología en la tinción. Ambos bacilos y cocobacillus pequeños y largos se desarrollan en cultivos de 24 hrs de *G. vaginalis* en agar sangre. Las medidas promedio son de 0.4-1.0 ó 1-5 μm . Sin embargo pueden llegar a medir de 2 a 3 μm de largo no forma filamentos. Smith (115) observó los cultivos en agar vaginalis (V agar) exhibiendo algunas bacterias cortas, Gram negativas. En donde las bacterias fueron más pleomórficas agrupadas; Gram variable fué en medios de almidón y con un componente fermentable. La *G. vaginalis* crece en cultivos de 48 hrs. En muestras de sangre fueron reportadas predominantemente Gram-positivos. El organismo fué parcialmente o enteramente Gram-positivo en la fase de crecimiento temprano exponencial en el medio de Loeffler o Roux (128).

La semejanza de *G. vaginalis* o bacteria coryneformes (difteroides) fué descrita por algunos investigadores. El arreglo angular o en palisada ocurre por que es la forma de división. Los granulos de meta-fosfato formados por *G. vaginalis*, especialmente durante su cultivo con la presencia del componente fermentable o

fosfato de sodio. Estos granulos tiñen Gram-positivos o rojo púrpura (metacromáticos) cuando tiñen con azul de metileno alcalino.

La *Gardnerella vaginalis* es Beta-hemolítico en medios que contienen sangre de humano o conejo mas no en agar con sangre de carnero (14,36,52,95), la hemolisis se mejora con incubación anaeróbica (75). Para preparación de medios con sangre de banco de sangre, la hemólisis aclara la sangre justo en el tiempo requerido (64). La importancia de la composición de el medio basal es añadir sangre y demostrar su observación los diámetros de las colonias en agar base columbiá con 5% de sangre de carnero fueron menores.

La hemolisis en sangre humana incorporada en agar columbia base, por BBL sistema microbiológico fuè superior al obtenido por Difco laboratorios base.

En la preparación del medio con peptonas al 2%, digerido de carne de caballo, maltosa 1% y sangre humana 4%. Edmunds (36) observó que las colonias de *G. vaginalis* fueron solo de 0.5 mm de diámetro después de incubación aeróbica por 3 días. Las colonias de *Streptococcus pyogenes* fueron más grandes bajo las mismas condiciones. Dunkelber y Mc Veigh (33) examinaron las peptonas comerciales y establecieron que la proteosa peptona No. 3 o myosate (BBL) da mejor crecimiento que las otras peptonas. En agar PSD que contienen proteosa, peptona, almidón y dextrosa hubo colonias

en 48 hrs. de *G. vaginalis* de 0.5 a 2mm de diámetro con bordes lisos y blanquesinos. El agar V es compuesto de agar base columbia (BBL) suplementado con proteasa 1% peptona y sangre humana 4%. Las colonias en agar V son redondas, opacas, lisas y con un diámetro de 0.5 mm de diámetro después de incubarlos por 48 hrs a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

MÉTODOS PARA AISLAR

Algunos medios diferentes tienen que ser usados para aislar *G.vaginalis* de muestras clínicas. El medio más exitoso posee ambas características diferencial y selectiva. La presencia de sangre humana marca la posibilidad de escoger *G. vaginalis* Beta-hemolítica de entre numerosas colonias no hemolíticas. Goldberg y Washington (48) demostró el valor de medios semiselectivos que contenían colistina (10µg/ml) y ácido nalidixídico (15µg/ml) incorporado en agar base columbia. La adición de 1% de almidón habilita el medio semiselectivo. Mickelsen (86) para distinguió las colonias de *G. vaginalis* por una clara hidrólisis de almidón (64), se desarrollaron medios con sangre humana gentamicina (4.0 µg/ml ácido nalidixídico µg/ml) y anfotericina B (2.0 µg/ml).

La *G. vaginalis* en medio designado HBT (medio-sangre humana) fué desarrollado por Totten (125). Este consiste en una capa base de agar BBL, ácido nalidíxico y colistin columbia, suplementado con proteosa 1% peptona No. 3 Difco, anfotericina B(2.0 µg/ml) y 0.0075% de twin 80 BBL con la misma composición excepto twin 80 y 5% sangre humana es añadida. Las zonas de Beta-hemólisis son claras con bordes difusos. Posteriormente con twin 80 medios mejoró la hemolisis y aumenta el crecimiento. Se examinaron 28 especies de *G. vaginalis* que fueron aislados en agar sangre de oveja, el 86% fué Beta-hemolítico en este medio, comparado con 100% de HBT. Significativamente la *G.vaginalis* fué aislada de líquidos vaginales en agar HBT (P=0.007). El medio de HBT fué utilizado exitosamente por Holst. Para aislar *G. vaginalis* de muestras anorectales. El HBT actual tiene el medio selectivo diferencial satisfactorio y una de sus características es inhibir una variedad de bacterias Gram positivas tales como *Lactobacillus*, *Coryneformes* y *Streptococos*. Se incuba a 35° - 37° C por 48 hrs. en atmósfera humidificada con CO₂ % se puede probar con la extinción de una flama dentro de una jarra de incubación.

A 72 hrs. de incubación se incrementó el porcentaje para aislarla dependiendo del medio. Por ejemplo 5(10%) de cultivos en agar chocolate fué negativo después de 48 hrs, mostrando un crecimiento

después de 72 hrs. en cultivos de HBT. En consideración a el tiempo apropiado de incubación para reconocer a la *G. vaginalis*, en el medio ambiente desfavorable, como el ácido úrico exhiben un crecimiento atípico que prolongan el tiempo que requiere para la formación de colonias.

El cubrir con plástico para cultivar la *Gardnerella vaginalis* fué descrito por Ching (22), los medios semiselectivos proteosa, peptona ambos contienen caldo con el que cubre el inoculado de líquido vaginal y se incubaba a 35° C por 18 hrs. generando CO₂, el resultado combinado del cultivo es usado en pruebas bioquímicas en 2 hrs para identificación provisional.

Los medios que contienen anticoagulante sulfonato de polyanetole de sodio, inhiben a la *G. vaginalis* y las características de las bacteremias puede tener ambas inhibiciones con el anticuagulante. La incorporación de sangre humana en los medios, limita el contacto con anticoagulante y permite contar las colonias. Scolea (77) recobró *G. vaginalis* de muestras de sangre heparinizada y fueron pipeteados en medio de agar, en contraste se duplicaron muestras de sangre que daban resultado negativo en el convencional BACTEC sistema radiométrico.

PRUEBAS DIFERENCIALES

Identificación presuntible

Las características de las colonias son redondas con zonas de hemólisis claras, borde difuso en medios de HBT la apariencia típica de la tinción de Gram y de la prueba de catalasa negativa proporcionó identificación presuntible de *G. vaginalis*. Otros trabajos y pruebas realizadas tales como la hidrólisis del hipurato han sido útiles. Estos criterios mínimos pueden ser útiles para aislar la especie de la secreción vaginal.

Confirmación.

La identificación óptima de *G. vaginalis* por perfiles típicos resultan de múltiples pruebas, el número limitado de pruebas bioquímicas puede faltar o dar identificación definitiva, la característica más valorable es la presencia de α -glucosidasa, ausencia B-glucosidasa, hidrólisis del hipurato, hemólisis de sangre humana y ausencia de hemólisis en sangre de carnero, además son útiles las características de fermentación de manitol negativa y zonas de inhibición en

cultivos de PSD que contengan discos de metronidazol 50 µg y 5 µg trimetropin. Los *Lactobacillus* no clasificados, bacterias coryneformes catalasa-negativa son sustancialmente más resistentes a estos agentes que la *G. vaginalis*, sin embargo los diámetros y zonas de inhibición varían entre la especie y el grupo, afectando además la densidad del inóculo.

COMPOSICION, ESTRUCTURA Y PRODUCTOS TOXICOS

Pared Celular

Durante la tinción de Gram, la pared celular indica fundamentalmente diferencias entre la composición y estructura de paredes de eubacterias. La pared de Gram-negativo (representados por *E. coli*) tiene una membrana exterior formada por lipopolisacáridos, proteínas y fosfolípidos que se ven como dos capas densas de electrones con un electrón-traslúcido en medio. Esta membrana trilaminar, está sobre una capa que contiene péptidoglicanos. La pared de bacterias Gram positivas representadas por (*Bacillus subtilis*) es relativamente densa, matriz amorfa de péptidoglicanos y secundariamente polimeros, tales como ácido teicoico. Beveridge (8) analizó la tinción de Gram y sugirió que la

cantidad de péptidoglicanos en la pared determina primariamente la tinción de la pared. Gram positivo o negativo.

La especie caracterizada como Gram variable puede aparecer como Gram positivo durante la fase de crecimiento exponencial, el Gram negativo es cuando es un cultivo de término, porque los péptidoglicanos retienen el cristal violeta.

Reyn (104) proporciona la primer evidencia de la ultraestructura de Gram positivos, característica de la pared de *G. vaginalis* en comparación con la pared de especies de *Corynebacterium difteriae* y *Lactobacillus acidófilos*. Debajo de la pared y en asociación con la membrana citoplásmica Criswell (29-30) comparó a *G. vaginalis* con *E. coli* y establece que ambos poseen multiples capas de células es su pared y ambas tienen bajo contenido de péptidoglicanos con representación 20-23% respectivamente, en toda la pared. Greenwood y Pickett (52) examinaron el tipo de especie y observaron múltiples laminaciones, esta pared fué interpretada como más cerrada que la pared de los Gram negativos.

Al reexaminar la ultraestructura de la pared, y su composición ATCC 14018 y *G. vaginalis* clínicamente aislada. Sachu (105) concluyó que las paredes presentaban organización Gram-positiva.

La pared de Gram negativas no contienen 2-keto-3 deoxy D-manno-2 ácido octonóico Acido diaminopimélico y Acido hidroxy y solo bajas concentraciones de endotoxina fué detectada. Esta evidencia indicó que *G. vaginalis* no contienen lipopolisacaridos clásicos. La pared celular contiene mayor contenido de alanina, ácido glutámico, lisina, glucosa y galactosa diagnosticada como pared de azúcar.

Capa de Exopolisacaridos

La capa exterior fué visualizada por microscopio electrónico y el color rojo indicó que tenía un componente de polisacaridos. Este material micro capsular, descrito como denso electrón de exopolisacaridos (105) puede verse como tejido empalizado ocasionalmente conectado, falsamente cerrado.

Este rol en la adherencia de *G. vaginalis* a las células epiteliales de la vagina, se a demostrado por material microcapsular haciendolo responsable .

Fimbrias

Las fimbrias de *G. vaginalis* se han observado en microscopio electrónico. El diámetro de las fimbrias es entre 3.0 y 7.5 μm .

Boustouille (12) estableció que los pili llevaron a aislarla de la vagina de mujeres con VB y además se aisló de uretra de hombres con uretritis no gonocócica.

Lípidos

O'Donnell (89) determinó que los ácidos grasos y la composición lípida polar de la especie ATCC 14018 y cuatro especies de *G.vaginalis*.

Especies con cadenas saturadas y no saturadas de ácidos grasos no hidroxilados fueron presentes, el mayor componente fué ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico.

Proteínas

Ison establece que la especificidad de *G. vaginalis* y la serotipificación de anticuerpos fué directamente de proteínas de diferente peso molecular. Las diferencias antigénicas fueron reveladas por análisis de Western blot, de los polipéptidos separados, a pesar de esta heterogeneidad antigénica, todas las especies examinadas mostraron una común molécula inmunodominante con una masa molecular de 41kDa.

DNA

La Guanina + citocina (G+C), contienen preparaciones de DNA de *G. vaginalis*, ATCC 14018 y fueron determinados en tres laboratorios. El valor establecido de la desnaturalización térmica fue un punto medio fue 42 mol%.

Productos-tóxicos

Rottini describió la toxina extracelular citolítica relacionada a *G.vaginalis* durante su crecimiento en caldo suplementado con peptona + tween 80. La citolisina purificada es una proteína anfílica, con peso molecular 63-61 kDA, determinado por dos métodos.

La toxina sufre una descomposición espontánea de actividad, esto se minimizó por sulfato de amonio y detergentes no iónicos y por una banda de membranas eritrocíticas. La prueba de 30ng de toxina no detecta actividad de fosfolipasa C. Esta hemolisina marca la especificidad, 50% de lisis en eritrocitos humanos fue obtenida con 0.75 ng de toxina, fueron 100 veces más altas las concentraciones para lisar eritrocitos de caballo, conejo, oveja o cerdo. Los leucocitos polimorfonucleares y las células endoteliales humanas fueron susceptibles a lisis.

Sin embargo estas dosis altas se requirieron para hemolizar eritrocitos humanos.

La actividad de la fosfolipasa de varias bacterias aisladas del tracto genital femenino fueron reportadas, la alta especificidad de la actividad de fosfolipasa A₂ fué detectada en células de una especie de *G. vaginalis*. El reporte de fosfolipasa C producida por dos de las siete especies de *G. vaginalis* aisladas, es difícil de evaluar la identidad de las siete especies y lo adecuado de las condiciones de cultivo, (crecen en 18 hr en medio triptosa con crecimiento mínimo).

SUPERFICIE DE ADHESION

La adhesión se vió desde Gardner y Dukes (46) quienes reconocieron el valor de células clave en vagina en el diagnóstico de vaginosis bacteriana. Las células clave son células epiteliales escamosas con superficie densa, cubiertas con bacterias *G.vaginalis*. Ellos las establecieron más comunmente en muestras vaginales y además se ve en aspirados de orina de vejigas de mujeres. Posteriormente las células clave también se han observado en semen, secreción uretral y muestras endouretrales de hombres, por que el mínimo contacto de la bacteria ocasiona daño potencial,

con liberación de enzimas extracelulares y anticuerpos locales y reducción de los cambios de coloración en líquido vaginal y orina.

Se usaron frotis de células epiteliales vaginales de la pared vaginal para estudios de adhesión. Mardh y Westrom (84) investigaron la adherencia a células epiteliales vaginales de especies patógenas de bacterias aisladas de la vagina, y pocas de las células de *Lactobacillus acidofilos* o células *G. vaginalis* se adhieren durante incubación de 30 min., solo el número de bacterias adheridas por célula se observaron en 50 células epiteliales vaginales y varió de cada especie estudiada, tal variación es debida a la heterogeneidad de las células epiteliales. Hacen uso de sistemas de cultivo de tejido vaginal humano, y lo analizan con microscopio electrónico. Sobel (117) establece la adherencia de *G. vaginalis* a células maduras, algunas en proceso de descamación, fué mayor la adherencia y actividad proliferativa en células epiteliales. Meijden (126) demostró que la vitalidad de células epiteliales vaginales es un factor significativo de adherencia.

La mayoría de las células clave colectadas de secreciones vaginales de pacientes con vaginosis bacteriana, excluyen el azul de tripan, indicando vitalidad. En ausencia de vitalidad (retiene el azul de tripan), las células epiteliales vaginales fueron leídas a 10 campos,

tomando en cuenta las células epiteliales vaginales (CEV) o células clave.

La adherencia de *G. vaginalis* a CEV se incrementó con la acidez del medio de prueba: PH=4 en fosfato-buffer salina (118) y PH=5-6 citrato-acetato-buffer fosfato (91). Conocemos que ambas las CEV llevan bacterias con red negativa creando una fuerza repulsiva electrostática, esto reduce el PH. La adherencia en el microambiente vaginal indudablemente es influenciado por el PH.

La influencia de concentraciones subinhibitorias de dos agentes terapéuticos en la adherencia de *G. vaginalis* a CEV fué estudiado por Peeters y Piot (91). Las concentraciones de metronidazol de 1-8 y 1-4, la MIC significativamente reduce la adherencia a CEV de 3 especies solo no a la 4. Las concentraciones subinhibitorias de ampicilina no reduce la capacidad de adhesión a CEV en alguna de las cuatro especies.

La hemagutinación de una o más especies de eritrocitos ocurre a 5° C y fue opuesto a lo caliente.

Otro estudio (110) demostró que las especies que hemaglutinan fueron más hidrópicas con adhesión a las células McCoy. Además marcaron diferencias establecidas entre las características de *G.vaginalis*- eritrocitos y la adherencia de *G. vaginalis* a células McCoy. Las células se adhieren después de varios tratamientos

químicos y físicos. La adhesión a células McCoy daña principalmente a la cubierta fimbriar externa, la sección de eritrocitos aglutinados reveló que la adhesión de *G. vaginalis* ocurre por medio de fimbrias delgadas.

SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES QUIMIOTERAPICOS

La efectividad de varios tratamientos para vaginosis bacteriana fué evaluada por Lossick (81,82). El metronidazol es comunmente usado y da cura inicialmente en rangos aproximados del 90%. El metronidazol se distribuye en el cuerpo y sufre un metabolismo oxidativo en hígado, con formación de metabolitos, el más común de estos es el metabolito hidroxilado, que puede alcanzar concentraciones en plasma y orina además inhibe a la *G. vaginalis*. El tratamiento con metronidazol, no afectan a los *Lactobacillus*, estos son capaces de recolonizar la vagina, de este modo reduce el riesgo de recaer.

Nitroimidazoles e imidazoles

El metronidazol (1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) fué originalmente con un espectrum limitado a anaerobios obligados tales como *Bacteroides spp* y *Tricomonas vaginales*, por que ellos

solo tienen electron transferido a proteínas de suficientemente bajo redox potencial o reduce el nitrogrupo. En 1978 Smith y Dunkelberg demostraron que la *G. vaginalis* es susceptible al metronidazol. Phelfer demostró el valor de la terapia de *G.vaginalis* asociada a vaginosis. Reconocieron que los resultados de las pruebas in vitro con metronidazol no reflejan el excelente resultado terapéutico. Ralph estudió la influencia de varias condiciones en la actividad del metronidazol y el metabolismo hidroxilado del metronidazol.

Se inoculó 10^4 UFC/ml y se incubaron anaeróbicamente por 24 hrs con microdosis de metronidazol, puede estar 12 veces bajo estas pruebas establecidas de 10^6 UFC/ml incubados por 48 h. posteriormente las condiciones anaeróbicas fueron usadas para algunos trabajos de pruebas de actividad del metronidazol. El metabolito hidroxilado del metronidazol es de 2-4 veces más activo que el propio metronidazol para más especies de *G. vaginalis*. Por ejemplo en un estudio de 510 especies aisladas de *G. vaginalis*. Bannatyne (6) establece que el rango de microdosis de metronidazol fue 1-16 $\mu\text{g/ml}$ y la microdosis para 50% de las especies fue 2 $\mu\text{g/ml}$, el rango de este metabolito hidroxilado fue 0.125-8 $\mu\text{g /ml}$. Esta prueba puede ser usada como sensibilidad diagnóstica. La prueba de agar suplementado con 5% sangre de caballo, con incubación

anaeróbica por 48 h, esta prueba mostró que el metabolito hidroxilado del metronidazol fue más rápido a 2-4 concentraciones.

Las características útiles para identificar *G. vaginalis*, es la presencia de una zona de inhibición alrededor de un disco que contenga metronidazol. La prueba de disco se puede tomar como prueba definitiva y puede tomar ventaja en las diferentes susceptibilidades al metronidazol y el metabolito hidroxilado. Las bases para estas sugerencias se ilustraron con los resultados de pruebas cuantitativas de 11 especies incubadas anaeróbicamente, 8 especies fueron 4:64 veces más susceptibles al metabolito hidroxilado que el propio metronidazol. En contraste 3 especies fueron resistentes a ambas drogas con concentraciones de ≥ 128 mg/ml, lo que sugiere que estas especies no fueron típicas de *G. vaginalis*.

La reducción rápida de la actividad antibacteriana del metronidazol ocurre en caldos de cultivo de *Bacteroides fragilis* y otros anaerobios obligados susceptibles como resultado de reducción bacteriana intracelular. Además el rango de inactivación es lento, un gran inóculo de *G. vaginalis* pueda inactivarse por ambos el metronidazol y su metabolito.

El resultado de la adhesión bacteriana es la formación de células clave que es una importante característica de VB. Peeters y Piot

demonstraron la capacidad de adhesión a células epiteliales vaginales fué reducido el crecimiento por concentraciones subinhibitorias de metronidazol. El cultivo de la bacteria es con CO₂, para estas pruebas de adhesión.

La exploración con microscopio electrónico fué usada para observar los efectos morfológicos de crecimiento en la presencia de concentraciones subinhibitorias de metronidazol y tinidazol, la población de *G. vaginalis* es heterogenea con algunas células de apariencia tumescente .

En contraste las células *B. fragilis* son largas y serpenteadas. La elongación celular bajo la influencia de ciertos agentes antibacterianos ocurre comunmente con bacterias Gram-negativas. La ausencia de filamentos de *G. vaginalis* consiste en la falta típica de células Gram-negativas en la pared.

Otros

5-nitroimidazoles y tinidazol tanto el tinidazol como el metronidazol tuvieron una misma actividad en pruebas de 510 especies *G.vaginalis* y ambas drogas mejoraron su actividad in vitro bajo condiciones anaeróbicas. El tinidazol es de menor actividad que el metabolito hidroxí.

Tres derivados de los imidazoles poseen ambas actividades tanto antimicótica como antibacteriana. Las pruebas de susceptibilidad *G.vaginalis* mostró que una microdosis de clotrimazole y miconazole caen 0.03-0.25 µg/ml, sin embargo no es valido el dato de que estos agentes sean efectivos en el tratamiento de vaginosis bacteriana.

B-lactamasas y carbapenems

Los niveles altos de susceptibilidad a drogas B-lactamasas es típica de mas especies de *G. vaginalis*. Phillips (74) establece que la ampicilina MIC está en un rango de 0.008 y 0.5 µg/ml.

Se examinaron 206 especies aisladas con un rango de ampicilina MIC 0.016 4.0 µg/ml con 90% de especies inhibieron 0.4 µg/ml. la verificación de las pocas especies caracterizadas por alto MIC es necesario, sin embargo se acepta que la *G. vaginalis* es resistente a la ampicilina.

King reportó que la MIC de piperacina fué 0.016-0.25 µg/ml el imipenem y meropenem fueron muy activos contra *G vaginalis* con MIC. de 0.12µg/ml. La amoxicilina MIC da 0.03-1 µg/ml de 52 especies de *G. vaginalis* aisladas y 0.0001-0.015 µg/ml de 32 especies aisladas de orina. Los métodos de dilución en agar con inoculación de 10^3 UFC, incubadas con CO₂ fueron usadas en

ambos estudios pruebas en donde se mezclan amoxicilina más ácido clavulánico producen MIC entre 0.016-0.25mg/ml. El ácido clavulánico es un ejemplo de un sitio activación, inhibidor irreversible de B-lactamas.

Amoxicilina

Acido clavulánico contra B-lactamasa producida por bacterias tales como *B. catarrhalis* está bien documentada, sin embargo no se conoce que la *G. vaginalis* produzca B-lactamasa. El ácido clavulánico puede suponerse que tiene mucha influencia en pruebas en vitro de amoxicilina.

El Augmentin (amoxicilina + ácido clavulánico) fué usado exitosamente para el tratamiento de mujeres que padecían vaginosis bacteriana.

Las cefalosporinas disponibles en 1970 no fueron muy activas contra *G. vaginalis*. Sin embargo King hace mención a una gran actividad en pruebas de 20 especies con cefotaxima (MIC 0.03-1µg/ml), cefpirome (MIC 0.06-8 mg/ml) y cefepime (MIC 0.03-0.5 µg/ml).

Eritromicina

La *G. vaginalis* es altamente susceptible a eritromicina con rangos de MIC entre 0.015-0.12 µg/ml. La eritromicina solo fué utilizada en

3(23%) de 13 mujeres con vaginosis bacteriana (81). El tratamiento no fué eliminado por las aminas que se encontraban en la secreción vaginal de mujeres infectadas. Holmes atribuyen que las fallas terapéuticas se atribuyen a la reducción en la actividad de la eritromicina por PH bajo en la secreción vaginal.

Tetraciclinas.-

Gran diversidad se ve en las especies de *G. vaginalis* susceptibles a tetraciclinas su MIC es de 0.5 µg/ml. Las pruebas terapéuticas de tetraciclina y doxiciclina en pacientes con vaginosis bacteriana da algunas curas y algunas fallas.

Clindamicina

Las especies de *G. vaginalis* fueron inhibidas por concentraciones de clindamicina de 0.24 - 2 µg/ml.

La clindamicina administrada oralmente o intravaginalmente crema 2% fué efectiva en el tratamiento de vaginosis bacteriana.

Quinolonas

Ciprofloxacina con un MIC entre 0.5 y 2 µg/ml o entre 1-4 µg/ml de *G. vaginalis*.

Otros

La estreptomycin (MIC 0.5-4 µg/ml) fué el más activo de los 5 aminoglucósidos probados. Los rangos de gentamicina MIC 1-8 y 4-32 µg/ml. Las sulfonamidas es inefectiva contra *G. vaginalis*.

REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO

Fué investigado por Dunkelberg la estimulación del crecimiento de la *G. vaginalis* en varios medios de base-peptona que lleva al desarrollo del medio PSD y la demostración de organismos que no requieren u otro medio NAD (factor XyV).

Desde los requerimientos de estos componentes tradicionalmente define *Haemophilus spp* y fué evidente con el nombre de *Haemophilus vaginalis* dado por Gardner y Dukes (46).

El medio líquido semidefinido permitió un buen desarrollo de 2 especies *G. vaginalis* 594^T y 317. Los componentes fueron libres de vitaminas, caseína enzimática digerida, 6 bases de ácidos nucleicos, maltosa, glucosa y una mezcla de sales inorgánicas. La falta de mantenimiento del medio, cuando se preparó con ácido hidrolizado-caseína y alguna cantidad de caseína hidrolizada enzimática. El

triptofano mejoró el crecimiento de especies en medios que contenían una de las caseínas hidrolizadas. La adenina fué identificada como un factor de requerimiento para el crecimiento de especies 594^T mas no en especies 317, ambas especies no se desarrollaron en medios que no tenían bases de purinas y pirimidinas, solo la omisión de algunas de las bases (excepto adenina) de el medio que contenía las cinco, no redujeron el crecimiento.

Epidemiología y tipo

Piot dividió las especies de *G vaginalis* aisladas de secreciones vaginales en 8 biotipos en base a los B-galactosidos, lipasa y reacción de hidrólisis de hipurato. El biotipo mas comun fué el I, 67(38%) y el biotipo II, 5 (31%) y cada uno de los otros biotipos representa no mas del 15% de las especies.

La lipasa-positiva en biotipos 1,2,3 y 4 fueron recuperados mas frecuentemente de mujeres con flora vaginal normal.

La colonización de la vagina por múltiples biotipos de *G. vaginalis* fue detectado en 48% de mujeres estudiadas por Briselden (14), por ejemplo ellos concluyen que los pacientes tuvieron que adquirir nuevas especies, sus biotipos cambian entre la primera y siguientes visita.

La restricción DNA para analizar endonucleasas es un método útil de tipificar utilizado para *Branhamella catarralis* y otros organismos. Defalco establece que nueve restricciones de endonucleasas se encuentran unidas *G. vaginalis*

Relación Genética

En experimentos de hibridación con radioisotopos DNA de ATCC 14018^T y DNA, Ocho especies de *G. vaginalis* mostraron alta proporción de secuencia de nucleótidos

Análisis de hibridación de DNA-DNA fallaron o indicaron la relación entre *G. vaginalis* y organismos en alguna de las especies siguiente.

Haemophilus influenza, *Haemophilus aphrophilus*, *P. multosida*, *Actinobacillus actino mycetemcomitans*, *Corynebacterium difteria*, *Corynebacterium pyogenes*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Lactobacillus casei*, *L. fermentum*, *Propionibacterium sensenii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bifido bacterium spp*, *Oligelca urethralis*, *Eikenella corrodens*, *Cardiobacterium hominis* y varias especies de *Moraxella*, *Neiseria Branhamella* y *Kingella*.

SIGNIFICADO DE *G. VAGINALIS* EN VAGINOSIS BACTERIANA

La VB tempranamente fué designada como vaginosis no específica por la ausencia de reconocer patógenos, afecta a una tercera parte de mujeres que se atienden en clínicas de enfermedades de transmisión sexual (40). Sin embargo aunque la enfermedad sea leve es un factor de riesgo para infecciones obstétricas, con resultados adversos de embarazos y enfermedad pélvica inflamatoria a propiciado que la *G.vaginalis* tenga un significado en vaginosis bacteriana y sea necesario considerar las características de la secreción vaginal y su doble acción bacteriana.

Criterios Diagnósticos

La secreción vaginal significativamente se asoció con vaginosis bacteriana y típicamente tiene las siguientes características (4,21,40,46,65)

- a) Leucorrea no viscosa, homogénea
- b) PH elevado (>4.5)
- c) Olor a pescado por la trimetilamina detectada después de la adición de hidróxido de potasio 10%
- d) Presencia de células clave que pueden representar 10-20% o más

de las células epiteliales vaginales.

- e) Reemplazo de *Lactobacillus*, dominando una gran población de *G. vaginalis* y varias especies de anaerobios y *M. hominis*.
- f) Incremento en las concentraciones de succinato con relación lactato.
- g) Presencia de diaminas putrecina y cadaverina.

Amsel propuso como mínimo 3 de las características, las cuales fueron usadas como criterios para el diagnóstico clínico de VB.

Estos criterios excluyen pacientes sintomáticas, tal como mal olor en la elitorrea y otros síntomas.

La aplicación de criterios clínicos standar, reconocen la llamada vaginosis bacteriana asintomática que aqueja a algunas mujeres.

Flora Vaginal Endógena

Las vaginas sanas de mujeres pre-menopausicas se encuentran colonizadas por una variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Estas bacterias constituyen la flora endogena o nativa, este término se refiere a la flora normal, porque es compatible con los cambios cuantitativamente antes de los cambios cualitativos en el espectrum de especies que ocurren en algunos casos de significado clínico de VB.

Los reportes de porcentajes de mujeres sanas colonizadas para *G. vaginalis*, depende de diferentes metodologías.

Algunos investigadores aislaron *G. vaginalis* en 30% (140), 21% (182) 11.2% (28) o ninguno (4.75) de cultivos de muestras vaginales en medios semiselectivos recobraron 9% (233) 58%, (88), 55% (65), 54% (70) etc. en mujeres sanas.

Sautter investigó la población bacteriana en muestras vaginales colectadas 2 o 3 veces a la semana por un mes, en siete mujeres sanas con vida sexual activa.

Los *Lactobacillos spp* y la *G. vaginalis* fué presente en 79 y 58% respectivamente de 65 series de cultivos. 37 especies fueron aisladas de *G. vaginalis*. Sin embargo fué aislada de las siete mujeres en algun tiempo durante el mes varias especies aeróbicas y anaeróbicas y fluctuaron entre niveles detectables e indetectables.

Influencias en la flora endógena

La composición de la flora endógena esta influenciada por interacciones aún no claras, entre el huesped, la bacteria y los factores exógenos.

Los estrógenos producidos por el huésped incrementan el glucógeno en el epitelio vaginal. El glucógeno es metabolizado a glucosa y este a ácido láctico.

El PH es favorecido por la multiplicación del ácido láctico producido por *Lactobacillus* y otras bacterias que toleran la acidez. El número de *Lactobacillus* es entre 110^7 - 5×10^9 UFC/ml de secreción vaginal de mujeres sanas.

El tratamiento con antibióticos reduce la población de *Lactobacillus* llevando a una elevación del PH y afectando en otras bacterias vaginales, el DIU es considerado por Amsel (4) y Holmes (107) como factor de riesgo para VB, estimando 5 veces más frecuente el riesgo. Una correlación positiva fué observada entre el uso de DIU y colonización densa de *G. vaginalis* y bacterias anaeróbicas Gram-negativas.

Muchos permanecieron ocultos entre la interacción de microorganismos de la micro flora vaginal. Por ejemplo que factores son responsables de la relación entre el número de *Lactobacillus* y número de *G. vaginalis* y anaerobios. Srarw y Sylman establecen que las especies vaginales de *Lactobacillus acidofilo* y *casei* pueden inhibir el crecimiento en medios sólidos de *G. vaginalis* y especies

de *Mobiluncus*, *Bacteroides* y cocos anaeróbicos, ellos consideran que el ácido producido por *Lactobacillus* fué responsable de esta inhibición.

Otro posible agente antibacteriano es el peróxido de hidrógeno. Interesantemente el H_2O_2 producido por *Lactobacillus* fué aislado en altos porcentajes de muestras vaginales de secreción vaginal de mujeres sanas y de mujeres con VB. La interacción inhibitoria entre muestras vaginales aisladas fueron examinadas por 2 metodos. Nagy inoculo 10^6 UFC de especies marcadas en agar columbia suplementado con 5% de suero de caballo, adicionando gotas de bacterias potencialmente inhibitorias y se observaron por zonas de inhibición, en el crecimiento después de incubación por 3 días. Las especies de *G. vaginalis* exhiben actividad antibacteriana en pruebas de tres cepas indicadores. Por otro lado 18 especies de *G. vaginalis* no fué inhibida por alguna de las 46 especies aisladas de *Lactobacillus*, que producen H_2O_2 , esto puede contribuir a el control de flora vaginal.

Flora Asociada a Vaginosis Bacteriana

El desarrollo de vaginosis bacteriana es acompañado por transición de los *Lactobacillus*, dominando principalmente microflora

acróbica, típica de la acidez vaginal en la secreción, una característica es el incremento en la variedad de bacterias anaeróbicas cuantitativamente, pocos lactobacillus y PH de \downarrow 4.7

Al subir el PH disminuye el potencial oxido-reducción con resultados en más micro medio ambiente anaeróbico.

Las aminos son producidas por anaeróbios, además incrementan el PH. Sin embargo las clausulas de esta transición microbiológica se mantiene obscura. El resultado puede ser detectado por cultivos, exámen microscópico y análisis bioquímicos de la elitorrea vaginal.

Conclusiones del cultivo

La *G. vaginalis* acontece en un número 10^6 UFC/ml en 77 a 78 secreciones vaginales con células clave. Entre un 93-100% de mujeres que padecen vaginosis bacteriana fueron colonizadas por *G. vaginalis* y el número de UFC en muestras de vaginas enfermas fué más alta que en vaginas sanas. En conclusión un cultivo negativo de *G. vaginalis* tuvo un 97% de valor predictivo de exclusión de VB. Los cultivos anaeróbicos tienden a contribuir grandemente en conocer la etiología de VB; Estudios de Pheiper, Spigel fué importante el foco de atención, en el rol de anaeróbios y *G. vaginalis* en el proceso de enfermedad.

Se recobran anaerobios de un alto porcentaje de mujeres con vaginosis y forman un alto número de cultivos cuantitativos de secreción vaginal incluyendo especies de *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium* además anaerobios móviles, bacilos curvos (*Mobiluncus spp*) fueron detectados en 33% (192), 38% (17), y 85% (95) de muestras vaginales de mujeres con vaginosis y solo un 5% de mujeres sanas. La *G. vaginalis* y el *Mobiluncus spp* fueron encontrados juntos en cultivos en una tercera parte las mujeres con vaginosis.

Los cultivos de rutina de muestras vaginales para la detección de *G. vaginalis* en diagnóstico de VB no es comunmente recomendado, son valiosos y no proporcionan una evidencia significativa.

Conclusiones microscópicas

La importancia en el exámen microscópico de la secreción vaginal fué enfatizado por Gardner y Dukes, quienes observaron la presencia de células epiteliales escamosas con apariencia húmeda sugestivas de células clave con la presencia de *G. vaginalis*. Las células clave típicas son de márgenes indistinguibles y una apariencia granular con adherencia de numerosas bacterias pequeñas. Algunos investigadores observaron células clave en la secreción vaginal de la

mayoría de las pacientes con vaginosis bacteriana, en conclusión las células clave son un indicador fidedigno de VB. Otras medidas para la detección de células clave son la tinción de Gram, y el papanicolaou. Petersen y Pels realizaron preparaciones con azul de metileno 0.1% y establecieron que la bacteria se tiñe, y se observan células clave que pueden distinguirse de *Lactobacillus*. La fijación usual con calor de muestras secas para tinción de Gram puede afectar la apariencia de células clave. La fijación en metanol absoluto por 5-10 min, preserva la morfología de las células epiteliales y leucocitos.

La identificación de bacterias o células clave puede hacerse por técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticera específica policlonal.

La *G. vaginalis* fué observada en 82% de células clave positivas de muestras vaginales.

Algunas investigaciones de Schnadig de bacterias en 157 muestras ectocervicales teñidas por método de papanicolaou y examinadas al microscopio reveló tres patrones bacterianos.

a) Bacilus largos (típicos de *Lactobacillus*) se observaron en 73 muestras (46%) b) Los llamados anaeróbios se encontraron en 77 muestras (49%) c) Bacterias escasas se observaron en 7 muestras los

anaeróbios fueron caracterizados por una población mixta consisten en bacilos, pleomórficos, delgados, pequeños (*G. vaginalis*) y varios porcentajes de cocobacillus, bacterias filamentosas y fusiformes. Los bacilos curvos fueron observados en 34 muestras (*Mobiluncus*), 13 de estas contenían las llamadas células coma, descritas como células epiteliales cubiertas predominantemente por bacilos curvos que frecuentemente se adhieren longitudinalmente mas lejos del borde de la células creando una apariencia rugosa.

Los cultivos preparados de muestras ectocervicales muestran *G.vaginalis* en 89% de los casos, que revelaron anaerobios. Además el *Mobiluncus spp* (especie no identificada) fué cultivada de 83% de muestras que exhibian anaerobios con bacilos curvos en muestras de papanicolaou. Cinco estudios mostraron la utilidad de basarse en el diagnóstico de laboratorio de VB en la evaluación de morfotipos y tinción de Gram de elitorrea vaginal. La modificación de Kopeloff en la tinción de Gram fué usar fushina para prevenir la sobre decoloración. Spiegel (121) hizo una valoración semicuantitativa de cinco morfotipos.

- a) *Lactobacillus*
- b) *G.vaginalis*
- c) Bacilos Gram negativos
- d) Pequeños bacilos Gram negativos y
- e) Cocos Gram positivos.

Joesoef (103) la proporción de cada morfotipo fué estimado en terminos de 0 y 1 + a 4+ y estandarizado a un sistema para el análisis de datos.

Eschenbach estableció que la VB se definía por criterios clínicos, el diagnóstico independiente de VB por la tinción de Gram y por los criterios de spigel tiene una sensibilidad de 97% y una especificidad 79% VPP de 69%

c) Conclusiones bioquímicas

La leucorrea vaginal se asoció con este síndrome en notable olor a pescado, olor a trimethylamina detectado después de la alcalinización de la leucorrea con 10% KOH (93). Es uno de los criterios diagnósticos. La presencia de aminas en la secreción vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana más no en secreción vaginales normal fué demostrada por electroforesis.

Chen (21) identificó las diaminas putrecina y cadaverina y además ácido- α -amino-n-butyrico en caldos de cultivo se aislaron anaeróbios de pacientes con VB. Es importante notar que este componente no fué detectado en cultivos puros de *G. vaginalis* aislada de mujeres con VB. La cromatografía de gas líquido fué usada para detectar cambios en la concentración de ácidos orgánicos y metabolitos en la secreción vaginal. El ácido láctico predominó en secreciones

normales. Cuando el succinato, acetato, butirato y propionato se incrementaron, disminuyó el lactato en leucorreas de pacientes con VB.

Vaginosis Bacteriana tiene una etiología polimicrobiana

En conclusión el cultivo, el microscopio y las pruebas bioquímicas dan muestra a la vez que la *G. vaginalis* no actúa sola para producir varias características clínicas de VB. Esto es ahora extenso acuerdo que la enfermedad es causada por *G. vaginalis* en contraste con ciertas bacterias anaeróbicas y *Mycoplasmas* (10,15,21,40,43). Mardh establece que la inoculación de *G. vaginalis* y el *Mobiluncus* spp. incrementa la secreción vaginal. Cuando se inocula con cualquier organismo, solo se incrementa poco o no la secreción. Mujeres voluntarias fueron utilizadas tempranamente para demostrar la patogenicidad de *G. vaginalis*. Algunas de estas pacientes “no tenían conocimiento” de la infección por *G. vaginalis*. Inicialmente desarrollaron vaginosis después de la inoculación intravaginal con cultivos de 12hr de *G. vaginalis*, o con material tomado directamente de vaginas de pacientes infectadas, en conclusión los resultados de infección vaginal fué debido al agente etiológico, más

no justificó por que los medios de cultivo no fueron adecuados para detectar bajos numeros de *G. vaginalis* en cultivos pre-inoculados.

La elitorrea asociada a VB tiene un caracter homogéneo a diferencia de la elitorrea purulenta característica de la gonorrea que es provocada por una respuesta quimiotáctica de leucocitos. Una posible razón de esta diferencia ocurre de estudios de quimiotaxis.

Sturm (233) establece que la migración de leucocitos en respuesta a la quimioatracción bacteriana esta fué inhibida por cultivos con filtros de succinato producido por *Bacteroides ureolyticus* y *Bacteroides bivius* (ahora *Prevotella*) en contraste la quimiotaxis no fué inhibida por *G. vaginalis* quien no produce significativa cantidad de succinato tal conclusión incriminó indirectamente que la producción de succinato por anaeróbios es como participan en la VB.

El tratamiento exitoso de VB con metronidazol es acompañado por una disminución en el número de anaerobios y *G. vaginalis*, desapareciendo las aminas vaginales y retornando los *Lactobacillus* - flora dominante con incremento consiguiente de ácido láctico y retornando el PH.

Transmisión de Bacterias Asociadas a Vaginosis

La VB es comúnmente considerada una enfermedad de transmisión sexual. La prevalencia de *G. vaginalis* fue aproximadamente 4% en mujeres que se atendían en clínicas universitarias y 33% en mujeres atendidas en clínicas de enfermedades de transmisión sexual (65%) la *G. vaginalis* fue encontrada en muestras uretrales en un 58% (170) de hombres no seleccionados atendidos en clínicas de enfermedades de transmisión sexual y 96% (75) de hombres de parejas de mujeres con *G. vaginalis* asociada a vaginosis. Si el cultivo uretral es positivo y el hombre es asintomático representa adquisición pasiva de mujeres infectadas o colonización permanente incierta.

La importancia de concurrir en el tratamiento de parejas fue ilustrado por la eliminación de recaídas en mujeres quienes sufrieron episodios repetidos de vaginosis presumiblemente debido a reinfección de su pareja constante, quien lleva *G. vaginalis* en el semen. Por otro lado, el tratamiento de la pareja sexual masculina de la mujer con VB no redujo significativamente los rangos de recurrencia de vaginosis. (87)

El cultivo vaginal de 12 mujeres con vaginosis y cultivo uretral de 12 parejas hombres fue obtenido en el mismo período de 24 hr. Los

biotipos aislados de *G. vaginalis* de ambas parejas fueron las mismas de 11 de las parejas. ($P = <0.005$), esto proporcionó evidencia de transmisión sexual. Piot enfatizó que la VB no implica necesariamente enfermedad de transmisión sexual. Evidencias de un posible origen endógeno de la bacteria asociado con vaginosis fué proporcionado por Holst. (60,62) Muestras de 148 mujeres con VB fueron obtenidas pasando un isopos 3 cm en el canal anal haciendo presión lateral para minimizar el contacto con heces.

La *G. vaginalis* fué encontrada en 45% de los cultivos anales; el *Mobiluncus mulieris* en 56%; *Mobiluncus curtisi* en 62% y *Mycoplasma hominis* en 54%. Estas y especies fueron además aisladas de muestras anorectales de entre 10 y 14% de 69 mujeres sanas y entre 4 y 11% de 131 parejas sexuales masculinas de cada una de las mujeres sanas o ellas padecían de vaginosis.

La *G. vaginalis* es una de las especies que fué recobrada de canales anales de entre 5 y 9% de 22 niñas vírgenes (60). La posible transferencia anal-vaginal resuelve el problema especial inherente en reportes de la presencia de *G. vaginalis* en cultivos vaginales de 5(4.2%) de 119 niñas sin abuso, con un rango de edad de 1-11 años

(10), 3 (6%) de 51 niñas que fueron entre 2 meses y 10 años de edad (83), y 9 (17%) de 52 niñas adolescentes vírgenes.

Para reconocer *G. vaginalis* y otras bacterias involucradas en VB pueden estar presentes además en canal anal en nuevas dimensiones para el cuadro de transmisión y epidemiología.

La flora de vaginas sanas en adultas contiene en algunos organismos incluyendo algunas especies asociadas a VB. Por que la etiología de este síndrome es multifactorial la transmisión pene-vagina o ano-vagina es potencial o se complementa con flora endógena iniciando la vaginosis. La enfermedad puede ser sintomática o asintomática dependiendo de la interacción entre miembros de la población vaginal y el hospedero.

Otros estudios revelaron que un número que exceda de 10^5 UFC/ml de *G. vaginalis* en el chorro de enmedio de una muestra urinaria de mujeres con disuria aguda y en muestras de 2 mujeres con cistitis espontanea con piuria, se toma como positiva. La piuria no está necesariamente presente en infecciones vaginales de *G. vaginalis*. (24,41,42)

La presencia de *G. vaginalis* en cultivos de muestras de cateterización urinaria en vacío fueron examinada en 3 grandes estudios. Clarke logró aislar significativamente de 119 (0.6%) de 19,463 muestras. Fué aislada considerando a las pacientes que

tenían síntomas o piuria y los cultivos de *G. vaginalis* fueron puros o casi puros. Josephson detectó $> 10^4$ UFC de *G. vaginalis* por ml en 322 (2.3%) de 14,178 muestras urinarias y recuperó cultivos puros de 67 mujeres y 5 hombres.

Lam y Birch demostró la importancia de los procedimientos del laboratorio seguros para detectar al máximo la *G. vaginalis* y recobrarlas en muestras vaginales. a) La orina debe de estar refrigerada a 4° C. hasta su cultivo. 3 de 11 muestras se mantuvieron a 20° C y el resultado del cultivo fué negativo después de 48 hrs. b) Se recobró al máximo la *G. vaginalis* en medios enriquecidos (medio agar V) ajustado a pH de 7. c) La incubación anaeróbica por menos de 48 hrs. recupera bien a la *G. vaginalis*. Se duplicaron cultivos duplicados en medios modificados de colistin-ácido nalidíxico, fue inoculada la muestra urinaria de 20 sujetos positivos a *G. vaginalis* e incubados a 37° C con atmósfera aeróbica y anaeróbica, ambos con 5% de CO₂, el crecimiento fué detectado en 5 de los cultivos incubados anaeróbicamente después de 18 hrs. En 16 cultivos después de 48 hrs. y en 20 cultivos después de 72 hrs. Por otro lado solo un cultivo aeróbico mostró crecimiento después de 18 hrs. y 8 cultivos fueron positivos después de 48 hrs. y 12 cultivos fueron negativos después de 72 hrs.

En conclusiones se sugiere que algunos exámenes de laboratorio menosprecian la incidencia de bacteriuria por *G. vaginalis* por que las condiciones experimentales son subóptimas. A PH de 5 fué recuperad de muestras urinarias en 17 de 41 pacientes (71) la baja viabilidad ocurre en orinas que están a temperatura ambiente el uso de agar sangre de carnero y la incubación aeróbica por solo un día reduce la probabilidad de detectar *G. vaginalis*.

Tracto Urogenital Masculino

La infección de *G. vaginalis* en el hombre involucra el tracto genital y posteriormente el tracto urinario (760). Por ejemplo en dos estudios de pacientes masculinos con varias enfermedades del tracto urinario, se obtuvo orina de la vejiga por aspiracion suprapúbica en ninguno de los 61 cultivos se obtuvo *G. vaginalis* (41). La presencia de *G. vaginalis* no da síntomas en la mayoría de los hombres más la bacteria puede asumir un papel patogénico por extensión a prostata o vejiga, especialmente en pacientes quienes tienen un procedimiento urológico (71). Probablemente en 1953 Leopold (80) aisló un organismo probablemente *G. vaginalis* de cultivos uretrales y muestras urinarias de hombres que padecían uretritis y prostatitis. Mas recientemente la *G. vaginalis* fué recuperada de cultivos entre un 5 y 11.4 de hombres sexualmente activos (23,31,32) y en altos

porcentajes en parejas sexuales de mujeres con VB (1,44) la mayoría de estos hombres fueron asintomáticos, y aquellos que presentaban uretritis se discriminaron porque tenían transmisión sexual o infección actual (32). La *G. vaginalis* dió un rol casual en uretritis y no se estableció a menos que la *Chlamydia trachomatis* y *U. urealiticum* se excluyeran. La secreción uretral y la inflamación de las glándulas del pene pueden involucrar la capa mucosa del prepucio y observarse una balanopostitis. Kinghorn recuperó *G.vaginalis* de muestras prepuciales de 21 hombres con balanopostitis y se aislaron concomitantemente *Bacteroides spp* en un 75% de los cultivos. Budge reportó 3 casos de *G. vaginalis* asociada a balanopostitis con olor a pescado, sugestivo de anaerobios, se observaron células clave en muestras endouretrales de dos hombres. Un caso de balanopostitis caracterizado por macula eritematosa, prueba de aminas positivas, involucró a la *G vaginalis*. La presencia de $>10^4$ UFC de *G. vaginalis* por ml en muestras urinarias en el chorro de enmedio es difícil de evaluar porque no se encontraron síntomas en los adultos masculinos así como en hombres que padecían enfermedad renal en estadio final, obstrucción uretral, cistitis post-cateterización, urinoma infectado y una prostatitis crónica. Es útil de mostrar que la vejiga fue el sitio de localización de *G. vaginalis* en 3 hombres con síntomas urinarios

(42). La *G. vaginales* fué cultivada de muestras de semen de 4 parejas sexuales asintomáticos con mujeres con VB.

S a n g r e

La bacteremia por *G. vaginalis* es mucho más frecuente en mujeres que en hombres. Durante el parto en intervenciones quirúrgicas, endometritis post-parto y aborto séptico es común el antecedente de bacteremia. La bacteria tiene acceso, entrando por venas de la placenta durante el post-parto intermedio. La *G. vaginalis* se ha asociado a amnioítis o endometritis. Las 30 pacientes con bacteremia de *G. vaginalis* estuvieron afebriles de 1-6 días (promedio 3 días) y se matuvieron en el Hospital por 2-15 días (5 días en promedio) y los cultivos fueron obtenidos después.

Respuesta inmunológica a infección por Gardnerella vaginalis

La respuesta inmunológica a infección intrauterina fué demostrada por Moller en un estudio de mujeres con ruptura prematura de membranas fetales. Se uso inmunofluorecencia en microscopio con globulina humana antifuorecente-conjugada, revelado en líquido amniótico, presentaron anticuerpos contra la bacteria que fué recuperada en el líquido amniótico, placenta y membranas fetales de

una paciente. La inmunoglobulina A secretoria puede detectarse antes de que aparezca los signos de infección intrauterina. Esta se presenta en secreción vaginal y puede interferir en la progresión de VB y bloquear la adherencia a las células epiteliales. De 28 mujeres con signos de vaginitis sin evidencia de infección extravaginal se estudiaron por Ghone, ellos usaron varias especies aisladas de *G. vaginalis* con antígenos de inmunofluorescencia y en unión con la enzima inmunoabsorbente. Ambos métodos detectaron inmunoglobulinas que reaccionaron con cada paciente. La prueba de cera de 15 mujeres con *G. vaginalis* asintomáticas se asoció a vaginosis y mostro una reacción negativa en 12 sujetos o algun nivel bajo de reactividad.

La elevación de títulos de anticuerpos es suero puede detectarse en algunas infecciones, las pruebas desarrolladas con antígenos de *G. vaginalis* con especies patógenas. Los reportes de la falta de respuesta humoral a *G. vaginalis* en pacientes con infección extravaginal (45), dificulta la evaluación cuando los resultados fueron obtenidos con pruebas de antígenos de especies diferentes de *G. vaginalis* y posiblemente no representativa de la especie, la afección de la inmunidad sugiere un factor en la asociación entre *G. vaginalis* e infecciones del tracto urinario en pacientes trasplantadas de riñon y entre *G. vaginalis* y vaginitis enfisematosas.

La *G.vaginalis* es opsonizada por fagocitos y eliminada por neutrofilos humanos en la presencia de suero humano normal con una respuesta primaria mediada por activación del complemento por vía alterna, sin embargo el organismo es resistente a ser eliminada por el mejor suero humano complementado.

CONCLUSIONES

La *Gardnerella vaginalis* es emergida de la obscuridad, es controvertido el rol en la vaginosis bacteriana y su potencial patogénico en sitios extravaginales, los mejores medios y métodos para aislarla e identificarla en la estandarización de los criterios clínicos y de laboratorio para el diagnóstico de vaginosis bacteriana y reconocer con seguridad la bacteria anaeróbica. La detección del *Mobiluncus spp* y *Mycoplasma hominis* de muestras anorrectales sugiere que puede tener un curso endógeno de vaginosis bacteriana en suma a la transmisión sexual. Una de las áreas a desafiar en el futuro es la investigación en modelos animales de VB, esto nos permitiría a) la reactiva patogenicidad de varias bacterias involucradas en VB y en infección extravaginal. b) Probar el potencial patogénico de *G.vaginalis* que muestra diferentes fimbrias para la adherencia a células epiteliales y la producción de toxina

citolítica y enzimas, como lipasa y fosfolipasa C. c) comparación de la eficacia terapéutica de drogas antibacterianas.

En conclusión la heterogenicidad antigénica de especies de *G.vaginalis* por métodos hace uso de antígenos preparados de cada paciente con especie patógena en estudio para evaluar la respuesta inmune a *G.vaginalis* asociada a infección.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Existen 2 pruebas mas como indicadores bioquímicos en el diagnóstico de Vaginosi Bacteriana.

La cromatografía de gas líquido tiene una sensibilidad 79%, especificidad 95% y determina la presencia de ácidos y aminos en la secreción vaginal que son producidos por bacterias anaeróbicas.

La prueba de prolina amino-peptidasa a mostrado superioridad comparada con la cromatografía de gas-líquido, 78,7 versus 29.8% respectivamente.

La prolina amino-peptidasa es una prueba basada en la detección de la actividad de la enzima.

La prolina amino-peptidasa se adhiere al substrato, la prolina naftil-B-amida-resultando prolina y B naftil-amida. La Naftil-amida puede reaccionar con algunas anilinas o formar varios complejos de colores. Estos pueden además combinarse con nitritos y formar

complejos diazo o pueden medirse directamente por fluorimetría. La variedad de bacterias y hongos reportados que producen aminopeptidasa in vitro incluyen algunos *Lactobacillus Mobiluncus* y *Candida*. Tiene una sensibilidad.- 83% - 93%, y una especificidad.- 95% VPP.- 78% -,VPN- 97%. La sensibilidad de la prolina amino-péptidasa especialmente en pacientes con *Mobiluncus* proporciona una superioridad.(130,131,132).

HONGOS PRODUCTORES DE L-PROLINA AMINOPEPTIDASA
Tabla 1

Aspergillus flavus

*A. niger**

A. oryzae

A. parasiticus

*Blastomyces dermatitidis**

*Brettanomyces bruxellensis**

Candida albicans

*C. tropicalis**

*Cephalosporium acremonium**

*Chrysosporium keratinophilus**

Colletotrichum species

*Cryptococcus neoformans**

*Epidermophyton floccosum**

*Fusarium oxysporum**

*Geotrichum candidum**

Haplospilus nidulans

Helminthosporium maydis

Histoplasma capsulatum

H. dubosii

*H. farcinosum**

HONGOS PRODUCTORES DE L-PROLINA AMINOPEPTIDAS

Tabla 2

*Kloeckera apiculata**
*Microsporium canis**
M. cookei
*M. distortum**
M. gypseum
*M. nanum**
*Mucor pusillus**
*Neurospora crassa**
Paracoccidioides brasiliensis
Penicillium glaucum
Pleurotus ostreatus
Podospora anserina
Polysphodylium pallidum
*Rhizopus nigricans**
*Rhodotorula mucilaginosa**
*Saccharomyces cerevisiae**
S. lactis
Schizosaccharomyces pombe
*Scopulariopsis brevicaulis**
*Stremphylium sarcinaeforme**

HONGOS PRODUCTORES DE L-PROLINA AMINOPEPTIDAS

Tabla 3

Thamnidium anomalum

T. elegans

*Torulopsis famata**

*Trichophyton guinekeanum**

*T. granulosum**

*T. interdigible**

*T. mentagrophytes**

T. persicolor

T. rubrum

T. rubrum

*T. schonlenii**

T. terrestre

T. tonsurans

*T. verrucosum**

T. violaceum

*Trichosporon cutaneum**

*Trichothecium roseum**

*Trigonopsis variabilis**

Tritirachium album

*Verticillium cinnabarium**

BACTERIAS PRODUCTORAS DE L-PROLINA
AMINOPEPTIDAS

Tabla 4

Aeromonas proteolytica

Arthrobacter species

Bacillus anthracis

B. brevis *

B. cereus *

B. circulans *

B. globigii *

B. laterosporus *

B. lentus *

B. licheniformis

B. megaterium

B. mesentericus

B. polymyxa *

B. pomilus

B. rotans *

B. shaericus *

b. subtilis

Bacteroides amylophilus

Bombina variegata

BACTERIAS PRODUCTORAS DE L-PROLINA
AMINOPEPTIDASA

Tabla 5

Clostridium histolyticum

Enterobacter aerogenes

Erwinia amylovora

E.coli

Klebsiella cloacae

Lactobacillus acidophilus

*L.casei**

Leptospira autumnalis

Mycobacterias

Mycoplasma laidlawii

Neisseria catarrhalis

N.flavescens *

N.gonorrhoeae *

N.meningitidis *

N.sicca *

Picea abies

Pseudomonas aeruginosa

P.tabaci

Sarcina lutea

BACTERIAS PRODUCTORAS DE L-PROLINA
AMINOPEPTIDAS

Tabla 6

Salmonella enteritidis

S.typhimurium

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis *

S.mites

S.pneumoniae

S.salivarius

S.thermophilus

Streptomyces fradiae

S.griseus

Xanthomonas campestris

MATERIAL

Tubos de ensayo de 13 x 100 con tapon de rosca
Gradillas
Mechero
Alcohol 30%
Cajas de petri esteriles desechables
Isopos de alginato de calcio
Asas bacteriológicas
Gasas estériles
Viales ministor
Algodón
Pipetas graduadas 1-10 ml
Puntas desechables 200-1000 ml.
Puntas desechables 10 - 100 ml
Microplacas de 96 pozos de 250 ml de capacidad estériles
Probetas graduadas en 100 - 1000 ml.
Matraz erlenmeyes de 100 - 1000 ml.
Portaobjetos
Cubreobjetos

REACTIVOS

Equipo de Gram de la SSA
L-Prolina-B naftilamida (sigma)
Tris buffer pH 7.0 (sigma)
Salt Fast Garnet gBC (sigma)
Pruebas bioquímicas estandarizadas
Agua destilada esteril
Hipurato de sodio (sigma)
Hinhidrina (sigma)
Suero de caballo
Sangre de carnero
Base de agar sangre bioxón
Base de agar chocolate bioxón
Base de agar Mac Conkey bioxón
Base de agar columbia bioxón
Polipeptona bioxón
Extracto de levadura Oxoid
Agar bacteriológico bioxón
Agar selectivo para candida Merck
Papel indicador pH Merck
Cinta testigo
Suero humano
Sangre humana

EQUIPO.

Balanza analítica

Balanza granataia

Autoclave

Microscopio óptico de luz

Microcentrifuga

Ultracongelador

Refrigerador

Vortex

Reloj de intervalo

Cronómetro

METODOS.

Se evaluaron 483 muestras de secreción cervico-vaginal de mujeres que asistieron a la clínica de infecciones ginecológicas del Hospital Juárez de México a las cuáles se les realizó.

- 1.-La detección de pH vaginal.
- 2.-La prueba de KOH (olor característico a aminas).
- 3.-Exámen en fresco.
- 4.-Tinción de Gram para la evaluación de la flora vaginal.
- 5.-Cultivo de *Gardnerella vaginalis* y de la flora bacteriana aerobia levaduras.
- 6.-La prueba de prolina amino péptidasa.

EVALUACION DE PH

Por medio de un isopo esteril de algodón se tomo una muestra de la secreción vaginal de la pared lateral de la vagina, luego el isopo fué rolado en la tira indicadora (universalindikator PH 0-14 Merck) y el cambio de coloración no evalúa el pH.

TINCIÓN DE GRAM.

El mismo isopo utilizado para la detección de pH fue utilizado para realizar un frotis en un portaobjetos, al que posteriormente se le realizó la tinción de Gram para evaluar la presencia de los diferentes morfotipos presentes.

LIBERACION O PRESENCIA DE AMINAS.

Se evaluó por la adición del alcali KOH 10% a la secreción vaginal como sigue. Con un isopo esteril se obtuvo una muestra de la secreción vaginal y posteriormente se depositó en un tubo de vidrio que contenía 1 ml de KOH al 10% esteril, inmediatamente se detectó la presencia o ausencia de aminas libres por el olor característico a pescado que desprendía la solución.

EXAMEN EN FRESCO.

Se realizó con una muestra de secreción vaginal obtenido con un isopo estéril y humedecido con sol salina fisiológica 0.85%. Se examinó microscópicamente para buscar la presencia de trichomonas vaginalis, levaduras, hifas y células clave.

METODOS MICROBIOLÓGICOS.

Para recobrar *Gardnerella vaginalis* se utilizó el medio semiselectivo HBT agar. La muestra cervico vaginal se obtuvo con un aplicador de algodón estéril y puesto en 2 ml de caldo de infusión cerebro-corazón, la muestra fue entonces enviada al laboratorio y procesado para el aislamiento e identificación de *G.vaginalis*. El isopo fué extraído del medio de transporte y el medio de agar fué inoculado girando el isopo, cruzando un sector de la placa, luego el inóculo con una asa bacteriológica fue estirado en toda la plaza de cultivo permitiendo el crecimiento y aislamiento. Posteriormente se incubó la placa a 37° C 48 hrs. en una jarra bacteriológica con una atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂.

Las colonias de *G. vaginalis* fueron presuntamente identificadas por la hemólisis generada en el medio de cultivo, tinción de Gram (observación de pequeños bacilos Gram negativos y la punta de oxidasa negativa).

La identificación definitiva se lleva a cabo con las pruebas de hidrólisis de hipurato e hidrólisis de almidón con técnicas microbiológicas estandarizadas.

Para recobrar levaduras y la flora bacteriana aerobia. Se tom6 una muestra de secreci6n cervico-vaginal con un isopo de algod6n y depositada en el medio de transporte caldo infusi6n cerebro-coraz6n y enviada al laboratorio. La muestra fue entonces inoculado en base de agar sangre (bioxi6n) suplementado con 5% de sangre de carnero, agar Mac Conkey (bioxi6n) y agar chocolate y procesada con t6cnicas de cultivo estandar luego las placas de cultivo fueron incubadas a 37° C de 24-48 hrs. y posteriormente se identificaron los diferentes tipos coloniales presentes e identificados con t6cnicas microbiol6gicas estandarizadas.

PRUEBA DE L-PROLINA AMINOPEPTIDASA

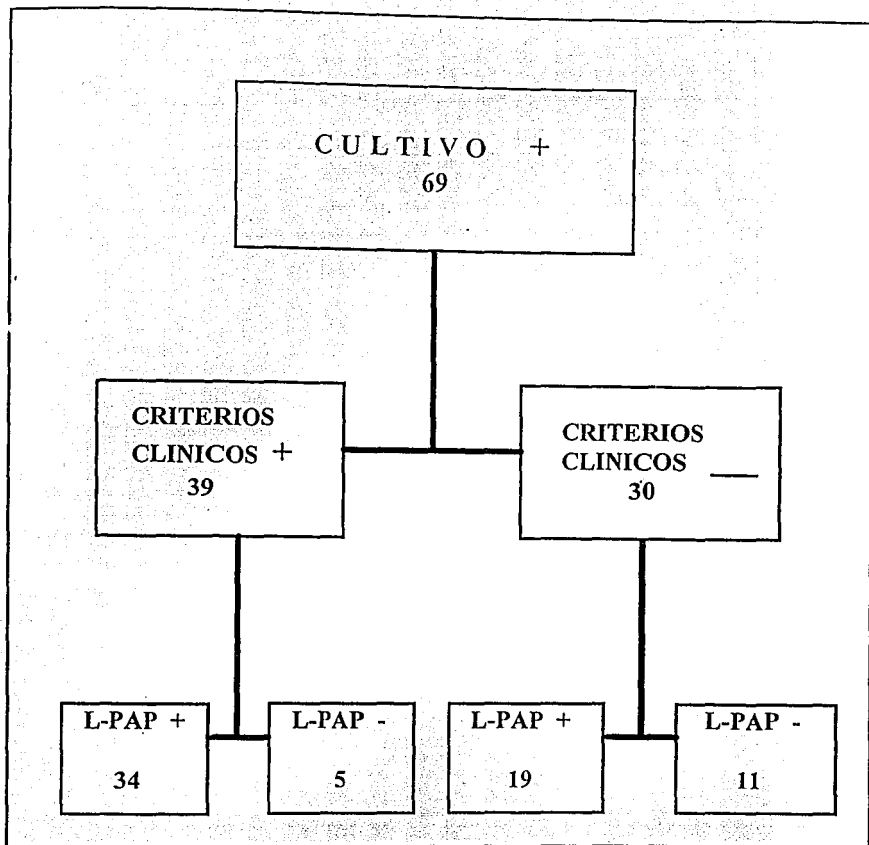
El ensayo se llevo a cabo como se describió originalmente un isopo conteniendo secreción vaginal fue depositado dentro de un tubo que contenía 1.5 ml de sol-salina fisiológica 0.85 % y agitado para resuspender el material vaginal. Posteriormente el isopo fue retirado y la suspensión fue transferida a tubos de microcentrifuga, luego fue centrifugado a 14 000 rpm por 5 minutos en una microcentrifuga hasta empaquetar la suspensión, el sobrenadante fue desechado a excepción de 100 µl para resuspender el botón y entonces 50 µl fueron adicionados a una microplaca que contenía 50 µl de L-Prolina B-naftilamida al 0.2% (sigma) disuelta en trisbuffer PH 7.0 previamente preparadas y conservadas en congelación a - 70° C. Posteriormente las placas fueron cubiertas para prevenir la evaporación e incubarlas a 37° C por 4 hrs. Entonces 50 µl del revelador SAL-FAST GARNET GBC (sigma) fueron adicionados a cada pozo para dectar B-naftilamida y leer visualmente el color rosa o rojo indican positividad el color ambar o anaranjado indica negatividad después de 5 minutos.

CRITERIOS DE SELECCION DE CASOS:

- 1.- Mujeres con signología clínica de vaginosis bacteriana
- 2.- Mujeres con manifestaciones clínicas de leucorrea
- 3.- Mujeres que no esten recibiendo alguna medicación por vía vaginal.
- 4.- Mujeres que no hayan recibido medicación antimicrobiana en los últimos 10 días previos a su consulta.
- 5.- Pacientes que voluntariamente acepten participar en el estudio

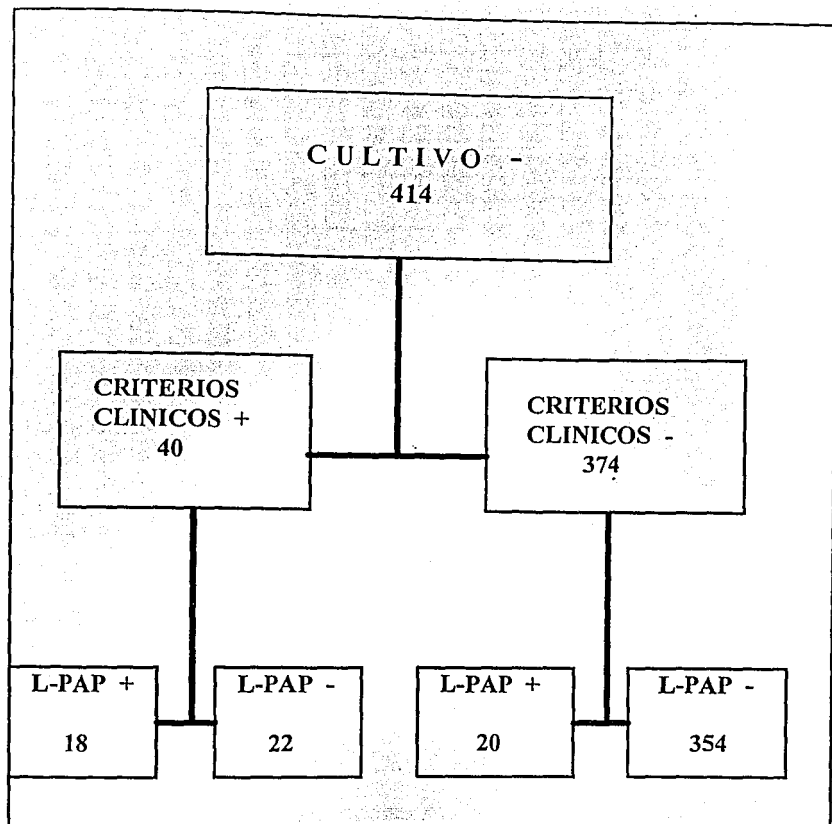
CRITERIOS DE EXCLUSION DE CASOS:

- 1.- Mujeres que no acepten participar después de una amplia explicación.
- 2.- Mujeres que no completen alguno de los estudios.
- 3.- Pacientes que no acudan a sus citas.
- 4.- Pacientes que tomen o se apliquen alguna medicación no establecida en el proyecto.



ESQUEMA 1

MUESTRA PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO



ESQUEMA 2

MUESTRA PACIENTES CON CULTIVO NEGATIVO

ESTANDAR DIAGNOSTICO IDEAL

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO

	+	-	TOTAL
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
	a + c	b + d	a + b + c + d

a= No. de casos verdaderos positivos

b= No. de casos falsos positivos

c= No. de casos falsos negativos

d= No. de verdaderos negativos

a+c= Total de casos con enfermedad

b+d= Total de casos sin enfermedad

a+b= Total de casos con resultados positivos independientemente de que tuvieran o no la enfermedad.

c+d= Total de casos con resultados negativos independientemente de que tuvieran o no la enfermedad.

a+b+c+d= Total de casos estudiados.

SENSIBILIDAD: Probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo tiene realmente la enfermedad.

FORMULA:

Sensibilidad=
$$\frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Total de casos con la enfermedad}}$$

$$S = \frac{a}{a + c}$$

ESPECIFICIDAD: Probabilidad de que la prueba resulte negativa, cuando el individuo en realidad no presenta el padecimiento.

FORMULA:

Especificidad=
$$\frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Total de casos sin la enfermedad}}$$

$$E = \frac{d}{b + d}$$

VALORES DE PREDICCIÓN

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: Si la prueba es positiva en un individuo, que probabilidades hay de que el sujeto realmente tenga el padecimiento.

TEOREMA DE BAYES

$$VP+ = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{(\text{sensibilidad}) (\text{prevalencia}) + (1 - \text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia})}$$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: Si la prueba es negativa en un individuo, que probabilidad hay de que el individuo no sufra el padecimiento.

TEOREMA DE BAYES

$$VP- = \frac{(\text{Especificidad}) (1 - \text{Prevalencia})}{(\text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia}) + (1 - \text{sensibilidad}) (\text{prevalencia})}$$

CULTIVO

CRITERIOS
CLINICOS

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
PRESENTES	39 a	40 b	79
AUSENTES	30 c	374 d	404
	69	414	483

SENSIBILIDAD:

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{39}{39+30} = .56$$

ESPECIFICIDAD:

$$E = \frac{d}{b+d} = \frac{374}{374+40} = .90$$

CUADRO 1

VPP:

$$VP+ = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{(\text{sensibilidad}) (\text{prevalencia}) + (1 - \text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia})}$$

$$VP+ = \frac{(.56) (.15)}{(.56) (.15) + (1 - .90) (1 - .15)} = .48$$

VPN:

$$VPN = \frac{(\text{Especificidad}) (1 - \text{Prevalencia})}{(\text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia}) + (1 - \text{sensibilidad}) (\text{prevalencia})}$$

$$VPN = \frac{(.90) (.85)}{(.90) (.85) + (.44) (.15)} = .87$$

CRITERIOS CLINICOS

L-PAP

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	52 a	39 b	91
NEGATIVO	27 c	365 d	392
	79	404	483

SENSIBILIDAD:

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{52}{52+27} = .65$$

ESPECIFICIDAD:

$$E = \frac{d}{b+d} = \frac{365}{365+39} = .90$$

CUADRO 2

VPP:

$$VP+ = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{(\text{sensibilidad}) (\text{prevalencia}) + (1 - \text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia})}$$

$$VP+ = \frac{(.65) (.15)}{(.65) (.15) + (1 - .90) (1 - .15)} = .53$$

VPN:

$$VPN = \frac{(\text{Especificidad}) (1 - \text{Prevalencia})}{(\text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia}) + (1 - \text{sensibilidad}) (\text{prevalencia})}$$

$$VPN = \frac{(.90) (.85)}{(.90) (.85) + (.35) (.15)} = .89$$

CULTIVO

L-PAP

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	53 a	38 b	91
NEGATIVO	16 c	376 d	392
	69	414	483

SENSIBILIDAD:

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{53}{53+16} = .76$$

ESPECIFICIDAD:

$$E = \frac{d}{b+d} = \frac{376}{376+38} = .90$$

CUADRO 3

VPP:

$$VP+= \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia}}{(\text{sensibilidad}) (\text{prevalencia}) + (1-\text{especificidad}) (1-\text{prevalencia})}$$

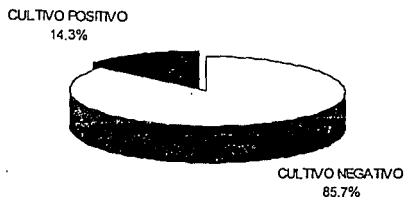
$$VP+= \frac{(.76) (.15)}{(.76) (.15) + (1-.90) (1-.15)} = .58$$

VPN:

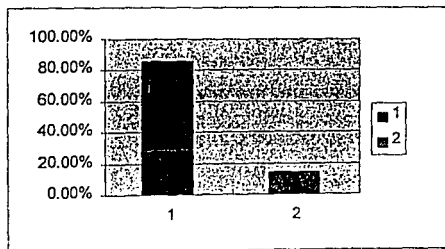
$$VPN= \frac{(\text{Especificidad}) (1 - \text{Prevalencia})}{(\text{especificidad})(1-\text{prevalencia}) + (1-\text{sensibilidad}) (\text{prevalencia})}$$

$$VPN= \frac{(.90) (.85)}{(.90) (.85) + (.14) (.15)} = .95$$

FRECUENCIA DE *G. vaginalis* EN POBLACION DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

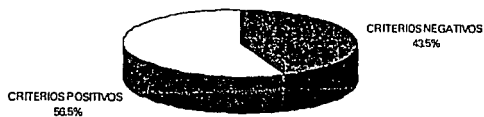


POBLACION ESTUDIADA N=483

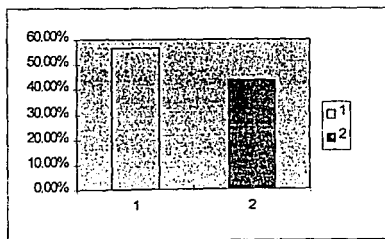


GRAFICA No. 1

CORRELACION DE CRITERIOS DE AMSEL Y CULTIVO POSITIVO DE *G. vaginalis*

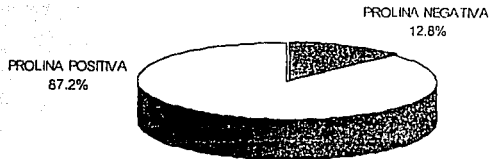


TOTAL DE PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO
N 49

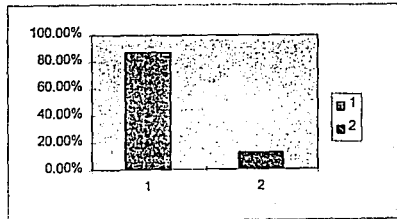


GRAFICA No. 2

**CORRELACION DE CULTIVO, CRITERIOS
DE AMSEL, Y L-PROLINA POSITIVOS**

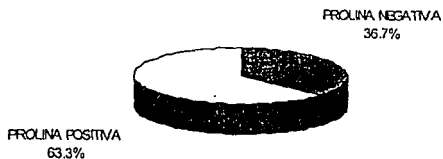


**PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO
CRITERIOS DE AMSEL POSITIVOS Y
PRUEBA DE PROLINA POSITIVA N=69**

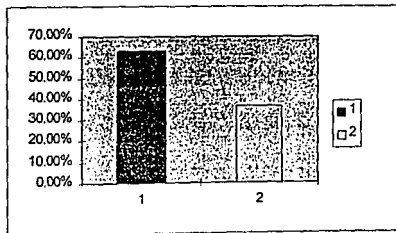


GRAFICA No. 3

CORRELACION DE CULTIVO, CRITERIOS DE AMSEL, Y L-PROLINA POSITIVOS



PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO
CRITERIOS DE AMSEL NEGATIVOS Y
PRUEBA DE PROLINA POSITIVA N=30



GRAFICA No. 4

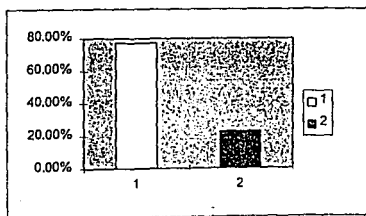
CORRELACION DE PRUEBA DE PROLINA POSITIVA CON EL CULTIVO DE *G. vaginalis*

PROLINA NEGATIVA
23.2%



PROLINA POSITIVA
76.8%

PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO N=69
PAP. PRUEBA DE PROLINA AMINO PEPTIDASA



GRAFICA No. 5

En el esquema 1 y 2 se demuestra la epidemiología de la vaginosis bacteriana en un estudio hecho en 483 pacientes, estudiadas en el Hospital Juárez de México.

Se dividieron en dos grupos: El primer grupo lo confirmaron todas aquellas pacientes con cultivo positivo (ESQUEMA 1) y el segundo grupo por pacientes con cultivo negativo. (ESQUEMA 2). En ambos grupos se valoraron a las pacientes con cultivo, criterios clínicos de Amsel y prueba de L-prolina-aminopéptidasa.

Se encontró que la presencia o ausencia de los criterios clínicos para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, encontrando que en solo 39 (56.5%) estuvieron presentes, cuando había cultivo positivo y en 30 (43.5%) estuvieron ausentes.

Se realizó la prueba de L-prolina aminopéptidasa en pacientes con cultivo positivo y criterios clínicos positivos: En 34 (87.2%) la prueba resulto positiva y en 5 (12.8%) fué negativa.(GRAFICA 3). También se realizó la prueba de prolina aminopéptidasa en pacientes con cultivo positivo y criterios clínicos negativos obteniendo que en 19 (63.3%) fué positiva la prueba, mientras que en 11(36.7%) fue negativa. en términos generales la prueba L-prolina aminopéptidas

en pacientes con cultivo positivo es de 53 (76.8%) resultaron positivas a L-PAP y sólo 16(23.2%) fueron negativas a L-PAP. Se utilizó el estandar diagnóstico ideal, para valorar sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Se obtuvo los siguiente:

Criterios clínicos vs Cultivo. CUADRO 1

Una sensibilidad de 56%, especificidad de 90%, VPP:48%, VPN:87%, L-PAP VS Criterios clínicos. CUADRO 2

Una sensibilidad de 65%, especificidad de 90%, VPP: 53%, VPN: 89%, L-PAP VS Cultivo. CUADRO 3

Una sensibilidad de 76%, especificidad de 90%, VPP:58%, VPN:95%.

DISCUSION:

Las pacientes con vaginosis bacteriana frecuentemente acuden a consulta por presentar sintomatología. Para el diagnóstico de este síndrome se utilizan con frecuencia los criterios clínicos de Amsel y nosotros demostramos que no son de gran utilidad ni patognomónicos de VB, ya que pueden estar presentes en otras infecciones como lo es la infección por tricomonas.

Por otro lado resultan ser subjetivos y dependen del observador para que les otorgue un determinado valor, existen factores que modifican estos criterios clínicos como son: (Duchas vaginales, coito reciente, exceso de moco).

En este estudio se llegó a la conclusión de que la prueba de L-prolina aminopéptidasa es útil para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, resulta ser además una prueba rápida (4 hrs.), sencilla, reproducible y de bajo costo.

Tiene una alta sensibilidad así como especificidad. Un valor predictivo positivo arriba del 50% y un valor predictivo negativo de

95%, lo que la hace ser de gran utilidad en el diagnóstico de VB. Como esta prueba mide la actividad de la enzima L-prolina aminopéptidasa y la *G. vaginalis* no es la única bacteria que la produce, existen otras bacteria y hongos productores de esta enzima y que en un momento determinado nos de una prueba de L-prolina aminopéptidasa positiva y no se trate de Vaginosis bacteriana.

Algunos microorganismos productores de L-prolina aminopéptidasa más frecuentemente encontrados en vagina son : *Candida*, *Mobiluncus* y algunas especies de *Lactobacillus*.

Sin embargo la *G. vaginalis* puede encontrarse como flora normal de la vagina y no estar produciendo dicho síndrome. En realidad cuando el desarreglo de la flora cervico-vaginal, conduce a la presencia signos y síntomas, hay un predominio de *G. vaginalis* y obviamente, una mayor concentración de L-prolina aminopéptidasa, lo que plantea una opción excelente para la utilización de esta cinta reactiva.

Como se calculó, el valor predictivo negativo de la prueba, indica que más del 87% de las mujeres con una prueba negativa, estarán libres de vaginosis bacteriana. Por el otro lado esta prueba rápida

puede ser de ayuda en el seguimiento de pacientes que reciben tratamiento. La prueba se negativiza coincidente con la normalización de la ecología bacteriana residente, así como una disminución casi a cero del número de colonias de *G. vaginalis*.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Abdennader, S., I. Casin, N. Brunat, M. Janier, Y. Perol, and P. Morel. 1990. Sexual transmission of *Gardnerella vaginalis*. Genitourin. Med. 66:45.
- 2.- Adeniyi-Jones, C., D. J. Groves, A. Mannethu, and J. Righter, 1980. *Hemophilus vaginalis* bacteremia. Can. Med. Assoc. J. 122:424-426.
- 3.- Åkerlun, M., and P.- A. Mårdh. 1974. Isolation and identification of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*) in women with infections of the lower genital tract. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 53:85-90.
- 4.- Amsel, R., P. A. Totten, C. A. Spiegel, K. C. S. Chen, D. Eschenbach, and K. K. Holmes. 1983. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am. J. Med 74:14-22.
- 5.- Balsdon, M. J., G. E. Taylor, L. Pead, and R. Maskell. 1980. *Corynebacterium vaginale* and vaginitis: a controlled trial of treatment. Lancet 1:501-504.
- 6.- Bannatyne, R. M., J. Jackowski, R. Cheung, and K. Biers. 1987. Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* to metronidazole, its bioactive metabolites, and tinidazole. Am. J. Clin. Pathol. 87:640-641.
- 7.- Berardi-Grassias, L., O. Roy, J. C. Berardi, and J. Furioli. 1988. Neonatal meningitis due to *Gardnerella vaginalis*. Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7:406-407.

- 8.- Beveridge, T. J. 1988. Wall ultrastructure: how little we know, p. 3-20. In P. Actor, L. Danco-Moore, M. L. Higgins, M. R. J. Salton, and G. D. Shockman (ed.), Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- 9.- Blackwell, A. L. and D. Barlow. 1984. Anaerobic vaginosis: clinical and diagnostic aspects. Scand. J. Urol. Nephrol. 86 (Suppl.):129-133.
- 10.-Blackwell, A. L., A. R. Fox, I. Phillips, and D. Barlow. 1983. Anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis): clinical, microbiological, and therapeutic findings. Lancet ii:1379-1382.
- 11.-Borchardt, K. A., B. S. Adly, R. F. Smith, J. Eapen, and C. B. Beal. 1989. Importance of *Gardnerella vaginalis* as an etiological agent in bacterial vaginosis. Genitourin. Med. 65:285.
- 12.-Boustouller, Y. L., A. P. Johnson, and D. Taylor-Robinson. 1987. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electronmicroscopy. J. Med. Microbiol. 23:327-329.
- 13.-Bowie, W. R., C. E. Shaw, D. G. W. Chan, J. Boyd, and W. A. Black. 1986. In vitro activity of difloxacin hydrochloride (A. 56619), A-56620, and cefixime (CL 284,635; FK 027) against selected genital pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 30:590-593.
- 14.-Briselden, A. M., and S. L. Hillier. 1990. Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 28:2761-2764.

- 15.-Bro, F. 1989. Vaginal microbial flora in women with and Without vaginal discharge registered in general practice. Dan. Med. Bull. 36:483-485.
- 16.-Bump, R. C., and W. J. Buesching III. 1988. Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission. Am. J. Obstet. Gynecol. 158:935-939.
- 17.-Burdge, D. R., W. R. Bowie, and A. W. Chow. 1986. Gardnerella vaginalis-associated balanoposthitis. Sex Transm. Dis. 13:159-162.
- 18.-Catlin, B. W. 1970. *Neisseria meningitidis* (menigococcus), p. 76-81. In J. E. Blair, E. H. Lennette, and J. P. Truant (ed). Manual of clinical microbiology, 1st ed. American Society for Microbiology, Washington. D. C.
- 19.-Catlin, B. W. 1975. Cellular elongation under the influence of antibacterial agents: way to differentiate coccobacilli from cocci. J. Clin. Microbiol. 1:102-105.
- 20.-Catlin, B. W. 1990. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 3:293-320.
- 21.-Chen, K. C. S., R. Amsel, D. A. Eschenbach, and K. K. Holmes.
- 22.-Ching, L. Q., K. A. Borchardt, R. F. Smith, and C. B. Beal. 1988. A 24 hour plastic envelope method for isolating and identifying *Gardnerella vaginalis* (PEM-GVA). Genitourin. Med. 64:180-184.
- 23.-Chowdhury, M. N. H. 1986. *Gardnerella vaginalis* carriage in male patients. Trop. Geogr. Med. 38:137-140.

- 24.-Clarke, R. W., L. E. Collins, and R. Maskell. 1989. *Gardnerella vaginalis* as a urinary pathogen. J. Infect. 19:191-193.
- 25.-Cook, R. L., G. Reid, D. G. Pond, C. A. Schmitt, and J. D. Sobel. 1989. Clue cells in bacterial vaginosis: immunofluorescent identification of the adherent gram-negative bacteria as *Gardnerella vaginalis*. J. Infect. Dis. 160:490-496
- 26.-Coyle, M. B., and B. A. Lipsky. 1990. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clin. Microbiol Rev. 3:227-246.
- 27.-Cristiano, L., N. Coffetti, G. Dalvai, L. Lorusso, and M. Lorenzi. 1989. Bacterial vaginosis: prevalence in outpatients. association with some micro-organisms and laboratory indices. Genitourin. Med. 65:382-387.
- 28.-Criswell, B. S., C. L. Ladwig, H. L. Gardner, and C. D. Dukes. 1969. *Haemophilus vaginalis*. vaginitis by inoculation from culture Obstet. Gynecol. 33:195-199.
- 29.-Criswell, B. S., J. H. Marston, W. A. Stenback, S. H. Black, and H. L. Gardner. 1971. *Haemophilus vaginalis* 594, a gram negative organism? Can. J. Microbiol. 17:865-869.
- 30.-Criswell, B. S., W. A. Stenback, S. H. Black, and H. L. Gardner. 1972. Fine structure of *Haemophilus vaginalis*. J. Bacteriol. 109:930-932
- 31.-Dawson, S. G., C. A. Ison, G. Csonka, and C. S. F. Easmon. 1982. Male carriage of *Gardnerella vaginalis*. Br. J. Vener. Dis. 58:243-245.

- 32.-Dunkelberg, W. E. 1977. *Corynebacterium vaginale*. Sex. Trasm. Dis. 4:69-75.
- 33.-Dunkelberg, W. E., Jr., and I. McVeigh. 1969. Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 35:129-145.
- 34.-Dunkelberg, W. E., Jr., S. Skaggs, and D. S. Kellogg, Jr. 1970. A study and new description of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). *Am. J. Clin. Pathol.* 53:370-377
- 35.-Easmon, C. S. F., C. A. Ison, C. M. Kaye, R. M. Timewell, and S. G. Dawson. 1982. Pharmacokinetics of metronidazole and its principal metabolites and their activity against *Gardnerella vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.* 58:246-249.
- 36.-Edmunds, P. N. 1960. *Haemophilus vaginalis*: morphology, cultural characteristics and viability. *J. Pathol. Bacteriol.* 79: 273-283.
- 37.-Edwards, D. I. 1979. Mechanism of antimicrobial action of metronidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 5:499-502.
- 38.-Elsner, P., and A. A. Hartmann. 1987. *Gardnerella vaginalis* in the male upper genital tract: a possible source of reinfection of the female partner. *Sex. Transm. Dis.* 14:122-123.
- 39.-Eschenbach, D. A., P. R. Davick, B. L. Williams, S. J. Klebanoff, K. Young-Smith, C. M. Critchlow, and K. K. Holmes. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 27:251-256.

- 40.-Eschenbach, D. A., S. Hillier, C. Critchlow, C. Stevens, T. DeRouen, and K. K. Holmes. 1988. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158:819-828.
- 41.-Fairley, K. F., and D. F. Birch. 1983 Unconventional bacteria in urinary tract disease: *Gardnerella vaginalis*. *Kidney Int.* 23:862-865.
- 42.-Fairley, K. F., and D. F. Birch. 1989. Detection of bladder bacteriuria in patients with acute urinary symptoms. *J. Infect. Dis.* 159:226-231.
- 43.-Fredricsson, B., K. Englund, L. Weintraub, A. Olund, and C. E. Nord. 1989. Bacterial vaginosis is not a simple ecological disorder. *Gynecol. Obstet. Invest.* 28:156-160.
- 44.-Gardner, H. L. 1980. *Haemophilus vaginalis* vaginitis after twenty-five years. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137:385-390.
- 45.-Gardner, H. L. 1983. "Non-specific" vaginitis: a non-entity. *Scand. J. Infect. Dis.* 40 (Suppl.):7-10.
- 46.-Gardner, H. L., and C. H. Dukes. 1955 *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as "nospecific" vaginitis. *Am. J. Obstet Gynecol.* 69: 962-976.
- 47.-Gibbs, R. S., M. H. Weiner, K. Walmer, and P. J. St. Clair. 1987. Microbiologic and serologic studies of *Gardnerella vaginalis* in intra-amniotic infection. *Obstet. Gynecol.* 70:187-190.

- 48.-Goldberg, R. L., and J. A. Washington II. 1976. Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginae*) from peptone-starch-dextrose agar and Columbia colistin-nalidixic acid agar. *J. Clin. Microbiol.* 4:245-247.
- 49.-Greaves, W. L., J. Chungafung, B. Morris, A. Haile, and J. L. Townsend. 1988. Clindamycin versus metronidazole in the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 72:799-802.
- 50.-Greenwood, J. R. 1983. Current taxonomic status of *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Infect. Dis.* 40 (Suppl.):11-14.
- 51.-Greenwood, J. R., and M. J. Pickett. 1979. Salient features of *Haemophilus vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 9:200-204.
- 52.-Greenwood, J. R., and M. J. Pickett. 1980. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:170-178
- 53.-Hansen, W., B. Vray, K. Miller, F. Crokaert, and E. Yourasowsky. 1987. Detection of *Gardnerella vaginalis* in vaginal specimens by direct immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 25:1934-1937.
- 54.-Harper, J. J., and G. H. G. Davis. 1982. Cell wall analysis of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:48-50.
- 55.-Heisterberg, L., P. E. Branebjerg, A. Bremmelgaard, J. Scheibel, and L. Hoj. 1987. The role of vaginal secretory immunoglobulin A. *Gardnerella vaginalis*, anaerobes, and *Chlamydia trachomatis* in postabortal pelvic inflammatory disease. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 66:99-102.

- 56.- Hill, G. B., D. A. Eschenbach, and K. K. Holmes. 1984. Bacteriology of the vagina. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 86 (Suppl.):23-39.
- 57.- Hillier, S., M. A. Krohn, D. H. Watts, P. Wolner-Hanssen, and D. A. Eschenbach. 1990. Microbiologic efficacy of intravaginal clindamycin cream for the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 76:407-413.
- 58.- Hillier, S. L., J. Martius, M. Krohn, N. Kiviat, K. K. Homes, and D. A. Eschenbach. 1988. A case control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N. Engl. J. Med.* 319:972-978.
- 59.- Holmes, K. K., C. Spiegel, R. Amsel, D. A. Eschenbach, K. C. S. Chen, and P. Totten. 1981. Nonspecific vaginosis. *Scand. J. Infect. Dis* 26(Suppl.):110-114.
- 60.- Holst, E. 1990. Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission. *J. Clin. Microbiol.* 28:2035-2039.
- 61.- Holst, E., L. Svensson, A. Skarin, L. Weström, and P. A. Mårdh. 1984. Vaginal colonization with *Gardnerella vaginalis* and anaerobic curved rods. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 86(Suppl.): 147-152.
- 62.- Holst, E., B. Wathne, B. Hovelius, and P. A. Mardh. 1987. Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:536-541.
- 63.- Huth, E. J. 1989. Style notes: bacterial vaginosis or vaginal bacteriosis? *Ann. Intern. Med.* 111:553-554.

- 64.- Ison, C. A., S. G. Dawson, J. Hilton, G. W. Csonka, and C.S.F. Easmon. 1982. Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. J. Clin Pathol. 35:550-554.
- 65.-Ison, C. A., and C. S. F. Easmon. 1985. Carriage of *Gardnerella vaginalis* and anaerobes in semen. Genitourin. Med. 61:120-122.
- 66.-Ison, C. A., D. G. Harvey, A. Tanna, and C. S. F. Easmon. 1987. Development and evaluation of scheme for serotyping *Gardnerella vaginalis*. Genitourin. Med. 63:196-201.
- 67.-Joesoef, M. R., S. L. Hillier, S. Josodiwondo, and M. Linnan. 1991. Reproducibility of a scoring system for Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. J. Clin. Microbiol. 29:1730-1731.
- 68.-Jolly, J. L. S. 1983. Minimal criteria for the identification of *Gardnerella vaginalis* isolated from the vagina. J. Clin. Pathol. 36:476-478.
- 69.-Jones, B. M., I. Geary, A. B. Alawattegama, G. R. Kinghorn, and B. Y. Duerden. 1985. *In-vitro* and *in-vivo* activity of metronidazole against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp. and *Mobiluncus* spp. in bacterial vaginosis. J. Antimicrob. Chemother. 16:189-197.
- 70.-Jones, B. M., G. R. Kinghorn, and B. I. Duerden. 1988. In vitro activity of azithromycin and erythromycin against organisms associated with bacterial vaginosis and chancroid. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 7:551-553.

- 71.-Josephson, S., J. Thomason, K. Sturino, R. Zabransky, and J. Williams. 1988 *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract: incidence and significance in a hospital population. *Obstet Gynecol.* 71:245-250.
- 72.-King, A., C. Boothman, and I. Phillips. 1989. Comparative *in vitro* activity of meropenem on clinical isolates from the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (Suppl.): 31-45.
- 73.-King, A., C. Boothman, and I. Phillips. 1990. Comparative *in vitro* activity of ceftiofime and ceftiofime, two new cephalosporins, *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.* 9:677-685.
- 74.-King, A., and I. Phillips 1986. The comparative *in vitro* activity of pefloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 17(suppl. B):1-10.
- 75.-Lam, M. H., and D. F. Birch. 1991. Survival of *Gardnerella vaginalis* in human urine. *Am. J. Clin. Pathol.* 95:234-239.
- 76.-Lam, M. H., and D. F. Birch, and K. F. Fairley. 1988. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract. *J. Clin. Microbiol.* 26:1130-1133.
- 77.-La Scolea, L. J., Jr., D. M. Dryja, and W. P. Dillon. 1984. Recovery of *Gardnerella vaginalis* from blood by the quantitative direct plating method. *J. Clin. Microbiol.* 20:568-569.
- 78.-Lefevre, J.-C., J.-P. Lepargneur, R. Bauriaud, M.- A. Bertrand, and C. Blanc. 1991. Clinical and microbiologic features of urethritis in men in Toulouse, France. *Sex. Transm. Dis.* 18: 76-79.

- 79.-Legrand, J. C., A. Alewacters, L. Leenaerts, P. Gilbert, M. Labbe, and Y. Glupezynski. 1989. *Gardnerella vaginalis* bacteremia from pulmonary abscess in a male alcohol abuser. *J. Clin. Microbiol.* 27:1132-1134.
- 80.-Leopold, S. 1953. Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. *U. S. Armed Forces Med. J.* 4:263-266.
- 81.-Lossick, J. G. 1982. *Gardnerella vaginalis* -associated leukorrhea: the disease and its treatment. *Rev. Infect. Dis.* 4(Sppl.): S793-S800.
- 82.-Lossick, J. G. 1990. Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. *Rev. Infect. Dis.* 12 (Suppl.6):S665-S681.
- 83.-Mardh, P.- A., E. Holst, and B. R. Maller. 1984. The grivet monkey as a model for study of vaginitis: challenge with anaerobic curved rods and *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 86(Suppl.):201-205.
- 84.-Mardh, P.- A. and L. Westrom. 1976. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 13: 661-666.
- 85.-McCarthy, L. R., P. A. Mickelsen, and E. G. Smith. 1979. Antibiotic susceptibilities of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) to 21 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:186-189.
- 86.-Mickelsen, P. A., L. R. McCarthy, and M. E. Mangum. 1977. New differential medium for the isolation of *Corynebacterium vaginale*. *J. Clin. Microbiol.* 5:488-489.

- 87.-Moi, H., R. Erkkola, F. Jerve, G. Nelleman, B. Bymose, K. Alaksen, and E. Tornqvist. 1989. Should male cosorts of women with bacterial vaginosis be treated? *Genitorium. Med.* 65:263-268.
- 88.-Nagy, E., M. Petterson, and P.- A. Mardh. 1991. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. *APMIS* 99:739-744.
- 89.-O'Donnell, A. G., D. E. Minnikin, M. Goodfellow, and P. Piot. 1984. Fatty acid, polar lipid and wall amino acid composition of *Gardnerella vaginalis*. *Arch. Microbiol.* 138:68-71.
- 90.-Panvonen, J. 1983. Physiology and ecology of the vagina. *Scand. J. Infect. Dis.* 40 (Suppl.):31-35.
- 91.-Peters, M., and P. Piot. 1985. Adhesion of *Gardnerella vaginalis* to vaginal epithelial cells: variables affecting adhesion and inhibition by metronidazole. *Genitourin. Med.* 61:391-395.
- 92.-Petersen, E. E., and K. Pelz. 1984. Anaerobic vaginosis. *Lancet* 1:337-338.
- 93.-Pheifer, T. A., P. S. Forsyth, M. A. Durfee, H. M. Pollock, and K. K. Holmes. 1978. Nonspecific vaginitis: role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N. Engl. J. Med.* 298:1429-1434.
- 94.-Piot, P. 1984. Bacterial vaginosis: an evaluation of treatment. *Scand. J. Urol Nephrol.* 86(Suppl.):229-235.

- 95.-Piot. P. 1991. Gardnerella, Streptobacillus, Spirillum, and Colymmatobacterium, p. 483-487. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 96.-Piot, P., and E. Van Dyck. 1983. Isolation and identification of Gardnerella vaginalis. Scand. J. Infect. Dis. 40 (Suppl.):15-18.
- 97.-Piot, P., E. Van Dyck, M. Goodfellow, and S. Falkow. 1980. A taxonomic study of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis) Gardner and Dukes 1955. J. Gen. Microbiol. 119: 373-396.
- 98.-Piot, P., E. Van Dyck, M. Peeters, J. Hale, P. A. Totten, and K. K. Holmes. 1984. Biotypes of Gardnerella vaginalis. J. Clin. Microbiol. 20:677-679.
- 99.-Piot, P., E. Van Dyck, P. A. Totten, and K. K. Holmes. 1982. Identification of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. J. Clin. Microbiol. 15:19-24
- 100.-Ralph, E. D. 1983. Comparative antimicrobial activity of metronidazole and the hydroxy metabolite against Gardnerella vaginalis. Scand. J. Infect. Dis. 40 (Sppl.):115-120.
- 101.-Ralph, E. D., Y. E. Amatrieks. 1980. Relative susceptibilities of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis), Neisseria gonorrhoeae, and Bacteroides fragilis to metronidazole and its two major metabolites. Sex. Transm. Dis. 7:157-160.

- 102.-Ralph, E. D., T. W. Austin, F. L. M. Pattison, and B. C. Schieven 1979. Inhibition of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) by metronidazole, tetracycline, and ampicillin. Sex. Transm. Dis. 6:199-202.
- 103.-Ratnam, S., and B. L. Fitzgerald. 1983. Semiquantitative culture of *Gardnerella vaginalis* in laboratory determination of nonspecific vaginitis. J. Clin. Microbiol. 18:344-347.
- 104.-Reyn, A., A. Birch-Andersen, and S. P. Lapage. 1966. An electron microscopic study of thin sections of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) and some possibly related species. Can. J. Microbiol. 12:1125-1136.
- 105.-Sadhu, K., P. A. G. Domingue, A. W. Chow, J. Nelligan, N. Cheng, and J. W. Costerton. 1989. *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell wall lipopolysaccharide. J. Med. Microbiol. 29:229-235.
- 106.-Sautter, R. L., and W. J. Brown. 1980. Sequential vaginal cultures from normal young women. J. Clin. Microbiol. 11:479-484.
- 107.-Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 1983. Panel discussion. First International Conference on Vaginosis, Kristiansand, Norway, April 16-17, 1982. Scand. J. Infect. Dis 40(Suppl.): 121-126.
- 108.-Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. 1984. Reports from working groups. The symposium on bacterial vaginosis (Stockholm, January 1984). Scand. J. Urol. Nephrol 86(Suppl.):259-266.

- 109.-Schnadig, V. J., K. D. Davie, S. K. Shafer, R. B. Yandell, M. Z. Islam, and E. V. Hannigan: 1989. The cytologist and bacteriosis of the vaginal-ectocervical area. Clues, commas and confusion. *Acta Cytol.* 33:287-297.
- 110.-Scott, T. G., C. J. Smyth: 1987. Haemagglutination and tissue culture adhesion of *Gardnerella vaginalis*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1999-2005.
- 111.-Sehgal, S. C., and V. Nalini: 1990. The role and prevalence of *Gardnerella vaginalis* in anaerobic vaginosis. *Infection* 18:83-85.
- 112.-Shanker, S., and R. Munro: 1982. Sensitivity of *Gardnerella vaginalis* to metabolites of metronidazole and tinidazole. *Lancet*:167.
- 113.-Skarin, A., and P.-A. Mardh: 1981. Scanning electron microscopic examination of *Bacteroides fragilis* and *Gardnerella vaginalis* after exposure to concentration gradients of metronidazole and tinidazole. *Scand. J. Infect. Dis.* 26(Suppl.): 54:59.
- 114.-Skarin, A., and J. Sylwan: 1986. Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B* 94:399-403.
- 115.-Smith, R. F: 1979. Comparison of two media for isolation of *Haemophilus vaginalis*. *J. Clin Microbiol.* 9:729-730.

- 116.-Smith, R. F., and W. E. Dunkelberg, Jr. 1977. Inhibition of *Corynebacterium vaginale* by metronidazole. Sex Transm. Dis. 4:20-21.
- 117.-Sobel, J. D., P. Myers, M. E. Levison, and D. Kaye. 1982. Comparison of bacterial and fungal adherence to vaginal exfoliated epithelial cells and human vaginal epithelial cell tissue culture cells. Infect. Immun. 35:697-701.
- 118.-Sobel, J. D., J. Schneider, D. Kaye, and M. E. Levison. 1981. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. Infect. Immun. 32:194-197.
- 119.-Spiegel, C. A., 1991. Bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:485-502.
- 120.-Spiegel, C. A., R. Amsel, D. Eschenbach, F. Schoenknecht, and K. K. Holmes. 1980. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. N. Engl. J. Med. 303:601-607
- 121.-Spiegel, C. A., R. Amsel, and K. K. Holmes. 1983. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J. Clin. Microbiol. 18:170-177.
- 122.-Spiegel, C. A., and M. Roberts. 1984. *Mobiluncus* gen. nov., *Mobiluncus curtisii* subsp. curtisii sp. nov., *Mobiluncus mulieris* sp. nov., curved rods from the human vagina. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:177-184.
- 123.-Sturm, A. W. 1989. Chemotaxis inhibition by *Gardnerella vaginalis* and succinate producing vaginal anaerobes: composition of vaginal discharge associated with *G. vaginalis*. Genitorin. Med. 65:109-112.

- 124.-Tylor-Robinson, D. 1984. The bacteriology of *Gardnerella vaginalis*. Scand. J. Urol. Nephrol. 86 (Suppl.):41-55.
- 125.-Totten, P. A., R. Amsel, J. Hale, P. Piot, and K. K. Holmes. 1982. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. J. Clin Microbiol. 15:141-147.
- 126.- Van der Meijden, W. L. H. Koerten. W. van Mourik, and W. C. de Bruijn. 1988. Descriptive light and electron microscopy of normal and clue-cell-positive discharge. Gynecol. Obstet. Invest. 25:47-57.
- 127.-Wells, J. Y. and S. H. Goei. 1981. Rapid identification of *Corynebacterium vaginale* in non-purulent vaginitis. J. Clin. Pathol. 34: 917-920.
- 128.-Zinnemann, K., and G. C. Turner. 1963. The taxonomic position of "*Haemophilus vaginalis*" (*Corynebacterium vaginale*). J. Pathol. Bacteriol. 85:213-219.
- 129.-Harold, C. 1986. Probability theory in the use of diagnostic test. Annals of Internal Medicine. 104: 60-66.
- 130.-Thomason, MD and Gelbart, S.M. 1988. Proline aminopéptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis. Obstet gynecol. 71. 607-611.
- 131.- Westley, P.J. and Anderson V.A. 1967. Amino péptidase profiles of varios bacteria. Applied Microbiology. 822-825.
- 132.-Schoonmaker, J. and Lunt, B. 1991. A new proline aminopeptidase assay for diagnosis of bacterial vaginosis. Am J. Obstet Gynecol

- 128.-Zinnemann, K., and G. C. Turner. 1963. The taxonomic position of "*Haemophilus vaginalis*" (*Corynebacterium vaginale*). J. Pathol. Bacteriol. 85:213-219.
- 129.-Harold,C.1986.Probability theory in the use of diagnostic test.Annals of Internal Medicine.104: 60-66.
- 130.-Thomason,MD and Gelbart,S.M.1988.Proline aminopéptidase actyvity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis. Obstet gynecol.71. 607-611.
- 131.- Westley.P.J. and Anderson V.A..1967.Amino péptidase profiles of varios bacteria.Applied Microbiology.822-825.
- 132.-Schoonmaker.J. and Lunt,B.1991.A new proline aminopeptidase assay for diagnosis of bacterial vaginosis. Am J.Obstet Gynecol 165. 737-742.