

50524  
42

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

EFFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE LA ADHERENCIA DE  
*Gardnerella vaginalis* A CELULAS McCoy.

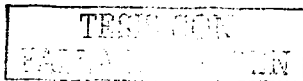
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO PRESENTA:

VALENTIN GARCIA RODRIGUEZ.

MEXICO D.F.

2003



A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
VETERINARIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N.  
BAJO DIRECCION DEL Dr. EN C. FERNANDO M. GUERRA INFANTE.

MEXICO, D.F.

2003

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

B

Dedicatorias.

A mis padres:

**Enrique García Córdoba e Isabel Rodríguez González** A quienes les debo la vida. A ellos que con su sacrificio y apoyo motivaron en mi el desarrollo académico. Les agradezco su esfuerzo y amor.

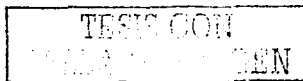
A **Goya** muy en especial por su gran espíritu y fortaleza, por su comprensión y amor, por el apoyo sin el cual no se hubieran alcanzado estos grandes logros. GRACIAS " TE AMO ".

A mis hijos:

**Kevin y Elian** quienes con la grandeza de su cariño, mantienen vivo en mi el deseo de superación y no permiten el olvidar las cosas buenas por las cuales se puede vivir, demostrando día a día la maravillosa magia que representa el ser parte de esta gran familia.

A mis hermanos:

**Santiago, Enrique e Isabel** quienes me han enseñado que la fortaleza esta en nosotros mismos y que por nuestros propios tropiezos hemos de crecer sin olvidar nunca el significado de "mi familia"; que sé estarán conmigo cuando sea necesario y en cualquier circunstancia.



A mis suegros:

**Melquiades Ruiz Cerecero y María de la Luz Velásquez**, Quienes han confiado en mi apoyándome incondicionalmente por lo que agradezco toda su atención.

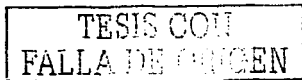
A mis profesores:

Al director de Tesis, **Dr. Fernando M Guerra Infante** quien gracias a su apoyo y confianza me permitió culminar el proyecto de investigación para lograr mi titulación ( un paso mas hacia el futuro ) "GRACIAS".

A las profesoras **Graciela M. González Lugo y María de Jesús** y al profesor **Gustavo Miranda Contreras** de quienes he aprendido muchas cosas nuevas, las cuales sé que son lecciones de vida que nos permiten no darnos por vencidos y alcanzar nuestras metas.

A mis compañeros de trabajo que motivaron a culminar el gran paso de mi titulación, muy en especial a mi jefa y amiga **Beatriz Romero B.** por la oportunidad brindada para concluir esta tarea en mi desarrollo profesional y a mis mejores amigos **Hector y Kendy** por su alluda comentarios orientación y todo su tiempo. A mi jefe "**RANA**" y a la "**WEAREVER**" por la comprensión y apoyo que he necesitado en esos tiempos difíciles y el cual nunca me han negado.

" G R A C I A S "



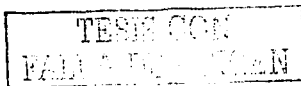
## CONTENIDO

	PAGINA
Índice General.	i
Índice de Figuras.	iii
Índice de Tablas.	iv
Resumen.	v
1. Introducción.	1
2. Marco teórico.	
2.1 Epidemiología.	2
2.2 Características microbiológicas de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	2
2.3 Elementos extracromosómicos.	4
2.4 Elementos genéticos transponibles.	5
2.5 Características fenotípicas inducidas por plásmidos.	6
2.6 Técnicas para la eliminación de plásmidos.	7
2.7 Interacción de la acriflavina con el material genético.	7
3 Planteamiento del problema.	9
4 Objetivos	
4.1 Objetivo general.	10
4.2 Objetivos específicos.	10
5 Hipótesis	
5.1 Hipótesis nula	10
5.2 Hipótesis alterna.	10
6 Diseño de investigación.	
6.1. Cepas bacterianas.	11
6.2. Características morfológicas y coloniales de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	12
6.3. Criterios.	13
6.4. Material y métodos.	14

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

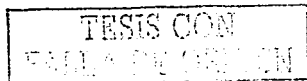


6.4.1.Crecimiento de las diferentes cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> en suspensión.	14
6.4.2.Tratamiento de <i>Gardnerella vaginalis</i> con acriflavina.	14
6.4.3.Determinación de la viabilidad bacteriana de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	14
6.4.4.Ensayos de adherencia a células McCoy fijadas.	15
6.4.5.Evaluación de los índices relativos, porcentajes y patrones de adherencia.	16
6.4.6.Extracción de DNA -	17
7.Resultados.	18
7.1.Efecto de la acriflavina sobre el DNA de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	30
8.Discusión.	35
9.Conclusiones.	40
10.Apéndice I Medios de cultivo.	41
11.Apéndice II Técnicas.	43
12.Apéndice III Reactivos.	49
13.Referencias.	51



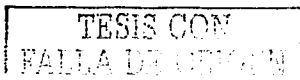
## CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.	PAGINA.
Figura 1: Interacción de la acriflavina con el material genético.	8
Figura 2: Efecto de la acriflavina en el crecimiento de <i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018.	20
Figura 3: Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018 a células McCoy.	21
Figura 4: Efecto de la acriflavina sobre la adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> ( ATCC 14018 ) a células McCoy	22
Figura 5: Efecto de la acriflavina sobre la adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> ( ATCC 14018 ) a células McCoy.	23
Figura 6: Electroferograma del DNA total de <i>Gardnerella vaginalis</i> ( ATCC 14018 )	31
Figura 7: Detección del tamaño molecular del DNA genómico y extracromosómico de <i>Gardnerella vaginalis</i> ( ATCC 14018 ).	32
Figura 8: Análisis del DNA genómico y extracromosómico de dos cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	33
Figura 9: Efecto de la acriflavina sobre el DNA extracromosómico de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018).	34



## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.	PAGINA.
Tabla 1: Efecto de la acriflavina sobre la viabilidad de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018).	24
Tabla 2: Efecto de la acriflavina sobre el índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células McCoy.	25
Tabla 3: Efecto de la acriflavina sobre la viabilidad de <i>Gardnerella vaginalis</i> (cepa 1417).	26
Tabla 4: Efecto de la acriflavina sobre el índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (cepa 1417).	27
Tabla 5: Efecto de la acriflavina sobre la viabilidad de <i>Gardnerella vaginalis</i> (cepa 1501).	28
Tabla 6: Efecto de la acriflavina sobre el índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (cepa 1501).	29



## RESUMEN

*Gardnerella vaginalis* es considerado como el patógeno más importante en el desarrollo de la vaginosis bacteriana, sus mecanismos de patogenicidad son la presencia de fimbrias que están involucradas en la adherencia a células epiteliales. La expresión de fimbrias en diversas bacterias generalmente es mediada por material genético extracromosomal, sin embargo en *Gardnerella vaginalis* aun no se han hecho estudios para determinar cuál es el origen genético de éstas, un método para inhibir la expresión de las fimbrias es mediante el uso de acriflavina por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la acriflavina sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy. Se emplearon tres cepas de *Gardnerella vaginalis* 14018 (ATCC) y 1417 (de aislamiento clínico) ambas adherentes a células McCoy y la 1051 (de aislamiento clínico) no adherente a células McCoy. Las tres cepas se incubaron en medio líquido BHI adicionado o no de acriflavina a concentraciones de 500, 250, 125, 12, 5, 1, 25, 0, 125 y 0, 0125 ng/mL, después de 24 horas de incubación a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a cada tubo se le realizó cuenta viable a las diluciones 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup> y 10<sup>7</sup>. Después de 48 horas de incubación, se realizaron los ensayos de adherencia en células McCoy así como la extracción de DNA para la búsqueda de fragmentos extracromosomales. Los resultados mostraron que las diferentes concentraciones de acriflavina empleadas no fueron tóxicas para las cepas 14018, 1417 y 1051 de *Gardnerella vaginalis* ya que el porcentaje de viabilidad observado para la mayor concentración (500 ng) de acriflavina fue de 95%, 93% y 94% respectivamente. En las pruebas de adherencia se observó que la cepa ATCC 14018 pierde su capacidad de adherencia cuando es tratada con concentraciones  $\geq 1.25$  ng de acriflavina a concentraciones de 0.0125 ng y 0.125 ng el índice relativo de adherencia fue de 6 a 10 (++) y 2 a 5 (+) bacterias por célula respectivamente, y el patrón de adherencia fue de agregativo a localizado. En la cepa 1417 se observó que la pérdida de adherencia fue desde la concentración de 0.0125 ng de acriflavina. La cepa 1501 no modificó sus características de no adherencia. En cuanto a la detección de DNA extracromosómico se observó la presencia de una banda con tamaño molecular de

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

9 416 kb para las cepas adherentes no tratadas con acriflavina, sin embargo después del tratamiento con acriflavina se demostró que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de acriflavina y la presencia de DNA extracromosomal ya que a mayor concentración de acriflavina desaparece esta banda por lo que posiblemente la falta en la capacidad de adherencia es debido a la eliminación de este DNA extracromosómico. En conclusión, la acriflavina logró inhibir la adherencia de *Gardnerella vaginalis* y esto puede ser debido a la pérdida de la expresión del plásmido ya que este colorante se intercala en el material genético extracromosomal.

TESIS CON  
FALLA DE C...

## 1. INTRODUCCION.

La vaginosis bacteriana es la infección mas común del tracto genitourinario en mujeres que son atendidas en las clínicas de consultas ginecológicas en diferentes países. La condición es caracterizada por profusas y malolientes descargas vaginales. Este síndrome puede ser lo más importante en las infecciones vaginales asociado a las mismas. La vaginosis bacteriana presenta una microbiología compleja, ya que la población de lactobacilos es desplazada y reemplazada por un grupo polimicrobiano de organismos en el cual se incluye a *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella vivia*; *Prevotella disiens*, *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y con frecuencia las especies del género *Mobiluncus*. En esta patología se ha observado que el microorganismo más importante es *Gardnerella vaginalis* así como de anaerobios, ocasionando un desbalance en la microflora normal de la misma con la consecuente desaparición de la flora lactobacilar. <sup>(1)</sup>

La flora bacteriana de la vagina está conformada predominantemente por lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno, los cuales generan grandes cantidades de "ácido láctico", por consiguiente el pH normal de la vagina se encuentra entre 3.5-4.5, excepto en el periodo menstrual. Esto permite que haya un balance adecuado de la flora existente, pues se inhibe el desarrollo de bacterias catalasa negativas como *Gardnerella vaginalis*.

Al existir una variación del pH, parece haber un decremento de los efectos restrictivos de la flora normal, ya que ésta disminuye notablemente la presencia de *Lactobacillus*, lo cual permite la proliferación masiva de anaerobios y de *Gardnerella vaginalis*.<sup>(2)</sup>

En la vaginosis bacteriana hay liberación de aminas debido a la descarboxilación de los aminoácidos presentes en el medio, lo cual le confiere al fluido vaginal un olor a pescado. Además existe una exfoliación de las células epiteliales de la vagina debida a la acción citotóxica de las poliaminas bacterianas de los ácidos orgánicos presentes en la vaginosis bacteriana. La observación microscópica de estas células muestra que *Gardnerella vaginalis* se adhiere avidamente a las células exfoliadas en un pH alcalino; a estas células se les denomina células guña. <sup>(3)</sup>

Se ha demostrado que *Gardnerella vaginalis* es capaz de adherirse a células uretrales femeninas y masculinas, lo cual puede ser un mecanismo de patogenicidad para esta bacteria.

## 2. MARCO TEORICO.

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA.

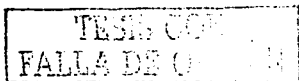
La incidencia de la vaginosis bacteriana varia de acuerdo a los diferentes estudios que se han realizado. En la población asintomática la prevalencia es de 4%. Sin embargo otros estudios han reportado que es del 30 al 45% en mujeres en edad reproductiva. En mujeres con enfermedades de transmisión sexual son del 33 al 64%. En casos obstétricos ( prenatales ) es del 10 al 26% y en las clínicas de planificación familiar es del 23 al 29%.

De acuerdo a los estudios hechos por algunos investigadores en México, la vaginosis bacteriana junto con la candidiasis genital son las causas más comunes de infección cervicovaginal, independientemente de los hábitos y costumbres sexuales de las pacientes, de tal forma que se encuentra entre un 17 y 30% predominando discretamente en las mujeres embarazadas.

La vaginosis bacteriana a pesar de ser un padecimiento infeccioso, transmisible sexualmente no está dentro de las enfermedades que se reportan en la Dirección General de Epidemiología, por lo que la frecuencia real del padecimiento en la Republica Mexicana se desconoce. <sup>(1)</sup>

### 2.2. CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS.

*Gardnerella vaginalis* es un microorganismo pleomórfico, inmóvil, gram-variable que no posee endosporas. El crecimiento del pequeño cocobacilo se puede observar en agar sangre a las 48 horas. Sus dimensiones varían de 0.4 hasta 1.5 micras, aunque



algunas pueden medir de 2 a 3 micras. *Gardnerella vaginalis* es beta-hemolítico en medio que contiene sangre humana o de conejo creciendo a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%, las colonias se pueden observar redondas, brillantes y lisas semejando a gotas de rocío. Las características más evaluadas son: la presencia de alfa-glucosidasa, ausencia de beta-glucosidasa, hidrólisis del almidón, hipurato, rafinosa, glucosa, maltosa, y sacarosa, son oxidada, catalasa y manitol negativo y en los cultivos presenta zonas de inhibición al colocar discos con 50 µg de metronidazol, 5 µg de trimetoprim o 10% de bilis. La pared celular tiene una membrana externa que consiste de lipopolisacáridos, proteínas y fosfolípidos. Su membrana contiene una delgada capa de péptidoglicano

La capa polisacáridica participa en la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células epiteliales de la vagina. También se sugiere que este compuesto interviene en la forma de agruparse del microorganismo en cultivos en caldo. Presenta fimbrias de un diámetro entre 3-7.5 nm y una toxina citolítica extracelular que actúa sobre los eritrocitos humanos, leucocitos polimorfonucleares y células endoteliales<sup>(41)</sup>

La adhesión a las células epiteliales urogenitales le permite a *Gardnerella vaginalis* su colonización, ya que minimiza el contacto de la bacteria con enzimas extracelulares y anticuerpos locales, además reduce la oportunidad de ser eliminada a través del fluido vaginal o la crina. Se sabe que la adhesión se lleva a cabo a través de la capa fibrilar de la pared celular bacteriana y la membrana celular, y que las variables que influyen en la capacidad de adherencia son el pH, la temperatura de incubación, la exposición a radiación ultravioleta y el tratamiento con sustancias como peróxido de sodio, azúcares y antibióticos.<sup>(51)</sup>

La adherencia mediada por fimbrias está dada por la presencia de DNA plasmídico, como por ejemplo en *E. coli* enteropatógena, que produce diarrea por su capacidad de adherirse a células de la mucosa intestinal. Se sabe incluso que esta bacteria presenta diferentes patrones de adherencia tales como: el agregativo (AggA), el localizado (LA) y el difuso (DA).<sup>(61)</sup>

Aunque en general es adecuado decir que el genoma de los procariones consta de un solo cromosoma, muchas bacterias poseen uno o varios elementos genéticos accesorios extracromosómicos encontrándose entre ellos los transposones y los

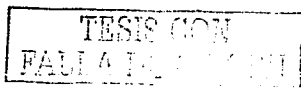


plásmidos<sup>(7)</sup> Actualmente se desconoce si existe material genético extracromosomal en *Gardnerella vaginalis*, y además no se conoce la localización de los genes que median la información asociada a la expresión de adherencia, por lo que es importante conocer los genes involucrados en la adherencia así como la existencia de DNA extracromosomal. Como se sabe existen dos grandes tipos de variabilidad microbiana, una es la variación fenotípica que afecta al conjunto de la población, no es hereditaria y es inducida por agentes extrínsecos originada como resultado de una mutación cromosómica, pero por otra parte, existen en las bacterias unos elementos extracromosómicos portadores de una información (episomas, plásmidos, transposones) capaces de ser transferidos de una bacteria a otra y que se pueden traducir como una manifestación fenotípica provocando variabilidad microbiana. Actualmente se conoce que la mayoría de las bacterias que presentan fimbrias en su superficie son originalmente el resultado de interacciones genéticas entre materiales cromosómicos y extracromosómicos.

### 2.3. ELEMENTOS EXTRACROMOSOMICOS.

Los elementos genéticos extracromosómicos muestran capacidad de replicación autónoma ( es decir, constituyen replicones propios ) Todos los plásmidos bacterianos estudiados son de DNA de cadena doble. La inmensa mayoría son circulares cerrados covalentemente y superenrollados. Algunos poseen la capacidad de integrarse reversiblemente en el cromosoma bacteriano: en esta situación se replican junto con el cromosoma ( bajo el control de éste ), y reciben el nombre de episomas.

En cuanto al tamaño, existe una amplia gama de plásmidos: desde plásmidos muy pequeños ( de unas 2 kb ) hasta plásmidos muy grandes ( 500 kb como el de *Pseudomonas* ). Incluso existen "megaplásmidos" en ciertos *Rhizobium* que llegan a tener 1600 kb. Cada tipo de plásmido tiene un número medio de copias por célula característico. Por regla general, los grandes plásmidos tienen una o dos copias por célula ( muestran un control estricto de la replicación ), mientras que los pequeños



suelen estar presentes como varias copias ( $> 10$ ), denominándose plásmidos de control relajado. (61)

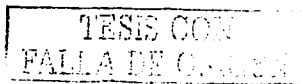
Los plásmidos conjugativos ( autotransmisibles ) son aquellos que se transfieren entre cepas por medio de fenómenos de conjugación. Algunos de estos plásmidos no sólo se transfieren entre cepas de la misma especie, sino que son capaces de hacerlo entre diversas especies de bacterias recibiendo el muy apropiado nombre de plásmidos promiscuos o de amplio espectro de hospederos. Esto permite la transferencia horizontal de información genética entre grupos bacterianos filogenéticamente alejados. Los plásmidos no conjugativos carecen de la propiedad de conjugación. Dentro de esta categoría existe un subgrupo, el de los plásmidos movilizables que son aquellos no autotransmisibles, que pueden ser transferidos por la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria. (61)

## 2.4 ELEMENTOS GENETICOS TRANSPONIBLES.

Los elementos genéticos transponibles son segmentos de DNA que son capaces de insertarse ( mas o menos al azar ) en otros segmentos de DNA. Tales elementos genéticos parecen ser omnipresentes en la naturaleza y no sólo se han encontrado en bacterias y arqueobacterias, sino también en eucariontes tales como levaduras, drosófila, nemátodos, plantas ( maíz ) y células de mamíferos.

En las bacterias se conocen tres clases de elementos transponibles:

- 1 -Secuencias de inserción (SI), que son fragmentos relativamente cortos de DNA (600-2000 pares de bases) que codifican solamente una función necesaria para que la SI cambie de lugar de inserción ( transposición ).
- 2 -Transposones, que son fragmentos de DNA algo mayores (2500-40 000 pares de bases) que no solamente codifican una función de transposición, sino también otras funciones como resistencia a productos químicos, producción de bacteriocinas, capacidad metabólica concreta, etc. Entre los transposones se incluye el Tn5, que codifica para la resistencia a la kanamicina y a la neomicina.



3.-Bacteriófagos, que son capaces de integrarse esencialmente al azar en el genoma del hospedero.

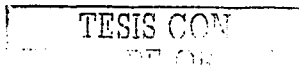
Los segmentos transponibles son entidades genéticas discretas que forman parte de cromosomas y de plásmidos, capaces de moverse de un lugar a otro del genoma (pasando a otros lugares del replicón original, o a otros replicones presentes en la misma bacteria). Existen varias clases de mecanismos de transposición, pero muchas de ellas suponen la simultánea replicación del elemento, de modo que queda una copia en el sitio original así como en la nueva localización. Estos elementos no son replicones, es decir, no poseen la capacidad de replicación autónoma, sino que son partes integrantes de los genomas de muchas bacterias, confiriendo plasticidad genética sobre los que pueden actuar mecanismos evolutivos.

Recientemente se ha descrito una nueva clase de elementos transponibles que poseen la capacidad de trasladarse desde el cromosoma de una bacteria al de otra sin formar parte de un plásmido o bacteriófago, estos se denominan transposones "conjugativos" y se han encontrado en microorganismos grampositivos aerobios y anaerobios. La transposición usualmente da como resultado la replicación localizada del elemento a partir de la secuencia de DNA original dadora y también la inserción de una copia del elemento en la secuencia de DNA receptora. <sup>(10)</sup>

## 2.5 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS INDUCIDAS POR PLASMIDOS

Los plásmidos no suelen ser indispensables para la viabilidad de la bacteria y muchos de ellos se pierden en ausencia de una presión selectiva. Los plásmidos no suelen determinar productos esenciales para el crecimiento (por eso no son dispensables), pero en la naturaleza, los plásmidos proporcionan ventajas selectivas en determinados ambientes o en determinadas condiciones, <sup>(11)</sup> las cuales se expresan fenotípicamente; tales como

- 1.-Resistencia a antibióticos.
- 2.-Resistencia a metales pesados (por ejemplo, resistencia a mercurio).
- 3 - Producción de toxinas, factores de penetración en tejidos, adherencia a tejidos del hospedero, etc.



- 4.-Producción de bacteriocinas ( toxinas con actividad antibacteriana ).
- 5.-Producción de sideróforos (quelatos para secuestrar iones  $Fe^{3+}$ ).
- 6.-Producción de enzimas que degradan determinados azúcares.
- 7.-Producción de enzimas que degradan hidrocarburos incluyendo algunos cíclicos recalcitrantes ( degradación de tolueno, xileno, alcanfor, etc ).
- 8.-Inductores de tumores en plantas (plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*).
- 9.-Interacciones simbióticas y fijación de nitrógeno en ciertos *Rhizobium*.<sup>(12)</sup>

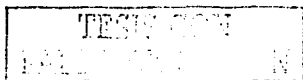
## 2.6 TECNICAS PARA LA ELIMINACION DE PLASMIDOS.

Una bacteria puede ser "curada" de su(s) plásmido(s), es decir, se le puede eliminar, ya sea de forma espontánea o por una serie de tratamientos en el laboratorio tales como: variación en las temperaturas óptimas de incubación, por agentes químicos como la acriflavina, ( que se inserta entre las bases de DNA) o por pases continuos en medios enriquecidos. Los mecanismos por los que se lleva esta curación de los plásmidos es que estos tratamientos interfieren con su replicación sin afectar la replicación del cromosoma, esto hace que en sucesivas divisiones de una bacteria el plásmido se vaya "diluyendo" en la población resultante.<sup>(13)</sup>

## 2.7 INTERACCION DE LA ACRIFLAVINA CON EL MATERIAL GENETICO

Los colorantes con acridina son denominados como "flavinas" debido a su color amarillo, ejercen un efecto bactericida y bacteriostático sobre un gran número de organismos. Entre los compuestos de uso clínico se hallan la proflavina y la acriflavina, que han sido utilizadas en la antisepsia de heridas.

Los colorantes con acridina interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en células de mamíferos y bacterias. Son moléculas heterocíclicas planares que interactúan con el DNA helicoidal de doble cadena por intercalación originando mutaciones por corrimiento del sistema de lectura (fig.1). Debido a su estructura



hidrófoba plana, la acridina se inserta entre 2 bases sucesivas en el DNA separándolas físicamente.

Cuando se duplica una hebra, se inserta una base extra en la cadena complementaria opuesta a la droga intercalada. Cuando se duplica la última cadena la nueva cadena también contiene una base extra. Las sales de acridina ( acriflavina ) tienen por lo tanto la propiedad de suprimir los factores extracromosómicos.

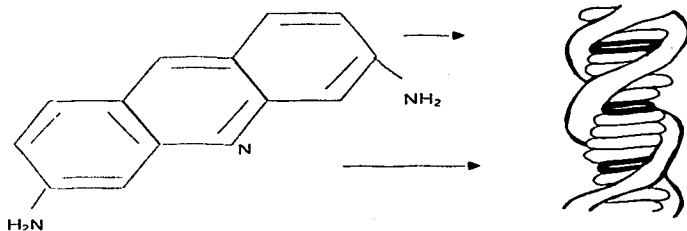
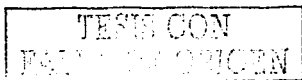


Figura 1: Molécula de acriflavina que se intercala entre los pares de bases del DNA.

### 3. PLANTFAMIEMTO DEL PROBLEMA.

*Gardnerella vaginalis* es un microorganismo que tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales, factor importante de virulencia que utiliza la bacteria para causar daño y manifestar las características propias de las infecciones que promueve. Esta adherencia pudiese ser dada por la presencia de plásmidos o material genético extracromosómico. El tratamiento de esta bacteria con acriflavina, podría curar a la bacteria del plásmido por lo que ésta perdería su capacidad de adherencia. Al desconocer la existencia de material genético extracromosómico, se ignora la procedencia de los genes que manifiestan el fenotipo adherente, pieza importante para entender la existencia pasiva de *Gardnerella vaginalis* y el hecho de que haya pacientes sin signos ni síntomas y por lo tanto no se le pueda controlar para evitar la proliferación y los subsecuentes contagios.



#### 4. OBJETIVOS.

##### 4.1. OBJETIVO GENERAL.

Demostrar el efecto de la acriflavina sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy.

##### 4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1) Determinar la viabilidad de las diferentes cepas de *Gardnerella vaginalis* antes y después de ser tratadas con diferentes concentraciones de acriflavina.
- 2) Determinar la capacidad de adherencia de las diferentes cepas de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy tratadas o no tratadas con acriflavina.
- 3) Analizar el DNA cromosómico y extracromosómico de las diferentes cepas de *Gardnerella vaginalis* con y sin tratamiento con acriflavina.

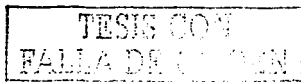
#### 5. HIPOTESIS.

##### 5.1. HIPOTESIS NULA.

La acriflavina no inhibe la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy.

##### 5.2. HIPOTESIS ALTERNA.

La acriflavina inhibe la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy



## 6. DISEÑO DE INVESTIGACION.

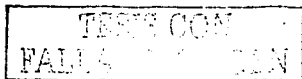
### 6.1. CEPAS BACTERIANAS.

Cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 proporcionada por el Dr. en C. Fernando M. Guerra infante, departamento de Virología del Instituto Nacional de Perinatología.

Una cepa de *Gardnerella vaginalis* aislada de un paciente con signos y síntomas de vaginosis bacteriana que cumplieron con los criterios de Amsel y una cepa de *Gardnerella vaginalis* aislada de un paciente sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana proporcionadas por el Biól. Alberto González Pedraza, laboratorio de Microbiología del centro de salud Dr. "José Castro Villagrana", Instituto de Servicios de Salud del Distrito Federal. Previamente identificadas de acuerdo a pruebas bioquímicas realizadas por Taylor<sup>(14)</sup>.

### MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS:

Se empleó base de agar Casman con 5% de sangre humana para crecimiento colonial e identificación hemolítica de las bacterias. (ver apéndice I)





6.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y COLONIALES DE LAS CEPAS DE  
*Gardnerella vaginalis*.

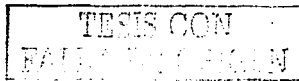
- \*Bacilos cortos Gram positivos o Gram variable.
- \*Anaerobio facultativo.
- \*Tiende al pleomorfismo
- \*Inmóvil
- \*Ausencia de flagelos
- \*Presencia de fimbrias
- \*No forma esporas ni cápsulas.

En base de agar Casman + 5% de sangre de carnero:

- \*Colonias pequeñas (0.2-0.3 mm de diámetro)
- \*Translúcidas
- \*Blanquecinas
- \*Brillantes
- \*Con borde regular, elevadas y convexas
- \*Beta-hemólisis.

Pruebas bioquímicas de identificación: (15-16)

- \*Catalasa y oxidasa: negativo
- \*Hidrólisis de hipurato: positivo
- \*Hidrólisis de almidón: positivo
- \*Fermentación de rafinosa, glucosa, maltosa, y sacarosa.



### 6.3. CRITERIOS.

#### CRITERIOS DE INCLUSION.

- \*Cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, en cultivo joven, crecida en base de agar de Casman + 5% de sangre humana; cultivada en caldo infusión de cerebro y corazón enriquecido con 10% de suero fetal de ternera con 24 horas de incubación. (ver apéndice)
- \*Cepa de aislamiento clínico 1417 de *Gardnerella vaginalis* adherente identificada por pruebas bioquímicas de paciente con signos y síntomas de vaginosis bacteriana, con diagnóstico positivo a los criterios de AmseI<sup>(3)</sup>
- \*Cepa de aislamiento clínico 1501 de *Gardnerella vaginalis* no adherente identificada por pruebas bioquímicas de paciente sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana.

#### CRITERIOS DE EXCLUSION.

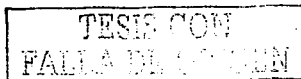
- \*Cepas que no son identificadas por pruebas bioquímicas.
- \*Cepas que no presenten la morfología microscópica y colonial característica de *Gardnerella vaginalis*.
- \*Cepas que sean catalasa u oxidasa positivo.
- \*Dar tratamientos físicos o químicos a cepas bacterianas previos a los ensayos de adherencia.

#### CRITERIOS DE ELIMINACION

- \*Cepas que modifiquen su morfología colonial o microscópica.
- \*Cepas que presenten contaminación con otra bacteria.
- \*Cepas con subcultivos continuos.
- \*Cepas con periodos de incubación mayor de 24 horas.
- \*Uso de tween y antibióticos en base de agar Casman-sangre humana empleados para el crecimiento de la bacteria.

#### VARIABLES

- \*Adherencia bacteriana a: utilización de diferentes concentraciones de acriflavina.
- \*Variable dependiente: adherencia microbiana.
- \*Variable independiente: concentración de acriflavina.



#### 6.4. MATERIALES Y METODOS.

##### 6.4.1. CRECIMIENTO DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* EN SUSPENSION.

Se realizó el cultivo en caldo para crecimiento bacteriano, del cual se obtuvieron las muestras necesarias para ensayos posteriores. Se promovió el crecimiento bacteriano inoculando las cepas ATCC 14018, 1417 (adherente) y 1501 (no adherente) de *Gardnerella vaginalis* en caldo BHI adicionado con SFT al 10% (3 mL) en tubos con tapón de rosca. Los tubos se incubaron 24 horas a 37° C ajustando al tubo 2 de McFarland ( $1 \times 10^8$  bacterias/mL). Transcurrido el tiempo se realizó la tinción de Gram para confirmar la pureza del microorganismo de cada uno de los tubos adicionado o no de acriflavina. Posteriormente se evaluó la viabilidad y la adherencia.

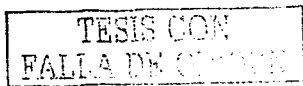
##### 6.4.2. TRATAMIENTO DE *Gardnerella vaginalis* CON ACRIFLAVINA.

Se preparó una solución madre con 1 µg / mL de acriflavina y se realizaron diluciones seriadas 1:2 con caldo infusión cerebro – corazón (BHI) hasta un volumen total de 5 mL en tubos con tapón de rosca de 18 X 150 hasta conseguir una concentración final de 0.0125 ng / mL. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 100 µL de una suspensión con  $600 \times 10^5$  bacterias /mL de *Gardnerella vaginalis* ( crecida previamente por 24 horas a 37° C en caldo infusión cerebro – corazón ). Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37° C a cada tubo se le determinó la prueba de viabilidad, adherencia y la extracción de DNA.

##### 6.4.3 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD BACTERIANA DE *Gardnerella vaginalis*.

Después del tratamiento previo de las cepas de *Gardnerella vaginalis* [14018 ATCC, 1417 (adherente) y 1501 (no adherente)] con acriflavina a diferentes concentraciones, se determinó la viabilidad bacteriana como sigue:

Después de las 24 horas de incubación, se tomaron de cada uno de los tubos 100 µL para realizar diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a una dilución final de  $10^{-5}$ . De las dos últimas diluciones ( $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), se tomaron 100 µL los cuales fueron depositados sobre cajas de Petri que contenían agar Casman con sangre humana al 5%. La



incubación de las cajas Petri fue de 48 horas a una temperatura de 37° C y una atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> al 5%. Al término del tiempo de incubación, se consideraron adecuadas las placas cuando éstas no presentaron contaminación y las colonias mostraran la morfología colonial característica de *Gardnerella vaginalis* y con presencia de hemólisis. Finalmente, se contaron todas las UFC que se observaron para emitir los resultados comparando la cantidad del crecimiento bacteriano en UFC entre una cepa no tratada y una tratada con acriflavina.

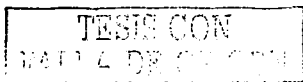
El porcentaje de viabilidad se determinó como sigue:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{UFC con tratamiento}}{\text{UFC sin tratamiento}} \times 100$$

#### 6.4.4. ENSAYOS DE ADHERENCIA A CELULAS McCoy FIJADAS.

Después del tratamiento previo de las cepas de *Gardnerella vaginalis* 14018 (ATCC), 1417 (adherente) y 1501 (no adherente) con acriflavina a diferentes concentraciones se realizaron los ensayos de adherencia.

A cada pozo de una microplaca de 24 pozos que contenía cubreobjetos con células McCoy prefijadas con metanol (ver apéndice); se agregaron 500 µL de caldo de cultivo fresco y 500 µL del caldo con crecimiento bacteriano tanto de las cepas tratadas como no tratadas con acriflavina. La microplaca se incubó a 37° C en atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación y en condiciones de esterilidad se retiró el caldo de cultivo de cada pozo. Cinco lavados se realizaron con solución salina fosfatos pH 7.2 (ver apéndice). Posteriormente, cada laminilla se fijó con 300 µL de metanol absoluto durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se tiñieron con colorante de Giemsa durante 30 minutos, retirando el exceso de colorante con agua corriente y cada cubreobjetos se fijó con resina a un portaobjetos para su análisis. <sup>(6)</sup>



#### 6.4.5. EVALUACION DE LOS INDICES RELATIVOS, PORCENTAJES Y PATRONES DE ADHERENCIA.

\*Adherencia relativa:

Número de bacterias adheridas por célula, de acuerdo a los siguientes valores:

(+++) 11 ó más bacterias adheridas por célula.

(++) 6-10 bacterias adheridas por célula.

(+) 2-5 bacterias adheridas por célula.

(-/+ ) la mayoría con menos de 2 bacterias por célula.

(-) No adherencia.

\*Porcentaje de adherencia:

Se define como el número de células que presentan 2 o más bacterias adheridas de un total de cien células.

$$\% \text{ de adherencia} = \frac{\text{células con 2 o más bacterias adheridas} \times 100}{100}$$

Patrón de adherencia se define como:

**Agregativo(AggA):** Cuando la bacteria se adhiere a la célula huésped, formando agregados que cubren el borde celular.

**Difuso(DA):** Cuando las bacterias se adhieren sobre toda la superficie celular.

**Localizado(LA):** Donde las bacterias forman microcolonias en uno o varios puntos de la célula.

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

#### 6.4.6. EXTRACCIÓN DE DNA.

La extracción de DNA bacteriano se realizó por 3 diferentes métodos:

##### 1 - Método de lisis de células blanco

Se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana de 24 horas en un tubo de ensayo de 13X100 y se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de la solución de lisis para glóbulos blancos (WCLB) (ver apéndice).

Se agitó vigorosamente en vortex, se incubó la muestra durante una hora a  $56^{\circ}\text{C}$  con agitación. Después del tiempo de incubación se agregó 100  $\mu\text{L}$  de fenol (Merck al 99%) y 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo (Merck al 100%), se agitó en vortex y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio de 13X100 y se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo (Merck al 100%), se dejó en agitador automático durante 5 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de NaCl 1 M y 1 mL de etanol absoluto (Merck al 99%). Se agitó por inversión y se centrifugó a 12000 rpm/ 15-20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla, enseguida se realizó un lavado con 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 75%, se desechó inmediatamente y se dejó secar la pastilla.

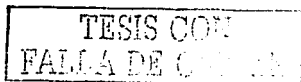
La muestra se resuspendió con 50-100  $\mu\text{L}$  de TE (ver apéndice). Al final se incubó durante 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  y después se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 2 - Método de lisis de células blanco + lisozima

El método de extracción de DNA empleando la solución de lisis de células blanco + lisozima (ver apéndice), se realizó bajo las condiciones anteriormente descritas, excepto que se empleó la solución de lisis adicionando 100  $\mu\text{L}$  de lisozima (Sigma) al 0.02%

##### 3 - Método de fenol-cloroformo

Para el método de fenol-cloroformo, a 150  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana, se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de la solución de lisozima (Sigma) al 0.02% y se continuó la extracción como se describió anteriormente.



## 7. RESULTADOS.

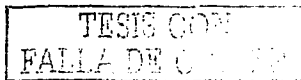
En la figura No.2 y tabla 1 se muestra el efecto de la acriflavina sobre la viabilidad de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, a las concentraciones de 12.5 ng/mL y 500 ng/mL. Para la muestra sin tratamiento se observaron  $45 \times 10^5$  UFC/mL con una morfología y hemólisis típica de *Gardnerella vaginalis*. Para los tubos con 12.5 ng/mL de acriflavina se obtuvieron  $44 \times 10^5$  UFC/mL. Para la muestra con un tratamiento de 500 ng/mL se observaron  $43 \times 10^5$  UFC/mL.

En la figura No. 3 se observa la adherencia de la cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 sobre células McCoy. Los resultados mostraron un índice relativo de 11 o más bacterias adheridas por célula, un patrón de adherencia agregativo (AggA) y un porcentaje de adherencia del 91%. Claramente se aprecia como las bacterias se adhieren masivamente sobre el borde celular.

En cuanto al efecto de la acriflavina sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy se observó que empleando una concentración de 0.0125ng/mL hay una disminución en la adherencia de las bacterias de *Gardnerella vaginalis* a las células McCoy, apreciándose un índice relativo de 6-10 bacterias adheridas por célula, un patrón de adherencia del tipo localizado (LA) y un porcentaje de adherencia del 20% (figura 4 )

En cuanto al empleo de concentraciones iguales o mayores de 1.25 ng/mL de acriflavina se observó que el índice relativo de adherencia fue de 0 bacterias por célula, por lo tanto no mostraron patrón de adherencia y el porcentaje de adherencia fue de 0% (tabla 2)

En las tablas 3-6 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las cepas utilizadas en función al tratamiento con acriflavina a diferentes concentraciones. El tiempo de crecimiento de *Gardnerella vaginalis* en medio BHI con y sin acriflavina fue de 24 horas para cada una de las cepas. Para los ensayos de adherencia se utilizaron células McCoy prefijadas con un tiempo de incubación de 3 horas a 37° C. Al realizar la comparación entre las 2 cepas ( cepa 1417 de aislamiento clínico adherente y cepa 1501 de aislamiento clínico no adherente ) se pudo observar lo siguiente:



Para la cepa 1417, que fue obtenida de un aislamiento clínico y que mostró capacidad de adherencia, se observó que después del tratamiento con acriflavina la viabilidad se mantuvo entre el 100 y 97% hasta la concentración de 250 ng/mL de acriflavina mientras que a una concentración de 500 ng/mL disminuyó la viabilidad a un 93%. Para la cepa 1417 sin tratamiento con acriflavina, el porcentaje de adherencia fue de 35%, índice relativo de 11 ó mas bacterias adheridas por célula y un patrón de adherencia de tipo agregativo. Sin embargo cuando la cepa 1417 se trato con concentraciones de acriflavina  $\geq 0.0125$  ng/mL ésta perdió totalmente su capacidad de adherencia.

Para la cepa 1501 que también fue de aislamiento clínico pero sin capacidad de adherencia el porcentaje de viabilidad después del tratamiento con acriflavina fue  $\geq$  al 90% aún a la concentración de 500 ng/mL, sin embargo como lo indican los antecedentes, previos, no presentó adherencia con o sin tratamiento con acriflavina.

TESIS CON  
FALLA DE CUMPLIMIENTO



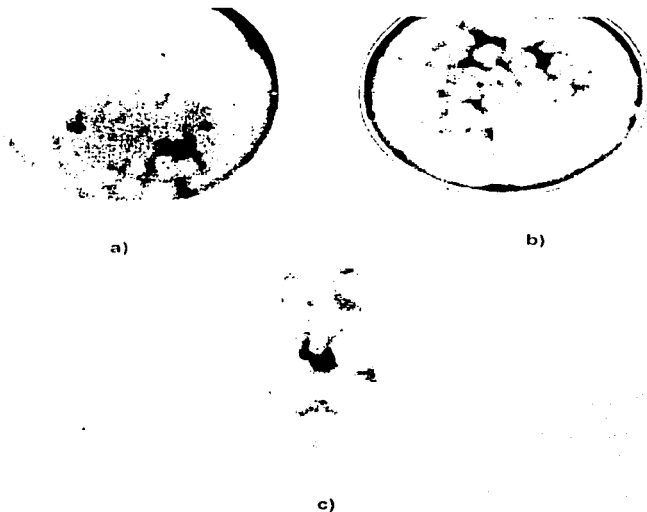


Figura 2: Efecto de la acriflavina en el crecimiento de *Gardnerella vaginalis*. *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) fue incubada sin acriflavina (a) ó con acriflavina (b,c), a concentraciones de 12.5 ng (b) o 500 ng (c).

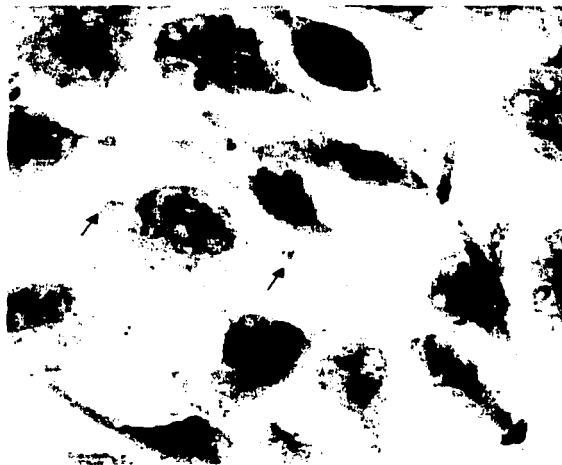


Figura 3: Adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy. La cepa de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) se incubó con células McCoy por 3 horas a 37° C. Se evaluó el porcentaje de adherencia, el índice de adherencia relativo, y el tipo de adherencia.

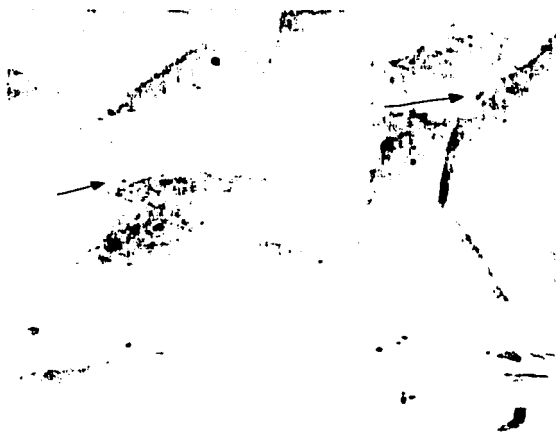


Figura 4: Efecto de la acriflavina sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy. *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) fue incubada con 0.0125 ng/mL de acriflavina por 48 horas. Posteriormente se evaluó la capacidad de adherencia a células McCoy.



Figura 5: Efecto de la acriflavina sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a células McCoy. *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) fue incubada con 1.25 ng/mL de acriflavina por 48 horas. Posteriormente se evaluó la capacidad de adherencia a células McCoy.

TESIS CON  
FALLA DE SISTEMA

**TABLA No. 1: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE LA VIABILIDAD DE  
*Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018).**

Concentración de acriflavina: ( ng / mL )	UFC X 10 <sup>5</sup> /mL n=4	porcentaje de viabilidad (%) n=4
Sin acriflavina	45 ± 3	100
0 0125	45 ± 3	100
0 125	45 ± 8	100
1 25	46 ± 3	100
12 5	44 ± 4	97 ± 2
125	44 ± 4	97 ± 2
250	44 ± 4	97 ± 2
500	43 ± 4	95 ± 1

± = desviación estandar

n = numero de experimentos

TESIS COM.  
FALLA DE COM. N

**TABLA No. 2: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE EL INDICE RELATIVO, PORCENTAJE Y PATRON DE ADHERENCIA DE *Gardnerella vaginalis* ( ATCC 14018 ) A CELULAS McCoy.**

Concentración de acriflavina: (ng/mL)	Indice relativo	porcentaje de adherencia (%)	Patrón de adherencia
Sin acriflavina	+++	91 ± 1	AggA
0 0125	++	20 ± 3	LA
0 125	+, ++	3 ± 1	LA
1 25	-	0	-
12 5	-	0	-
125	-	0	-
250	-	0	-
500	-	0	-

(+++ ) = 11 ó mas bacterias adheridas por célula

(++) = 6-10 bacterias adheridas por célula

(+) = 2-5 bacterias adheridas por célula

(- ) = ausencia de adherencia

AggA = agregativo

LA = localizado.

TESIS COMPLETA  
 FALLA DE...

TABLA No. 3: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE LA VIABILIDAD DE  
*Gardnerella vaginalis* ( CEPA 1417 ).

Concentración de acriflavina: ( ng / mL )	UFC X 10 <sup>5</sup> /mL	porcentaje de viabilidad (%)
	n=4	n=4
Sin acriflavina	28 ± 3	100
0 0125	28 ± 3	100
0 125	28 ± 3	100
1 25	28 ± 8	100
12 5	29 ± 8	100
125	27 ± 3	97 ± 2
250	27 ± 3	97 ± 2
500	26 ± 3	93 ± 1

± = desviación estandar

n = numero de experimentos.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

**TABLA No. 4: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE EL INDICE RELATIVO, PORCENTAJE Y PATRON DE ADHERENCIA DE *Gardnerella vaginalis* (CEPA 1417) A CELULAS McCoy.**

Concentración de acriflavina (ng/mL)	Indice relativo	porcentaje de adherencia (%)	Patrón de adherencia
Sin acriflavina	+++	35 ± 4	AggA
0 0125	-	0	-
0 125	-	0	-
1 25	-	0	-
12 5	-	0	-
125	-	0	-
250	-	0	-
500	-	0	-

(+++)= 11 ó mas bacterias adheridas por célula

(++) = 6-10 bacterias adheridas por célula

(+) = 2-5 bacterias adheridas por célula

(-) = ausencia de adherencia

AggA = agregativo

TESIS CON  
FALLA DE CUBRILIN

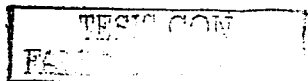


TABLA No. 5: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE LA VIABILIDAD DE *Gardnerella vaginalis* (CEPA 1501).

Concentración de acriflavina: ( ng / mL )	UFC X 10 <sup>5</sup> /mL n=4	porcentaje de viabilidad (%) n=4
Sin acriflavina	36 ± 3	100
0.0125	37 ± 3	100
0.125	36 ± 3	100
1.25	36 ± 3	100
12.5	35 ± 3	97 ± 2
125	35 ± 3	97 ± 2
250	35 ± 3	97 ± 2
500	36 ± 3	94 ± 1

± = desviación estándar

n = número de experimentos



**TABLA No. 6: EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE EL INDICE RELATIVO, PORCENTAJE Y PATRON DE ADHERENCIA DE *Gardnerella vaginalis* (CEPA 1501) A CELULAS McCoy.**

Concentración de acriflavina: (ng/mL)	Indice relativo	porcentaje de adherencia (%)	Patrón de adherencia
Sin cariflavina	-	0	-
0 0125	-	0	-
0 125	-	0	-
1.25	-	0	-
12.5	-	0	-
125	-	0	-
250	-	0	-
500	-	0	-

(+++ ) = 11 o mas bacterias adheridas por célula

(++) = 6-10 bacterias adheridas por célula

(+) = 2-5 bacterias adheridas por célula

(- ) = ausencia de adherencia

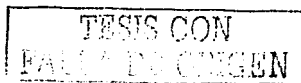
TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

## 7.1. EFECTO DE LA ACRIFLAVINA SOBRE EL DNA DE *Gardnerella vaginalis*.

Los resultados obtenidos por el método fenol-cloroformo para la extracción de DNA genómico y extracromosómico de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 sin tratamiento con acriflavina se observan en las figuras 6-8.

En la figura 6 se observa que los 3 métodos de extracción de DNA empleados son útiles para obtener el DNA sin embargo se observa que por el método de miniprep se obtiene una banda de menor intensidad que muestra un tamaño molecular  $> 2,072$  pb lo que podría representar un plásmido. Tratando de elucidar el peso molecular del DNA obtenido, nuevamente se realizó un electroferograma empleando marcadores de mayor tamaño molecular. En la figura 7 por el mismo método de miniprep se observa una banda de 9,416 pb aproximadamente y que es similar al de la figura 6, lo que podría representar un plásmido. En la figura 8, se observa que la cepa 1417 que mostró capacidad de adherencia sobre células McCoy presenta un fragmento extracromosomal parecido al de la cepa tipo de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 (figura 6) En el caso de la cepa 1501 que es una cepa no adherente, no se observó la presencia de material genético extracromosomal después de la extracción del DNA por el método miniprep en comparación a lo que ocurrió con las cepas ATCC 14018 y 1417.

En cuanto al efecto de la acriflavina sobre las cepas de *Gardnerella vaginalis* se observó que después de la extracción de DNA mediante el método de miniprep la cepa ATCC 14018 mostró la pérdida de la banda de DNA de 9,416 pb cuando la cepa es tratada con concentraciones  $\geq 12.5$  ng/mL de acriflavina, (figura 9).



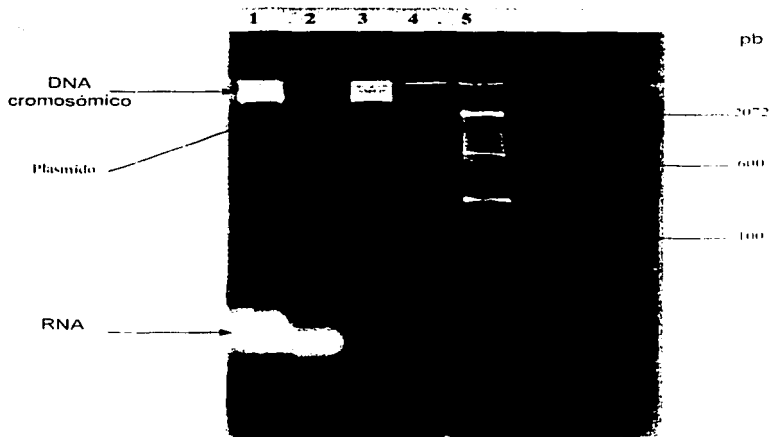


Figura 6: Electropherograma del DNA total de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018). Se emplearon 3 métodos de extracción de DNA: 1) método fenol-cloroformo; 2) método de miniprep; 3) método de lisis de células blanco mas lisozima. La extracción de DNA por el método de miniprep para una cepa de *Gardnerella vaginalis* obtenida de muestra clínica con capacidad de adherencia (1417) se muestra en el carril 4. En el carril 5 se observa el marcador de tamaño molecular.

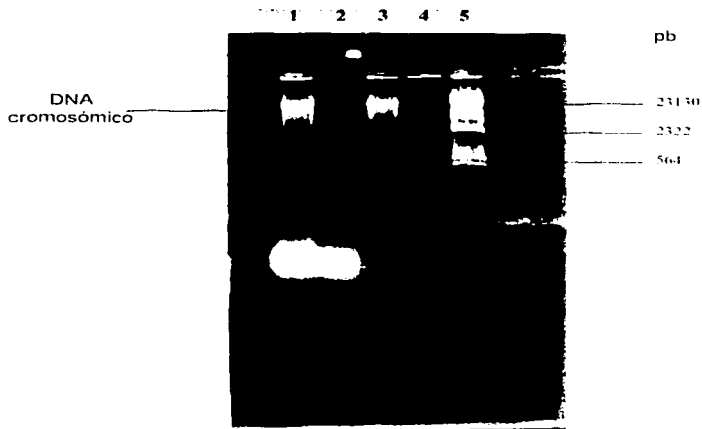


Figura 7: Detección del tamaño molecular del DNA genómico y extracromosómico de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018). Se emplearon 3 métodos de extracción de DNA: 1) método fenol-cloroformo; 2) método de miniprep; 3) método de lisis con blanco mas lisozima. En el carril 4 se muestra el DNA de una cepa clínica de *Gardnerella vaginalis* (1417). En el carril 5 se observa el marcador de tamaño molecular.

LABORATORIO  
FALLA DE DIAGNÓSTICO

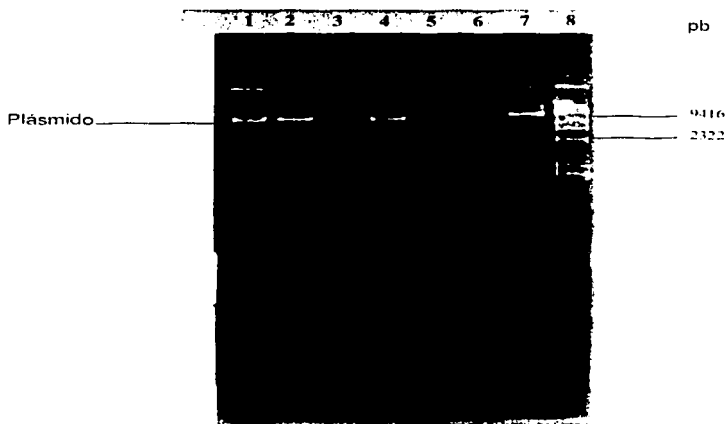


Figura 8: Análisis del DNA genómico y extracromosómico de dos cepas de *Gardnerella vaginalis*. Se analizó el DNA total de dos cepas de *Gardnerella vaginalis*; una cepa clínica 1417 y la cepa 14018 (ATCC), mediante los 3 métodos de extracción de DNA, carril 1,2,3) ATCC 14018; carril 4,5) cepa 1417; carril 1,4,7) método de lisis de células blanco; carril 2,5) método de miniprep; carril 3) método de lisis de células blanco y lisozima; carril 6) DNA de células J774; carril 7) mezcla de DNA celular y de *Gardnerella vaginalis*; carril 8) marcador de tamaño molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

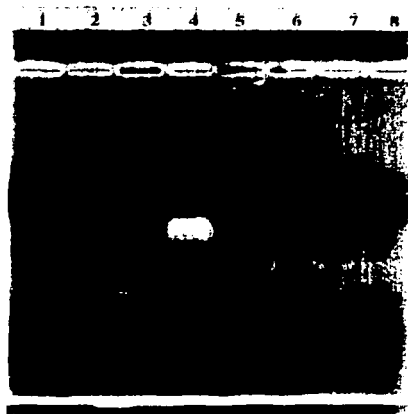


Figura 9: Efecto de la acriflavina sobre el DNA extracromosómico de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018). *Gardnerella vaginalis* se trató con acriflavina por 48 horas con las siguientes concentraciones: carril 1) 0.125 ng; carril 2) 0.0125 ng; carril 3) 125 ng; carril 4) sin tratamiento; carril 5) 250 ng; carril 6) 500 ng; carril 7) 1.25 ng; carril 8) 12.5 ng. Posteriormente se extrajo el DNA por el método de miniprep.

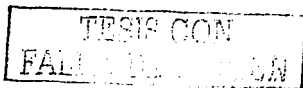
TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

## 8. DISCUSION.

El mecanismo por el cual *Gardnerella vaginalis* causa daño depende ciertamente de su habilidad para adherirse a las células epiteliales y está demostrado que esta habilidad depende de un factor importante en las bacterias que es la presencia de pillis en su superficie celular. Las propiedades de adhesividad de *Gardnerella vaginalis* han sido investigadas usando células epiteliales vaginales encontrando que las bacterias se adhieren fuertemente sobre el borde celular conformando lo que desde un inicio se denominó como células clave<sup>(1)</sup> También se ha ensayado sobre los factores que modifican la capacidad de *Gardnerella vaginalis* para adherirse y se conoce que las variables que afectan la adherencia in vitro, son: el pH, la incubación a 56° C por 30 minutos y la radiación ultravioleta. La oxidación con peryodato de las células vaginales causan una apreciable reducción en la adherencia de *Gardnerella vaginalis*, así como la adición de carbohidratos en el medio de cultivo no modifica la adherencia.<sup>(5)</sup>

Aun cuando la biología de *Gardnerella vaginalis* no ha sido bien caracterizada se han realizado investigaciones en donde se ha puesto de manifiesto la presencia de pillis (también llamadas fimbrias) en la superficie de este microorganismo a través de técnicas como la microscopía electrónica.<sup>(10)</sup> A pesar de que hablemos de un mismo microorganismo en género y especie no implica que todas las cepas existentes desarrollen un fenotipo adherente, característica que probablemente este ligada directamente con un posible intercambio de información genética entre las bacterias ya que se sabe que por conjugación se puede transferir material genético (plásmidos) de una bacteria a otra transformando genotipos y fenotipos, otorgando características antes inexistentes en una bacteria

En 1984 Jonson y Davies demostraron que de 8 aislamientos examinados, 3 de ellos no presentaban pillis, también observaron que la relativa presencia de los pillis estaba directamente relacionada con la frecuencia en la que se subcultivaba al microorganismo.<sup>(20)</sup> En este estudio se emplearon 3 cepas de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14013, 1417 de aislamiento clínico y 1501 de aislamiento clínico). A estas tres cepas se les realizaron ensayos previos de adherencia obteniéndose los siguientes resultados ATCC 14018 es una cepa de referencia, presenta adherencia en un 91%



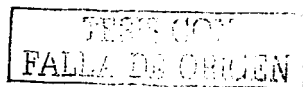


con un patrón agregativo (AggA). La cepa 1417 de aislamiento clínico, presenta adherencia en un 35% con un patrón agregativo ( AggA ). La cepa de aislamiento clínico 1501 no presenta adherencia.

En el estudio de la estructura y composición de *Gardnerella vaginalis* se ha podido determinar el contenido de guanina y citosina del DNA cromosomal por el método de punto de fusión obteniéndose un porcentaje de 42 mol %. Mediante el método de gradientes se obtuvo un porcentaje de 43 mol %. Los procedimientos para el análisis de DNA cromosomal se han facilitado con el uso de endonucleasas de restricción así como para la exploración de plásmidos pero en la actualidad el DNA plasmídico en *Gardnerella vaginalis* no ha sido descubierto <sup>(14)</sup> Tomando en cuenta que el fenotipo adherente esta ligado directamente con la presencia de fimbrias y que las fimbrias son una manifestación de un genotipo inducido por plásmidos, hipotéticamente se podría establecer la posible existencia de material genético extracromosomal en *Gardnerella vaginalis*. La presencia de este material genético extracromosomal se puede poner de manifiesto por medio de la curación de las bacterias de sus plásmidos. Una bacteria puede ser curada de sus plásmidos ya sea de forma espontanea o por tratamientos en el laboratorio tales como variación en las temperaturas óptimas de incubación o por agentes químicos como la acriflavina. <sup>(13)</sup>

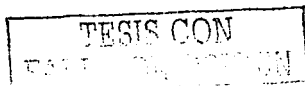
En la presente investigación se hace uso de la acriflavina como una forma posible de poner de manifiesto la presencia de material genético extracromosomal ya que las acridinas se fijan entre los pares de bases del DNA bloqueando su replicación, existiendo concentraciones de acriflavina que impiden la replicación de un elemento extracromosómico sin impedir la replicación del cromosoma mismo, es decir sin dificultar la multiplicación de la bacteria, por lo cual se esperó que después del tratamiento con acriflavina se observara en *Gardnerella vaginalis* una modificación en su patrón de adherencia.

Por ejemplo, en 1982 Toshio Hara y col. observaron que en la incubación por 12 horas de *B. subtilis* con 20 µg/mL de naranja de acridina, la bacteria perdió su capacidad para producir poliglutamato hasta en un 65%. El poliglutamato es utilizado para la fermentación de alimentos, esta sustancia es una característica fenotípica inducida por plásmidos. <sup>(21)</sup> En este trabajo se utilizaron concentraciones de acriflavina de 0.0125,



0.125, 1.25, 12.5, 125, 250, y 500 ng y se observó que la cepa de referencia ATCC 14018 perdió su capacidad de adherencia cuando fué incubada a concentraciones  $\geq$  a 1.25 ng de acriflavina. El efecto de la acriflavina sobre una cepa de aislamiento clínico (1417) mostró que esta perdió su capacidad de adherencia con concentraciones  $\geq$  a 0.0125 ng. El efecto de la acriflavina sobre cepas clínicas no adherentes no provocó ningún cambio morfológico y/o bioquímico. En cuanto a la viabilidad de la cepa ATCC 14018 mostró que el empleo de una concentración de 500 ng de acriflavina solo redujo el 5% de la viabilidad siendo esta del 95%. Un resultado similar se obtuvo en la cepa 1417 de aislamiento clínico adherente en donde se observó un porcentaje de 93% de viabilidad a la misma concentración de acriflavina. Como se pudo observar, los porcentajes de viabilidad no indican una modificación importante aun a la máxima concentración de acriflavina utilizada para el estudio por lo que se puede apreciar que la sustancia no es tóxica

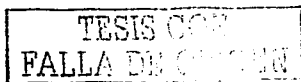
Otros estudios realizados sobre la curación de plásmidos empleando sales de acridina son los realizados con diferentes especies de *Bacteroides* resistentes a cloranfenicol y eritromicina, en donde la incubación de estas bacterias con una concentración de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de acriflavina provocó la pérdida del plásmido y la resistencia a dichos antibióticos. <sup>(22)</sup> Como se puede apreciar en este estudio se utilizó una mayor concentración del agente químico con respecto al utilizado para esta investigación de *Gardnerella vaginalis*. Como se sabe la resistencia a los antibióticos es información genética mediada por plásmidos y que se traduce en los fenotipos de las bacterias que la presentan. Recientemente en E.U. se han observado cepas de *Gardnerella vaginalis* con resistencia a la tetraciclina. Se ha evaluado la actividad de la tetraciclina con 36 distintos aislamientos clínicos de *Gardnerella vaginalis* utilizando 16 mg/L y se observó que 7 de los aislados (19%) presentaron una resistencia de 51 a 78% a la tetraciclina. <sup>(23)</sup> En 1997 R. Huang y colaboradores <sup>(24)</sup> observaron que el determinante tet(M) es el responsable de la resistencia de *Gardnerella vaginalis* a la tetraciclina. El gen está localizado en el cromosoma y está asociado con transposones conjugativos que son segmentos de material genético el cual puede cambiar de posición dentro del mismo cromosoma bacteriano e incluso combinarse con otros cromosomas y ser responsables de manifestaciones fenotípicas en las bacterias. Se examinaron las



secuencias nucleotídicas del gen tet(M) en 5 aislamientos de *Gardnerella vaginalis* que presentaron resistencia a la tetraciclina y se compararon con otras secuencias descritas de tet(M). Entre los 5 aislamientos, 4 de ellos tenían secuencias idénticas. El tamaño tenía variaciones entre 4.7 kbp y 10 kbp. Las secuencias fueron comparadas con secuencias de *Ureaplasma urealyticum*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria gonorrhoeae* concluyendo que la secuencia del gen de tet(M) de *Gardnerella vaginalis* no presenta identidad con otras secuencias publicadas de tet(M).

*Neisseria gonorrhoeae* presenta un alto nivel de resistencia a la tetraciclina y esta asociado con la presencia de un plásmido de tamaño aproximado de 25.2 kbp el cual acarrea el determinante tet(M).<sup>(26)</sup>

La secuencia del plásmido de *Lactobacillus plantarum* 5057 pMD5057 también se ha completado para la resistencia a la tetraciclina el cual tiene 10,877 pares de bases. Tiene una alta homología con las secuencias de *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.<sup>(26)</sup> De estas investigaciones se podría pensar que el fenotipo de resistencia a los antibióticos de las bacterias es generalmente una manifestación de material genético extracromosomal al igual que la presencia de fimbrias, sin embargo no es así ya que se ha demostrado que el gen de la resistencia a los antibióticos en *Gardnerella vaginalis* se encuentra localizado en su cromosoma por lo que parte de esta investigación reside en demostrar si el fenotipo adherente de *Gardnerella vaginalis* es consecuencia de material genético extracromosomal o no. Aun cuando *Gardnerella vaginalis* presenta resistencia a antibióticos, y ésta información no se encuentra distribuida en plásmidos sino en el cromosoma de la bacteria, lo anterior es un ejemplo más de la actividad de la acriflavina lo que representa un antecedente para dar solidez a nuestros postulados. Al incluir una cepa de *Gardnerella vaginalis* no adherente ( 1501 ) se hizo con la finalidad de establecer las posibles modificaciones que la acriflavina pudiera causar, ya que al no presentar adherencia podría ser posible que la acriflavina ejerciera acción sobre la bacteria a cualquier otro nivel y no únicamente sobre la base del fenotipo adherente, de lo cual se pudo observar lo siguiente: la cepa 1501 no presentó ninguna modificación en sus características morfológicas y/o bioquímicas descartando la posibilidad de que la acción de la acriflavina se pudiera deber a un posible efecto tóxico.



Al comparar los resultados obtenidos de las extracciones de DNA para ATCC 14018 y la cepa 1417, en ambas se observó la presencia de un fragmento de material genético extracromosomal que mediante la técnica de miniprep se observó que mostraba un tamaño molecular de 9,416 pb mientras que para la cepa 1501, no se observó dicho elemento extracromosomal.

Por otro lado, el análisis electroforético del DNA de bacterias tratadas con acriflavina obtenido de las cepas 14018 y 1417 demostró que perdieron el material genético extracromosomal cuando se emplearon las concentraciones de acriflavina mayores a 1.25 ng/mL la pérdida de este fragmento extracromosómico podría ser el responsable de la pérdida de adherencia que muestra la cepa 14018 y 1417 cuando son tratadas con concentraciones de acriflavina  $\geq$  a 0.0125 ng/mL.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

## 9. CONCLUSIONES.

- 1) La viabilidad de *Gardnerella vaginalis* se mantiene al 95% cuando se incuba con acriflavina a las concentraciones de 0.0125-500 ng/mL.
- 2) La adherencia de *Gardnerella vaginalis* se pierde cuando es tratada con 0.0125 ng/mL de acriflavina.
- 3) *Gardnerella vaginalis* muestra un DNA extracromosomal de 9,416 pb.
- 4) El fragmento de DNA extracromosomal de *Gardnerella vaginalis* se elimina después del tratamiento con 1.25 ng/mL de acriflavina.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

## Apéndice I

### 10. Medios de cultivo.

#### \*BASE DE AGAR CASMIAN (BIOXON) SANGRE HUMANA.

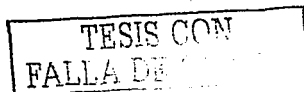
Fórmula para cada 1000 mL en agua destilada.

Extracto de levadura	3.5g
Peptona de caseína	11.3g
Peptona de carne	5.0g
Extracto de carne	3.0g
Nicotinamida	0.05g
Acido p-aminobenzoico	0.05g
Dextrosa	0.50g
Almidón de maíz	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	13.5g

PREPARACION : suspender 43 g del polvo en un litro de agua destilada.

Mezclar perfectamente. calentar con agitación frecuentemente y hervir durante un minuto hasta disolución completa; esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Enfriar a 45-50° C, agregar 5% de sangre humana desfibrinada en condiciones de esterilidad y envasar en cajas de Petri estériles. Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 horas antes de usarse este medio y determinar su funcionalidad con cultivo de microorganismos típicos.



**CALDO DE INFUSION CEREBRO-CORAZON (BHI) ENRIQUECIDO CON 10% DE SUERO FETAL DE TERNERA.**

Fórmula para 1000 mL en agua destilada.

Infusión deshidratada de cerebro y corazón de ternera.	17.5g
Proteosa peptona	10.0g
Dextrosa	2.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico	2.5g

**PREPARACION:** disolver el medio deshidratado y envasar 5 mL de este en tubos con tapón de rosca de 13 X 100 mm y esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 500 µl de suero a cada tubo o en su caso medio de enriquecimiento requerido.

Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 horas antes de usarse



## Apéndice II

### 11. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION.

#### PRUEBA DE LA CATALASA:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

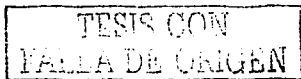
Se realiza cuando se coloca una porción de una colonia perfectamente aislada de un cultivo de 18-24 horas (excepto de colonias de agar sangre ) en un portaobjetos y se le añade 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 10% (importante no invertir el orden de aplicación ya que pueden dar resultados falsos positivos.

#### INTERPRETACION:

+Positiva: Formación inmediata de burbujas visibles.

+Negativa: No hay formación de burbujas.

\*Nota: No realizar la prueba en cultivos de más de 24 horas ya que la enzima sólo está presente en cultivos viables.





## PRUEBA DE OXIDASA:

Está basada en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, ésta reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones

La prueba de oxidasa utiliza ciertos reactivos colorantes, como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, que actúa como receptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno, la p-fenilendiamina, es incolora en estado reducido pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol.

## TECNICA:

Se realiza colocando una asada de la colonia sospechosa depositándola sobre papel filtro que previamente se agregó una gota de reactivo de diclorhidrato de p-fenilendiamina.

## INTERPRETACION:

+Positiva: las colonias con actividad citocromo oxidasa desarrollan en segundos un intenso color azul en el sitio de inoculación.

+Negativa: no hay desarrollo de color en el sitio de inoculación. Para esta prueba no se debe emplear alambre de acero inoxidable, dado que puede producir reacciones falsas positivas

TESIS CON  
FALSO NEGATIVO

## HIDROLISIS DEL HIPURATO:

Los microorganismos que poseen la enzima hipuricaza, las cuales hidrolizan el hipurato de sodio formando benzoato de sodio y glicina. Para el revelado de la prueba se emplea reactivo de ninhidrina, el cual reacciona con la glicina liberando grupos  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  los cuales reaccionan con la ninhidrina residual formando un compuesto de color azul púrpura.

## PROCEDIMIENTO:

En tubo serológico agregar 0.5 mL de solución de hipurato de sodio al 1% en agua destilada, y se coloca una asada de un cultivo puro de *Gardnerella vaginalis* y se incuba a 37° C durante 2 horas.

Agregar 0.2 mL de ninhidrina de sodio al 3.5 % y volver a incubar durante 30 minutos.

## INTERPRETACION:

+Positiva: Desarrollo de coloración púrpura.

+Negativa: Sin cambio de color.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## \*UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS:

El medio base de agar semisólido-Cistina-Digerido (CTA) con 1% de hidratos de carbono se usa fundamentalmente para la detección del ácido producido por microorganismos fermentadores.

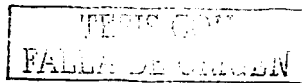
Fórmula para cada 1000 mL en agua destilada.

L-Cistina	0.50g
Peptona de caseína	20.0g
Agar	2.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Rojo de fenol	0.017g
Sulfito de sodio	0.5g

## PREPARACION.

Suspender 28.5 g de polvo deshidratado en un litro de agua destilada, si se desea, agregar de 0.5 al 1% de carbohidratos para pruebas específicas de fermentación.

Homogeneizar y calentar a ebullición durante 1 minuto, trasvasar a tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 115-118° C durante 15 minutos, o en su caso preparar soluciones al 20% (p/v) del o los carbohidratos a usar, pesando 0.5 g del mismo y suspendiéndolo en 2.5 mL de agua.



Dejar enfriar a 45-50° C el medio estéril y agregar a cada matraz en condiciones de esterilidad la solución de carbohidratos correspondiente, la cual se ha esterilizado previamente por filtración de membrana de 0.45 micras de poro, suplementando este con 0.5% de suero fetal de ternera.

Agitar y pasar 5 mL a tubos de 13X100 mm de tapón de rosca estériles, rotular los tubos con el carbohidrato correspondiente. Una vez a temperatura ambiente se incuban a 37° C por 24 horas, para comprobar su esterilidad.

Los medios CTA se siembran con un asa recta hasta profundidad con inóculo denso de la bacteria se incuban a 37° C por 24 horas; Sin embargo algunas cepas pueden necesitar de 24 a 72 horas para producir el ácido suficiente como para hacer el virre del indicador.

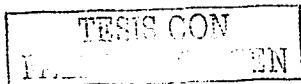
Cepa	almidón	rafinosa	glucosa	maltosa	sacarosa
<i>Gardnerella vaginalis</i>	+	+	+	+	+

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PREPARACION DE CELULAS EN MICROPLACA DE 24 POZOS.

De botellas de cultivos celulares con una confluencia entre 70 a 80 % con 24 horas de incubación a 37° C en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, se procedió a eliminar el medio de cada botella por la cara opuesta a la monocapa celular. Posteriormente se adicionó 1.5 mL de solución de tripsina-verseño (tripsina al 0.025% en verseno al 0.05%), la cual se dejó actuar sobre la monocapa celular por 5-10 segundos, se eliminó y se dejó actuar la solución residual a un tiempo aproximado de 5 minutos a 37° C facilitando de este modo la disgregación celular.

Posteriormente se realizan de 2 a 3 golpes en un costado de la botella de cultivo para lograr el desprendimiento de la capa celular de su soporte, posteriormente se resuspendieron en medio MEM sin antibiótico adicionado con 10% de suero fetal de ternera para favorecer el crecimiento. 500 µL de la suspensión celular fueron depositados en microplacas de 24 pozos que contenían previamente cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Las microplacas se incubaron a 37° C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, el sobrenadante se eliminó y posteriormente 300 µL de metanol absoluto fueron depositados. La microplaca se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se eliminó el metanol y la microplaca se almacenó a menos 20° C hasta el momento de su uso.



Apéndice III

SOLUCION DE LISIS PARA GLOBULOS BLANCOS (WCLB).

PARA PREPARAR 100 mL.

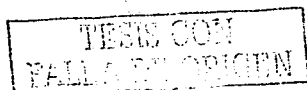
Tris base pH= 7.6	-----	10mM
EDTA pH= 8.0	-----	10mM
NaCl	-----	50mM
SDS	-----	0.2%
Proteinasa K	-----	200 µg/mL

Para preparar la solución WCLB + lisozima, adicionar además 200 µg /mL de lisozima.  
Filtrar en membrana millipore de 0.22 µm.

SOLUCION DE TBE 10X

Tris base	-----	324 g
EDTA	-----	1 g
Ac Bórico	-----	100 g

H<sub>2</sub>O estéril, ajustar el pH de 8.0-8.8 aforando a 2 litros ( disolver con calor ).



## SOLUCIONES Y COLORANTES

### \*SOLUCION SALINA FOSFATOS pH 7.2 (PBS)

Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato dibásico de potasio	0.2g
Fosfato básico de sodio 12 H <sub>2</sub> O	2.9g
Cloruro de potasio	0.2g
Agua destilada	1000 mL

Pesar las cantidades indicadas anteriormente y disolver en pequeñas porciones de agua destilada hasta dilución total; si es requerida ajustar pH a 7.2 con solución de HCl 0.01 M o en su caso NaOH 0.01 M.

### \*COLORANTE DE GIEMSA.

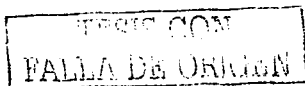
Formula para 100 mL en solución 1:1 metanol-glicerol.

Eosina	3.0g
Azur II	0.80g
Metanol	50 mL
Glicerol	50 mL

Disolver colorantes en metanol y posteriormente agregar glicerol, mezclando uniformemente y dejando reposar a la obscuridad hasta maduración.

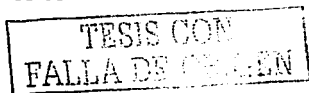
#### TECNICA:

Se fija el extendido celular con metanol durante 3 a 5 minutos, posteriormente se cubre con solución de Giemsa, dejando actuar de 20 a 30 minutos, y posteriormente se lava el preparado con agua corriente y se deja secar en posición vertical.



### 13. REFERENCIAS.

- 1.-González Pedraza A. Ortiz M.C. and Irigoyen Coría A. Bacterial vaginosis a "Broad Overview" Lat-Amer.Microbiol, 1999; 41:25-34
- 2.-Villegas C H. Gardnerella vaginalis infection in heterosexual couples. Ultrastructural study in desquamation cell of stratified epithelium. Ginecol Obstet Méx, 1995; 63: 140-42
- 3.-D. Sobel J. Bacterial vaginosis Annu Rev Med, 2000; 51: 349-352
- 4.-A. Spiegel C. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev, 1991; 4: 486-502
- 5.-Peeters M. and Piot P. Adhesion of Gardnerella vaginalis to vaginal epithelial cells: variables affecting adhesion and inhibition by metronidazole. Genitourin Med, 1985; 61: 391-5
- 6.-Zepeda López H. González Lugo G. Escherichia coli adherence to Hep-2 cells with prefixed cells J.Clin Microbiol, 1995;33: 1414-1417
- 7.-Bauer W. R. F. H. C. Crick J. H. DNA superenrollado. Inv. Ciencia, 1980; 78-89
- 8.-Daquet G.L. (Eds). Resistencia bacteriana En: Técnicas en bacteriología III. JIMS. Barcelona 1977 pág 190-193
- 9.-A. Frøman (Eds) Anatomía bacteriana, fisiología y genética. En: Microbiología de Burrows 22ª ed Interamericana McGraw-Hill, México. 1985: pág. 215-218
- 10.-R. Pellón J. (Eds) Genética microbiana. En: La ingeniería genética y sus aplicaciones Acribia, España. 1986 pág 53-60
- 11.-Brock T. D. The bacterial nucleus: a history. Microbiol Rev, 1988: 397-411
- 12.-Levinson M. D. Ph. D. W.(Eds). Estructura de las células bacterianas. En: Microbiología e inmunología médicas. El manual moderno; México. 1992: pág. 8-14
- 13.-Kuess U. U. S. Replication of plasmids in Gram-negative bacteria Microbiol Rev, 1998 53 491-516
- 14.-Taylor E Phillips I The identificación of Gardnerella vaginalis. J. Med Microbial, 1993 16: 83-92
- 15.-Wesley Catlin B. Gardnerella vaginalis: Characteristics, clinical considerations, and controverses. Clin Microbiol Rev, 1992:5: 213-237
- 16.-Yong C. T. Thompson J. S. Rapid microbiochemical method for identification of Gardnerella vaginalis J. Clin Microbial, 1982: 16: 30-33





- 17.-D. Brock T.(Eds). Plásmidos. En: Microbiología. 4ª ed. Prentice-Hall, México.1987: pág 391
- 18 -Sambrook Fritsch M.(Eds). Agarose gel electrophoresis. In: Molecular cloning. 2ª ed. Cold. Spring. New York 1989: pp. 150-163
- 19 -Johnson A. P. and Davies H. A. Demonstration by electron microscopy of pili on *Gardnerella vaginalis*. J. Vener Dis. 1984 60: 396-7
- 20 -Boustouller Y. L. Johnson A. P. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. J. Med Microbiol. 1987: 23. 3327-329
- 21 -Hara T. Tamayr A. Elimination of Plasmid-Linked polyglutamate Production by *Bacillus subtilis* (natto) with Acridine Orange. App Environ Microbiol. 1982; 44: (6): 1456-1458
- 22 -Nasim A. Brychcy T. Genetic effects of acridine compounds. Mutat Res. 1979; 65: (4): 261-88
- 23 -Eley A. Clarry T M. Tetracycline resistance in *Gardnerella vaginalis*. J. Antimicro Chemother. 1977 40 452-453
- 24 -Huang D M. R. Binzi G. Molecular evolution of the tet(M) gene in *Gardnerella vaginalis* J Antimicro Chemother.199740 561-565
- 25 -Gascoyne-Binzi D M. Heritage J. Hawkey P M. Nucleotide Sequences of the tet(M) genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 1993 32(5) 667-676
- 26 -Danielsen M. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. Plasmid 2002;48:(2):98-103

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN