

520

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

## Frecuencia de Tricomoniasis , Candidiasis y Gonorrea y su Relación con la Vaginosis Bacteriana en una Población Aparentemente Sana

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

MARIA ARACELI FERNANDEZ HERNANDEZ

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F., 1988





## **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.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION .....	4
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVOS .....	20
MATERIAL Y METODOS .....	21
RESULTADOS.....	29
DISCUSION .....	36
CONCLUSIONES.....	50
CUADROS.....	52
DIAGRAMAS .....	55
FIGURAS.....	59
TABLAS.....	60
GRAFICAS.....	70
ANEXOS.....	74
REFERENCIAS .....	79

## RESUMEN

En la práctica ginecológica las infecciones cervicovaginales provocadas por bacterias, virus y hongos son las infecciones más frecuentemente diagnosticadas. La candidiasis, la tricomoniasis y la gonorrea son entidades bien conocidas mientras que la etiología y factores predisponentes de la vaginosis bacteriana (vaginitis inespecífica) no están bien comprendidas. Por tal motivo se decidió realizar este trabajo en una población aparentemente sana para tratar de conocer la frecuencia de las infecciones cervicovaginales más frecuentes en la zona central de nuestro país como la vaginitis provocada por hongos, bacterias y protozoarios, así como también la gonorrea y ayudar a la comprensión de puntos no aún aclarados en la vaginosis bacteriana. Así también como conocer el mejor método de conservación de Gardnerella vaginalis para realizar posteriormente diferentes estudios bacteriológicos.

La frecuencia de los microorganismos encontrados en la población total que corresponde a mujeres aparentemente sanas y con una vida sexual activa fueron: Gardnerella vaginalis (16.8%), Candida spp, (14.4%), Trichomonas vaginalis (1.3%) y Neisseria gonorrhoeae (0.2%), mientras que la combinación de Gardnerella sp. y Candida spp. fue la más comúnmente encontrada (6.0%).

La vaginosis bacteriana es atribuida a una especie llamada Gardnerella (Haemophilus) vaginalis, la cual fue identificada por la presencia de colonias puntiformes, beta-hemolíticas en el medio de sangre humana en doble capa (HB). Esta bacteria es de forma cocobacilar gram-negativa y gram-variable, utiliza el almidón y la dextrosa para producir ácido, provoca la hidrólisis del hipurato y tiene una reacción negativa de catalasa.

En la población estudiada no se encontró la asociación de G. vaginalis-vaginosis bacteriana, ya que esta especie se aisló aproximadamente en la mitad de los casos de mujeres con vaginosis bacteriana. Así mismo, también se ha reportado la influencia de diferentes métodos anticonceptivos y prácticas de higiene personal (como son las duchas vaginales) en la aparición de vaginosis bacteriana no encontrándose esta correlación para la población.

El diagnóstico de la vaginosis bacteriana se basó en el cumplimiento de al menos 3 de 4 de los principales criterios propuestos por Amsel y col. (1983):

- 1) pH vaginal mayor a 4.5
- 2) Presencia de células gúfa.
- 3) Prueba de diaminas positiva.
- 4) Presencia de leucorrea vaginal anormal.

La población con vaginosis bacteriana presentó con mayor frecuencia el pH vaginal mayor a 4.5, la presencia de células gúfa y la prueba de diaminas positiva; mientras que un pequeño porcentaje de la población sin vaginosis bacteriana se caracterizó por poseer un pH vaginal mayor a 4.5 y por la presencia de leucorrea anormal. La sintomatología de leucorrea anormal, olor e irritación o ardor presentó mayor frecuencia, sin haber queja de otro síntoma como sangrado intermenstrual, dispareunia, etc.

En la población estudiada aproximadamente una de cada seis estuvo infectada con G. vaginalis y un porcentaje similar con Candida spp, es decir, en casi la tercera parte se encontró alguno de estos microorganismos, lo que revela la importancia que pueden tener estos patógenos oportunistas como causantes de infecciones cervicovaginales.

La conservación de esta bacteria se llevo a cabo bajo diferentes métodos y condiciones de conservación. Se tuvieron resultados aceptables con un medio sólido con reactivos nacionales manteniéndolos a 4°C (refrigeración) y un medio líquido a una temperatura de -70°C, sin embargo, el método más efectivo es la liofilización.

## INTRODUCCION

Las enfermedades cervicovaginales atribuidas a protozoarios, bacterias o virus constituyen una de las causas mas importantes de consulta ginecológica en todo el mundo (De la Cruz y Calderón, 1985), encontrándose entre las más frecuentese importantes a la gonorrea y a la vaginitis de diversa etiología (Hurd, 1979).

La gonorrea es la más antigua enfermedad de transmisión sexual conocida; este término proviene de la palabra griega "gonorrhoe" que significa flujo de semen (Arya et. al., 1983) o flujo de semillas, introducido por Galeno en el año 130 d.c. (Joklik et. al., 1983).

Durante mucho tiempo la sífilis y la gonorrea no se distinguían considerándose como una sola entidad, ya que en 1767 el Dr. Hunter se autoinoculó con secreción uretral de un paciente que padecía solo gonorrea, presentando síntomas sífilíticos por lo que éstos fueron adjudicados a esta enfermedad (Arya et. al., 1983; Joklik et. al., 1983). Hasta 1793 Bell, separó definitivamente ambas enfermedades y en 1879 Neisser, describió el agente etiológico de la gonorrea, especie a la que se le denominó Neisseria gonorrhoeae.

Se ha podido establecer que entre el 20 y 80% de la población femenina puede presentar gonorrea de una manera asintomática (Joklik et. al., 1983). Mientras que la forma sintomática se manifiesta por una leucorrea purulenta provocada por la introducción del germen en el tejido del epitelio cilíndrico provocando una inflamación (Carpenter, 1982); pudiéndose presentar también disuria leve o pasajera, dolores abdominales, irritación y fiebre (Arya et. al., 1983; Joklik et. al., 1983).

Estudios realizados han demostrado que N. gonorrhoeae puede infectar mucosas de endocérvix, uretra, orofaringe, canal anal o conjuntiva, desarrollando en consecuencia cervicitis, uretritis gonocócica, faringitis amigdalitis, proctitis, conjuntivitis gonocócica y oftalmía neonatorum gonocócica (Arya et. al., 1983). Se ha encontrado que aproximadamente el 50% de las mujeres con gonorrea presentan además una colonización rectal (Joklik et. al. 1983).

El diagnóstico de la gonorrea puede hacerse en base a un frotis de Gram, en donde se encuentran una gran cantidad de leucocitos poli-morfonucleares (más de 6 por campo) (Eschenbach et. al., 1983) con diplococos gran-negativos intra y extracelulares (Arya et. al., 1983; Eschenbach et. al., 1983; Joklik et. al., 1983). Este frotis da un porcentaje de seguridad del 95% en hombres sintomáticos, mientras que en mujeres es de tan sólo el 60% (Kellogg et. al., 1976), por lo cual es necesario efectuar un cultivo para confirmar el diagnóstico y así descartar una posible confusión con otras bacterias como Moraxella spp. y Acinetobacter spp. (Koneman et. al., 1983).

Dentro del género Neisseria encontramos dos especies importantes que son: N. gonorrhoeae (gonococo) y N. meningitidis (meningococo), las cuales tienen como único reservorio a la especie humana. Son diplococos gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos que miden de 0.6 a 1.0 micras de diámetro, presentan sus lados adyacentes aplanados confiriéndoles una forma parecida a los granos de café. Para su crecimiento necesitan de una atmósfera de CO<sub>2</sub> entre el 5-10%, una humedad del 70% aproximadamente, una temperatura entre los 35° a 37°C y un medio enriquecido (Kellogg et. al., 1976; Carpenter, 1982; Eschenbach et. al., 1983; Joklik et. al., 1983; Koneman et. al., 1983).

El medio de cultivo más recomendado para su aislamiento es el medio de Thayer-Martin que contiene base de agar GC y hemoglobina además de vancomicina, colistina y nistatina, antimicrobianos que inhiben bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras respectivamente. Este medio es utilizado cuando la muestra proviene de un sitio rico en flora bacteriana como es el endocérnix, orofaringe, canal anal, conjuntiva o uretra; también es usado el medio de agar gelosa chocolate cuando la muestra viene de un sitio estéril como líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc. (Joklik et. al., 1983). Actualmente se ha reportado la presencia de cepas de gonococo que son sensibles a la vancomicina, por lo que se recomienda utilizar el medio de agar gelosa chocolate o sembrar paralelamente ambos medios (Kellogg et. al., 1976; Eschenbach et. al., 1983; Koneman et. al., 1983).

En estos medios con un tiempo de incubación de 24 a 48 horas se producen colonias blanco-grisáceas, opacas, convexas, lisas, redondas, que miden de 0.5 a 2mm. de diámetro; cuando se deja incubando por más tiempo las colonias se vuelven dentadas, aumentan su tamaño y su consistencia se vuelve blanda y ligeramente resbalosa (Arya et. al., 1983; Koneman et. al., 1983).

Para descartar la presencia de N. gonorrhoeae es necesario dejar incubando la muestra por un período mínimo de 72 horas (Eschenbach et. al., 1983).

Su identificación se basa además de la morfología colonial y microscópica en reacciones bioquímicas encontrándose que las neisserias son catalasa y oxidasa positiva. La utilización de carbohidratos para el gonococo es positiva solamente con glucosa, mientras que para el meningococo la glucosa y maltosa dan reacciones positivas (Joklik et. al., 1983; Koneman et. al., 1983). Hay que señalar que en

las reacciones de degradación de carbohidratos solo se produce ácido pero no gas (Joklik et. al., 1983).

La vaginitis es la infección más frecuente que se encuentra en la práctica ginecológica y la más preocupante para la mujer (Hurd, 1979; Leighton, 1982), manifestándose por leucorrea, prurito, irritación, edema, dispareunia y disuria (Hurd, 1979).

El flujo vaginal o leucorrea es una característica común en la mujer, sin embargo le es dificultoso diferenciar entre una leucorrea fisiológica y una patológica. La primera es transparente o blanca, mucosa y espesa (Gardner y Dukes, 1955) aumentando su cantidad después de la menstruación, de una relación sexual o de una excitación; la secreción vaginal normal posee un pH de 3.8 a 4.2. en la mujer adulta. La segunda es una leucorrea amarillenta, grisácea, verdosa o purulenta presentando en algunas ocasiones olor fétido, con aspecto grumoso o espumoso. Los agentes etiológicos pueden ser Trichomonas vaginalis, Candida albicans y Gardnerella vaginalis presentándose en porcentajes variables de acuerdo al tipo de población (Hurd, 1979).

Trichomonas vaginalis es un protozoo descubierto en 1836 por Donné, quién observó microorganismos móviles en casos de mujeres con leucorrea purulenta y espumosa (De la Cruz y Calderón, 1985).

Se ha observado que T. vaginalis infecta mucosas de vagina y uretra causando secreción amarillo-verdosa, espumosa y fétida, una irritación vulvar y vaginal, dispareunia y algunas veces cistitis (Arya et. al., 1983). Las paredes vaginales y cérvix pueden presentar enrojecimiento y aspecto granular, dando un aspecto de fresa (Taylor et. al., 1982; Arya et. al., 1983; Eschenbach et. al., 1983; De la Cruz y Calderon, 1985).

Los síntomas de la tricomoniasis pueden variar ampliamente (Arya et. al., 1983), encontrándose sin embargo, un alto porcentaje de casos asintomáticos (De la Cruz y Calderón, 1985). Su diagnóstico se basa en su identificación efectuada en un examen en fresco, en donde presenta forma redondeada o de pera, mide de 8 a 15 micras, posee 4 flagelos anteriores y uno posterior que se encuentra a lo largo de la membrana ondulante la que le confiere movimientos rotatorios característicos (fig. 1) (Arya et. al., 1983; Joklik et. al., 1983; De la Cruz y Calderón, 1985).

Para su aislamiento se utiliza el medio de Feinberg Whittington o el medio modificado de Diamond; cuando se tiene sospecha de su presencia, se identifica de la manera arriba mencionada. Con esta metodología se tiene un porcentaje de seguridad del 60% (Eschenbach et. al., 1983).

Esta infección al igual que la gonorrea en los adultos se transmite por contacto sexual.

La candidiasis o moniliasis es la más común de las infecciones vaginales causada principalmente por un hongo llamado Candida albicans (Eschenbach et. al., 1983; Joklik et. al., 1983), ya que el género Candida spp. forma parte de la flora normal de mucosas, piel, tracto gastrointestinal (Carpenter, 1982; Joklik et. al., 1983), manifestando su patogenicidad bajo ciertas condiciones como períodos de premenstruación, diabetes, ingestión de antimicrobianos, embarazo, etc. (Arya et. al., 1983; Eschenbach et. al., 1983; Joklik et. al., 1893).

La candidiasis se puede manifestar como leucorrea escasa, acuosa, blanquecina y mucoide o profusa, gruesa y en forma de grumos (Arya et. al., 1983; De la Cruz y Calderón, 1985), existiendo algunas veces la sensación de quemaduras durante la micción, así como prurito perivaginal con escoriaciones eritematosas en los labios extendiéndose a la mucosa vaginal (Arya et. al., 1983; Eschenbach et. al., 1983).

El diagnóstico inicial de la candidiasis se realiza con un examen en fresco con solución salina al 0.85% (De la Cruz y Calderón, 1985) o bien colocando dos gotas de hidróxido de potasio al 10% para facilitar la observación de levaduras de aproximadamente 3 a 6 micras de diámetro con forma elipsoidal o esférica (Joklik et. al., 1983) (fig. 2.).

Se ha estimado que aproximadamente el 50% de las mujeres asintomáticas tienen Candida spp. en vagina (Eschenbach et. al., 1983).

C. albicans es capaz de producir levaduras, pseudohifas o hifas verdaderas. Cuando forma parte de la flora normal crece como una levadura con brotes; mientras que las hifas se producen cuando hay invasión de tejidos. Su cultivo se lleva a cabo con medios selectivos como el medio de Sabouraud y Biggy, donde produce colonias convexas, de coloración cremosa y opaca que miden de 1 a 2 mm. de diámetro (Joklik et. al., 1983).

La morfología microscópica y colonial mencionadas, son la base de una identificación presuntiva, sin embargo es necesario hacer otro tipo de pruebas como es la producción de tubo germinativo, que es un apéndice elongado que crece hacia afuera y tiene aproximadamente la unidad del ancho y el doble de largo de la célula levaduriforme como una identificación definitiva. Este se produce después de 90 minutos en suero humano a 37°C ayudando a separar a C. albicans de otras especies (Eschenbach et. al., 1983; Joklik et. al., 1983) (fig. 3).

Existe un tercer tipo de vaginitis llamada "vaginitis inespecífica" que fue atribuida primeramente a diversas bacterias como estafilococos, estreptococos, bacilos coliformes, micrococos y difteroides (Gardner y Dukes, 1955).

En 1953 Leopold, a partir de hombres con prostatitis y mujeres con cervicitis aisló a un bacilo gram-negativo, no móvil, no capsulado y pleomórfico empleando el medio de agar Casman en donde crecieron pequeñas colonias hemolíticas incoloras, sugiriendo que ésta guardaba relación con el género Haemophilus spp. pero no le atribuyó la capacidad de causar tales enfermedades (Dukes y Gardner, 1961; Vontver y Eschenbach, 1981).

En 1955, Gardner y Dukes publicaron un estudio más detallado de sus características morfológicas, nutricionales y el cuadro clínico que presuntamente causaba, lo describieron como un bacilo gram-negativo, no móvil, no capsulado, pleomórfico y que necesitaba de factores X y V para su crecimiento por lo cual fue incluido en el género Haemophilus spp. y bautizó como Haemophilus vaginalis, concluyendo que era el único agente etiológico de la vaginitis inespecífica transmitiéndose por contacto directo.

En 1963, Zinneman y Turner propusieron el cambio al género Corynebacterium spp. debido a sus propiedades morfológicas y de tinción (Dunkelberg y McVeigh, 1969; Taylor y Phillips, 1983; Brown et. al., 1984).

Estó fue apoyado por Dunkelberg y McVeigh (1969), quienes realizaron un estudio con características nutricionales proponiendo la utilización del medio sólido PSD (proteosa-peptona # 3, almidón y dextrosa) como un medio de aislamiento e identificación, en donde se presentaban colonias blancas, opacas, convexas, con cúpula, de forma cónica, una apariencia compacta, de borde entero y con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm. de diámetro.

La controversia acerca de su taxonomía siguió durante los años 70's, fue hasta 1979 cuando Greenwood y Pickett propusieron la creación de un nuevo género "Gardnerella" sp. teniendo como base estudios de hibridación de ADN, microscopía electrónica, análisis bioquímico de la pared celular y reacciones bioquímicas (cuadro 1). Actualmente está bien establecida la especie Gardnerella vaginalis.

La vaginitis inespecífica se ha definido como aquella alteración que provoca una leucorrea anormal y no es producida ni por T. vaginalis, ni C. algicans ni N. gonorrhoeae (Kaufman, 1980; Vontver y Eschenbach, 1981).

Pheifer et. al. (1978) encontró asociación en el sobrecrecimiento de bacterias anaeróbicas y la vaginitis inespecífica, esto fue apoyado por Chen et. al. (1979), quien al examinar flujos vaginales provenientes de mujeres enfermas, encontró diferentes aminas como: putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, metilamina, isobutilamina y feniletilamina; siendo las principales las dos primeras que le dan el olor fétido característico (citado en Taylor et. al., 1982; Chen et. al., 1983). En 1980 Spiegel, también confirmó el aumento de bacterias anaerobias en mujeres enfermas encontrándose entre las más importantes Bacteroides spp. y Peptococcus spp. En 1983 Spiegel, propuso el cambio de nombre de vaginitis inespecífica al de "vaginosis bacteriana" (utilizado en este trabajo) sugiriendo al mismo tiempo una relación sinérgica entre G. vaginalis y bacterias anaerobias. También se ha propuesto el nombre de "vaginosis anaerobia" por Blackwell y Barlow (1982).

Un punto de apoyo a lo expuesto anteriormente es el uso del metronidazol como tratamiento actual, se sabe que éste es más activo contra bacterias anaerobias que contra G. vaginalis; y que al terminar el tratamiento los síntomas presentados desaparecen totalmente (Spiegel et. al., 1980).

La vaginosis bacteriana según algunos autores es la más frecuente de las vaginitis y su sintomatología es la menos notoria (Dunkelberg et. al., 1970; Leighton, 1982; Chattopadhyay, 1984). La característica más común en esta infección es la presencia de leucorrea, su color va desde gris pasando por amarillo, verdoso y blanco; su consistencia es homogénea; su aspecto líquido o espumoso; su cantidad también varía; pero en lo que coinciden la mayoría de los investigadores es en la presencia de una leucorrea fétida y homogénea (Gardner y Dukes, 1955; Criswell et. al. 1969; Hurd, 1979; Bhattacharyya y Jones, 1980; Dattani et. al., 1982; Blackwell y Barlow, 1982; Ison et. al., 1982; Blackwell et. al., 1983; Brown et. al., 1984).

Amsely col. (1983) iniciaron su estudio evaluando cinco criterios para diagnosticar la vaginosis bacteriana tomando como base los siguientes puntos:

- 1) La presencia de leucorrea homogénea.
- 2) Un pH vaginal mayor de 4.5.
- 3) La liberación de diaminas con la adición de hidróxido de potasio al 10% (KOH) (Blackwell y Barlow, 1982; Chen et. al., 1983).
- 4) La detección de diaminas anormales por cromatografía.
- 5) La presencia de células guña en un examen en fresco.

Llegaron a la conclusión de que para definir la vaginosis bacteriana deben de cumplirse al menos tres de los cuatro criterios siguientes:

- a) Leucorrea delgada, homogénea y consistencia como de leche.
- b) El pH vaginal superior a 4.5.
- c) Olor a "pescado" desprendido a la adición de hidróxido de potasio al 10% a la muestra vaginal (Blackwell y Barlow, 1982; Amsel et. al., 1983; Chen et. al., 1983).
- d) La presencia de células guña en un examen en fresco, (células guña con sus bordes no bien definidos, cubiertas de cocobacilos gram-negativos y cocos gram-positivos dándoles un aspecto granular (Gardner y Dukes, 1955)).

La manifestación de enrojecimiento, prurito e inflamación son mínimas, lo que sugiere una baja virulencia de G. vaginalis (Gardner y Dukes, 1955; Chattopadhyay, 1984).

La sintomatología puede agudizarse cuando se aunan otro tipo de infecciones como candidiasis y tricomoniasis (Blackwell y Barlow, 1982; Amsel et. al., 1983). Esta última al parecer esta relacionada con la aparición de la vaginosis bacteriana; también hay factores tales como la utilización del dispositivo intrauterino (DIU), los anticonceptivos orales, el número de embarazos y la experiencia sexual que pueden predisponer a la presencia de la enfermedad dependiendo del tipo de población estudiada (McCormack et. al., 1977; Amsel et. al., 1983; Eschenbach, 1984).

G. vaginalis se ha aislado en porcentajes variables (12-47%) en mujeres asintomáticas aumentando estas frecuencias en poblaciones con vaginosis bacteriana. Sin embargo, hay reportes de su asociación con cuadros de septicemia, sepsis neonatal y sepsis post-aborto (Leighton, 1982; Chattopadhyay, 1984; La Scolea et. al., 1984).

G. vaginalis fue aislada primeramente en medios como agar-Casman, agar gelosa chocolate, PSD (proteosa-peptona # 3, almidón dextrosa), agar-V, agar sangre de carnero, agar sangre de conejo, CNA (colistina, ácido nalidixico, anfotericina B) y actualmente es recomendable el medio de sangre humana en bicapa (HB o HBT) que fue propuesto por Totten et. al., (1982), contiene base de agar columbia, proteosa-peptona #3, anfotericina B, ácido nalidixico, colistina (que inhiben levaduras, bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas respectivamente) y además tween 80 y sangre humana. Es un medio en bicapa, selectivo y diferencial, el cual detecta pequeñas concentraciones de G. vaginalis y sirve al mismo tiempo como identificación presuntiva ya que produce una beta hemólisis al ser aislada en medios que contienen sangre humana o sangre de conejo.

Esta bacteria necesita para su crecimiento una temperatura de 36° a 37°C, un pH entre 6 y 6.5 y una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> aproximadamente (Buchanan y Gibbons, 1974).

La identificación de G. vaginalis se basa en :

- a) Morfología microscópica, en donde presenta una forma cocobacilar, es gram-negativa o gram-variable, con un grado moderado de pleomorfismo, mide de 0.3 a 0.6 por 1.0 a 2.0 micrómetros, se encuentra aislada o en pares mostrando sus extremos redondeados (Dukes y Gardner, 1961; Lewis et. al., 1972; Buchanan y Gibbons, 1974).
- b) Morfología colonial, se presentan colonias pequeñas beta hemolíticas, puntiformes, convexas, redondas, de borde entero dando una apariencia de pequeñas gotitas de agua al cabo de 48 horas de incubación en el medio de HB.
- c) Reacciones negativas de catalasa y oxidasa. La primera se caracteriza por la carencia de burbujeo en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%, y la segunda por no virar el indicador al violeta oscuro (Leighton, 1982).
- d) Utilización de carbohidratos en donde se han reportado varios esquemas variando su metodología de preparación e inoculación. Los azúcares más frecuentemente usados son el almidón, dextrosa, maltosa, glucosa, manitol y rafinosa, siendo las cuatro primeras reacciones positivas y las dos últimas reacciones negativas (Leighton, 1982; Piot et. al., 1982).
- e) Hidrólisis del hipurato. Este es un criterio importante para la identificación de G. vaginalis (Leighton, 1982; Jolly, 1983). Esta bacteria

hidroliza la sal de hipurato de sodio dando como resultado glicina la cual se manifiesta con la adición del indicador de nintidrina caracterizándose por un color violeta oscuro.

- f) Sensibilidad a los antimicrobianos. La prueba se efectúa con discos impregnados de metronidazol (50 microgramos en PSD), nitrofurantoina (150 microgramos en agar sangre humana), sulfonamida (1 miligramos en agar sangre humana), bilis (10% en PSD) y bacitracina (Piot et. al., 1982; Chattopadhyay, 1984).

Las pruebas de morfología microscópica, la beta hemólisis, la reacción de catalasa y utilización de carbohidratos nos dan el 90 al 94% de seguridad. Se han propuesto otras reacciones como, la reducción del telurito, la alfa y beta glucosidasa, en conjunto con la hidrólisis del hipurato y la sensibilidad a los antimicrobianos para aumentar a un 98% de seguridad (Piot et. al., 1982; Chattopadhyay, 1984).

Sin embargo, es muy fácil confundir a G. vaginalis con otro tipo de bacterias (difteroides) (cuadro 2), éstas son más gruesas, gram-negativas, con tendencia de bacilos a cocobacilos pleomórficos e irregulares, mientras que G. vaginalis son cadenas cortas, delgadas, regulares, gram-negativas o gram-variables, que al encontrarse en parejas pueden presentar formas L o V (Dunkelberg, 1965; Piot et. al., 1982). Jolly (1983) propuso las siguientes reacciones para separar a los organismos parecidos a G. vaginalis de esta última:

- 1) Utilización de carbohidratos.
- 2) Beta hemólisis en agar sangre humana.
- 3) Hidrólisis del hipurato.

La morfología, características bioquímicas y la patogenicidad son algunas características importantes para estudiar y comprender el comportamiento de los microorganismos. Otro parámetro de estudio importante es la conservación, ya que tiene como objetivo el mantene-

viabiles a los cultivos con propiedades iguales a las que tenían al ser aislados, es decir, sin mutaciones o variaciones y sin contaminantes; pueden ser utilizados para fines didácticos, de investigación, industriales o para emplearlos en bioensayos (De la Cruz, 1982).

Existen dos métodos de conservación que son: a corto y largo plazo.

Dentro de la conservación a corto plazo están:

- 1) Resiembras, que es el método tradicional y más fácil ya que consiste de pases periódicos a medio fresco.
- 2) Almacenamiento en aceite mineral, que al igual que el anterior es un medio sencillo y barato. Su tiempo de conservación va de meses a años dependiendo de las especies bacterianas. Consiste en obtener un crecimiento de la cepa en tubos con medio sólido inclinado agregando aceite mineral en condiciones de esterilidad, hasta cubrir por completo el área inclinada. Los tubos se guardan en posición vertical y en refrigeración.
- 3) Congelación, con este método los resultados varían de una especie a otra, ya que hay especies muy sensibles a este proceso, la velocidad de enfriamiento debe ser lenta al principio (hasta 4°C) y posteriormente rápida de 4°C a -70°C. Su período de conservación va de seis meses a dos años, reduciéndose cuando se congelan y descongelan las cepas.
- 4) Papel, en éste pueden ser conservadas las enterobacterias por varios años, y consiste en humedecer el papel estéril con una solución que contenga  $10^8$  bacterias/ml. o más, secándose al aire o al vacío y guardándose en tubos que son colocados en desecadores en refrigeración.

En la conservación a largo plazo encontramos a la liofilización, que consiste en la deshidratación de suspensiones bacterianas congeladas sometidas a bajas presiones, con lo que el agua pasa del estado sólido a gas sin pasar por el estado líquido (sublimación). Las bacterias liofilizadas pueden almacenarse por largo tiempo evitándose el contacto con oxígeno, humedad y luz ocupando un espacio pequeño (De la Cruz, 1982).

Los principales pasos para el proceso de liofilización son:

- 1) Selección de viales.
- 2) Selección del agente crioprotector, siendo los más utilizados por la American Type Culture Collection (ATCC) la leche descremada al 20%, la sacarosa a una concentración final del 12% y el dimetil sulfóxido a una concentración del 5%.
- 3) Preparación y propagación de la cepa, en este inciso es necesario tomar en cuenta las características nutricionales del microorganismo para obtener un crecimiento óptimo (suspensiones con una concentración mínima de  $10^6$  bacterias/ml.). Esta biomasa debe ser colectada en el período de máxima estabilidad y viabilidad (última parte de la fase logarítmica o la primera de la fase estacionaria).
- 4) Liofilización, este proceso se lleva a cabo por 18 horas.
- 5) Almacenamiento, las cepas liofilizadas deben ser guardadas a temperaturas menores de  $5^{\circ}\text{C}$ .
- 6) Rehidratación de cepas liofilizadas. Se abren los viales rehidratándose con 0.3 a 0.4 ml. de caldo estéril, se mezcla perfectamente bien hasta formar una solución homogénea y se transfiere a 5 ml. del caldo utilizado, sembrándose 0.2. ml. de éste en una placa.

- 7) Ultracongelación, cuando la liofilización no da buenos resultados, las cepas pueden almacenarse a  $-90^{\circ}\text{C}$  con nitrógeno líquido.

La liofilización es el método más frecuentemente utilizado debido a que tiene períodos de conservación mayores de 15 años.

En la literatura revisada existe muy poca información acerca de la conservación de G. vaginalis, estudiándose aquí en 3 métodos diferentes. El conocer las condiciones óptimas de conservación nos permite seguir otro tipo de investigaciones como, efectuar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos e investigar factores de virulencia. Por otra parte, aspectos como su transmisión y los factores y relaciones que favorecen la aparición de la vaginosis bacteriana no han sido aún esclarificados, por lo cual es importante seguir su estudio.

### HIPOTESIS

- Entre las enfermedades cervicovaginales, las únicas diagnosticadas en nuestro medio son la tricomoniasis, la candidiasis y la gonorrea. Sin embargo, la vaginosis bacteriana atribuida a G. vaginalis y bacterias anaerobias posiblemente sea más frecuente que cualquiera de ellas.

- Si consideramos a G. vaginalis como el agente etiológico de la vaginosis bacteriana, es de esperarse que se encuentre en un alto porcentaje en población que presente tal cuadro. Por el contrario, no se aislará a partir de una población sana.

- Para realizar estudios en la relación huésped-parásito y sensibilidad a los antimicrobianos es necesario una buena conservación de las cepas. Para G. vaginalis la liofilización puede ser el mejor método a largo plazo para mantener la viabilidad.

### OBJETIVOS

- Comparar la frecuencia de aparición de Trichomonas vaginalis, Candida albicans, Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis y posibles combinaciones en una población femenina aparentemente sana.
- Establecer la correlación de aislamiento de Gardnerella vaginalis con las manifestaciones clínicas en una población sana y con vaginosis bacteriana.
- Conocer el tiempo de supervivencia de Gardnerella vaginalis bajo diferentes métodos y condiciones de conservación.

## MATERIAL Y METODOS

Este trabajo formo parte de un estudio clínico-microbiológico global que fue realizado en la Clínica # 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, con un total de 507 mujeres trabajadoras del mismo, 365 de ellas pertenecieron al personal médico y de enfermería y el resto a diferentes áreas de trabajo.

Para poder entrar a este estudio, la población estudiada debio cumplir con los requisitos siguientes:

- 1) Estar de acuerdo para participar.
- 2) Tener una vida sexual activa.
- 3) Ser mayor de 18 años.

Por otra parte, fueron excluidas las mujeres que presentaron flujo menstrual y habian ingerido antimicrobianos como: metronidazol, ampicilina, tetraciclina, nistatina, sulfas y ácido nalidíxico por lo menos dos semanas antes de la toma de muestras.

A cada una de ellas se le entrevisto y con los datos obtenidos se lleno un cuestionario (cuadro 3). Posteriormente se realizo un examen ginecológico, que consistió en la introducción de un espejo vaginal sin lubricante, lo que permitio observar el estado de la región endocervical y de la región vaginal; se procedió a tomar las muestras con hisopos de algodón estéril, los que fueron utilizados dependiendo de la zona anatómica muestreada de la siguiente manera (diagrama 1):

- 1) Región endocervical. El hisopo se introdujo ligeramente en el canal del endocérnix para absorber la secreción, se inculó de inmediato la placa con el medio de Thayer-Martin (anexo 1) que nos ayudo a detectar la presencia de N. gonorrhoeae.

Con el mismo hisopo se hizo un frotis para tinción de Gram que fue teñido en el laboratorio.

2) Región de fondo de saco vaginal. Se tomaron varias muestras con hisopos de algodón distribuyéndolas de la manera siguiente:

- a) Con un hisopo se inoculó el medio de HB (anexo 2) para obtener las cepas de G. vaginalis y fue hecho un frotis para teñirlo por la técnica de Gram.
- b) Se introdujo un hisopo en un tubo que contenía 2 ml. de medio de transporte de Stuart, que en el laboratorio fue empleado para inocular el medio de Biggy (anexo 3) donde fue confirmada la presencia del género Candida spp.
- c) Otro hisopo fue utilizado para realizar un examen en fresco con tubos de 13 por 100 mm. conteniendo 1 ml. de solución salina al 0.85%, fue observado de inmediato a un aumento de 400X para la identificación de tricomonas, levaduras y células gú.
- d) El último hisopo sirvió para medir el pH, impregnando tiras de papel y colocando de 2 a 3 gotas de hidróxido de potasio al 10% al hisopo para detectar el olor como a "pescado" (prueba de diaminas).

Todos los medios fueron incubados a una temperatura de 37°C de 48 a 72 horas, el medio de Thayer-Martin y HB fueron colocados en jarras con vela para obtener una tensión de CO<sub>2</sub> del 5% aproximadamente, mientras que el medio de Biggy fue incubado en aerobiosis.

Al observar crecimiento microbiano, fueron hechas las resiembras necesarias para tener cultivos puros y se procedió al siguiente esquema de identificación:

a) Candida spp.

A partir del medio selectivo de Biggy con 24 horas de incubación fue observada la morfología colonial y posteriormente se efectuó un frotis para tinción de Gram, en donde fue confirmada la morfología microscópica. Fueron tomadas 4 colonias con el asa estéril introduciéndolas en tubos de 13 por 100 mm. con 1 ml. de suero, se dejó incubar por 24 horas observando la proliferación del tubo germinativo a 400X al cabo de este tiempo. Esta prueba ayudo a separar a C. albicans de otras especies (diagrama 2).

b) Neisserria gonorrhoeae.

Las cepas sospechosas se dejaron crecer por 24 hcras en el medio de agar gelosa chocolate (anexo 1) en donde se confirmo la morfología colonial. Se prosiguió a realizar un frotis de Gram para asegurarse de la pureza y morfología microscópica, por último se procedió a la identificación bioquímica (diagrama 3):

- 1) Reacción de catalasa, fue colocada una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y dos colonias de la cepa en un portaobjetos limpio, notando la presencia o ausencia de burbujeo.
- 2) Reacción de oxidasa, se emplearon discos impregnados de N-N-N-N-tetrametilparafenildiamina (anexo 4), en un extremo fue colocado un pequeño inculo de la cepa (2 colonias), observando sí aparecio el color violeta o no.
- 3) Reacción de coaglutinación, fueron utilizados reactivos comerciales de Phadebact. El equipo contiene un reactivo que actúa como control negativo, con suero normal de conejo unido a estafilococos y otro conteniendo estafilococos con suero antigonococo. Al poner en contacto la cepa con el reactivo se llevo a cabo la aglutinación de los estafilococos apareciendo agregados visibles.

4) Utilización de carbohidratos, se uso un medio basal de CTA (agar triptefna cistina) al que se le agregó soluciones de glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa (anexo 5). Los tubos fueron sembrados inoculando la cepa en el primer cuarto del medio incubándolos por 24 horas en jarras con vela.

c) Gardnerella vaginalis.

Su identificación fue realizada con un cultivo de 48 horas de incubación en el medio de HB, donde se tomó en cuenta su morfología colonial, continuando a efectuar un frotis de Gram para confirmar la pureza y la morfología microscópica de la cepa. Por último, fueron efectuadas las siguientes reacciones bioquímicas (diagrama4) :

- 1) Reacción de catalasa, fue realizada de la misma manera que para el gonococo.
- 2) Utilización de carbohidratos (anexo 6), los tubos fueron inoculados con un inóculo grueso agitandose perfectamente bien para homogeneizar la solución e incubar de 24 a 120 horas en una jarra con vela.
- 3) Hidrólisis del hipurato (anexo 7), se inoculó de igual manera que en el paso anterior, fue incubado por 24 horas, revelando con solución de ninhidrina (0.2 ml.); al cabo de aproximadamente 5 min. se observó un color morado intenso.

Trichomonas vaginalis.

La identificación de este microorganismo se hizo en base a su morfología presentada en un examen en fresco (fig. 1).

Fue utilizada la prueba de chi-cuadrada como método estadístico.

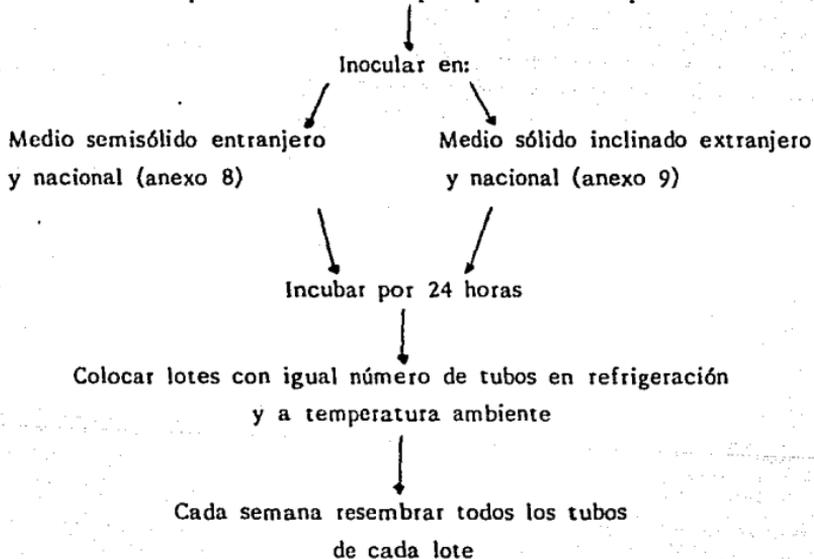
**CONSERVACION DE CEPA TIPO (ATCC 14018) DE  
G. vaginalis.**

Para la conservación de la cepa tipo se empleó el método a corto plazo que comprendió la resiembra y la congelación y el método a largo plazo, el que consta de la liofilización. Estos métodos se realizaron de la siguiente manera:

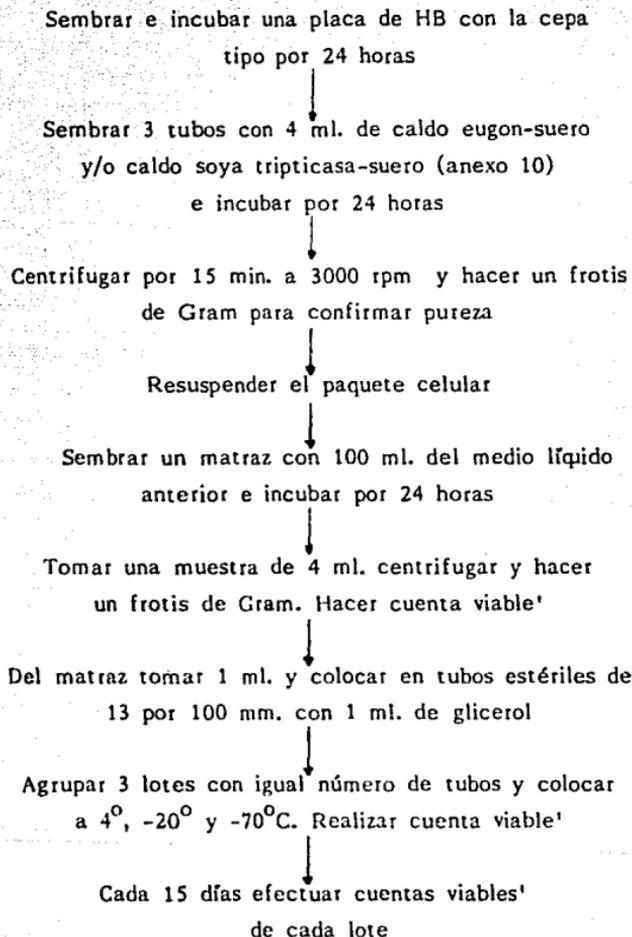
**CONSERVACION A CORTO PLAZO**

**a) Resiembra.**

Sembrar una placa de HB con cepa tipo e incubar por 24 horas



b) Congelación.



' La técnica para realizar la cuenta viable se describe en la página 27.

### CUENTA VIABLE

- 1) De cada lote fue tomado un tubo, permitiéndolo alcanzar la temperatura ambiente.
- 2) Se homogeneizó y se tomo 0.1 ml. del líquido que al adicionarse a un volumen de 0.9 ml. de caldo infusión cerebro corazón (BHI), resultó una dilución de 1:100.
- 3) Se volvió a mezclar por 10 seg. aproximadamente.
- 4) A partir de esta dilución 1:100 fue tomado 1 ml. del líquido adicionándose a un volumen de 9 ml. de BHI (dilución 1:10), con lo que la dilución resultante fue de 1:1000.
- 5) Nuevamente se homogeneizó por 10 seg.
- 6) Se volvieron a efectuar los pasos del 2 al 5 según el caso, hasta llegar a la dilución deseada.

Se tomo 0.1 ml. de cada dilución comenzando de la dilución más alta, sembrando 2 placas de HB sin antibióticos por cada dilución y distribuyendo el líquido por toda la placa con el asa estéril.

Todas las cajas fueron incubadas en jarras con velas a 37°C por 72 horas, al cabo del tiempo fueron contadas las colonias de cada dilución considerando solamente aquellas placas en donde crecieron entre 30 y 300 colonias.

## CONSERVACION A LARGO PLAZO

### b) Liofilización

Sembrar una placa de HB con cepa tipo e incubar por 24 hrs.

Sembrar 3 tubos de caldo eugon-suero y/o caldo soya  
tripticasa-suero e incubar por 24 hrs.

Realizar frotis y sembrar un matraz con 100 ml. del medio anterior.  
Incubar por 24 hrs.

Colocar 6 ml. del medio en tubos estériles y centrifugar a  
3000 rpm por 15 min.

Tomar un tubo al azar,  
hacer frotis para comprobar  
pureza, resuspender el paquete  
y efectuar cuenta viable.

Realizar cuenta viable'

Realizar cuenta viable'

Efectuar cuenta viable'  
cada 15 días

Colocar 0.6 ml. de  
leche descremada o  
leche peptonizada  
al 20%

Pasar 0.3 ml. de esta  
suspensión en viales  
pequeños estériles,  
tapándolos en gasa.

Colocar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por  
24 horas

Liofilizar por 24 horas

Hacer cuenta viable'

Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$

' La técnica para realizar la cuenta viable se describen en la página 27.

## RESULTADOS

### I. AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS VAGINALES.

La población estudiada correspondió a personas aparentemente sanas que ingresaron al estudio cumpliendo los siguientes requisitos: estar de acuerdo en participar en el estudio, llevar una vida sexual activa y ser mayor de 18 años. La población total fue profesionista con un nivel socioeconómico medio, siendo dividida en dos grupos, sana y enferma, definiéndose la primera como aquella población que no presentó ningún síntoma y signo de vaginitis o vaginosis bacteriana, mientras que la segunda fue aquella que presentó síntomas y signos de vaginitis y/o vaginosis bacteriana, o bien que se les aisló alguno de los siguientes organismos: T. vaginalis, N. gonorrhoeae o Candida spp.

En la tabla 1 se presenta los datos generales de ambas poblaciones observándose que no existe diferencia significativa en ellas al aplicar la prueba estadística de chi-cuadrada, siendo la edad promedio de 33 años y teniendo una media de embarazos de 3, una media reducida de abortos y una iniciación de vida sexual desde los 21 años. En la tabla 2 observamos los diferentes microorganismos aislados en la población total encontrando a G. vaginalis en un 16.8% de la población, el 14.4% de Candida spp., el 1.3% de T. vaginalis y un 0.2% para N. gonorrhoeae; teniendo que al presentarse en combinación G. vaginalis y Candida spp. fueron las más comunes (6%) mientras que las demás se presentaron con una frecuencia del 0.2%.

La tabla 3 muestra el aislamiento de G. vaginalis dentro de las dos poblaciones, encontrándose que en la población con vaginosis bacteriana fue aislada aproximadamente en la mitad (45.9%), mientras que la población aparentemente sana se encontró en un porcentaje menor (14.3%). En esta misma tabla, siguiendo los criterios de Amsel et. al. (1983) de

los cuales se debe de cumplir lo menos 3 de los 4 propuestos para definir la vaginosis bacteriana, se detectó que solo el 18.05% de la población total padecía tal entidad.

Los parámetros presentados en orden descendente por su frecuencia en la población con vaginosis bacteriana fueron: el pH vaginal mayor a 4.5, la prueba de diaminas positiva, la presencia de células guña y por último la presencia de leucorrea anormal. Por otro lado, en la población aparentemente sana el orden descendente de positividad de los parámetros estudiados fueron: el pH vaginal mayor a 4.5, la prueba de diaminas y la presencia de células guña cuando se aisló

G. vaginalis; cuando no se detecto ésta el parámetro siguiente al pH vaginal mayor de 4.5 es la presencia de leucorrea anormal (tabla 4).

Si comparamos ambas poblaciones los cuatro parámetros estudiados fueron más frecuentes en la población con vaginosis bacteriana.

La tabla 5 correlaciona la presencia de células guña con el aislamiento y crecimiento de G. vaginalis; cuando se aisló ésta última, presento un crecimiento de 4+ (mayor de 10 colonias en la cuarta estría) en la mayoría de los casos, en comparación con la población aparentemente sana que no presento células guña, exceptuando en dos casos el crecimiento fue heterogéneo, siendo más frecuentemente el crecimiento de 4+ (mayor de 10 colonias en la cuarta estría).

El aislamiento de G. vaginalis se asocia con el cuadro de vaginosis bacteriana, sin embargo existen factores tales como, los diferentes tipos de duchas vaginales y los diferentes métodos anticonceptivos que predisponen a tal cuadro. La tabla 6 muestra la correlación de dichos factores con el cuadro de vaginosis bacteriana.

En la población con vaginosis bacteriana y sin G. vaginalis se empleo con mayor frecuencia la ducha vaginal con benzal (13%) siendo el dispositivo intrauterino (DIU) el método anticonceptivo más usado

dentro de la misma población independientemente del aislamiento de G. vaginalis. En la población sin vaginosis bacteriana no se observó relevancia en los métodos de higiene personal (duchas vaginales), mientras que el uso de dispositivo intrauterino fue mayor cuando no se aisló G. vaginalis (20.1%) siendo éste similar al presentado en la población con vaginosis bacteriana.

La vaginosis bacteriana es una infección cuya sintomatología es leve o nula y por lo tanto existe la controversia acerca de los síntomas presentados. La tabla 7 presenta la sintomatología manifestada por la paciente; notándose que en ambas poblaciones no se presenta una combinación bien diferenciable de síntomas sin embargo, dentro de la población enferma la unificación de la presencia de leucorrea anormal, olor y/o ardor o irritación fue la combinación más frecuente.

En la población aparentemente sana el parámetro más frecuente es la presencia de leucorrea anormal lo que coincide en lo reportado en la tabla 4. El siguiente parámetro fue la presencia de ardor o irritación.

## II IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA DE MICROORGANISMOS OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS VAGINALES

Los resultados obtenidos en la identificación de los diferentes microorganismos aislados de las muestras vaginales fueron los siguientes:

### a) Candida spp.

En el medio selectivo de Biggy este hongo presentó colonias cremosas u oscuras, opacas, convexas, de 1 a 2 mm. de diámetro. Su morfología microscópica fue elipsoidal o esférica presentando refringencia, frecuentemente se encontraron en proceso de gemación siendo gram-positiva su tinción (fig. 2). Posteriormente al iniciar la proliferación del tubo germinativo en suero humano, a cabo de 24 horas de incubación se observó

una elongación de éste tubo germinativo que sale de la célula levaduriforme (fig. 3), esta prueba tiene como objetivo la diferenciación entre Candida spp. y C. albicans encontrándose ésta última en mayor proporción (57%).

b) Neisseria gonorrhoeae

En el medio de Thayer-Martin y en el medio de agar gelosa chocolate el gonococo se presentó como colonias blanco-grisáceas, convexas, lisas, redondas y de 0.5 a 2 mm. de diámetro. En el frotis de Gram se observaron diplococos gram-negativos con sus paredes adyacentes aplanadas dándole forma de granos de café.

Su identificación bioquímica fue demostrada por los siguientes resultados:

1. Reacción de catalasa positiva, cuando se presenta burbujeo al poner en contacto la cepa sospechosa con el peróxido de hidrógeno.
2. Reacción de oxidasa, distinguible por la aparición de un color morado fuerte en el disco impregnado con el reactivo de oxidasa indicando la positividad de la reacción.
3. Reacción de coagulación, presentándose grumos con la cepa sospechosa y los reactivos de coagulación.
4. Utilización de carbohidratos positivos, cuando se aprecia un vire de color naranja a amarillo en la parte superior del tubo de lactosa, permaneciendo naranja en los restantes.

c) Gardnerella vaginalis.

En el medio de HB la morfología de las colonias de G. vaginalis fue: puntiforme, redondeada, convexa y beta-hemolítica dándoles una apariencia de gotitas de agua.

Al examinar un frotis con tinción de Gram se encontraron formas cocobacilares gram-variables o gram-negativas, en pares o aisladas observándose algunas veces formas de L o V.

La identificación bioquímica de este microorganismo se realizó mediante el análisis de los 3 ensayos siguientes:

- 1) Reacción de catalasa negativa, cuando no se presenta burbujeo de la cepa sospechosa con el peróxido de hidrógeno.
- 2) Utilización de carbohidratos positiva, cuando hay un vire de color naranja a amarillo en el almidón y dextrosa mientras que el naranja persiste en la rafinosa y manitol.
- 3) Hidrólisis del hipurato positiva, cuando aparece un color morado fuerte, al agregar el reactivo de ninhidrina después de una incubación de 24 horas.

Como podemos observar en la tabla 8 la morfología microscópica, colonial, la beta-hemólisis y la reacción de catalasa obtuvieron un 100% de positividad; la hidrólisis del hipurato obtuvo un 93%, mientras que en las reacciones de utilización de carbohidratos un 91% fue para el almidón positivo, un 70% de dextrosa positiva y un 100% para manitol y rafinosa negativa.

### Trichomonas vaginalis

Al observar el microscópio la morfología de este microorganismo se vió que concordaba con la descrita anteriormente (fig. 1) encontrándose positiva su identificación.

### III CONSERVACION DE LA CEPA TIPO (ATCC) DE G. vaginalis

En las tablas 9 y 9.a se presentan los datos de conservación a corto plazo utilizando medio semisólido y sólido, observándose que este último fue el mejor cuando fue preparado con medio nacional y se colocó en condiciones de refrigeración. En este medio las cepas de G. vaginalis mostraron viabilidad entre los 30 a 50 días.

Las gráficas 1, 2 y 3 contienen los datos de conservación de cepas crecidas en diferentes medio líquidos y bajo diferentes condiciones de temperatura.

En la gráfica 1, el caldo eugon-glicerol y el caldo soya tripticasa-glicerol fueron medios adecuados para la conservación de la cepa tipo, mientras que en la gráfica 2 y 3 tan solo el caldo soya tripticasa-glicerol es el medio adecuado para la conservación a 4° y -20° C.

Así mismo, en las tres gráficas al compararlas podemos obtener que las temperaturas adecuadas en forma descendente fueron: -70°, -20° y 4°C.

La gráfica 4 presenta los datos de la conservación a largo plazo por liofilización, en donde en el lote 1 y 2 se utilizo caldo eugon-suero como medio de crecimiento, y leche peptonizada y leche descremada como medio de conservación respectivamente (medio soporte), mientras

que en el lote 3 se utilizó como medio de crecimiento caldo soya tripticasa-suero y leche descremada como medio soporte. Al comparar los 3 lotes, tanto el lote 1 como el 2 muestran un rango de supervivencia ligeramente mayor que el lote 3.

Al comparar las cuatro gráficas y observar el mayor tiempo de conservación tenemos que  $-20^{\circ}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  y la liofilización (200 días aproximadamente) son los tres métodos adecuados para la conservación de G. vaginalis.

## DISCUSION

El estudio de las enfermedades cervicovaginales es de importancia debido a su alta frecuencia dentro de la población femenina (De la Cruz y Calderón, 1985), siendo las más comunes la gonorrea y la vaginitis atribuida a T. vaginalis, Candida, spp. y G. vaginalis, encontrándose que los métodos de aislamiento e identificación varían de un agente etiológico a otro.

### I AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO DE MUESTRAS VAGINALES

Se ha podido demostrar que la frecuencia de aparición de las enfermedades cervicovaginales varía conforme al tipo de población, aunque como el caso de la tricomoniasis, candidiasis, vaginosis bacteriana y gonorrea que son infecciones que pueden encontrarse en poblaciones sanas en forma asintomática ha sido de gran importancia al tratar de detectarlas para evitar problemas de salud.

La vaginosis bacteriana producida por G. vaginalis fue la más frecuentemente encontrada en nuestros individuos en comparación con las anteriormente mencionadas, sin embargo, existen puntos que no han sido aclarados en la actualidad por lo cual es importante seguir estudiandola.

La población con vaginosis bacteriana y la población aparentemente sana, corresponde a una población homogénea de trabajadoras del Seguro Social de la Clínica # 25, en donde el 71.9% son profesionistas, encontrándose que ninguna de las 507 mujeres (población total) manifestó sintomatología (tabla 7).

Dentro de la población total se obtuvo un orden decreciente de aislamiento de la siguiente manera: G. vaginalis, Candida spp. en una frecuencia similar; T. vaginalis en catorce veces menos y N. gonorrhoeae en un porcentaje aún menor que el anterior; la combina-

ción que se presentó más frecuentemente fue la de G. vaginalis con Candida spp. (6.0%) en aproximadamente la mitad de la frecuencia presentada como microorganismos aislados; las otras posibles combinaciones con los demás microorganismos obtuvieron un porcentaje menor.

Podemos observar una situación similar entre G. vaginalis y Candida spp., ya que en la primera sigue existiendo la controversia de si constituye parte de la flora normal. Algunos investigadores la asocian con la vaginosis bacteriana presentándose esta última en frecuencia similar con la candidiasis (Balsoon et. al., 1980).

Así mismo, se ha reportado casos en los cuales la presencia de Candida spp. se puede encontrar en poblaciones asintomáticas como sintomáticas (Osborne et. al., 1982) ya que este género forma parte de la flora normal de diferentes partes del cuerpo humano y que solo bajo ciertas circunstancias como embarazo, diabetes, el uso de pastillas anticonceptivas, obesidad, etc. puede manifestar su patogenicidad.

Por otro lado, Taylor y col. (1982) reporta que Candida spp. se aisló con mayor frecuencia de mujeres con un solo compañero sexual, mientras que T. vaginalis es más común en mujeres con varios compañeros sexuales.

La frecuencia de T. vaginalis y N. gonorrhoeae no es importante dentro de la población estudiada, ya que ambas son patógenos transmitidos predominantemente por vía sexual, incrementándose su frecuencia en poblaciones femeninas con mucha promiscuidad en sus relaciones sexuales.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Amsel y col. (1983), quien estudió una población estudiantil sana encontrando a G. vaginalis en 40%, Candida spp. 10% y T. vaginalis en 2%. En cambio Gardner y Dukes (1955) estudiaron a mujeres activas sexualmente y con presencia de leucorrea obteniendo en un 92% la asociación vaginitis

inespecífica-H. vaginalis, tricomoniasis 19.7% y candidiasis en 4.3%.

Desde hace varias décadas se conoce la vaginitis provocada por hongos y tricomonas, más recientemente se agregó una tercera denominándosele "vaginitis inespecífica" (Gardner y Dukes, 1955; Ainsel et. al., 1983). Estas tres infecciones son importantes dentro de la práctica ginecológica debido a su alta frecuencia (Leighton, 1982).

Osborne et. al. (1982) reportó que la asociación de G. vaginalis, Herpes simplex virus, T. vaginalis y N. gonorrhoeae son los causantes de vaginitis estadísticamente significativa. De la misma manera Hurd (1979) menciona que las causas más comunes de vaginitis son : Candida spp., Haemophilus spp. y Trichomonas spp. (25%, 35% y 20% respectivamente).

En 1955, Gardner y Dukes presentaron un estudio efectuado con mujeres sexualmente activas y que padecían de leucorrea, diagnosticándoseles vaginitis inespecífica, a las cuales al realizarles los estudios microbiológicos se encontró una bacteria (a la que llamaron Haemophilus vaginalis) predominante dentro de esta población, concluyendo que H. vaginalis es el agente causal de la vaginitis inespecífica, ya que fue aislada en un 92%. Los estudios mostraron que es transmitida sexualmente y los pacientes presentaban una leucorrea grisácea, homogénea, fétida, con un pH vaginal entre 5 y 5.5. y además observando un examen en fresco se encontraban células gúña (células epiteliales cubiertas de cocobacilos gram-negativos o gram-variables dándoles un aspecto granular) pudiéndose encontrar además cúmulos de bacterias fuera de las células epiteliales.

A partir de este estudio se le asoció a H. vaginalis con la vaginitis inespecífica.

Se han realizado estudios donde se tomo como principal característica la presencia de leucorrea anormal ya que éste es uno de los síntomas más comunes de la vaginitis inespecífica (Gardner y Dukes, 1955; Hurd, 1979).

Reilly y Human (1983), aislaron a G. vaginalex en 6.7% de mujeres que poseían leucorrea anormal excluyendo a mujeres que pertenecían al departamento de Medicina Genito-urinaria, concluyeron que sólo bajo ciertas circunstancias es un patógeno; lo que contrasta con los hallazgos de Mirza et. al. (1983), quienes la aislaron en un 75% de una población de una clínica de enfermedades transmitidas sexualmente y que padecían por lo tanto de leucorrea anormal.

Lee y Schamal (1973) estudiaron una población femenina de una escuela correccional donde aislaron en un 13.6% a G. vaginalis padeciendo la mayoría leucorrea anormal.

Sin embargo, existen autores que han registrado la presencia de G. vaginalis en poblaciones asintomáticas, (Tarlington y D'Abbrera, 1967; Lewis et. al., 1972; McCormack, 1977; Levison et. al., 1979, Dattani et. al., 1982; Totten et. al., 1982; Amsel et. al., 1983; Easmon e Ison, 1983; Jolly, 1983; Moss, 1983; Ratnam y Fitzgerald, 1983).

Dentro de nuestra población asintomática se aislo a G. vaginalis en un bajo porcentaje (14.3%) por lo cual sugerimos que este microorganismo al igual que Candida spp. se pueden encontrar como parte de la flora normal vaginal y que sólo bajo ciertas circunstancias puede comportarse como un patógeno, en otras palabras es un patógeno oportunista (Levison et. al., 1979).

Nuestra población total presento el cuadro de vaginosis bacteriana en un 18.05% de donde la mitad aproximadamente le fue aislada G. vaginalis, mientras que la población que manifesto tan solo el cuadro de vaginosis bacteriana obtuvo un porcentaje similar, Esto nos indica que no existe relación entre el aislamiento de G. vaginalis y la vaginosis bacteriana para la población estudiada.

Amsel et. al. (1983) y Levison et. al. (1979) mencionan que la incidencia de G. vaginalis aumenta en la población que presenta la vaginosis bacteriana, sin embargo, los trabajos de Dattani et. al. (1982); Totten et. al. (1982) Moss (1983) y Ratnam y Fitzgerald (1983) practicados en poblaciones con vaginosis bacteriana, reportan un porcentaje de aislamiento de G. vaginalis que varía del 27% al 92%.

Como podemos observar los porcentajes son diferentes de un tipo de población a otra aún dentro de poblaciones con características similares, esto ha traído como consecuencia que siga existiendo la controversia alrededor del papel de G. vaginalis en la vaginosis bacteriana.

En los últimos años se ha reportado que G. vaginalis no es la única bacteria que produce la vaginosis bacteriana, sino que existe también un aumento de bacterias anaerobias que son las causantes del olor fétido del flujo vaginal. Hasta ahora no se sabe bajo que condiciones se efectuó el sobrecrecimiento de ambos tipos de bacterias y en que orden se lleva a cabo (Spiegel et. al., 1980; Leighton, 1982; Blackwell et. al., 1983).

Anteriormente no estaba bien definida la vaginosis bacteriana asociándose únicamente a la presencia de leucorrea grisácea y fétida (Gardner y Dukes, 1955), no fue sino hasta 1983 con Amsel y col., que propusieron 4 criterios principales para definir y diagnosticar el cuadro de vaginosis bacteriana (pág. 12).

Los criterios de mayor relevancia en el reporte de Amsel y col. (1983) fueron: el pH vaginal mayor de 4.5 y la detección de aminas anormales estando ambos puntos estrechamente relacionados ya que las aminas anormales como la cadaverina y la putrescina son productos de desecho de bacterias anaerobias lo que provoca que se eleve el pH vaginal normal y le confiera un olor característico a la leucorrea vaginal (olor a pescado) en contacto con el reactivo de hidróxido de potasio. El otro criterio importante es la presencia de células guña

(células descritas por primera vez por Gardner y Dukes (1955)) quienes propusieron que Gardnerella (Haemophilus) vaginalis es un microorganismo que no infecta tejidos, sino que es un parásito de las células epiteliales por lo cual su sintomatología es leve.

La leucorrea anormal como la definió Amsel y col. (1983) es un flujo delgado y homogéneo en tanto que Gardner y Dukes (1955), la describieron como una leucorrea grisácea y fétida. Existen trabajos en los cuales se ha encontrado relación con la presencia de flujo vaginal anormal y en otros en la cual no existe.

En nuestra población con vaginosis bacteriana los criterios descritos por Amsel y col. fueron observados en el siguiente orden:

- 1) La prueba positiva de diaminas.
- 2) El pH vaginal mayor a 4.5.
- 3) La presencia de células guña en el examen en fresco.

Dentro de esta población la frecuencia de cada uno de ellos es diferente cuando no fue aislada G. vaginalis (tabla 4).

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Amsel y col. (1983), el pH vaginal mayor a 4.5, la presencia de células guña y la presencia de diaminas, son características válidas para el diagnóstico de vaginosis bacteriana en la población enferma independientemente del aislamiento de G. vaginalis.

Lo anteriormente mencionado es apoyado por trabajos realizados por Spiegel (1980, 1983) donde se correlacionó en un 93% la presencia de células guña y en un 90% la detección de diaminas en una población con vaginosis bacteriana; Blackwell et. al., (1983) encontro un 100% de correlación entre los parámetros anteriormente mencionados.

Blackwell et. al. (1983) y Mirza et. al. (1983) relacionan los tres puntos antes mencionados con el aislamiento de G. vaginalis encontrando una estrecha correlación; para nuestra población no existe tal relación lo que viene a apoyar la hipótesis formulada por Spiegel (1980): G. vaginalis no es el único microorganismo involucrado en la vaginosis bacteriana, sino que existe una relación sinérgica entre G. vaginalis y algunas bacterias anaerobias".

El cuarto criterio, la presencia de leucorrea vaginal anormal presenta la más baja frecuencia en comparación con los otros tres parámetros por lo cual no es una característica confiable y única para definir la vaginosis bacteriana.

En la población aparentemente sana, la frecuencia de los 4 parámetros fue menor que en la población con vaginosis bacteriana, los más importantes son:

- 1) El pH vaginal mayor a 4.5. (28.3%).
- 2) La presencia de leucorrea vaginal anormal (15.5%) cuando no se aisló G. vaginalis.

El pH vaginal normal oscila entre 4 y 4.2. dependiendo del ciclo menstrual y del tipo de flora bacteriana predominante (Hurd, 1979; Spiegel et. al., 1980).

Se ha podido establecer que cuando el pH vaginal se ve alterado es debido a que los lactobacilos que constituyen la flora vaginal normal dominante disminuyen o desaparecen, trayendo como consecuencia que la acidez baje y el medio se vuelva más alcalino propiciando la proliferación de otro tipo de bacterias principalmente anaerobias (Peptococcus spp., Bacteroides spp. y Peptostreptococcus spp.) (Spiegel et. al., 1980; Amsel et. al., 1983). Por consiguiente al aumentar la flora bacteriana anaerobia los productos de desecho cambian a compuestos

aminados, los que son responsables del olor fétido característico de secreciones vaginales anormales, intensificando el olor al agregar hidróxido de potasio (Spiegel et. al., 1980; Chen et. al., 1983).

Otra de las causas del aumento del pH vaginal es la presencia de moco cervical (Blackwell y Barlow, 1982) y la presencia de semen en la muestra vaginal (Chen et. al., 1983).

Sin embargo, la presencia de leucorrea anormal cobra mayor importancia en la población aparentemente sana, ya que puede ser causada por factores físicos, químicos o psicológicos, presencia de gérmenes oportunistas y erosión cervical (Hurd, 1979; Arya et. al., 1983).

La observación de células guía es quizá el criterio más importante y significativo para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana ya que al examinar la muestra sospechosa también se pueden apreciar cúmulos de bacterias fuera de las células epiteliales (Gardner y Dukes, 1955; Dunkelberg, 1965; Tarlinton y D'Abbrera, 1967; Leighton, 1982).

La tabla 5 muestra la relación de células guía con el crecimiento y concentración de G. vaginalis. En la población con vaginosis bacteriana G. vaginalis presentó un crecimiento de 4+ más frecuentemente.

G. vaginalis no es una bacteria que ataque tejidos vivos, sino que es considerada como un parásito de células epiteliales (Gardner y Dukes, 1955; Tarlinton y D'Abbrera, 1967; Hurd, 1979). Al cambiar la flora normal se propicia que las bacterias anaerobias y G. vaginalis recubran las células, no que les confiere un aspecto granular dificultando apreciar sus bordes.

Dentro de la población enferma estudiada existe una estrecha relación (94.1%) entre la presencia de células guía y el cuadro de vaginosis bacteriana, siendo esta relación mucho menor (0.7%) en la población sana. Esto es apoyado por lo reportado por Amsel et. al., (1983), el cual

encuentra un 90% de asociación entre la presencia de células gúfa y la vaginosis bacteriana y tan sólo un 10% entre células gúfa en mujeres sanas y con G.vaginalis.

El examen en fresco demostró ser muy seguro para identificar las células gúfa, sin embargo, es recomendable la observación del frotis con tinción de Gram para poder distinguir las formas de las bacterias y evitar confusiones, ya que algunas veces los lactobacilos tapizan las células epiteliales provocando lecturas falsas positivas (Dunkelberg, 1965).

Se han efectuado estudios donde se analizaron varios factores que predisponen a la aparición de la vaginosis bacteriana (tabla 6), entre los más importantes encontramos a las duchas vaginales y los métodos anticonceptivos (Lewis et. al., 1972; McCormack et. al., 1977; Dattani et. al., 1982; Taylor et. al., 1982).

Los diferentes métodos anticonceptivos y en especial las diferentes sustancias que existen para realizar duchas vaginales no muestran una correlación con la aparición de la vaginosis bacteriana y el aislamiento de G. vaginalis lo que difiere de los resultados de McCormack et. al. (1977) y Dattani et. al. (1982), los cuales reportaron la dependencia de la vaginosis bacteriana y la ingestión de anticonceptivos orales.

En el presente trabajo se observó que la población enferma y sin G. vaginalis tiene una frecuencia del 13% en el uso de ducha con benzal en tanto que en la población sana se obtuvo una frecuencia de 6.7%, para los otros tipos de duchas se presentaron en frecuencias similares para ambas poblaciones.

La ducha realizada con benzal no es suficiente para eliminar la vaginosis bacteriana, ya que el benzal es una sustancia que cambia las condiciones naturales de la vagina provocando la desaparición de lactobacilos (flora vaginal normal).

Sin embargo, nuestros resultados están apoyados por los trabajos de Lewis et. al.(1972), McCormack et. al. (1977) y Taylor et. al. (1982), en donde éstos no encontraron ningún tipo de asociación entre el uso de diversos métodos anticonceptivos e higiene personal y el cuadro de la vaginosis bacteriana.

El cuadro de vaginosis bacteriana posee una sintomatología muy leve o benigna, ya que como se mencionó anteriormente los agentes etiológicos parasitan las superficies de las células por lo cual no se encuentra enrojecimiento, sangrado, ni se reporta un gran porcentaje de ardor o dispareunia (Gardner y Dukes, 1955; Taylor et. al., 1982; Chattopadhyay, 1984).

En cuanto a la sintomatología referida por la paciente las frecuencias mayores fueron cuando no se manifestó ninguna alteración (44.7% y 56.3%). En la población con vaginosis bacteriana la conjunción de la presencia de leucorrea anormal, olor y ardor o irritación (11.8%) ocupa el segundo lugar en importancia, estos últimos tres síntomas son los más comunes en la vaginitis. En la población sana la presencia de leucorrea anormal es la segunda en importancia, lo que es corroborado por el médico ginecólogo (signología) (tabla 4).

La detección de leucorrea anormal se basa en su color, olor y aspecto. Recordando que la vagina es una región fácilmente contaminable, es probable que las alteraciones observadas se daban a la presencia de otros microorganismos como Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum etc., los que originan también una sintomatología o cambian los signos de un cuadro de vaginosis bacteriana ya existente (Blackwell y Barlow, 1982).

Amsel y col.(1983) encuentran correlación entre la leucorrea vaginal de color grisáceo y fétida asociada al cuadro de vaginosis bacteriana, mientras que Dattani et. al. (1982) y Ratnam y Fitzgerald (1983) reportaron la presencia de leucorrea vaginal fétida, prurito, dispareunia y

disuria en poblaciones con vaginosis bacteriana decreciendo cada una de ellas en importancia.

Para nuestra población la sintomatología es benigna o leve ya que se manifiesta por: leucorrea vaginal anormal preferentemente amarilla, irritación o ardor, sin embargo, el mayor número de casos no manifiestan ninguna sintomatología al cuadro de vaginosis bacteriana.

## II IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA DE MICROORGANISMOS OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS VAGINALES

Los procedimientos para identificar a Candida spp., Trichomonas spp. y Neisseria spp. son métodos estándar por lo cual su identificación no fue dificultosa.

Para G. vaginalis las pruebas de identificación son diversas y son diferentes los esquemas propuestos (Totten et. al., 1982; Jolly, 1983).

En este trabajo las cepas identificadas como G. vaginalis cumplen todos los criterios propuestos por Piot et. al. (1982) como: la morfología microscópica, cocobacilos gram-variables o gram-negativos (predominando ésta última), solos o en pares, con un grado ligero de pleomorfismo; si morfología típica colonias beta-hemolíticas, redondas, convexas, translúcidas, que van de 0.1 a 0.8 mm. de diámetro aproximadamente; la utilización positiva del almidón, la no utilización de manitol y rafinosa; la reacción de hidrólisis del hipurato positiva y la reacción de catalasa negativa.

La utilización de carbohidratos no son reacciones muy confiables, especialmente la llevada a cabo con el reactivo de dextrosa, Dunkelberg et. al., (1969) confirma lo anterior proponiendo que la dextrosa pierde su actividad cuando es esterilizada en autoclave. Bailey et. al., (1979) no reportó la utilización de dextrosa por G. vaginalis, mientras que Levison et. al., (1979) y Greenwood y Pickett (1979) reportaron la

utilización positiva de dextrosa.

La hidrólisis del hipurato no se realizó en un pequeño número de cepas. Piot et. al., (1984) efectuó un estudio en donde obtuvo biotipos diferentes de las cepas de G. vaginalis proponiendo que el cambio de biotipos de las cepas puede deberse al grado de virulencia de ellas, a la reinfección de la paciente o a que puede poseer varios tipos de cepas y por lo tanto diferentes biotipos.

El esquema de identificación que se efectuó en este trabajo para G. vaginalis y que fue propuesto por Piot y col. (1982) es lo suficientemente seguro, sin embargo éste último y otros autores como Dukes y Gardner (1961), Bailey et. al., (1979), Leighton (1982) y Jolly (1983) proponen otro tipo de pruebas que completan la identificación de G. vaginalis.

### III CONSERVACION DE LA CEPA TIPO ATCC (14018) DE G. vaginalis

La conservación de microorganismos tiene como objetivos primordiales, mantener los cultivos tipos vivos en condiciones cercanas a las que tenían al ser aisladas, sin mutaciones ni variaciones y sin contaminantes, pudiendo ser utilizados para fines didácticos, de investigación, industriales o para emplearlos en bioensayos (De la Cruz, 1982).

La conservación se lleva a cabo por diferentes métodos como, congelación, resiembra, liofilización, etc., así mismo la efectividad de cada una de ellas depende de la cantidad de inóculo que se coloca en el medio y del medio de soporte donde son conservadas, teniendo que colocar un inóculo grande de microorganismos hay una mayor probabilidad de supervivencia (De la Cruz, 1982).

Existen pocos trabajos acerca de la conservación de G. vaginalis.

En el presente estudio la conservación a corto plazo de las cepas de G. vaginalis en el medio sólido y en condiciones de refrigeración tuvo una supervivencia de 30 a 50 días. Tarlinton y D'Abbrera (1967) reportaron un promedio de supervivencia similar al nuestro en 3 semanas aproximadamente a 4°C utilizando el medio sólido de agar gelosa chocolate.

La conservación de las cepas de G. vaginalis en diferentes medios líquidos fue óptima cuando fue congelada a -70°C utilizando indistintamente el caldo eugon-glicerol o caldo soya tripticasa-glicerol. Lo anterior es apoyado por lo reportado en el Manual de Bergey donde mencionan la temperatura de -70°C para obtener una mejor viabilidad (Buchanan y Gibbons, 1974).

Para los dos tipos de conservación el factor importante es el mantenimiento de las bajas temperaturas ya que cuando por fallas eléctricas se elevó la temperatura de los congeladores incrementando los microorganismos su metabolismo, y al bajar la temperatura de manera brusca se provoca un mayor número de muertes trayendo como consecuencia la alteración de la supervivencia.

Aunque tan solo se utilizaron dos soportes, los resultados indican que la efectividad de la liofilización depende del medio de crecimiento y no del medio de soporte. Como podemos observar en la gráfica 4 al cambiar el medio de cultivo en el que creció la cepa hay un mayor índice de muerte de microorganismos mientras al mantener las mismas condiciones de crecimiento y cambiar el medio soporte la viabilidad es similar. Lo anterior puede ser debido a que el caldo eugon-suero provoca el desarrollo óptimo de las cepas de G. vaginalis manteniendo sus condiciones al colocarlas en el medio soporte ya que probablemente este medio de crecimiento contiene una sustancia que protege a las cepas durante el proceso de liofilización. Sin embargo, debemos de puntualizar que la curva de supervivencia del lote 3 no posee los puntos

suficientes para afirmar que el caldo soya tripticasa no sea efectiva para la conservación de las cepas, ya que las tres curvas se mantienen dentro del rango de dos logaritmos.

Por otro lado sí comparamos los diferentes métodos de conservación podemos decir que la liofilización es el mejor de ellos, ya que las cepas tienen un tiempo de supervivencia de 6 a 7 meses aunque cada uno de ellos puede ser utilizado conforme a las necesidades dando buenos resultados.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudio una población aparentemente sana en donde los organismos mas frecuentemente aislados fueron:

G. vaginalis y el género Candida spp. encontrándose así mismo mayor asociación entre ambas.

Gardnerella vaginalis es asociada con el cuadro de vaginosis bacteriana, en este estudio no se encontró correlación entre las dos anteriores. Por lo tanto, G. vaginalis se puede encontrar como parte de la flora normal vaginal comportándose como un patógeno oportunista bajo circunstancias aún no comprendidas y apoyando así la hipótesis propuesta por Spiegel (1980, 1983): "G. vaginalis y las bacterias anaerobias actúan en conjunto para provocar el cuadro de vaginosis bacteriana".

Así mismo, Amsel y col. (1983) propusieron 4 criterios para diagnosticar el cuadro de vaginosis bacteriana, siendo los más sobresalientes dentro de nuestra población con tal cuadro los siguientes: la presencia de diaminas, el pH vaginal mayor a 4.5 y la detección de células guía, este último parámetro es quizá el más importante. Si correlacionamos el crecimiento de G. vaginalis con la presencia de células guía en la población con vaginosis bacteriana encontramos que, el crecimiento fue de 4+ cuando se aisló dicho organismo encontrándose células guía en todos los casos independientemente de la presencia de G. vaginalis.

Por otra parte, los parámetros asociados al cuadro de vaginosis bacteriana como, los diferentes métodos anticonceptivos y los métodos de higiene personal para esta población estudiada no están correlacionados con tal cuadro.

Así mismo, la sintomatología y signología referida al cuadro de vaginosis bacteriana es leve o benigna.

EL esquema de identificación propuestó por Piot et. al. (1982) que fue realizado en este trabajo fue lo suficientemente seguro comprendiendo las siguientes pruebas: morfología colonial y microscópica característica, la utilización del almidón y dextrosa y la no utilización de manitol y rafinosa, así como también la hidrólisis positiva del hipurato y la reacción negativa de catalasa.

Con lo referente a la conservación de G. vaginalis fue adecuada en el medio sólido con compuestos nacionales a una temperatura de 4°C, en medio líquido a -70°C y el método más efectivo fue la liofilización.

Por último, mencionaremos que en nuestro país los estudios efectuados sobre la vaginosis bacteriana, los agentes que lo provocan y los diversos factores que pueden propiciar su aparición son muy pocos; por lo cual recomendamos que se realicen diferentes tipos de investigación desde el punto de vista bacteriológico e inmunológico.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS GENEROS:  
Haemophilus spp., Corynebacterium spp. y Gardnerella sp.

CARACTERÍSTICAS	G E N E R O S		
	<u>Haemophilus</u>	<u>Corynebacterium</u>	<u>Gardnerella</u>
Tinción de Gram	-	+	- 0 +
Reacción de catalasa	no	si	no
Presencia de arabinosa en la pared celular	no	si	no
Factores X y V necesarios	si	no	no
G/C en moles (%)	38-42	52-68	43-1
Unión de DNA	solo con <u>Haemophilus</u>	solo con <u>Corynebacterium</u>	solo con <u>Gardnerella</u>

Tomado de: Vontver y Eschenbach, 1981.



CUADRO 3. CUESTIONARIO REALIZADO EN LA POBLACION FEMENINA

DIRECCION GENERAL DE MEDICINA PREVENTIVA  
LABORATORIO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO  
CLINICA DE SECRECION TRANSVAGINAL

No. Progresivo \_\_\_\_\_  
Expediente No. \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Nombre: \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_\_  
Domicilio: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES DE IMPORTANCIA

Familiares \_\_\_\_\_  
Higiéno dietético (Duchas vaginales, baño diario, aseo de manos): \_\_\_\_\_  
Quirúrgicos \_\_\_\_\_  
Otros: \_\_\_\_\_ Embarazo \_\_\_\_\_ Diabetes \_\_\_\_\_  
Antecedentes Gineco Obstétricos de importancia: \_\_\_\_\_  
F.U.M. \_\_\_\_\_ Menarca \_\_\_\_\_ Vida Sexual Activa \_\_\_\_\_ Frecuencia \_\_\_\_\_  
Trastornos menstruales \_\_\_\_\_ Infecciones Venéreas Ant. \_\_\_\_\_  
Método anticonceptivo \_\_\_\_\_ Inyectable \_\_\_\_\_ Oral \_\_\_\_\_ DIU \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_  
Compañeros sexuales \_\_\_\_\_ Circuncidado \_\_\_\_\_  
Sangrado post coito \_\_\_\_\_ Dispareunia \_\_\_\_\_ Disuria \_\_\_\_\_  
Multiparidad : Gesta \_\_\_\_\_ Para \_\_\_\_\_ Cesáreas \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_

-SECRECION VAGINAL:

Antigüedad \_\_\_\_\_ -Cérvix \_\_\_\_\_  
Cantidad \_\_\_\_\_ Errojecimiento \_\_\_\_\_  
Color \_\_\_\_\_ Ulceras \_\_\_\_\_  
Olor \_\_\_\_\_ Sangrado \_\_\_\_\_  
Consistencia \_\_\_\_\_ Ectropión \_\_\_\_\_  
-Prurito \_\_\_\_\_ Erosión \_\_\_\_\_  
-Ardor \_\_\_\_\_ Tumores \_\_\_\_\_  
Placas rojizas \_\_\_\_\_

Otros \_\_\_\_\_

CALIFICACION

- Inexistente + Leve ++ Moderado +++ Intenso ++++ Muy severo

- VAGINA:

Congestión \_\_\_\_\_ Errojecimiento \_\_\_\_\_  
Puntos hemorrágicos \_\_\_\_\_  
- GENITALES EXTERNOS:  
Vesículas \_\_\_\_\_ Eritema \_\_\_\_\_ Errojecimiento \_\_\_\_\_  
Diagnóstico Clínico Final \_\_\_\_\_  
Tratamiento Inicial \_\_\_\_\_  
Exámenes post-tratamiento \_\_\_\_\_  
Observaciones : \_\_\_\_\_

pH \_\_\_\_\_ KCH \_\_\_\_\_

EXAMEN EN FRESCO. (CELULAS POR CAMPO 40 X)

Células guía \_\_\_\_\_ Trichomonas \_\_\_\_\_  
Levaduras \_\_\_\_\_ Leucocitos \_\_\_\_\_  
Frotis de Gram \_\_\_\_\_  
Lactobacilos \_\_\_\_\_ Bacilos Gram Neg. \_\_\_\_\_  
Cocobacilos Gram Var. \_\_\_\_\_ Cocos Gram Pos. \_\_\_\_\_  
Bacilos curvos Gram Neg. \_\_\_\_\_ Células guía \_\_\_\_\_  
Cultivo : \_\_\_\_\_

DIAGRAMA 1

OBTENCION DE MUESTRAS GENITALES

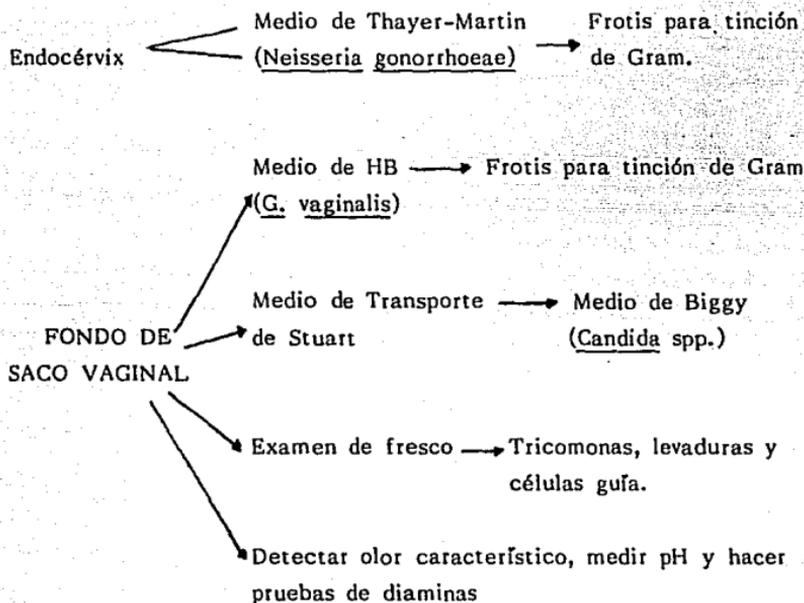


DIAGRAMA 2

IDENTIFICACION DE

Candida albicans

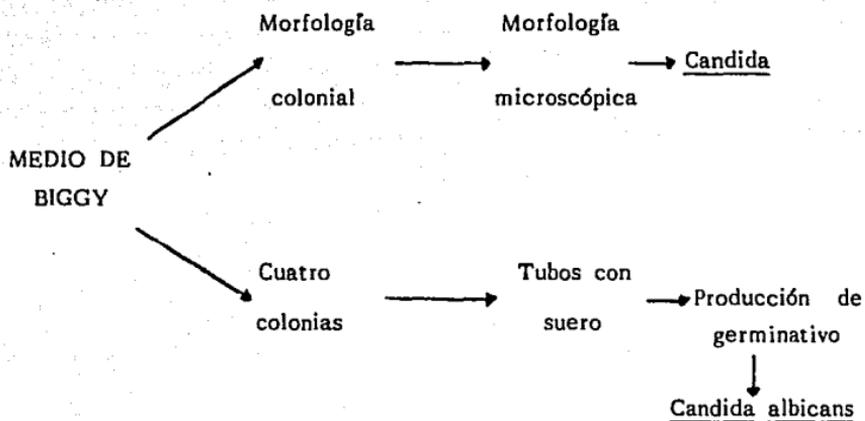


DIAGRAMA 3

IDENTIFICACION DE  
N. gonorrhoeae

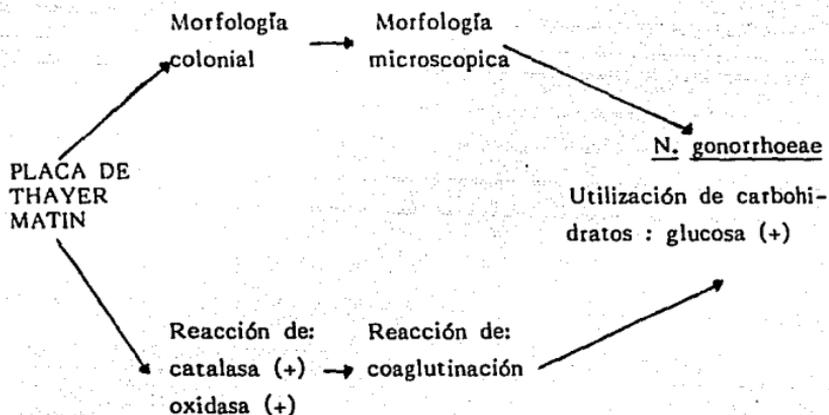


DIAGRAMA 4

IDENTIFICACION DE

G. vaginalis

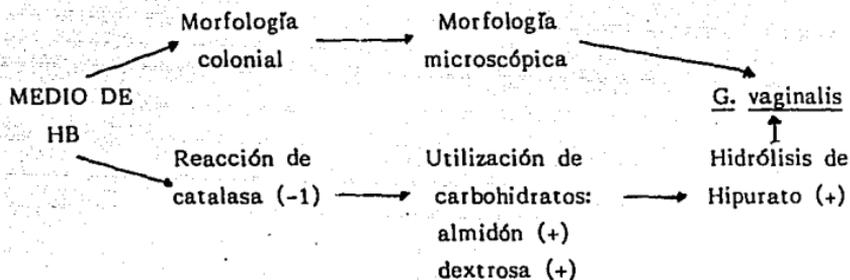


Fig. 1 Trichomonas vaginalis



Fig. 2. Células levaduriformes del género Candida spp. en proceso de gemación.

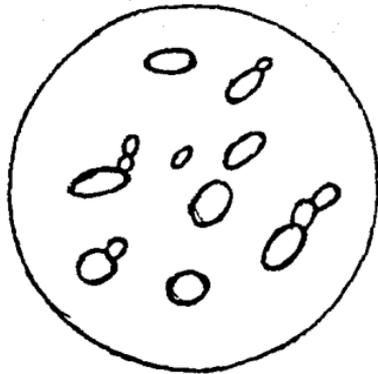


Fig. 3. Aparición de tubo germinativo para la diferenciación de C. albicans.



TABLA 1. PRESENCIA DE G. vaginalis (G.v.) EN POBLACIONES CON Y SIN VAGINOSIS BACTERIANA.

VAGINOSIS BACTERIANA			
( $\bar{X}$ )	G. v	SIN G.v.	$\chi^2$
EDAD	33.7	32.5	N.S.
INICIACION DE VIDA			
SEXUAL ACTIVA	21.6	21.2	N.S.
ABORTOS	0.6	0.3	N.S.
EMBARAZOS	3.06	2.4.	N.S.

SIN VAGINOSIS BACTERIANA			
( $\bar{X}$ )	G. v	SIN G. v	$\chi^2$
EDAD	33.4	33.0	N.S.
INICIACION DE VIDA			
SEXUAL ACTIVA	21.8	21.5	N.S.
ABORTOS	0.7	0.5	N.S.
EMBARAZOS	3.3	3.0	N.S.

$\bar{X}$  Media

$\chi^2$  Prueba estadística de chi-cuadrada

N.S.. No significativo por la prueba de chi-cuadrada

TABLA 2. FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS  
EN LA POBLACION TOTAL

MICROORGANISMOS	# DE PACIENTES	( % )
<u>Gardnerella vaginalis</u> (G.v)	79	(16.8)
<u>Candida</u> spp.	68	(14.4)
<u>Trichomonas vaginales</u> (T.v)	6	(1.3)
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (N.g)	1	(0.2)
No incluidas	285	(60.5)
G. v + <u>Candida</u> spp.	28	(6.0)
T. v + <u>Candida</u> spp.	1	(0.2)
T.v + G. v	1	(0.2)
N. g + G. v	1	(0.2)
<u>Candida</u> spp. + T. v + G. v	1	(0.2)
TOTAL :	471	(100)

**TABLA 3. CORRELACION ENTRE EL AISLAMIENTO DE  
G. vaginalis Y LA VAGINOSIS BACTERIANA**

	VAGINOSIS BACTERIANA	
<u>G. vaginalis</u>	POSITIVO ( % )	NEGATIVO ( % )
AISLAMIENTO	39/85 (45.9)	40/279 (14.3)
SIN AISLAMIENTO	46/85 (54.1)	239/279 (85.7)
PORCENTAJE DE POBLACION CON VAGINOSIS BACTERIANA	85/471	(18.05%)

**TABLA 4 . FRECUENCIA DE LOS PARAMETROS DE AMSEL CORRELACIONANDO LA PRESENCIA Y AUSENCIA DE G. vaginalis (G. v) Y LA VAGINOSIS BACTERIANA**

PARAMETROS DE AMSEL	VAGINOSIS BACTERIANA	
	G. v (%)	SIN G.v (%)
pH vaginal mayor a 4.5	39 (45.9)	45 (53)
Prueba de diaminas	39 (45.9)	44 (51)
Presencia de células guña	39 (45.9)	41 (48.2)
Flujo vaginal anormal (punto de vista médico)	13 (15.3)	20 (23.5)

PARAMETROS DE AMSEL	SIN VAGINOSIS BACTERIANA	
	G. v (%)	SIN G.v (%)
pH vaginal mayor a 4.5	24 (8.2)	79 (28.3)
Prueba de diaminas	9 (3.6)	18 (6.5)
Presencia de células guña	2 (0.7)	0 (0)
Flujo vaginal anormal (punto de vista médico)	0(0)	42 (15.1)

**TABLA 5. CORRELACION ENTRE LA PRESENCIA DE CELULAS GUIA (C.G) Y EL CRECIMIENTO DE *G. vaginalis* (G.v) EN PACIENTES CON Y SIN VAGINOSIS BACTERIANA**

	VAGINOSIS BACTERIANA			
	G. v		SIN G. v	
	C.G. (+)	C.G. (-)	C.G. (+)	C.G. (-)
SIN CRECIMIENTO	0	0	41	5
+	2	0	0	0
++	2	0	0	0
+++	9	0	0	0
++++	26	0	0	0

	SIN VAGINOSIS BACTERIANA			
	G. v		SIN G. v	
	C.G. (+)	C.G. (-)	C.G. (+)	C.G. (-)
SIN CRECIMIENTO	0	0	0	239
+	0	8	0	0
++	0	2	0	0
+++	0	4	0	0
++++	2	24	0	0

- +        menos de 10 colonias en la primera estría.
- ++      más de 10 colonias en la primera estría y menos de 10 colonias en la segunda estría.
- +++    más de 10 colonias en la segunda estría y menos de 10 colonias en la tercera.
- ++++   más de 10 colonias en la cuarta estría.

TABLA 6. ALGUNOS FACTORES ASOCIADOS CON LA APARICION DE LA VAGINOSIS BACTERIANA Y *G. vaginalis* (G.v)

VAGINOSIS BACTERIANA		
	G. v ( % ) (N = 39)	SIN G. v ( % ) (N = 46)
DUCHA ACUOSA	0 (0)	1 (2.2)
DUCHA CON BENZAL	3 (7.7)	6 (13)
DUCHA CON VINAGRE	3 (7.7)	3 (6.6)
OTRAS	0 (0)	1 (2.2)
DISPOSITIVO INTRAUTERINO	12 (30.8)	13 (28.3)
ANTICONCEPTIVOS LOCALES	0 (0)	0 (0)
OTROS <sup>1</sup>	21 (53.8)	24 (52.2)
SIN VAGINOSIS BACTERIANA		
	G. v ( % ) (N = 40)	SIN G. v ( % ) (N = 239)
DUCHA ACUOSA	1 (2.5)	20 (8.4)
DUCHA CON BENZAL	3 (7.5)	16 (6.7)
DUCHA CON VINAGRE	3 (7.5)	13 (5.4)
OTRAS	1 (2.5)	12 (5)
DISPOSITIVO INTRAUTERINO	3 (7.5)	48 (20.1)
ANTICONCEPTIVO LOCALES	2 (5)	4 (1.7)
OTROS <sup>1</sup>	31 (77.5)	146 (61.1)

<sup>1</sup> Anticonceptivos orales, inyecciones, combinaciones y salpingoclasia.

**TABLA 7. CORRELACION ENTRE LA SINTOMATOLOGIA Y LA PRESENCIA O AUSENCIA DE LA VAGINOSIS BACTERIANA (V.B.)**

FLUJO ANORMAL	OLOR	IRRITACION O ARDOR	V. B. (%)	SIN V.B. (%)
+	-	-	8*(9.4)	31*(11.1)
-	+	+	1 (1.2)	7 (2.5)
-	-	+	5 (5.9)	24 (8.6)
+	-	+	8 (9.4)	10 (3.6)
+	-	+	8 (9.4)	21 (7.5)
-	+	+	7 (8.2)	11 (4)
+	+	+	10 (11.8)	18 (6.5)
-	-	-	38 (44.7)	157 (56.3)
<b>T O T A L</b>			<b>85 (100)</b>	<b>279 (100)</b>

+ Sí presenta

- No presenta

\* Número de pacientes

TABLA 8. PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DE  
G. vaginalis\*

IDENTIFICACION POR:	No. DE CEPAS IDENTIFICADAS	(%)
MORFOLOGIA MICROSCOPICA	110	(100)
MORFOLOGIA COLONIAL	110	(100)
BETA HEMOLISIS EN SANGRE	110	(100)
UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS:		
- ALMIDON (+)	100	(91)
- DEXTROSA (+)	77	(70)
- MANITOL (-)	110	(100)
- RAFINOSA (-)	110	(100)
HIDROLISIS DEL HIPURATO	103	(93.6)
REACCION NEGATIVA DE CATALASA	110	(100)

\* Realizadas en 110 cepas.

**TABLA 9. CONSERVACION A CORTO PLAZO DE LA CEPA TIPO (14018) DE G. vaginalis UTILIZANDO MEDIO SEMISOLIDO NACIONAL Y EXTRANJERO COLOCADO A TEMPERATURA AMBIENTE (T.A) Y EN REFRIGERACION (REF).**

**EXPERIMENTO 1**

**MEDIO SEMISOLIDO EXTRANJERO**

TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF
0	++	++
6	++	++
13	-	-
20	-	-

**EXPERIMENTO 2**

**MEDIO SEMISOLIDO EXTRANJERO**

**MEDIO SEMISOLIDO NACIONAL**

TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF	TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF
0	++	++	0	++	++
6	-	-	6	++	++
13	-	-	13	-	+
20	-	-	20	-	-

++ crecimiento bueno

+ crecimiento moderado (colonias contables)

- crecimiento nulo

TABLA 9a. CONSERVACION A CORTO PLAZO DE LA CEPA TIPO (14018)  
DE G. vaginalis EN MEDIO SOLIDO NACIONAL Y EXTRANJERO  
ALMACENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE (T.A)  
Y REFRIGERACION (REF).

EXPERIMENTO 1

MEDIO SOLIDO EXTRANJERO			MEDIO SOLIDO NACIONAL		
TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF.	TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF
0	++	++	0	++	++
6	++	++	6	++	++
13	++	++	13	++	++
20	++	++	20	++	++
28	-	++	28	-	++
34	++	-	34	-	++
41	-	-	41	-	+
48	-	-	48	-	-

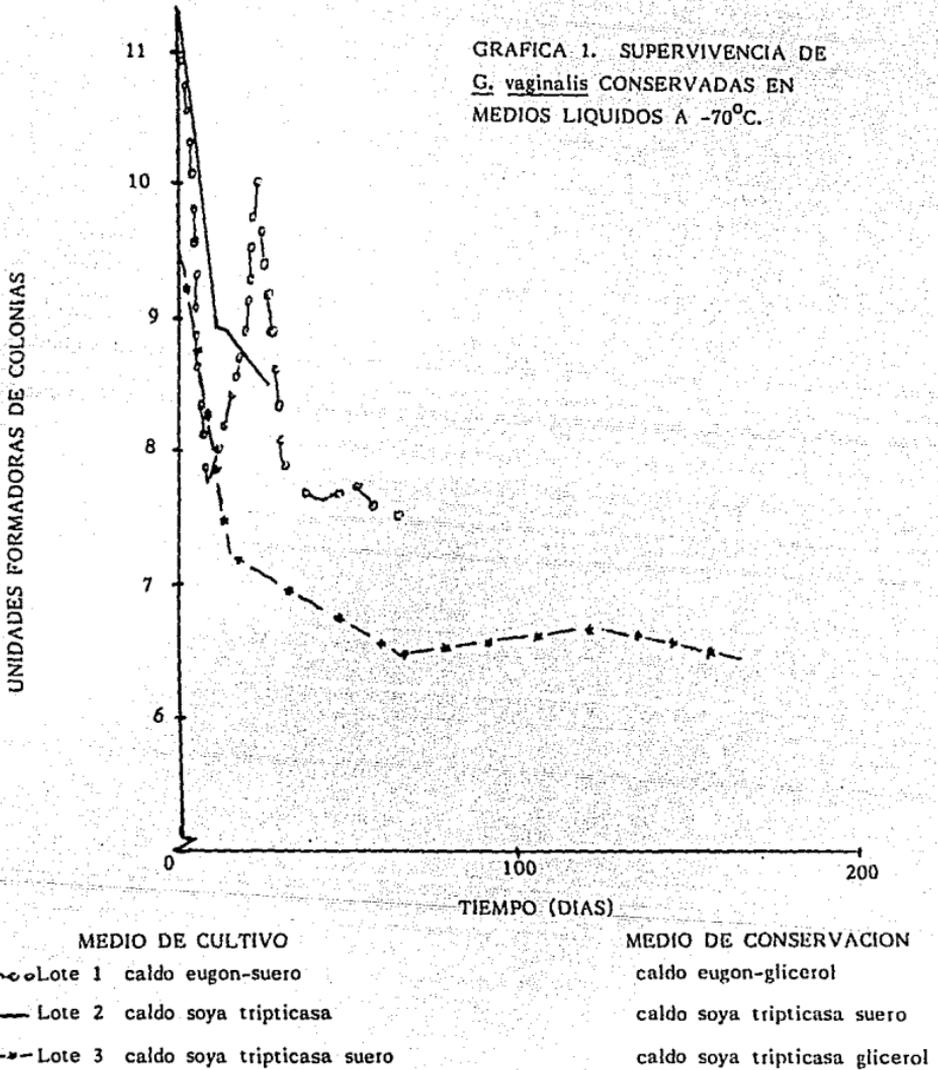
EXPERIMENTO 2

MEDIO SOLIDO EXTRANJERO			MEDIO SOLIDO NACIONAL		
TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF.	TIEMPO (DIAS)	T.A.	REF
0	++	++	0	++	++
6	++	++	6	++	++
13	++	++	13	++	++
20	-	-	20	-	++
27	-	-	27	-	++
35	-	-	35	-	++
			42	-	++
			49	-	+
			52	-	+
			68	-	-

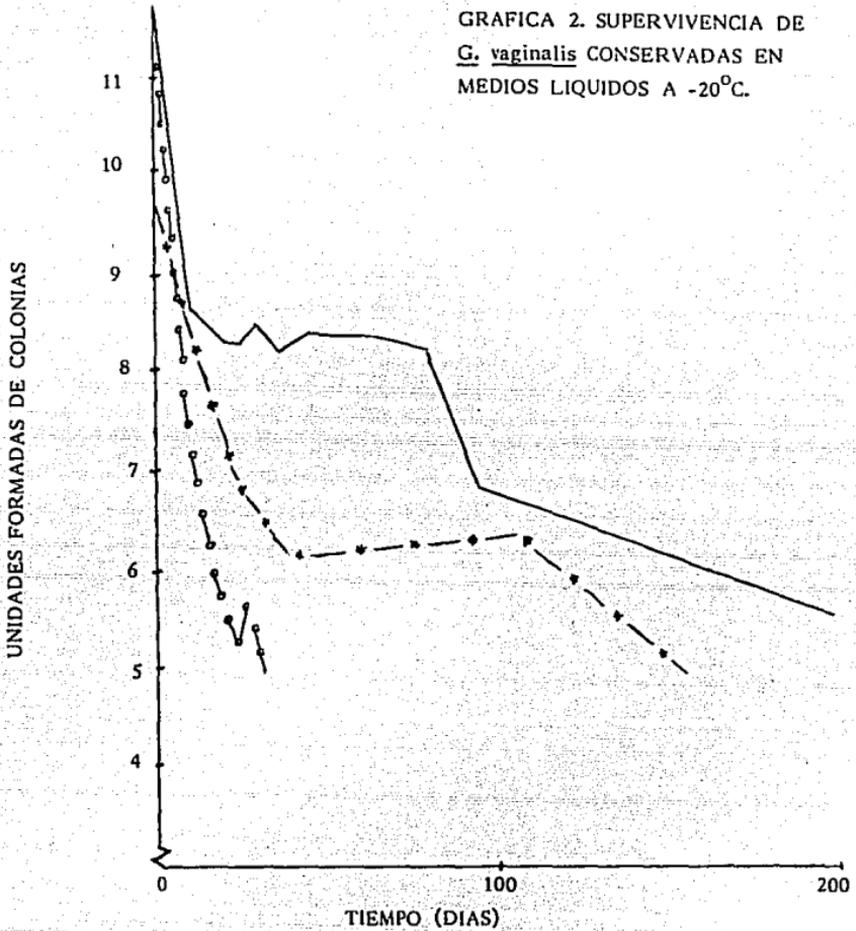
++ Crecimiento bueno  
- Crecimiento nulo

+ Crecimiento moderado  
(colonias contables)

GRAFICA 1. SUPERVIVENCIA DE *G. vaginalis* CONSERVADAS EN MEDIOS LIQUIDOS A  $-70^{\circ}\text{C}$ .



GRAFICA 2. SUPERVIVENCIA DE *G. vaginalis* CONSERVADAS EN MEDIOS LIQUIDOS A -20°C.



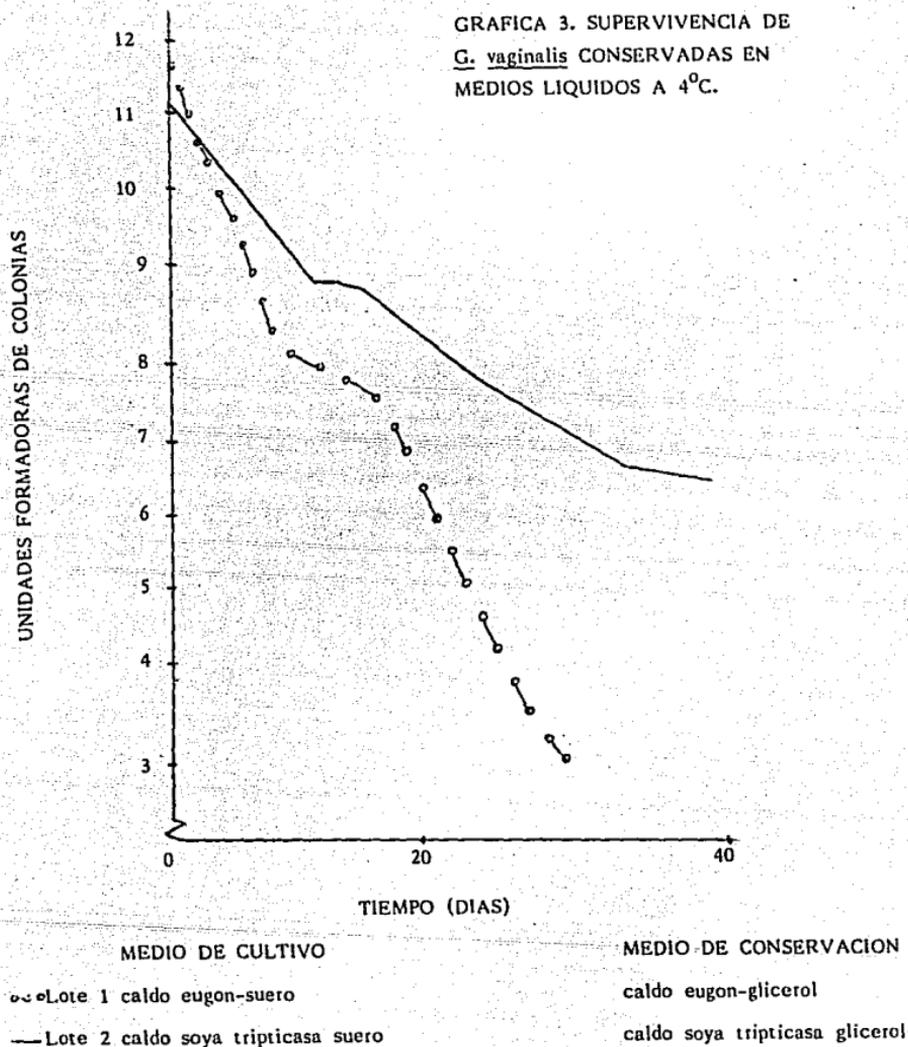
MEDIO DE CULTIVO

- ○ Lote 1 caldo eugon-suero
- Lote 2 caldo eugon-tripticasa
- - - Lote 3 caldo soya tripticasa suero

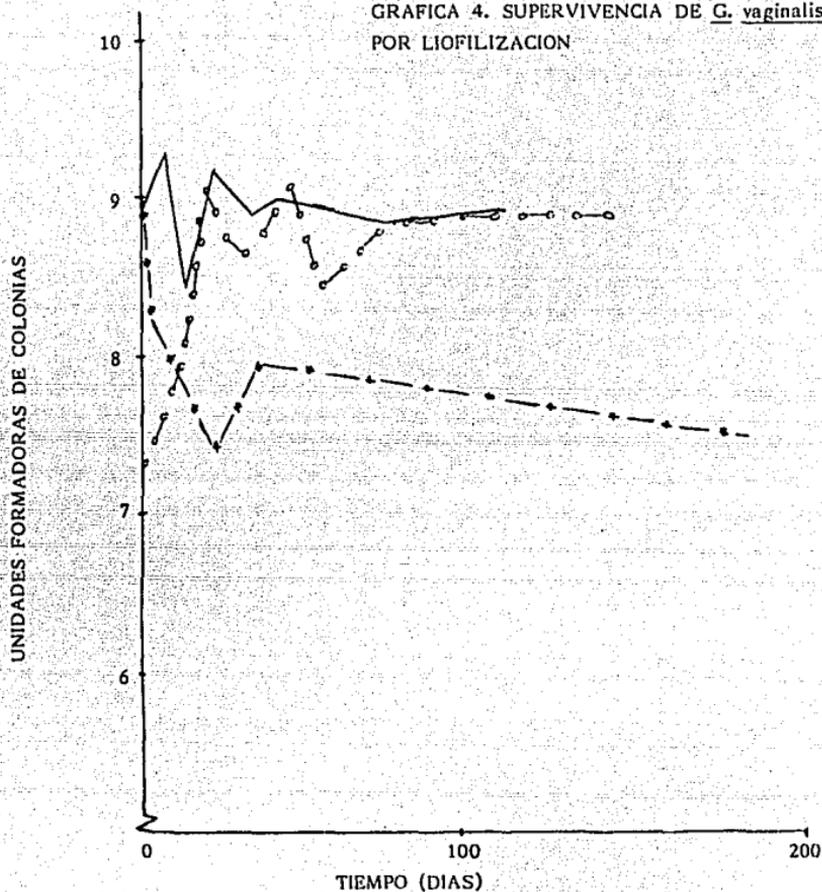
MEDIO DE CONSERVACION

- caldo eugon-glicerol
- caldo soya tripticasa glicerol
- caldo soya tripticasa glicerol

GRAFICA 3. SUPERVIVENCIA DE *G. vaginalis* CONSERVADAS EN MEDIOS LIQUIDOS A 4°C.



GRAFICA 4. SUPERVIVENCIA DE G. vaginalis  
POR LIOFILIZACION



MEDIO DE CULTIVO

- Lote 1 caldo eugon-suero
- Lote 2 caldo eugon-suero
- ▼ Lote 3 caldo soya tripticasa suero.

MEDIO DE CONSERVACION

- leche peptonizada (20%)
- leche descremada (20%)
- leche descremada (20%)

## ANEXOS

### ANEXO 1 MEDIO DE CULTIVO DE THAYER MARTIN

Se mezcla la base de agar GC (36 g.) con 500 ml. de agua bidestilada, hirviendo posteriormente para disolver la base, Por otra parte, la hemoglobina se mezcla (20 g.) con un volumen pequeño de agua hasta disolverla perfectamente. Se prepara un embudo grande y un matraz; el embudo se cubre con algodón envuelto en gasa, se filtra la hemoglobina y se completa a un volumen de 500 ml.

Se esteriliza ambos matraces a 1.5 lb. por min. se enfrían al chorro de agua hasta una temperatura de 45°C aproximadamente y se mezcla el contenido de la hemoglobina en la base que se encuentra en un matraz de un litro.

Por último con una pipeta estéril se vacía, primero el polienriquecimiento y después el inhibidor VCN, se mezclan todos los componentes y se vacía el medio en cajas petri estériles.

Para preparar el medio de gelosa chocolate se sigue el mismo procedimiento solo que no se adiciona el inhibidor VCN.

### ANEXO 2 MEDIO DE HB

Este medio es en bicapa y se prepara de la siguiente manera: para la primera capa se pesan 12.8 g. de base de agar columbia y se mezclan con 300 ml. de agua bidestilada, se hierve y se esterilizan posteriormente a 1.5 lb, por 15 min.

La segunda capa contiene 25.5. g. de base de agar columbia más 6 g. polipeptona que se mezclan con 600 ml. de agua y se esterilizan bajo las mismas condiciones.

Se enfría el matraz de la primera capa y se vacía una capa muy delgada en cajas petri estériles dejándose solidificar. La segunda capa también se enfría a chorro del agua y se le agrega con pipetas estériles, colistina 6 ml., ácido nalidíxico 6 ml., anfotericina B 6 ml., tween 80 6 ml. (a una concentración de 10 mg/ml., 15 mg/ml., 10 mg/ml y 0.0075% respectivamente) y sangre humana 30 ml. (5%). Se mezcla perfectamente bien y se vacía en las mismas cajas de petri arriba utilizadas.

El medio de HB sin antibióticos se prepara de la misma manera con la diferencia de que se le agrega tan sólo tween 80 y sangre humana.

### ANEXO 3 MEDIO DE BIGGY

Se pesa y se disuelve el medio en la cantidad de agua deseada, se hierve y se agita para que no se queme el medio. Se enfría y se vacía en cajas de petri estériles.

### ANEXO 4 REACTIVO DE OXIDASA

Se prepara una solución de N-N-N-N-tetrametilparafenildiamina al 1% y se impregnan los discos.

### ANEXO 5 UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS PARA GONOCOCO

Se esteriliza el medio de agar tripteína cistina (CTA) en tubos de 13 por 100 mm. con tapón de rosca conteniendo volúmenes de 2.7 ml.

Se preparan soluciones madre de glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa al 10% y se esterilizan con un milliporo de 0.45 micras.

El medio basal se guarda a 4°C mientras que los carbohidratos se colocan a -70°C.

Antes de ser utilizados los tubos se precientan y los carbohidratos se dejan a temperatura ambiente; posteriormente se coloca un volumen de 0.3 ml. de cada uno de los carbohidratos (concentración final del 1%) en el medio basal.

#### ANEXO 6 UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS DE G. vaginalis

Se mezclan: polipeptona (2 g.), gelatina bacteriológica (2 g.) y rojo de fenol (0.01 g.) en 100 ml. de agua bidestilada, se calienta la solución ligeramente para disolver por completo la gelatina y el rojo de fenol. Posteriormente se divide en 4 partes iguales, se agrega a cada una de ellas un carbohidrato diferente (almidón al 2%, dextrosa al 2%, manitol 2% y rafinosa al 2%); si no hay una disolución completa se calientan a baño maría hasta obtenerla. Se dejan enfriar para ajustar el pH a 7.2 utilizando hidróxido de sodio al 1%.

Se coloca un volumen de 0.5 ml. en tubos con tapón y se esterilizan a 1.5 lb. por 15 min. Todos los tubos se guardan en refrigeración, al momento de utilizarlos se guardan en refrigeración, al momento de utilizarlos se calientan ligeramente para facilitar su inoculación.

#### ANEXO 7 HIDROLISIS DEL HIPURATO

Se preparan 100 ml. de fosfato de potasio monobásico al 0.067 M y 100 ml. de fosfato de sodio dibásico al 0.067 M. Se colocan 73.2 ml. del fosfato de potasio y 26.8 ml. de fosfato de sodio en un matraz erlenmeyer

agregando posteriormente 1 g. de hipurato de sodio. Se mezcla bien y se mide el pH a 6.4.

En otro recipiente se hace una solución de ninhidrina al 3.5% utilizando como solvente una solución de acetona-butanol en una relación 1:1.

La solución de hipurato de sodio se guarda en tubos con tapón (0.5 ml.) en refrigeración, mientras que la solución de ninhidrina se almacena en un frasco ámbar y se deja a temperatura ambiente.

#### ANEXO 8 MEDIO SEMISOLIDO

El volumen que se prepara para el medio nacional y extranjero es de 100 ml. El medio extranjero contiene: caldo eugon (3 g.), almidón (1 g.), proteosa-peptona #3 (2 g.), agar (0.4 g.) y sangre humana (5%); el medio nacional tiene los mismos ingredientes solamente se suple la proteosa-peptona # 3 por polipeptona.

Ambos se hierven y se esterilizan, colocando la sangre después de enfriar cada uno en el chorro del agua. Se vacían en tubos de 13 por 100 mm. con tapón de rosca en un volumen de 4 ml.

#### ANEXO 9 MEDIO SOLIDO

Al igual que en el medio anterior, el volumen a preparar es de 100 ml. El medio extranjero se compone de base de agar columbia (4.2 g.), proteosa-peptona # 3 (1 g.) y sangre humana (5%); difiere del medio nacional en la utilización de polipeptona en lugar de proteosa-peptona # 3.

Se vacía en tubos de 13 por 100 mm. con tapón de rosca dejándose solidificar en posición inclinada cuidando que el medio no toque el tapón.

## ANEXO 10 MEDIO LIQUIDO

Se preparan 100 ml. de ambos medios, el medio extranjero contiene caldo eugon (3 g.) y suero de caballo (5 ml.) en tanto que el medio nacional utiliza caldo de soya tripticasa.

Se añade el suero después de haber esterilizado el caldo y de haberse enfriado. Se colocan y se guardan los tubos de 13 por 100 mm. con el medio a 4°C.

REFERENCIAS

- 1) Amsel, R., Totten, P.A., Spiegel, A.C., Chen, K.C.S., Eschenbach, D., Holmes, K.K. 1983. Nonspecific Vaginitis. Diagnostic Criteria and Microbial and Epidemiologic Associations. Am. J. Med. 74:14-21.
- 2) Arya, P.O. Oseba, A.O., Bennett, J.F. 1983. Enfermedades vénereas. Diagnóstico y Tratamiento. Ed. El Manual Moderno. México. 281.
- 3) Bailey, R.K., Voss, J.L., Smith, R.F. 1979. Factors Affectin Isolation and Identification of Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale). J. Clin. Microbiol. 9:65-71.
- 4) Balsdon, J.M. Pead, L., Taylor, E.G., Maskell, R. 1980. Corynebacterium vaginale and Vaginitis: A controlled trial of treatment .. The Lancet. 8:501-503.
- 5) Bhattacharyya, N.M., Jones, M.B., 1980. Haemophilus vaginalis Infection, Diagnosis and Treatment. J. Reprod. Med. 24:71-75.
- 6) Blackwell, A., Barlow, D. 1982. Clinic diagnosis of anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis). Br. J. Vener. Dis. 58:387-393.
- 7) Blackwell, L.A., Fox, R.A., Phillips, J., Barlow, D. 1983. Anaerobic Vaginosis (Non-specific Vaginitis): Clinical, Microbiological and Therapeutic findings. The Lancet. 17:1379-1382.
- 8) Brown, D. Jr., Kaufman, H.R., Gardner, L.H. 1984. Gardnerella vaginalis Vaginitis. J. Reprod. Med. 29:300-305.
- 9) Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ava. edición: The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 135-137.

- 10) Carpenter, L.P. 1982. Microbiología. Ed. Interamericana. México. 518
- 11) Chattopadhyay, B. 1984. The role of Gardnerella vaginalis in non-specific vaginitis. J. Infection. 9:113-125.
- 12) Chen, C.S.K., Amsel, R., Eschenbach, A.D. Holmes, K.K. 1983, Diagnóstico bioquímico de la Vaginitis. Infectología. 3:285-297.
- 13) Criswell, S.B., Ladwig, L.C., Gardner, L.H., Dukes, D.C. 1969. Haemophilus vaginalis Vaginitis by Inoculation from Culture. Obstet. Gynecol. 33:195-199.
- 14) Dattani, M.I., Gerken, A., Evans, A.B. 1982. Aetiology and Management of Non-specific Vaginitis. Br. J. Vener. Dis. 58:32-35.
- 15) De la Cruz, G.R. 1982. Conservación de microorganismos. Infectología. 2:519-522.
- 16) De la Cruz, G.R., Calderón, J.E. 1985. Diagnóstico rápido de Infecciones cervicovaginales. Infectología. 5:115-121.
- 17) Dukes, C.D., Gardner, H.L. 1961. Identification of Haemophilus vaginalis. Am. J. Obstet. Gynecol. 8:277-282.
- 18) Dunkelberg, W.E. 1965. Diagnosis of Haemophilus vaginalis vaginitis by Gram-stained smears. Am. J. Obstet. Gynecol. 91:998-1000.
- 19) Dunkelberg, W.E., McVeigh, I. 1969. Growth requirements of Haemophilus vaginalis. Antonie Van Leeuwenhock. 35:129-145.
- 20) Dunkelberg, W.E., Skaggs, R., Kellogg, D.S. 1970. Method for isolation and identification of Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis). Appl. Microbiol. 19:47-52.

- 21) Easmon, F.S.C., Ison, A.C. 1983. Gardnerella vaginalis. The Lancet. 6:343-344.
- 22) Eschenbach, A.D. 1984. Diagnosis of Bacterial Vaginosis (Nonspecific Vaginosis): Role of the laboratory. Clinical Microbiol. Newsletter. 6:18-21.
- 23) Eschenbach, D., Pollock, M.H., Schachter, J. 1983. Laboratory Diagnosis of Female Genital Tract Infections. Cumitech. 17:1-17.
- 24) Gardner, H.L., Dukes, C.D. 1955. Haemophilus vaginalis Vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 69:962-976.
- 25) Greenwood, J.R., Pickett, M.J. 1979. Salient Features of Haemophilus vaginalis. J. Clin. Microbiol. 9:200-204.
- 26) Hurd, J.K. Jr. 1979. Vaginitis. Med. Clin. North America. 63:423-429.
- 27) Ison, C.A., Dawson, S.G., Hilton, J., Csonka, G.W., Easmon, C.S.F. 1982. Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of Gardnerella vaginalis infection. J. Clin. Pathol. 35:550-554.
- 28) Joklik, K.W., Willett, P.H., Ames, B.D. 1983. Zinsser Microbiología. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires 1411.
- 29) Jolly, J.L.S. 1983. Minimal criteria for the identification of Gardnerella vaginalis isolated from the vagina. J. Clin. Pathol. 36:478-478.
- 30) Kaufman, H.R., 1980. The Origin and Diagnosis of "Nonspecific Vaginitis". N.E.J. Med. 303:637-638. (Sección editorial).
- 31) Kellog, S.D., Holmes, K.K., Hill, A.G. 1976. Laboratory Diagnosis of Gonorrhea. Cumitech. 4:1-10.

- 32) Koneman, W.E., Allen, .D.S., Dowell, R.V., Sommers, M.H. 1983. Diagnostico Microbiológico. Ed. Médico Panamericana. Buenos Aires. 533.
- 33) La Scolea, L.J. Jr., Dryja, D.M., Dillon, W.P. 1984. Recovery of Gardnerella vaginalis from blood by the quantitative direct plating method. J. Clin.Microbiol. 20:568-569.
- 34) Lee, L., Schmale, D.J. 1973. Ampicillim therapy for Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis) vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 115:786-788.
- 35) Leighton, P.M. 1982. Gardnerella vaginalis: Laboratory Isolation and Clinical Significance. Can. J. Pub. HHH. 73:335-339.
- 36) Levison, E.M., Trestman, I., Quach, R., Sladowski, C., Floro, N.C. 1979. Quantitative Bacteriology of vaginal flora. Am. J. Obstet. Gynecol. 313:139-144.
- 37) Lewis, J.F., O'Brien, S.M., Ural, U.M., Burdks, T. 1972. Corynebacterium vaginale Vaginitis. Am. J. Obstet, Gynecol. 112:87-90.
- 38) McCormack, M.W., Hayes, H.C., Rosner, B., Evrard, R.J., Crockett, A.V., Alpert, S., Zinner, H.S. 1977. Vaginal Colonization with Corynebacterium vaginale J. Infections Ds. 136:740-745.
- 39) Mirza, N.B., Nsanze, H., D'Costa, L.J., Piot, P. 1983. Microbiology of vaginal discharge in Nairobi, Kenya. Br. J. Vener. Dis. 59:186-188.
- 40) Moss, S. 1983. Isolation and identification of anaerobic organisms from the male and female urogenital tracts. Br. J. Vener. Dis. 59:182-185.

- 41) Osborne, G.N., Grubin, L., Pratson, L., 1982. Vaginitis in sexually active women: Relationship to nine sexually transmitted organisms. Am. J. Obstet. Gynecol. 142:962-967.
- 42) Piot, P., Van Dyck, E., Totten, P.A., Holmes, K.K. 1982. Identification of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. J. Clin. Microbiol. 15:19-24.
- 43) Piot, P., Van Dyck, E., Peeters, M., Hale, J., Totten, A.P., Holmes, K.K. 1984. Biotypes of Gardnerella vaginalis J. Clin. Microbiol. 20:677-679.
- 44) Ratnam, S., Fitzgerald, I.B. 1983. Semiquantitative Culture of Gardnerella vaginalis in laboratory determination of Nonspecific vaginitis. J. Clin. Microbiol. 18:344-347.
- 45) Reilly, S., Human, P.R. 1983. Gardnerella vaginalis: Pathogen or comensal? The Lancet. 6:111.
- 46) Spiegel, C.A., Amsel, R., Eschenbach, D., Schoenknecht, F., Holmes, K.K. 1980. Anaerobic Bacteria in Nonspecific Vaginitis. N.E.J. Med. 303:601-607.
- 47) Spiegel, C.A., Amsel, R., Holmes, K.K. 1983. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram stain of vaginal fluid. J. Clin. Microbiol. 18:170-177.
- 48) Tarlinton, M.N., D'Abrera, V. St. E. 1967. Identity of a disputed, Haemophilus-like organism in Nonspecific vaginitis. J. Path. Bact. 93:109-117.
- 49) Taylor, E., Barlow, D., Blackwell, A.L., Phillips, I., 1982. Garnerella vaginalis, Anaerobis and Vaginal discharge. The Lanc. 19:1374-1379.

- 50) Taylor, E., Phillips, I. 1983. The identification of Gardnerella vaginalis. J. Med. Microbiol. 16:83-92.
- 51) Totten, P.A., Amsel, R., Hale, J., Piot., Holmes, K.K. 1982. Selective Differential Human Blood Bilayer media for isolation of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. J. Clin. Microbiol. 15:141-147.
- 52) Vontver, A.L., Eschenbach, A.D. 1981. Participación de Gardnerella vaginalis en la vaginitis inespecífica. Clínicas de Obstetricia y Ginecología. 24:439-460.
- 53) Zinneman, K., Turner, G.C. 1963. The Taxonomic position of "Haemophilus vaginalis" (Corynebacterium vaginale). J. Path. Bacteriol. 85:213-219.