

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD DE CEPAS
COLONIZANTES E INFECTANTES DE *Gardnerella vaginalis* Y SU
ASOCIACIÓN CON BACTERIAS ANAEROBIAS**

BIOQUÍMICA ADRIANA BELMONTE

DIRECTORA: DRA EMMA GUILLERMINA SUTICH

2012

CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA Y VIROLOGÍA

A la memoria de mi padre
A mi esposo e hijos sin cuya comprensión y ayuda no hubiese podido
realizar este trabajo de tesis
A mi madre
A mi colega y amiga Mónica
A mis compañeros de cátedra
Y especialmente a mi directora de Tesis Dra Emma G Sutich por su
invalorable ayuda y estímulo permanente

INDICE

1.- RESUMEN	1
RESUMEN.....	2
2.- INTRODUCCION	5
2.1.- ECOLOGIA VAGINAL	6
2.1.1.- Diversidad microbiana de la biota vaginal.....	6
2.1.2.- Condición de salud vaginal	10
2.2.- VAGINOSIS BACTERIANA.....	12
2.2.1.- Importancia clínica.....	12
2.2.2.- En la mujer en edad fértil.....	14
2.2.3.- En la mujer durante el embarazo.....	15
2.3.- MICROBIOTA NORMAL VERSUS VAGINOSIS BACTERIANA	17
2.4.- PATOGENESIS DE LA VAGINOSIS BACTERIANA	18
2.4.1.- Microorganismos implicados en la Vaginosis Bacteriana.....	20
2.4.2.- Rol patógeno de <i>Gardnerella vaginalis</i>	22
2.4.3.- Rol patógeno de Micoplasmas (<i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma spp.</i>)	23
2.4.4.- Rol patógeno de anaerobios (Géneros: <i>Atopobium</i> y <i>Mobiluncus</i>).....	25
2.4.4.1.- Género: <i>Atopobium</i>	26
2.4.4.2.- Género: <i>Mobiluncus</i>	28
2.5.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA VAGINOSIS BACTERIANA	28
2.5.1.- Criterios de Amsel.....	29
2.5.2.- Criterios de Nugent.....	30
2.5.3.- Sistema simplificado de puntuación de Ison y Hay	31
2.5.4.- Criterios de BACOVA.....	33
2.6.- <i>Gardnerella vaginalis</i>	35
2.6.1.- Taxonomía: Perspectiva histórica.....	35
2.6.2.- Factores de virulencia: adherencia, producción de enzimas sialidasas, citolisina y formación de biofilm.....	39
2.6.2.1.- Producción de Enzimas: Sialidasas y citolisina.....	40
2.6.2.1.1.- Sialidasas: propiedades y mecanismo de acción.....	40
2.6.2.1.2.- Producción de citolisina.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6.2.2.- Adherencia.....	45
2.6.2.3.- Producción de Biofilm.....	47
2.7.- OBJETIVOS.....	53
2.7.1.- Objetivos generales	53
2.7.2.- Objetivos específicos	53
3.- DESARROLLO	55
3.1.- MATERIALES Y METODOS.....	56
3.1.1.- Muestras para los aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i> y Micoplasmas	56
3.1.2.- Aspectos clínicos.....	57
3.1.2.1.- Población en estudio.....	57
3.1.2.2.- Criterios de selección de cada grupo.....	58
3.1.2.2.1.- Diagnóstico clínico	58
3.1.2.2.2.- Diagnóstico bacteriológico.....	59

3.1.3.- Aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i>	62
3.1.3.1.- Toma de muestras	62
3.1.3.2.- Examen y procesamiento de las siembras.....	62
3.1.3.3.- Conservación de las cepas aisladas.....	65
3.1.4.- Investigación de Micoplasmas	68
3.1.4.1.- Siembra e identificación	68
3.1.4.2.- Interpretación de resultados	70
3.2.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD	71
3.2.1.- Detección de actividad Sialidasa	71
3.2.1.1.- Muestra utilizada	72
3.2.1.2.- Procedimiento de detección	72
3.2.2.- Producción de Citolisina (VLY)	73
3.2.2.1.- Preparación del inóculo	74
3.2.2.2.- Preparación de la suspensión de Glóbulos Rojos Humanos (GRH).....	75
3.2.2.3.- Ensayo de producción de citolisina.....	75
3.2.3.- Detección de formación de Biofilm.....	76
3.2.3.1.- Evaluación del medio de enriquecimiento óptimo	77
3.2.3.2.- Preparación del inóculo.....	77
3.2.3.3.- Formación del Biofilm.....	77
3.2.3.3.1.- Técnica de siembra	78
3.2.3.3.2.- Lavado y fijación.....	78
3.2.3.3.3.- Revelado.....	78
3.2.3.3.4.- Lectura e interpretación.....	79
3.3.- MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS	80
4.- RESULTADOS	90
4.1.- VALORACIÓN DE LOS CRITERIOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS	91
4.1.1.- Selección de los casos de VB	91
4.1.2.- Selección de los casos controles	95
4.2.- ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS	97
4.2.1.- Identificación y conservación de los aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i>	98
4.2.1.1.- Identificación de <i>Gardnerella vaginalis</i>	98
4.2.1.2.- Conservación de los aislamientos	100
4.2.2.- Conservación de muestras para estudio de Micoplasmas, cultivo e Identificación	102
4.2.2.1.- Conservación de las muestras	102
4.2.2.2.- Siembra e identificación de Micoplasmas	102
4.3.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD	107
4.3.1.- Detección de actividad sialidasa en fluido vaginal	107
4.3.2.- Producción de citolisina (vaginolisina) por distintos aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i>	109
4.3.3.- Producción de Biofilm de cepas colonizantes e infectantes de <i>Gardnerella vaginalis</i>	112
4.3.3.1.- Evaluación del medio de enriquecimiento óptimo	112
4.3.3.2.- Detección cualitativa de producción de biofilm	114
4.3.3.3.- Detección cuantitativa de producción de biofilm	115
5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	119
5.1.- VALORACIÓN DE LOS CRITERIOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS	121

5.1.1.- Selección de casos de Vaginosis Bacteriana.....	121
5.1.2.- Selección de casos controles	122
5.2.- IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	124
5.2.1.- Aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i>	124
5.2.2.- Identificación de micoplasmas y frecuencia de aislamientos.....	125
5.3.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD	127
5.3.1.- Detección de actividad sialidasa en fluido vaginal	127
5.3.2.- Producción de citolisina por distintos aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i>	130
5.3.3.- Producción de biofilm de cepas colonizantes e infectantes de <i>G. vaginalis</i>	132
5.3.4.- Conclusiones.....	134

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
2.1 Cálculo del valor numérico (score) basado en los morfotipos según Nugent	31
2.2 Estados Vaginales Basicos (BACOVA)	34
2.3 Transcripción parcial de la tabla publicada por Piot y col (1980) en el Journal of Clinical Microbiology	37
2.4 Porcentaje de aislamiento de <i>G. vaginalis</i> en un grupo de 241 pacientes sexualmente activas	51
2.5 Porcentaje de recuperación de <i>G. vaginalis</i> en población de 100 mujeres adultas con y sin síntomas de VB	52
3.1 Pruebas mínimas para identificación de <i>Gardnerella vaginalis</i>	65
3.2 Especies de Micoplasmas y sustratos metabólicos que requieren	71
4.1 Valores de frecuencia de los criterios clínicos de Amsel en Casos y Controles de la población estudiada de mujeres sexualmente activas (n=154)	91
4.2 Evaluación de los parámetros de Amsel en población estudiada de 154 mujeres sexualmente activas	93
4.3 Frecuencia de los distintos valores numéricos de Nugent en 77 pacientes con VB según criterios de Amsel	94
4.4 Frecuencia y porcentajes de los parámetros de Amsel en el grupo control de 77 pacientes sexualmente activas	96
4.5 Frecuencia de los distintos valores numéricos de Nugent en las 77 pacientes del grupo control	97
4.6 Características bioquímicas de los 87 aislamientos de <i>Gardnerella vaginalis</i> de una población de 154 mujeres sexualmente activas	100
4.7 Porcentaje de recuperación de <i>Gardnerella vaginalis</i> (n=6), conservadas a – 20 °C	101
4.8 Porcentaje de recuperación de <i>Gardnerella vaginalis</i> (n=6), conservadas a – 70 °C	101
4.9 Frecuencia de aislamientos de Micoplasmas en una población de 154 mujeres sexualmente activas	103

VII

Tabla		Página
4.10	Frecuencia de aislamiento de <i>M. hominis</i> en una población de 154 mujeres sexualmente activas de casos controles y casos con VB	104
4.11	Frecuencia de aislamientos de <i>Ureaplasma</i> spp. en una población de 154 mujeres sexualmente activas en grupo control y grupo con VB	105
4.12	Medianas y rangos de actividad sialidasa (nmoles de metoxifenol formado) en pacientes con y sin VB(p<0,0001)	109
4.13	Valores de Unidades de Hemólisis producidas por los 20 aislamientos de <i>G. vaginalis</i> estudiados	110
4.14	Frecuencia de aislamientos de <i>G. vaginalis</i> según los distintos grados de producción de Biofilm por detección cualitativa	114

VIII

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Porcentaje de cada especie bacteriana presente en los cuatro grupos étnicos de mujeres estudiadas	10
2.2	Diagrama del Modelo de disminución de lactobacilos	18
2.3	Diagrama del Modelo de patógeno primario	19
2.4	Géneros predominantes detectados en vagina de mujeres con VB y sin VB	22
2.5	Detección de un biofilm continuo en corte histológico teñido con Brown-Hopps modificación de la coloración de Gram	50
3.1	Esquema básico del estudio de casos y controles de una población de 154 pacientes sexualmente activas	58
3.2	Diagrama que señala los distintos pasos seguidos en el estudio de la secreción vaginal de la población estudiada	60
3.3	Medios de cultivo utilizados para la siembra de flujo vaginal de la población de 154 mujeres estudiadas	62
3.4	Medios de cultivos y equipos comerciales utilizados para el estudio de muestras endocervicales de la población de 154 mujeres estudiadas	63
3.5	Cultivo en placa con asa por agotamiento	64
3.6	Eppendorf conteniendo cepas de <i>G. vaginalis</i> en el medio de conservación MGY	66
3.7	Cepas ATCC de <i>G. vaginalis</i> (14018; 14019; 49145)	67
3.8	Frascos con medios R ₁ y R ₂ para Micoplasmas (BioMerieux)	69
3.9	Microplacas de 96 pocillos utilizadas en la detección de sialidasa	72
3.10	Cultivo de placas sembradas con <i>G. vaginalis</i> en anaerobiosis	74
3.11	<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018	76
3.12	Microplacas de poliestireno utilizadas en la producción de biofilms de <i>Gardnerella vaginalis</i>	76
4.1	Imagen de la observación microscópica con 1000x de un extendido de flujo vaginal con células guía de paciente con Vaginosis Bacteriana	92
4.2	Observación de Coloración de Gram de distintos campos de un frotis de Exudado vaginal de paciente con puntaje de Nugent =10 (VB según criterios de Amsel)	94
4.3	Observación de Coloración de Gram de distintos campos de un frotis de Exudado vaginal de paciente con puntaje de Nugent = 0 (microbiota normal)	95
4.4	Pruebas mínimas realizadas para la identificación de <i>Gardnerella vaginalis</i>	98

IX

Figura		Página
4.5	Pruebas complementarias para la identificación de <i>Gardnerella vaginalis</i>	99
4.6	Frasco con medio de transporte para Micoplasmas	102
4.7	Cultivo de muestra endocervical para búsqueda de Micoplasmas en equipo Micoplasma IST-2 (bioMérieux.S.A)	103
4.8	Distribución de aislamientos de Micoplasmas en una población de 154 mujeres sexualmente activas	104
4.9	Gráfico descriptivo de la frecuencia de aislamiento de los dos géneros de Micoplasmas en la población de 154 mujeres sexualmente activas y su distribución dentro de cada grupo.	106
4.10	Curva Estándar de Metoxifenol puro	107
4.11	Actividad sialidasa expresada en nmoles de metoxifenol formado de lavados vaginales de una población de 112 mujeres sexualmente activas	108
4.12	Curva Estándar de producción de hemólisis a distintas concentraciones de Glóbulos Rojos Humanos (GRH) en agua destilada	110
4.13	Gráfico de la Mediana y Desviación estándar de la detección de citolisina en 10 aislamientos de <i>G. vaginalis</i> del Grupo control vs 10 del Grupo con VB	111
4.14	Cinética de crecimiento de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> en Caldo Tripteína Soya en aerobiosis a 37°C	112
4.15	Cinética de crecimiento de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> en Caldo Casman en aerobiosis a 37°C	113
4.16	Cinética de crecimiento de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> en Caldo Cerebro Corazón en aerobiosis a 37°C	113
4.17	Lectura cualitativa de biopelículas de <i>Gardnerella vaginalis</i> desarrolladas en microplacas de poliestireno	115
4.18	Lectura cuantitativa de formación de biofilms en microplacas sembradas con <i>Gardnerella vaginalis</i> a DO ₄₆₀ nm, en lector de microplacas	116
4.19	Gráfica de las lecturas a DO ₄₆₀ nm de los biofilms formados por aislamientos de <i>G. vaginalis</i> colonizantes e infectantes	117
4.20	Gráfico de la Mediana y Desviación estándar de la producción de biofilm de aislamientos de <i>G. vaginalis</i> provenientes del grupo control (n=10) y grupo con VB (n=10) estudiados	118

ABREVIATURAS

VB Vaginosis Bacteriana
PP Parto prematuro
DNA Acido Desoxiribonucleico
(UU-2) *Ureaplasma urealyticum* biovar 2
RAPD Amplificación randomizada polimórfica del DNA
VN: Valor numérico
HIV: Virus de Inmunodeficiencia humana
ARDRA: método de restricción y amplificación ribosomal de DNA
ITS: Infecciones de Transmisión Sexual
BVAB: Bacterial Vaginosis Associated Bacterium
PCR: Polimerasa Chain Reaction
G+C: Guanina + Citosina
VLY: Vaginolisina
CD59: Proteina Regulatoria del Complemento
BACOVA: Balance del Contenido Vaginal
ASS: Agar Base Columbia sangre suplementado
Medio CG: Caldo cerebro corazón glicerol
Medio MGY: Medio con leche descremada, Glucosa y Extracto de levadura con glicerol
GRH: Globulos Rojos Humanos
RPM: Revoluciones Por Minutos
UH: Unidades de Hemólisis
VPP: Valor predictivo positivo
VPN: Valor predictivo negativo
DO: Densidad Optica
CCC: Caldo Cerebro Corazón

1.1.- RESUMEN

La Vaginosis Bacteriana (VB) es una patología del tracto genital inferior con mayor importancia en la etapa fértil de la mujer por el peligro de provocar Ruptura Prematura de Membrana durante la gestación y aumento de riesgo de la adquisición o propagación de infecciones por el HIV₁, VHS₂ y Papiloma virus. La etiología es polimicrobiana abarcando junto a *Gardnerella vaginalis* distintas especies de anaerobios incluyendo Micoplasmas. Ante el descubrimiento de distintos mecanismos de virulencia en *Gardnerella vaginalis* autores como Swidsinski y Gelber la señalan como patógeno iniciador de la VB.

Los objetivos de esta tesis fueron investigar la expresión de la producción de enzimas como sialidasas y citolisinas, así como la capacidad de formar biofilm tanto en aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de un grupo de pacientes con VB y en pacientes sanas, para ver si existen diferencias entre ambos grupos. Además conocer la coexistencia con Micoplasmas en cuanto a su tenor en ambas poblaciones, puesto que se trata de una patología polimicrobiana.

Con esto se intenta incrementar nuestros conocimientos acerca del comportamiento de *Gardnerella vaginalis*, uno de los microorganismos que está señalado como principal involucrado en la patogenia de la Vaginosis Bacteriana. También nos da posibilidades de pensar estrategias para su prevención y tratamiento, e incluso implementar pruebas diagnósticas válidas, accesibles y rápidas que ayuden a hacer un diagnóstico de mayor certeza fundamentalmente en pacientes asintomáticas.

En la primera etapa del estudio nos dedicamos a la inclusión de los casos y controles en base a los criterios clínicos de Amsel y microbiológicos del puntaje de Nugent, también se efectuó cultivo bacteriológico, el que nos permitió descartar otras patologías e incorporar casos de VB pura y controles sanos, asintomáticos; así como la detección de micoplasmas en ambos grupos. Al mismo tiempo se tomaron muestras de lavados vaginales (conservados a -70° C hasta el estudio

posterior de producción de actividad sialidasa) y cada aislamiento de *G. vaginalis* se conservó a -70° C para realizar el estudio de factores de patogenicidad.

En una segunda etapa se procedió a la medición de actividad sialidasa en los lavados vaginales mediante utilización de una técnica colorimétrica publicada por Cauci.

En una tercera etapa se estudió la capacidad de producción de citolisina (tomando como referencia la metodología empleada por Rottini) y el estudio de la capacidad de formación de biofilm, que se llevó a cabo trabajando en microplacas de poliestireno (según la técnica descrita por Patterson).

Se realizó un estudio epidemiológico de casos y controles (77 casos de VB y 77 controles) en una población original de 154 pacientes, para determinar si los factores de patogenicidad de *G. vaginalis* (producción de actividad sialidasa, citolisinas y formación de biofilm) y los micoplasmas implicados difieren en estos dos grupos. Se trabajó con un nivel de significación α del 5% y un poder β del 80% y los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el test de U Mann Whitney para determinar si existe asociación entre las variables estudiadas. El análisis de los datos epidemiológicos se realizó calculando las razones de odds e intervalos de confianza.

Las conclusiones tras la evaluación de los resultados fueron las siguientes:

- a) La incidencia de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. en la población sana fue de 1.3 y 9.1 % respectivamente, mientras que en la población con VB fue de 13 y 27.3%. Resultando el hallazgo de *M. hominis* estadísticamente significativo de VB ($p < 0.0001$).
- b) La enzima sialidasa estuvo presente en el lavado vaginal de ambas poblaciones por lo que sugerimos un punto de corte de valores ≥ 5.5 nmoles de metoxifenol para su interpretación como índice de VB. La diferencia entre ambos grupos resultó significativa ($p < 0.0001$).
- c) La capacidad de producción de citolisina no mostró diferencia significativa siendo los valores de unidades de hemólisis semejantes en ambos grupos ($p = 0,29$).

d) En lo referente a la producción de biofilm se encontró diferencia significativa entre el grupo control respecto del grupo con VB ($p < 0.0001$) siendo de mayor magnitud en estos últimos aislamientos.

Podría decirse que *G. vaginalis* tiene un potencial de virulencia innato y que los aislamientos provenientes de pacientes con VB tienen mayor capacidad para adherir que los de pacientes sanas. Por lo tanto al ser predominante su presencia, las enzimas que producirían como citolisina y sialidasas, actuarían sobre la mucosa favoreciendo la exfoliación y pérdida de células del epitelio vaginal. Todo esto torna más vulnerable al nicho ecológico vaginal para la adquisición de otras patologías.

En cuanto al dosaje de sialidasa en fluido vaginal como método diagnóstico de VB, no es útil por si solo ya que puede haber pacientes con este síndrome con valores menores a 5,5 nmoles que es el punto de corte que proponemos.

2.- INTRODUCCION

2.1.- ECOLOGIA VAGINAL

2.1.1.- Diversidad microbiana de la biota vaginal

La vagina humana es un órgano sumamente versátil a través del cual se puede ver afectada la salud de la mujer, pudiendo permitir o no una gestación, la finalización a término de un embarazo, así como la adquisición de una enfermedad como el HIV tan temible por sus consecuencias.

En el año 1894 Döderlein fue quien hiciera el primer estudio de flora vaginal describiéndola como compuesta por bacilos Gram positivos (llamados posteriormente bacilos de Döderlein) y a los que hoy llamamos lactobacilos.

Por estudios posteriores se identificó una flora más amplia y heterogénea formada por coliformes, difteroides, cocos Gram positivos y en 1973 Gorbach publica la presencia de los anaerobios como integrantes de la microflora vaginal.

Hoy con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se han ampliado aún más los conocimientos de aquel entonces, comprobando que era más compleja de lo que se creía.

Es sabido que las comunidades bacterianas están influenciadas por factores como son: la raza, la edad, las fluctuaciones hormonales, actividad sexual, número de parejas, uso de medicamentos, prácticas de higiene por duchas vaginales, así también como la existencia de enfermedades como: diabetes, infecciones urinarias, entre otras. Por todo esto podemos decir que la flora microbiana vaginal se encuentra en un permanente estado dinámico, donde determinados grupos de bacterias sobreviven y multiplican bajo las condiciones ambientales existentes, las que al fluctuar provocan cambios en la microbiota.

La vagina de mujeres sanas en edad sexualmente activa está colonizada fundamentalmente por bacilos Gram positivos pertenecientes al género *Lactobacillus* los que juegan un rol protector en prevenir infecciones genitourinarias.

Primeramente fueron conocidos como Lactobacilos de Döderlein que más tarde se conocieron como un complejo llamado *Lactobacillus acidophilus*; hoy se describen otras especies: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus*.

Aquellos que originalmente se denominaban *L acidophilus* se vio que estaban constituidos por un grupo heterogéneo, que posteriormente fue dividido según las homologías del DNA en grupos A y B por Johnson (1980), quien estudió 89 cepas las que fueron divididas en grupos A y B; las del grupo A tenían entre un 20 a 30% de homología, quedando definidas como: A₁, A₂, A₃ y A₄, pero muy baja homología con el grupo B.

Del mismo modo, entre las dos especies del grupo B, había entre un 20 a 30 % de homología y se designaron como: B₁ y B₂.

Fueron estudiadas también sus propiedades fisiológicas y pared celular, tras lo cual quedaron seis especies individualizadas como: *Lactobacillus acidophilus* (A₁), *Lactobacillus crispatus* (A₂), *Lactobacillus amylovorus* (A₃), *Lactobacillus gallinarum* (A₄), *Lactobacillus gasseri* (B₁) y *Lactobacillus johnsonii* (B₂).

El estudio taxonómico hecho por Fujisawa presentado en 1992 en el International Journal of Systematic Bacteriology, también significó un gran aporte.

En 1999 Falsen anuncia la caracterización de una nueva especie: *Lactobacillus iners*.

En el 2002 Vásquez y su grupo de investigación estudian los Lactobacilos presentes en la flora vaginal de mujeres sanas. Si bien las especies del complejo *Lactobacillus acidophilus* son consideradas como las especies constituyentes mayoritarias de la flora vaginal, existen diferencias según varios estudios realizados. Uno de los motivos puede ser por la dificultad que se plantea en la

identificación de este género por métodos convencionales así como las variaciones entre las distintas pacientes según su estatus.

Este grupo estudió 202 aislamientos provenientes de flujos vaginales de 23 mujeres suizas sin VB según los criterios de Nugent, mediante RAPD (amplificación randomizada polimórfica del DNA) con identificación a nivel de especie mediante gradiente de temperatura temporal por electroforesis en gel, PCR múltiplex y secuenciación del DNA 16S ribosomal.

Los resultados de este grupo demuestran que la flora vaginal predominante en la población estudiada (mujeres sanas) estaba compuesta por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, y *Lactobacillus jensenii*. Ellos señalan que *L. iners* no había sido publicado anteriormente como uno de las especies predominantes en vagina, salvo por Falsen en 1999, quien describió a esta especie por primera vez. La explicación sería que no se puede aislar en los medios de cultivo comúnmente utilizados como el agar sangre ni en el Agar Rogosa.

Un par de años más tarde, en el 2004, Zhou da a conocer su trabajo realizado en cinco mujeres adultas sexualmente activas, sanas, que mediante técnicas moleculares identificó las especies numéricamente dominantes implementando posteriormente un análisis filogenético. Observó que la diversidad de microorganismos que conformaban la comunidad microbiana vaginal era distinta en las mujeres. Las especies de *Lactobacillus* parecían predominar en cuatro de cinco mujeres, no obstante en una mujer tuvo como dominante a *Atopobium spp* mientras que una segunda mujer tuvo un número apreciable de *Megasphaera spp*, *Atopobium spp* y *Leptotrichia spp* ninguno de los cuales había sido demostrado que fuera miembro común del ecosistema vaginal con anterioridad. Entre las mujeres en las que prevalecían los lactobacilos, había dos grupos distintos, cada uno de los cuales consistía de una sola especie. Un grupo de dos mujeres presentó clones genéticamente divergentes que estaban

relacionados con *Lactobacillus crispatus*, mientras que en el segundo grupo de otras dos mujeres había clones de *Lactobacillus iners* que estaban fuertemente relacionados con un filotipo solo. Estos sorprendentes resultados sugieren que los métodos de estudios moleculares pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre la diversidad de especies bacterianas que se encuentran en la vagina y esta información podría ser crucial en la comprensión de los factores de riesgo para diversas enfermedades infecciosas.

Existe un trabajo más reciente de Ravel publicado en mayo del 2011 el cual fue realizado sobre una población de 396 mujeres asintomáticas de América del Norte en el que estaban representados los cuatro grupos étnicos: mujeres blancas, negras, hispanas y asiáticas (Figura 2.1). Se identificaron las especies bacterianas presentes en flujo vaginal de esta población, mediante la pirosecuenciación de genes 16S rRNA. En los resultados describe que las comunidades bacterianas encontradas fueron ubicadas en cinco grupos: en cuatro fueron dominantes *L iners*, *L crispatus*, *L gasseri* o *L jensenii*, mientras que en el quinto había menor proporción de bacterias lácticas y mayor de anaerobios estrictos. Lo que pudo verse en todos los casos fue que la producción de ácido láctico parecía conservarse.

Este autor refiere que las proporciones de cada grupo de microorganismos tuvo una variación significativa entre los grupos étnicos.

También encontró diferencias en el pH vaginal, resultando ser mayor en las mujeres hispanas ($5,0 \pm 0,59$) y en negras ($4,7 \pm 1,04$) mientras que en mujeres asiáticas fue ($4,4 \pm 0,59$) y en blancas fue más bajo aún ($4,2 \pm 0,3$). Por lo tanto es de tener en cuenta estas diferencias en el momento de evaluar los riesgos y la toma de decisiones en el diagnóstico de enfermedades.

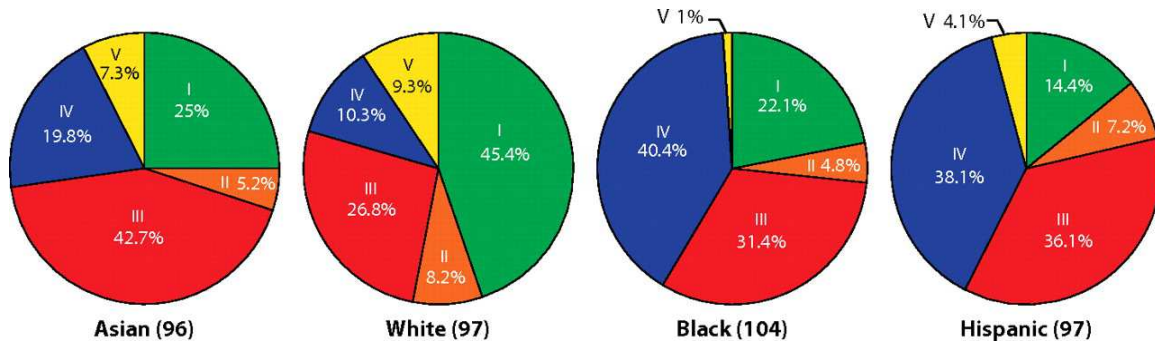


Figura 2.1: Porcentaje de cada especie bacteriana presente en los cuatro grupos étnicos de mujeres estudiadas. Entre paréntesis figura el número de mujeres de cada grupo
 I: *L. crispatus*; II: *L. gasseri*; III: *L. iners*; IV: Grupo diverso; V: *L. Jensenii* (Ravel y cols. 2011)

Resumiendo, podemos decir según hoy se sabe que en la mujer en edad fértil la microbiota vaginal residente está constituida en forma dominante por *Lactobacillus* principalmente por: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners*, seguido por *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus*, quienes constituyen el 80 a 95 % de la flora colonizante de esta mucosa.

2.1.2.- Condición de salud vaginal

Las distintas especies mencionadas de *Lactobacillus* mantienen al ecosistema vaginal en condiciones de salud mediante la producción de sustancias antimicrobianas las que inhiben las bacterias patógenas preservando el estado de salud a nivel vaginal.

Entre las sustancias que producen se encuentran: peróxido de hidrógeno el cual es estable en este medio, bacteriocinas que son altamente activas y ácidos débiles como el ácido acético y láctico los que provienen de la fermentación del glucógeno secretado por las células epiteliales (Aroutcheva y cols. 2001), (Valore y cols. 2002).

La cantidad de H₂O₂ producida en el fluido vaginal de mujeres con microflora vaginal sana fue estimada en 1,0 a 15,5 ug/ml por Al-Mushrif en 1998 y también posteriormente en el año 2006 por Strus y cols.

Definitivamente estudios hechos por distintos autores reflejan que el control de la flora vaginal es un mecanismo complejo en el cual el H₂O₂ cumple un rol principal, se encuentra involucrado entre otros y su actuación depende de la naturaleza de los microorganismos blancos.

Además estos microorganismos son capaces de interferir con patógenos genitourinarios por mecanismos que incluyen la exclusión competitiva de las células superficiales con producción de adhesión inhibiendo compuestos surfactantes, autoagregación, hidrofobicidad superficial y co-agregación con otras especies bacterianas.

En los últimos años se ha pensado, con marcada tendencia, en el uso de Lactobacilos como probióticos con el fin de restablecer el equilibrio ecológico y proteger al tracto vaginal de infecciones por microorganismos patógenos (Atassi y cols. 2006), (Boris y col. 2000).

Entre sus propiedades están la capacidad de degradar lípidos y engrosar la producción de citoquinas que favorecen al desarrollo embrionario en la mujer en la etapa gestacional según relatos de Reid y Bocking en el 2003.

La aplicación de Lactobacilos exógenos en la vagina de pacientes como agentes probióticos brinda una alternativa en cuanto a tratamientos antimicrobianos así como para uso profiláctico generando grandes expectativas.

Pascual en el año 2004 lo demuestra en su tesis doctoral: "Bacteriocinogenia en el género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana".

En el 2011, se hace referencia de la actividad de las bacteriocinas L23 producidas por *Lactobacillus fermentans* y L60 por *Lactobacillus rhamnosus* como inhibidores con una considerable actividad frente a *M. hominis* y *U. urealyticum* (Daniele y cols. 2011).

Según el estudio hecho, ambas bacteriocinas mostraron ser activas en un 100% de las cepas probadas tanto de *M. hominis* como *U. urealyticum*. El efecto antimicrobiano de las bacteriocinas L23 y L60 resultó tan efectiva que pudo observarse aún a 1/8 de la concentración inicialmente usada.

Es por esto que proponen el uso de ellas como una alternativa tanto en la prevención como para el tratamiento de las infecciones genitales femeninas, teniendo en cuenta que algunos tratamientos con antibióticos pueden resultar ineficaces.

2.2.- VAGINOSIS BACTERIANA

2.2.1.- Importancia clínica

Fue en el año 1984 que en Estocolmo se llevó a cabo el Primer simposio Internacional de Vaginosis Bacteriana, donde se denominó a esta patología con el ese mismo nombre, puesto que no es un proceso inflamatorio sino un sobrecrecimiento bacteriano.

Se trata de una infección del tracto genital inferior que puede desencadenar otras patologías como: enfermedad inflamatoria pélvica (Haggerty y cols. 2004), infertilidad (Westrom 1975), parto prematuro (Klebanoff y cols. 2005), e incrementar el riesgo de contraer HIV (Myer y cols. 2005). Está documentado en un trabajo presentado en el 2001 por Cu-Uvin, que la Vaginosis Bacteriana propaga la replicación viral y la diseminación del virus HIV-1, favorece la adquisición, reactivación o transmisión del HSV-2 (Cherpes y cols. 2003), (Watts 2005). También Cohn en el 2005 menciona la relación de mujeres infectadas con HIV y la asociación con la VB.

Entre un 15 a 50% de las mujeres puede presentarse en forma asintomática dependiendo de la población estudiada (Eschenbach y cols. 1988).

Entre los factores de riesgo de esta patología se encuentran: la posesión de más de una pareja sexual, el uso de duchas vaginales frecuentes (Brotman y cols. 2008), los tratamientos hormonales en mujeres en edad fértil (esto modifica la consistencia del moco cervical), la presencia de dispositivos intrauterinos (Holzman y cols. 2001) y también se asocia con el stress (Culhane y cols. 2002).

Los primeros en describir esta enfermedad fueron Gardner y Dukes en el año 1955, quienes inocularon secreción de pacientes con Vaginosis Bacteriana a 15 mujeres voluntarias de las cuales 11 contrajeron la enfermedad, mientras que la inoculación de cultivo puro de *G. vaginalis* a 13 voluntarias dio por resultado que sólo una paciente desarrollara esta enfermedad.

Por otro lado Criswell logró inducir una vaginosis usando un cultivo puro de *G. vaginalis* con alto inóculo en 7 de 29 voluntarias. Con esto quedó demostrada la naturaleza transmisible de la Vaginosis Bacteriana (Criswell y cols. 1969).

En el estudio hecho en 1955 por Gardner y Dukes, demostraron que pudieron aislar *G. vaginalis* de la uretra en 45 hombres de 47 que eran parejas de mujeres con vaginosis y más adelante en el año 1978 Pfeifer detectó *G. vaginalis* en la uretra de 27 de 34 parejas de pacientes con Vaginosis Bacteriana.

El grupo de investigación de Piot, en 1984 aportó evidencias de la transmisión sexual tras obtener cultivos vaginales de 12 mujeres con VB y del cultivo de uretra de sus esposos dentro de las 24 hs. Los biotipos aislados de cada pareja fueron los mismos en 11 de ellas, lo que resultó fuertemente sugestivo de la transmisión sexual ($p = 0,005$).

En el año 2005 Swidsinski observando biopsias de muestras vaginales por medio de fluorescencia con hibridización in situ descubrió que esta patología está asociada con el desarrollo de un biofilm polimicrobiano adherente que contiene abundante cantidad de *G. vaginalis* en el epitelio vaginal.

Esto estaría de acuerdo con estudios anteriores que señalaban a este germen como el predominante en pacientes con vaginosis, mientras que *Lactobacillus* era el predominante en la vagina de pacientes sanas

premenopáusicas. Aunque actualmente se sabe que la especie *L. crispatus* predomina en la flora vaginal normal y *L. iners* en la flora acompañante de la Vaginosis Bacteriana.

La denominación de este síndrome inicialmente como vaginitis inespecífica fue cambiada por Vaginosis Bacteriana fundamentado esto en la ausencia de reacción inflamatoria del epitelio vaginal (Gardner 1983).

2.2.2.- En la mujer en edad fértil

La Vaginosis Bacteriana es una de las causas mas frecuentes de consulta ginecológica, junto a la vulvovaginitis candidiásica. Hay estudios hechos tanto en América como en Europa que hablan de una prevalencia entre 4,9 al 36 %.según una publicación de Morris en el año 2001.

Alrededor de un 50 % de pacientes, porcentaje que varía según distintos autores, suele presentarse en forma asintomática y existen controversias respecto del tratamiento en estos casos, solo se acuerda en general el tratamiento para controlar los síntomas o disminuir los riesgos en complicaciones que puedan surgir después de cirugías ginecológicas.

Si bien se han identificado ciertos factores como propicios en el desarrollo de la VB, como ser: el cambio de parejas o parejas múltiples, uso de dispositivos intrauterinos como anticonceptivos, uso reciente de antibióticos, el hábito de duchas vaginales, el fumar cigarrillos, también hoy lo que se sabe con certeza es que no es una enfermedad que se da como consecuencia de una infección sexual como es el caso de otras ITS.

Algunas pacientes suelen presentar recurrencias por lo que se suele repetir el tratamiento y es menester conseguir una buena recolonización con *Lactobacillus* que garantice una eficiente producción de H₂ O₂ y bacteriocinas.

También se asocia esta patología con un incremento del riesgo de contraer HIV. El mecanismo potencial por el cual la Vaginosis Bacteriana podría

incrementar la transmisión del HIV incluye los efectos sobre los mediadores de la inmunidad local. Por otro lado el H₂O₂ que producen los lactobacilos pueden inhibir in vitro al HIV, de modo tal que esta ausencia en mujeres con VB las vuelve más vulnerables.

2.2.3.- En la mujer durante el embarazo

En el caso de mujeres gestantes, la flora vaginal anormal y la VB están asociadas con un incremento del riesgo de parto prematuro (PP). La prevalencia de VB en el embarazo, según Menard (2010) es del 6 al 55%.

Esta patología está asociada con una endometritis subclínica la que podría crear un medio adverso para el desarrollo del embrión o feto, además existe el riesgo de una corioamnionitis donde se produce un incremento de las citoquinas proinflamatorias y prostaglandinas que podrían derivar en un parto prematuro.

La colonización microbiana en cervix, placenta y líquido amniótico y la producción de proteasa pueden llevar a una ruptura de membrana; también se ha sugerido que el nivel de producción de sialidasa y mucinasa en vagina es mayor en mujeres con VB, estas sustancias podrían interferir favoreciendo el PP.

Se considera Parto Prematuro a aquel nacimiento ocurrido con antelación a las 37 semanas de gestación. Se estima por algunos autores que tiene una incidencia de 5-13 % (Kurki y cols.1992).

Las mujeres con mayor riesgo de (PP) son aquellas donde el diagnóstico de VB se realiza en estadios más tempranos en el embarazo que cuando la gestación esta más avanzada.

Jean Pierre Menard publicó en el año 2010 un estudio donde estima la relación entre la cuantificación vaginal de los principales microorganismos relacionados con vaginosis bacteriana y el riesgo de (PP) en mujeres con trabajo de parto prematuro. Se basó en el uso de métodos moleculares para cuantificar las especies de *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* y

Mycoplasma hominis en muestras de fluidos vaginales de mujeres admitidas para trabajo de parto prematuro espontáneo con membranas intactas.

El resultado de este estudio fue que el riesgo de (PP) estaba significativamente asociado con altas concentraciones en la vagina de *A. vaginae* y *G. vaginalis* en las mujeres con trabajo de parto prematuro.

Anteriormente Ugwumadu analizó en el año 2003 la respuesta al tratamiento temprano en el segundo trimestre del embarazo pensando que esto podría reducir este riesgo en la población obstétrica.

Como conclusión de este estudio se pudo afirmar que el tratamiento con Clindamicina de la flora vaginal anormal así como de la VB en forma temprana, en el segundo trimestre del embarazo, reducía significativamente el riesgo de aborto involuntario así como el nacimiento espontáneo pretérmino en la población obstétrica en general.

En el 2009, Mitchell estudió el uso oral y vaginal con Metronidazol en embarazadas, si bien logra disminuir la concentración de la mayoría de las bacterias anaerobias asociadas a VB, no ocurrió lo mismo con *Leptotrichia*, *Sneathia* y BVAB1 (Bacterial Vaginosis Associated Bacterium) las que no tenían una disminución significativa, aún con la terapia vaginal usando Metronidazol. O sea que la vía de administración del antibiótico tiene un impacto menor en la erradicación bacteriana en mujeres embarazadas con VB.

Los estudios del uso de Metronidazol, no fueron satisfactorios así como tampoco resultó en los estudios del 2003 del uso intravaginal de Clindamicina que si bien lograban la erradicación de la VB, no disminuían el riesgo de parto prematuro, posiblemente porque la concentración de Clindamicina en el endometrio no resultaba efectiva para los microorganismos.

Por lo tanto pudo verse que el inicio de tratamiento sistémico con Clindamicina, mejoraba las posibilidades de modificar los riesgos asociados a la flora vaginal anormal y la VB.

2.3.- MICROBIOTA NORMAL VERSUS VAGINOSIS BACTERIANA

Hasta ahora hemos visto que por estudios hechos por Vásquez y cols en el 2002, así como los realizados por Rabe y Hillier en el 2003, revelaron el predominio de las especies de *Lactobacillus*, en mujeres e su etapa fértil. Estos cumplen el rol protector mediante la producción de ácido láctico, H₂O₂ y bacteriocinas que actúan como antibacterianos inhibiendo a los patógenos y preservando el estado saludable de este nicho ecológico vaginal.

En el caso de pacientes con Vaginosis Bacteriana puede observarse la pérdida de muchas de estas especies de *Lactobacillus* salvo *L. iners* y la adquisición de una variedad de bacterias tanto anaerobias como facultativas. Los cultivos de flujo vaginal de pacientes con Vaginosis Bacteriana presentan desarrollo predominante de *Gardnerella vaginalis* y otras bacterias como *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Mobiluncus* spp., que sólo se pueden recuperar si se realiza cultivo anaerobio.

Fredricks hace un estudio de identificación molecular de las bacterias asociadas a la VB el que es publicado en el año 2005 en "*The New England Journal of Medicine*". El y su grupo de investigación pudieron ver que las mujeres con VB tenían una infección vaginal compleja con muchas especies nuevas recién reconocidas incluyendo tres bacterias pertenecientes al orden de los Clostridiales que fueron altamente específicas de la VB.

Quienes también adhieren a este cuadro son distintas especies del género *Mycoplasma*.

Aún se desconoce cuál es el primer acontecimiento en el comienzo de la Vaginosis Bacteriana, si la pérdida de *Lactobacillus* o la adquisición de todo el espectro de Gram negativos que se detectan en este síndrome.

Existe la especulación de que podría tratarse de un proceso simultáneo o de otro desencadenante aún no identificado. El conocimiento de esto esclarecería la patogénesis de la VB.

2.4.- PATOGENESIS DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

Hasta el momento existen dos modelos competitivos que explican la patogénesis de este síndrome:

Uno es el **Modelo de la disminución de *Lactobacillus***:(Figura 2.2) el que sugiere una disminución de lactobacilos productores de H_2O_2 lo que favorece al sobrecrecimiento de los anaerobios y bacterias facultativas derivando en una Vaginosis Bacteriana.

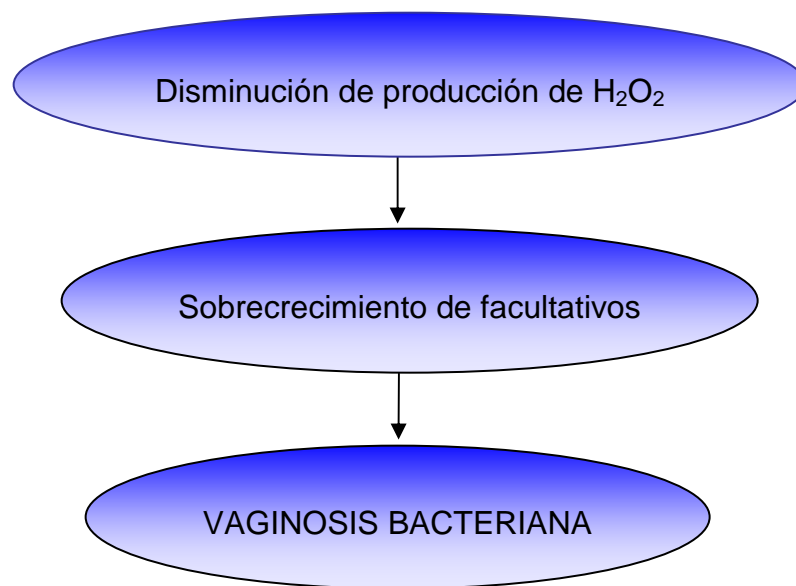


Figura 2.2: Diagrama del Modelo de disminución de lactobacilos

Otro es el **Modelo de patógeno primario**: (Figura 2.3) explica esta patología a través de la entrada de anaerobios facultativos que provocan un desplazamiento de los lactobacilos derivando en este cuadro de vaginosis. También es posible que algún otro factor sea el agente etiológico principal, y que los cambios en la microbiota vaginal reflejen un evento posterior en la patogénesis de la BV (Srinivasan y cols.2008).

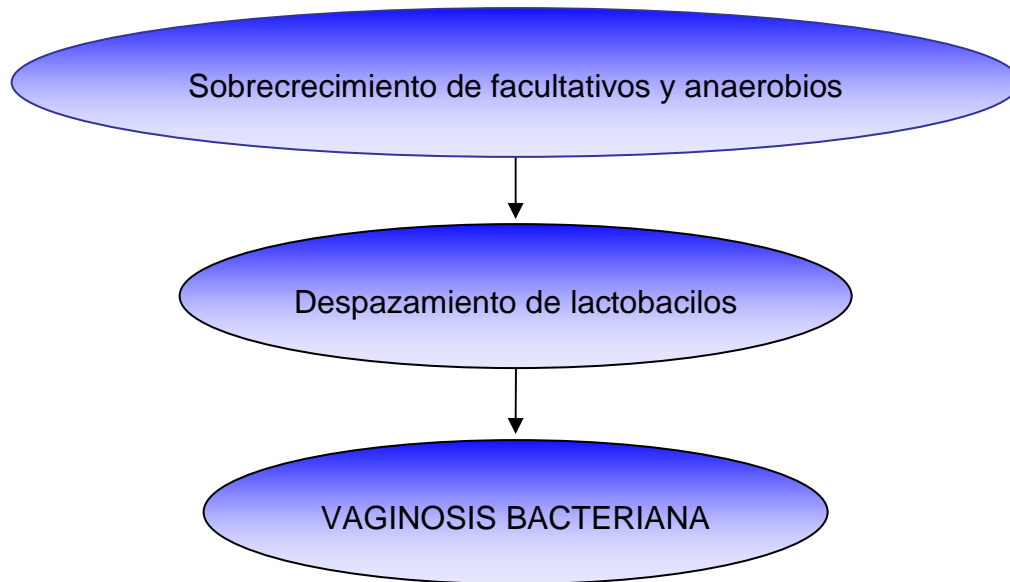


Figura 2.3: Diagrama del Modelo de patógeno primario

Recientemente, el término patogrupo ha sido propuesto para las infecciones polimicrobianas por Dowd y cols., en el año 2008, puesto que ninguna de las especies por si sola es capaz de causar la enfermedad, sino más bien los efectos sinérgicos del consorcio dan lugar a la fisiopatología.

En la actualidad, se conoce mucho más respecto de quienes constituyen la flora colonizante en el estado de salud vaginal como en el de enfermedad. Fue esto lo que contribuyó a que se le asigne hoy una etiología polimicrobiana a la VB (Vontver y cols.1981), (Spiegel y cols.1991).

Siendo éste un cuadro de origen endógeno, suele predisponer a las recurrencias y se podría pensar que existen causas inherentes al huésped que lo hacen vulnerable a la infección y en algunos casos a la reiteración de la misma.

2.4.1.- Microorganismos implicados en la Vaginosis Bacteriana

Este síndrome, se caracteriza por la disminución de la presencia de *Lactobacillus* con sobrecrecimiento de flora anaerobia preexistente (*Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. y especies de *Mobiluncus*), *Gardnerella vaginalis* y micoplasmas genitales lo que provoca un incremento del ph vaginal.

Hoy se sabe que el diagnóstico de Vaginosis Bacteriana se correlaciona con la detección de otros géneros bacterianos anaerobios como *Atopobium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, en las muestras vaginales (Verstraelen y cols. 2004).

De todas maneras puede verse en la literatura que los estudios epidemiológicos de la VB están centrados en la presencia de *G. vaginalis* como patógeno dominante incluso en su aporte para la formación de biofilm. Según Verstraelen lo que no está claro es que se le deba atribuir el rol de iniciador de esta patología.

Si bien se utilizan los criterios de Nugent para establecer el diagnóstico de esta patología, a través de la coloración de Gram pueden detectarse algunos morfotipos, pero otros microorganismos como *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. a quienes se los asocian con la VB, se escapan con esta metodología (Keane y cols. 2005).

Respecto de este último género, hace unos años, se ha separado a *U urealyticum* en dos biovariedades: *U parvum* a quien no se le asigna rol patógeno en el hombre y *U urealyticum* (biovar 2) aislado como agente etiológico de uretritis (Deguchi y cols. 2004), (Povlsen y cols. 2002).

Aún no hay suficientes estudios para conocer bien cual es el rol de estos microorganismos en la VB.

En el año 2008 Haggerty y cols. publican un trabajo hecho sobre la búsqueda de la relación entre microorganismos comúnmente denominados fastidiosos, la VB y las características clínicas de selección de la VB. Para esto estudiaron una población de 50 mujeres sin endometritis gonocócica ni clamidial

cuyas muestras endometriales y cervicales fueron utilizadas para la búsqueda de *Leptotrichia sanguinegens/amnionii*, *Atopobium vaginae*, bacterias asociadas a la VB (BVAB1), *Ureaplasma urealyticum biovar 2 (UU-2)* y *Ureaplasma parvum*, utilizando PCR.

Estos autores llegaron a la conclusión de que *L sanguinegens/amnionii*, *A vaginae* y BVAB1 están asociados con las características clínicas coincidentes con VB definida por los criterios de Nugent y Amsel. El estudio hecho respecto de *Ureaplasma urealyticum biovar 2 (UU-2)* y *U parvum* permitió ver que no están directamente relacionados con VB, pero sí con la uretritis no gonocócica en hombres.

Deguchi y cols., en el año 2004, en cambio sólo recuperaron UU-2 en uretritis no gonocócica, no así *U parvum* (biovar 1).

Haggerty y cols. también señalan que estas bacterias antes mencionadas, llamadas fastidiosas, pueden causar infecciones aún no reconocidas.

En China, se publicó en el 2010 un análisis molecular de la flora bacteriana presente en la VB diagnosticada en 50 pacientes y su comparación con la flora de 50 mujeres controles sanas (Figura 2.4). Los phyla más predominantes en la vagina de pacientes controles fueron Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria (Ling y cols. 2010).

Hay tres filos que son marcadores de condiciones de salubridad: Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria y ocho géneros que incluyen: *Gardnerella*, *Atopobium*, *Megasphaera*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Leptotrichia/Sneathia*, *Prevotella* y *Papillibacter* los que están fuertemente asociados con la VB ($p < 0.005$) (Figura 2.4). Estos géneros son potencialmente excelentes marcadores y podrían ser usados como indicadores de VB para el diagnóstico molecular.

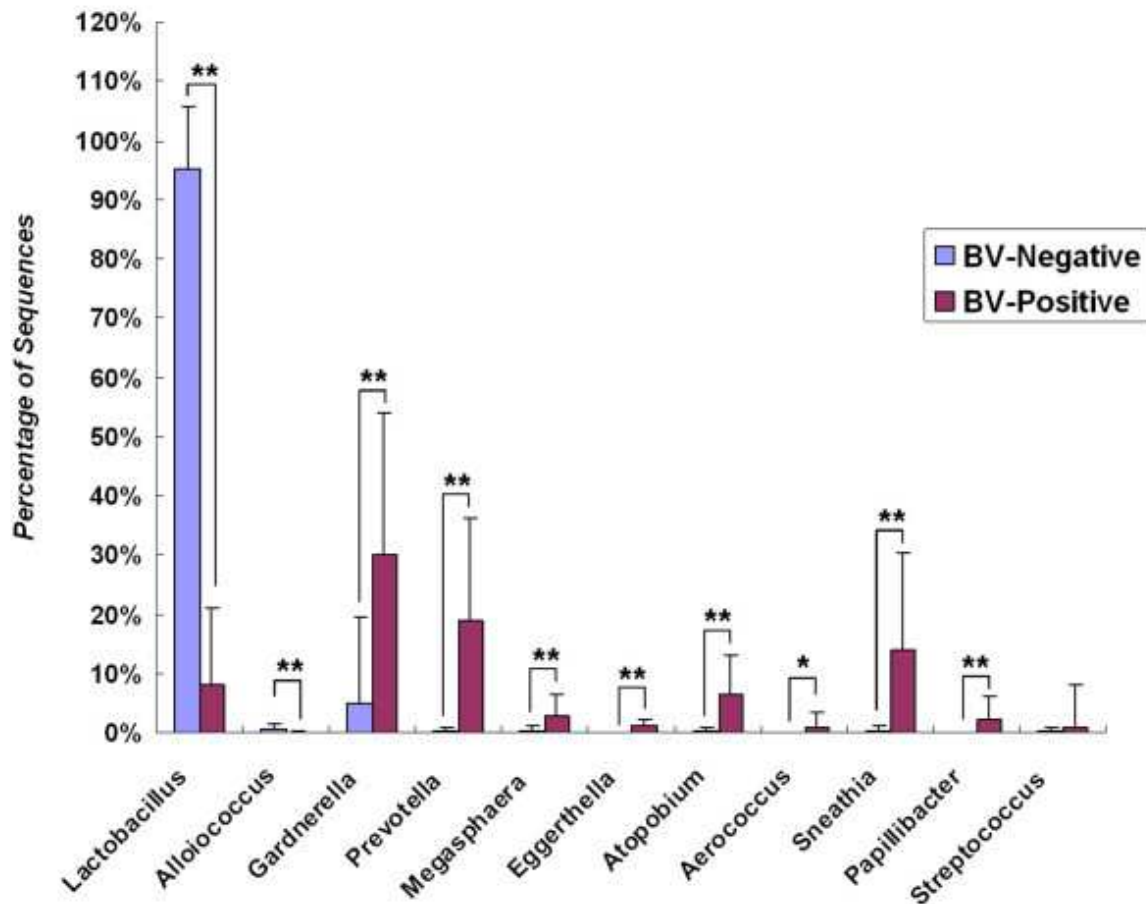


Figura 2.4: Géneros predominantes detectados en vagina de mujeres con VB y sin VB. Entre los géneros predominantes, *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Alloiococcus*, *Sneathia*, *Prevotella*, *Papillibacter*, *Megasphaera*, *Eggerthella*, *Aerococcus* se encontraban asociados significativamente con VB (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). A excepción de *Lactobacillus* y *Alloiococcus*, los que fueron detectados en niveles mayores, otros géneros fueron más abundantes en pacientes con VB. (Ling y cols.2010)

2.4.2.- Rol patógeno de *Gardnerella vaginalis*

Indiscutiblemente, la vagina está colonizada por numerosas bacterias anaerobias en VB. Pero ha sido un tema de debate desde hace décadas si los síntomas y el síndrome son una consecuencia de la asociación de varias especies, o de alguna forma es una especie clave en cada caso, que precipita el trastorno.

Un estudio hecho por Criswell y cols. en 1969 del seguimiento del comportamiento de *G. vaginalis* inoculada en pacientes voluntarias demostró el inicio de la infección, lo que sugeriría que, en condiciones de fomentar la expresión de determinantes de virulencia, *G. vaginalis* puede tener mayor potencial patogénico. Por otra parte, estudios recientes de Swidsinski y cols., en el 2005 y posteriormente en el 2008 Gelber han indicado que *G. vaginalis* está provista de una serie de factores de virulencia, y por consiguiente la idea de que es el agente etiológico de la VB está siendo reafirmado por estos autores.

Actualmente existen estudios que explican la resistencia a ciertos tratamientos atribuibles a los biofilms bacterianos (Patterson y cols. 2007).

Tal vez en un futuro cercano se desarrollen nuevas estrategias terapéuticas basadas en la degradación enzimática de estos biofilms que complementen o reemplacen a los tratamientos antibióticos actuales.

Por lo tanto aún hoy siguen las controversias acerca de este síndrome sinérgico polimicrobiano y que pareciera que lo más sustentable está ligado a la presencia de *Gardnerella vaginalis*.

2.4.3.- Rol patógeno de Micoplasmas (*Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp.)

Es en el año 1937 que se hace una primer referencia del hallazgo de micoplasmas, los que ahora llamamos *Mycoplasma hominis*, en un absceso de las glándulas de Bartolino por Dienes y Edsall.

Ureaplasma spp. puede encontrarse tanto en mucosa vaginal como cervical en un 40 a 80% de mujeres asintomáticas maduras mientras que *M. hominis* solo en un 21 a 53% (Cassell y cols. 1993).

La importancia de estas dos especies de micoplasmas en su participación en la VB genera discusiones y desacuerdos. Si es sabido que en este síndrome

existe un incremento en el contenido no solo de *G. vaginalis* y bacterias anaerobias sino también de Micoplasmas.

Hay diferencias entre distintos estudios publicados respecto del rol de *M. hominis* y la epidemiología de la VB. Existen autores como Keane y cols. que en el 2000 afirman no haber encontrado *M. hominis* en pacientes sin VB y sí en pacientes con VB en un 53%, mientras que otro estudio publicado por Cedillo y cols. en ese mismo año, aislaron *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. en un 17% y 52% respectivamente de mujeres con VB contra un 2% y 13% respectivamente en grupo control.

Zariffard y cols. en el año 2002. realizan un estudio de los microorganismos asociados a la VB como Lactobacilos, *Gardnerella vaginalis* y *M. hominis* detectados mediante la técnica de real time PCR. Los autores encontraron que *M. hominis* estaba en una frecuencia mucho menor que *G. vaginalis* y además no hallaron diferencia de su presencia en mujeres con y sin VB.

El principal papel de los micoplasmas a nivel genital en la mujer está asociado con la afección durante el embarazo, la infertilidad, parto prematuro e infecciones corioamnióticas en el feto (Abele-Horn y cols. 2000).

La característica de parásito intracelular que vive en armonía con el huésped le permite tener un contacto íntimo con las membranas celulares del hospedero. De esta manera realiza intercambio y asimismo puede inyectar su contenido citoplasmático. Como poseen nucleasas, éstas combinadas con los radicales superóxidos pueden causar un efecto clastogénico pudiendo producir alteraciones cromosómicas (ya sea por pérdidas o reordenamiento en fragmentos de los cromosomas).

Las adhesinas, quienes juegan un rol preponderante en la colonización e infección interaccionan con los receptores de membranas celulares. Son proteínas sialoconjugadas, glucolípidos sulfatados o proteínas modificadas por lípidos. En *Mycoplasma hominis* está presente otra proteína en la superficie denominada Vaa,

codificada por 6 tipos de genes, que pueden activarse o no pudiendo ayudar a su diseminación de célula en célula.

M. hominis en el metabolismo de la arginina, genera energía en forma de ATP por hidrólisis utilizando la vía de tres enzimas dando como productos finales CO₂ y NH₃ lo que es tóxico para las células del huésped (Henrich y cols. 1999), (Boesen y cols. 2001).

Los *Ureplasma* spp. poseen tres fosfolipasas A₁, A₂ y C que al liberar ácido araquidónico inducen el parto prematuro, alterando la síntesis de prostaglandinas E₂ y F₂ debido a la actividad de la fosfolipasa A₂ que induce la liberación de cantidades excesivas de ácido araquidónico inhibiendo así la síntesis de prostaglandinas.

También es sabido que *U. urealyticum* induce la producción de citocinas inflamatorias como TNF α , interleuquina 6 (Li y cols. 2000).

2.4.4.- Rol patógeno de anaerobios (Géneros: *Atopobium* y *Mobiluncus*)

En el año 2004 Haggerty y cols. formulan la hipótesis de que los microorganismos relacionados con la VB estaban asociados con la endometritis en la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). Para investigar esto hicieron un estudio multicéntrico mediante un ensayo clínico randomizado para comparar la eficacia de la hospitalización y tratamiento ambulatorio para los casos leves a moderados de EIP.

Actualmente se sabe que esta entidad clínica tiene etiología multimicrobiana.

Los bacilos Gram negativos y los micoplasmas, tanto *M. hominis* como *U. urealyticum*, fueron aislados del tracto genital superior en mujeres con endometritis y salpingitis. Así como también la VB ha sido asociada con sospecha clínica y subclínica de EIP.

Este grupo demostró la existencia de la asociación entre bacilos Gram negativos anaerobios y cocos Gram positivos anaerobios, microorganismos comúnmente encontrados en pacientes con VB y la endometritis aguda.

De este estudio se desprende que los microorganismos presentes frecuentemente en mujeres con VB ascienden al endometrio provocando una infección del tracto genital superior.

Por ende como consecuencia del estudio, Haggerty recomienda el uso de metronidazol para el tratamiento de todas aquellas mujeres con EIP, de modo tal que mejore la cobertura de los anaerobios, reduzca la frecuencia de infertilidad y embarazo ectópico post tratamiento así como la recurrencia de EIP.

Cauci y cols. en el año 1998 comprobaron que la producción de sialidasas por anaerobios pueden promover la virulencia no solo destruyendo las mucinas sino engrosando la adhesión a las mucosas de otros gérmenes, inhibiendo el efecto protector de la IgA sobre factores de virulencia como la citolisina. También los anaerobios producen distintas proteasas (prolidasas) capaces de clivar las IgA, facilitando el ingreso de otros microorganismos al nicho vaginal alterando así la ecología del mismo.

2.4.4.1.- Género: *Atopobium*

Atopobium vaginae ha sido señalada como una bacteria fuertemente ligada a la VB en el 2005 por autores como Fredricks y cols. y en el 2007 por De Backer y cols. Tanto *Gardnerella vaginalis* como *Atopobium vaginae* son integrantes de la flora vaginal de pacientes sanas y también se encuentran incrementadas en la Vaginosis Bacteriana, detectándose en las infecciones recurrentes aún después de haber hecho tratamiento, comprobado por Bradshaw y cols. en el año 2006 mediante un estudio de control de pacientes tratadas con Metronidazol por vía oral.

Es posible que esta persistencia se deba a la formación de biofilms por ambas bacterias en el epitelio vaginal, que les ayudaría a evadir la terapia antibiótica. Esto fortalece la hipótesis de que *G. vaginalis* y *A. vaginae* son las especies clave en la patogénesis de la VB.

Esta bacteria también se aisló de abscesos de ovario, sangre y membranas amnióticas según se encuentra en distintas publicaciones (Geissdörfer y cols. 2003). Lo que no se sabe aún, es si esta bacteria cumple algún rol patógeno en la VB o simplemente se comporta como un oportunista.

Por un lado es sabido que *Atopobium* produce como uno de los productos metabólicos en mayor cantidad al ácido láctico, el cual previene del crecimiento de microorganismos no deseables en el nicho vaginal y por otro lado algunas especies producen amonio mediante la actividad de dipeptidil peptidasas, esto genera un ambiente propicio como sustrato para microorganismos relacionados con la VB, incluyendo a *G. vaginalis*.

Atopobium vaginae ha sido detectado en sitios donde dispone más de proteínas que azúcares como fuente energética, esto es lo que ocurre en mujeres posmenopáusicas, donde disminuye la disponibilidad de carbohidratos fermentables provenientes del glucógeno presente en las células del epitelio vaginal, resultando un cambio de la microbiota vaginal la cual provee de energía a partir de otras fuentes metabólicas (Cauci y cols. 2002)

Tanto *G. vaginalis* como *A. vaginae* están presentes como constituyentes de la flora normal, pero altas concentraciones de ambos son altamente sugestivos de una Vaginosis Bacteriana.

Las fallas en los tratamientos antibióticos son debidas a la persistencia de ambos microorganismos en los biofilms que forman en el epitelio vaginal (Swidsinski y cols. 2008).

2.4.4.2.- Género: *Mobiluncus*

Entre 1980 y 1990 se le dio importancia a este género por su presencia en gran parte de los extendidos de frotis vaginales de pacientes con VB donde se describía la presencia de bacterias curvas en las células guía.

En 1984, Spiegel y cols. reconocen dos especies: *M. mulieris* y *M. curtisii*. en base a reacciones bioquímicas y estudios de homología del DNA.

M. curtisii fue posteriormente dividido en dos subespecies: *M. curtisii* subespecie *curtisii* y *M. curtisii* subespecie *holmesii* (Spiegel y cols.1984).

En cuanto a su rol patógeno se lo asocia con la producción de abscesos umbilicales (Sturm y col.1984), en mamas (Bennett y cols.1989), cuero cabelludo de neonatos, además se asocia con RPM y prematuridad (Spiegel 1991).

En 1993 Taylor-Robinson y cols. identificaron la citotoxina de *Mobiluncus* que es capaz de desprender monocapas celulares o inducir la pérdida de cilias en células cultivadas de oviducto. Si bien la excreción de la toxina es leve, su efecto parece potenciarse cuando este germen coloniza el epitelio vaginal adhiriéndose mediante su flagelo.

En 2008 Meltzer estudió la asociación de *Mobiluncus curtsii* con las recidivas de la VB, encontrando en un estudio de seguimiento del tratamiento de pacientes con VB, que había asociación entre la persistencia de *M. curtsii* y la reiteración de VB entre los 65 a 70 días después de completar el tratamiento inicial. La presencia y persistencia de *M. curtsii* detectado por PCR fue interpretada como que está fuertemente asociado con la recurrencia de VB. Lo que queda en duda es si se trata de un microorganismo patógeno o simplemente es un marcador de grandes disturbios de la flora vaginal.

2.5.- CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

En cuanto a la sintomatología que pueden señalar las pacientes está la presencia de flujo vaginal incrementado con presencia de mal olor o la existencia

de irritación local, aunque una mitad de las mujeres no manifiestan tener estos síntomas no obstante algunos de ellos se detectan en el examen médico.

Puede ocurrir que pase desapercibida esta afección debido a que algunas pacientes podrían considerar que la presencia de flujo estaría dentro de la condición de normalidad.

Para el diagnóstico de la VB se buscan signos que en la pesquisa del examen clínico suelen detectarse, como el hacer el examen pélvico y por otro lado la interpretación la observación microscópica de una coloración de Gram del extendido de fondo de saco vaginal, que ayuda a concretarlo.

2.5.1.- Criterios de Amsel

Para el diagnóstico clínico de VB se utilizan generalmente los criterios de Amsel definidos en 1983, por ser una herramienta práctica y se basan en la presencia de tres de los siguientes signos:

- a) flujo vaginal blanco grisáceo, homogéneo y fluido de consistencia lechosa.
- b) el pH superior a 4,5
- c) la alcalinización del flujo con HOK al 10% produce liberación de aminas
- d) presencia de células guía (clue cells) que son células de descamación vaginal con numerosa cantidad de bacterias adheridas.

No obstante estos criterios que suelen ser útiles para el diagnóstico de la VB no lo son para la totalidad de las pacientes, específicamente no lo es para aquellas mujeres asintomáticas que representan una cantidad cercana al 50%.

Por lo tanto muchas veces resulta subjetivo y además requiere del equipamiento de un microscopio en el lugar de atención de la paciente.

Por un estudio hecho por Keane y cols. en el año 2005 en el Reino Unido, detectaron que los criterios de Amsel eran usados sólo por un 65% de los clínicos y sólo el 31% de los profesionales utilizan los cuatro criterios para su evaluación.

En nuestro país no se encuentran registros del uso de los mismos, pero se promueve su aplicación por sociedades científicas como la Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia (FASGO), en su Guía Práctica Integral de Diagnóstico de Vaginosis-Vaginitis del 2010. (www.fasgo.org.ar/)

2.5.2.- Criterios de Nugent

Estos surgen como alternativa para el diagnóstico de VB basado en los morfotipos que pueden reconocerse mediante la coloración de Gram.

Por un análisis comparativo hecho por Klebanoff y cols. (2004) respecto de la prevalencia de síntomas, entre mujeres con VB (Score de Nugent ≥ 7 por Gram) y sin VB, a través de un interrogatorio sobre los dos síntomas clásicos de la VB como ser si detectaron: olor vaginal fuerte o aumento del flujo vaginal, la conclusión fue que estaban levemente presentes en forma notoria en las pacientes con vaginosis, respecto de las pacientes con ausencia de síntomas.

La alta prevalencia de VB y la falta de síntomas en una proporción considerable de pacientes llevan al interrogante si la VB debería ser considerada como una variante de la microbiota vaginal o una enfermedad.

Debido a que estos hallazgos pueden presentar variaciones entre distintas pacientes se han implementado técnicas microscópicas basadas en la coloración de Gram del frotis de la secreción vaginal. Esto requiere de la participación de profesionales bien entrenados.

Para esto se tiene en cuenta el método de Nugent y cols. (1991).

Este se basa en el reconocimiento microscópico de tres morfotipos bacterianos como son: bacilos Gram positivos (lactobacilos), bacilos Gram negativos y Gram variables (*Gardnerella vaginalis* y *Bacteroides* spp) y bacilos Gram negativos curvos (*Mobiluncus* spp), según puede verse en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Cálculo del valor numérico (score) basado en los morfotipos según Nugent

Morfotipos	Nº de microorganismos/campo microscópico de inmersión				
	ninguno	<1	1-4	5-30	>30
<i>Lactobacillus spp</i>	4	3	2	1	0
<i>Gardnerella</i> y bacilos Gram negativos anaerobios	0	1	2	3	4
<i>Mobiluncus spp</i>	0	1	1	2	2

Puntaje de referencia a asignar en la observación por microscopía de inmersión (x1000) en la evaluación de la composición de la flora vaginal.

El puntaje de cada morfotipo (*Lactobacillus spp*, *Gardnerella* y Bacilos Gram negativos anaerobios, *Mobiluncus spp*) debe sumarse y así tener un puntaje total para su interpretación: VN: 0-3 indica flora vaginal normal; VN: 4-6 flora intermedia; VN >7 indica VB.

El valor numérico (VN) correspondiente a cada uno de los tres morfotipos debe sumarse para obtener el valor final y luego interpretar según se señala a continuación:

-Un VN de Nugent de 0-3 es considerado estado de equilibrio normal (flora lactobacilar)

-En cambio un VN comprendido entre 7-10 nos diagnostica una VB, puesto que se está ante un cambio de flora con ausencia de bacilos Gram positivos y presencia de altas concentraciones de *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp* y/o *Mobiluncus spp*.

Pero si estamos ante un rango de 4-6 se trata de una microbiota intermedia que fluctúa entre los dos extremos anteriormente señalados.

2.5.3.- Sistema simplificado de puntuación de Ison y Hay

Este sistema de puntuación fue una modificación de los criterios diagnósticos de Nugent, hecha en el 2002 por Ison y Hay.

Ellos proponen dos grados adicionales al sistema de Nugent, el grado 0: cuando hay ausencia de bacterias y grado IV cuando sólo tiene flora compuesta por cocos Gram positivos adheridos a las células, que no es considerada flora anormal y suele darse en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico.

Por lo tanto estos autores señalan los 5 grados siguientes: 0, I, II, III y IV; correspondiendo en cada caso la siguiente interpretación:

Grado 0: presencia de células epiteliales sin bacterias

Grado I: es comparable al valor numérico 0-3 de Nugent (flora vaginal normal)

Grado II: comparable al valor numérico de 4-6 (pocos lactobacilos y flora bacteriana mixta)

Grado III: se identifica con el valor numérico de 7-10 de Nugent (flora bacteriana mixta, ausencia de lactobacilos)

Grado IV: solo presencia de cocos Gram positivos.

En este caso solo el grado III es el que señala la presencia de flora bacteriana compatible con una VB.

Quien primero hiciera una descripción de la flora bacteriana vaginal fue Döderlein en 1892, basado en el examen microscópico sin teñir, delimitando tres grados: I correspondía a una vagina limpia donde predominaban lactobacilos, el III la consideraba una flora de Döderlein patológica, en este caso describía una secreción abundante, purulenta o escasa y acuosa, esto se asemeja a una Tricomoniasis o una VB, mientras que el grado II era un estado intermedio, asociado con una flora mixta con pocos lactobacilos.

Hoy en día podemos describir algo más a través de la coloración de Gram Nicolle, pero el conocimiento a medida que avanzan los estudios nos revela un nicho ecológico más complejo, sobre todo si observamos los últimos estudios descriptivos de los integrantes de este ecosistema en la VB a través de técnicas moleculares.

El sistema de puntuación numérica de Nugent para la interpretación de la tinción de Gram del frotis vaginal fue impulsado con la idea de estandarizar el diagnóstico de la VB y aumentar la confiabilidad inter-evaluadores.

Este método muestra una sensibilidad y especificidad mayor en comparación con los criterios de Amsel, aunque el interrogante sobre el riesgo de morbilidad potencial y la necesidad de terapia antimicrobiana en mujeres con flora intermedia siguen sin respuesta.

2.5.4.- Criterios de BACOVA

En el año 2002 Di Bartolomeo y cols. publican un estudio hecho del Balance del Contenido Vaginal (BACOVA) para la expresión del valor numérico en el diagnóstico de la VB cuyo objetivo era validar y normatizar la metodología del estudio microscópico de la disfunción vaginal en nuestro país.

Este grupo elaboró, junto a un grupo de consultores y basado en estudios piloto, el Manual de Procedimientos BACOVA en el año 2004, el que es actualizado anualmente. Como no se ha podido asignar etiología infecciosa a la VB sostienen que carece de sentido el estudio de microorganismos específicos para su diagnóstico.

BACOVA es una metodología que no requiere ni de la determinación del pH ni del test de aminos, sólo se basa en el estudio microscópico de los morfotipos bacterianos mediante la determinación de un valor numérico resultante del estudio de la microbiota presente. Esto se implementa a través de la observación en fresco, coloración de Gram y Giemsa del extendido vaginal.

Como resultado se logra evaluar la flora microbiana presente y la existencia de reacción inflamatoria, presencia de parásitos y levaduras. No se consideran síntomas ni signos, que pueden o no estar presentes.

Los valores numéricos entre 0 y 3 corresponden a una mayoría de lactobacilos por sobre el resto de morfotipos, lo que señala un estado de salud vaginal.

En el caso aquel donde el contenido vaginal muestra un aumento relativo de morfotipos correspondientes a anaerobios y disminución de lactobacilos el informe del VN corresponde al rango entre 4 a 6 (VN intermedio). La presencia de células guía orienta a un estado progresivo de VB y su presencia suma dos puntos al VN real. Esto se toma a partir de una propuesta de Lanzafame y cols. (2000)

En el caso de la VB ese VN corresponde al comprendido entre 7 y 10, en esta circunstancia habrá una ausencia o mínima presencia de lactobacilos con un predominio de morfotipos cocobacilares Gram negativos principalmente anaeróbicos y ausencia de reacción inflamatoria.

Como este criterio tiende al estudio de la disfunción vaginal incluye además de la VB. la pesquisa de las vaginitis (por tricomonas y levaduras) así como las vaginitis inespecíficas.

En el Manual BACOVA se señalan cinco estados vaginales básicos: la microbiota normal, microbiota normal con reacción inflamatoria vaginal, microbiota intermedia, vaginosis bacteriana y por último la vaginitis inespecífica.

En la Tabla 2.2 tomada del Manual BACOVA 2011 se puede ver cuales son los valores numéricos correspondientes a cada uno de los cinco estados vaginales básicos.

Tabla 2.2: ESTADOS VAGINALES BASICOS (BACOVA)

Estado vaginal básico	Valor numérico	Reacción Inflamatoria
I. Microbiota normal	0-3	no
II. Microbiota normal más reacción inflamatoria vaginal	0-3	si
III. Microbiota intermedia	4-6	no
IV. Vaginosis Bacteriana	7-10	no
V. Vaginitis inespecífica	4-10	si

Manual BACOVA 2011

El Valor Numérico informa sobre la proporción relativa de morfotipos bacterianos presentes y la Reacción Inflamatoria Vaginal se expresa mediante el recuento de leucocitos, ambas apreciaciones se realizan sobre una misma

muestra y extendido, siendo lo más apropiado el informe de la relación leucocitos por célula epitelial por campo. Tiene la ventaja de distinguir estados de vaginosis y vaginitis y permite detectar una disfunción estrogénica.

Como conclusión, los autores señalan que estos cinco estados pueden identificarse mediante el examen microscópico del contenido vaginal en todas las mujeres en edad fértil, incluso embarazadas con un 100% de valor predictivo positivo y negativo, en forma independiente de otros parámetros como signos y síntomas. Mediante la integración de criterios tanto de Nugent como Amsel se mejora la sensibilidad y especificidad. Además no deja de ser un método accesible por su bajo costo, sencillo y reproducible entre laboratorios de primer nivel.

El estudio morfológico de BACOVA, esta basado en la relación entre el valor numérico, el que informa sobre el “factor estrógeno” (principal factor sistémico hormonal que regula la función vaginal) y la respuesta inflamatoria vaginal (RIV) que es la respuesta local del sistema inmunológico. Por lo tanto este estudio permite medir los dos parámetros de respuesta en la mujer.

En los últimos tiempos el estudio del valor numérico se destaca como la forma diagnóstica más empleada (gold standard) de la VB. (Forsum y cols. 2008), (Martinez y cols. 2011).

2.6.- *Gardnerella vaginalis*

2.6.1.- Taxonomía: Perspectiva histórica

El primero en mencionar a este microorganismo como con características similares al género *Haemophilus*, aislado de vías genitourinarias (prostatitis en hombres y cervicitis en mujeres), fue Leopold en 1953 y posteriormente lo hacen Gardner y Dukes en 1955, quienes le dan el nombre de *Haemophilus vaginalis* a los cocobacilos Gram negativos aislados de pacientes con una entidad clínica que denominan vaginitis inespecífica.

En 1955 Wurch y Lutz y un año después en 1956 Lutz y cols. indagaron sobre las características culturales y bioquímicas de estos microorganismos aislados de muestras genitales.

En años sucesivos se hicieron diversos estudios respecto de sus requerimientos nutricionales por distintos investigadores: en 1961 Lapage, en 1968 Park y cols. y en 1969 Dunkelberg y Mc Veigh.

Entre estos estudios en el año 1963 se propone una red denominación como *Corynebacterium vaginale* por Zinnemann y Turner, como también posteriormente lo hacen Dunkelberg y cols. en 1970.

Posteriormente a raíz del trabajo realizado por Piot y cols., se encasillan en los grupos 8 y 9 los microorganismos relacionados con este germen como puede verse en su publicación de 1980 "**A Taxonomic study of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955**" en el *Journal of General Microbiology*. En la Tabla 2.3 se muestra una copia de solo los ítems e) y f) de la publicación, por la riqueza de detalles en lo referente al estudio de cepas provenientes de distintos orígenes (cada laboratorio de donde proviene una cepa es señalado mediante la letra C y un número).

Utilizando el ensayo con endonucleasa S1, la hibridación DNA-DNA fue hecha con cepas representativas del estudio numérico así como también fueron incluidas cepas de *Bifidobacterium* y *Actinomyces* ambas de referencia. Encontraron que *H vaginalis* era un grupo genotípicamente legítimo y su DNA mostró homología con el DNA de las cepas marcadoras probadas. La composición de base del DNA de *H vaginalis* fue la misma en un 42 a 44 mol % G+C. También observaron una alta asociación con un grupo formado por *Corynebacterium haemolyticum* y *Corynebacterium pyogenes*, actualmente estas dos especies ya dejaron de pertenecer al género *Corynebacterium*. Esta ubicación tenía que ver con la falta de requerimientos de factores X y V (hemina y NAD), así como la tendencia a retener el cristal violeta usado en la coloración de Gram, lo que

condice más con este género, en lo referente a su estructura de pared. Quienes preferían esta denominación fueron Zinnemann y Turner (1963).

Tabla 2.3: Transcripción parcial de la tabla publicada por Piot y cols. en el Journal of Clinical Microbiology(1980), donde figuran las cepas asignadas a los grupos 8 y 9.

(Description and source of strains assigned to clusters based on pattern differences)

*C43, C43D	<i>Haemophilus vaginalis</i> ; NCTC 10287, ATCC 14018; K. Zinnemann; vagina
C46, C46D	<i>H. vaginalis</i> ; P. N. Edmunds, Fife Area Health Authority, Kirkcaldy, T64 (group 2)
C47, C50.	<i>H. vaginalis</i> ; P. N. Edmunds, T66 (group 2), T34 (group 3)
C121, cC122	<i>H. vaginalis</i> ; R. E. Weaver, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A., CDC 1412, 1413
C54 to C56, C69, C72 to C74, C79, C81 to C83, C85, C86, C89 to C93, C95, C97, C99, C105, C123	Coryneform sp.; ITG 77, 78, 130,285,290,291,293, 803, 822,823,826,828, 831,836, 838, 839, 840,871, 879, 884,898, 801, 805; vagina

(f) Strains assigned to cluster 9 (unclassified coryneforms)

C49	<i>Corynebacterium vaginale</i> ; P. E. Pease, The University, Birmingham, 646 (group 2)
C45	<i>Haemophilus vaginalis</i> ; P. N. Edmunds, TI 45 (group 6)
C108	<i>Streptococcus</i> sp.; ITG 284; vagina
C52, C57, C58, C64 to C67, C70, C76, C80, C88, C98	Coryneform sp., ITG 75, 131, 132, 137, 143, 145, 147,286,296, 806, 833, 886, 300, 146,802; vagina
C118 to C120	
C100	Coryneform sp.; ITG 900; penile ulcer

* Type strains; D, duplicate cultures; C, laboratory numbers.

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md, U.S.A. ; ITG, Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerp, Belgium; NCDO, National Collection of Dairy Organisms, Shinfield, Reading; NCIB, National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden; NCTC, National Collection of Type Cultures, London. (Piot y cols 1980)

La conclusión de Piot y cols. fue que *Haemophilus vaginalis* era una especie que tenía poca similitud con los géneros *Haemophilus* como Gram negativos y *Corynebacterium* como Gram positivos. Por lo tanto debería incluirse en un nuevo género que posiblemente pudiera contener también algunas cepas clasificadas en el grupo 9. En consecuencia apoyan el nombre de *Gardnerella*

vaginalis, según lo propuesto por Greenwood y Pickett (1979) en honor a Gardner, quien fuera el primero en describir la vaginitis relacionada con este microorganismo.

Por lo tanto ellos sugieren la creación de un nuevo género que logre incorporar las cepas conocidas como *H. vaginalis* o *Corynebacterium vaginale* y este nuevo género como lo propusieran Greenwood y Pickett en 1979 sería *Gardnerella vaginalis*. Esto consta en la publicación del año 1980 en el International Journal of Systematic Bacteriology (Greenwood 1980), en ese año ellos presentan la **cepa 594 de Gardner y Dukes como la cepa tipo de *Gardnerella vaginalis*** y la depositan en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection) como **ATCC 14018T** y en la Colección Nacional de cultivos tipo (National Collection of type Cultures) como **NCTC 10287T**.

En el año 1997 en Italia Ingianni y cols. hicieron un estudio de genotipificación de especies de *Gardnerella* a partir de 34 cepas aisladas de pacientes con VB . Tras analizar distintas técnicas moleculares, recomiendan el método de restricción y amplificación ribosomal de DNA (ARDRA) con el cual logran identificar cuatro genotipos (1, 2, 3 y 4). Aunque en este estudio no encontraron correlación entre la vaginosis bacteriana y cualquiera de los genotipos identificados, el método ARDRA es propuesto como una herramienta útil para el estudio de la etiopatogenia y la epidemiología de *Gardnerella vaginalis*.

En el año 2001 se publica un trabajo hecho por Jian y cols. en China basado en un estudio filogenético del género *Bifidobacterium*. Realizaron el análisis filogenético de *Bifidobacterias* y *Gardnerella* usando HSP60 para buscar similitudes genéticas, construyeron un árbol que incluye especies de *Bifidobacterias* y *Gardnerella*. La topología fue básicamente similar a la hecha con 16SrRNA, pero con las siguientes diferencias: en vez de agruparla con la mayoría de las especies de *Bifidobacterium* en el árbol filogenético, *G. vaginalis* forma una rama relativamente independiente con *Bifidobacterium inopinatum*. Los autores

demuestran en este estudio que el gen HSP60 es una herramienta precisa y conveniente para el análisis filogenético del género *Bifidobacterium* por ser un elemento bastante conservado y constante.

En la actualidad este microorganismo está ubicado como:

Phylum: <i>Actinobacteria</i>	<i>Stackebrandt et al., 1997</i>
Clase: <i>Actinobacteria</i>	<i>Stackebrandt et al., 1997</i>
Subclase: <i>Actinobacteridae</i>	<i>Stackebrandt et al., 1997</i>
Orden: <i>Bifidobacteriales</i>	<i>Stackebrandt et al., 1997</i>
Familia: <i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Stackebrandt et al., 1997</i>
Género: <i>Gardnerella</i>	<i>Greenwood & Pickett, 1979</i>
Especie: <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardner & Dukes, 1955*</i> <i>Greenwood & Pickett, 1979**</i>

* En 1955 Gardner y Dukes proponen el nombre de *Haemophilus vaginalis*

** En 1979 Greenwood y Pickett proponen el nombre de *Gardnerella vaginalis*.

A partir de 1980 queda definitivamente esta última denominación registrada en el International Journal of Systematic Bacteriology, mediante la publicación del estudio hecho por Greenwood y Pickett con las justificaciones necesarias que avalaran dicho cambio de denominación.

2.6.2.- Factores de virulencia: adherencia, producción de enzimas sialidasas, citolisina y formación de biofilm

De todos los microorganismos involucrados en la VB, *Gardnerella vaginalis* es el que se ha estudiado más extensamente. Hasta hace un par de años atrás se conocía la existencia de un factor potencial de virulencia por parte de ella que es la producción de una hemolisina así también como la presencia de pilis de adherencia y una cubierta de exopolisacáridos.

Yeonam y cols. en el año 2010 publican un trabajo realizado con dos cepas de *G. vaginalis* aisladas de una paciente con VB y otra proveniente de una paciente sana asintomática pero con un puntaje de Nugent de 9 y compara sus genomas.

Encontraron que algunas de las características comunes de virulencia son evidentes en uno o más de los genomas de las cepas de *G. vaginalis* como la capacidad de degradar la mucina, la citotoxicidad, la hemólisis, la adhesión al epitelio, la producción de biofilm, la recolección de hierro y la resistencia antibiótica.

En los siguientes ítems ahondaré sobre cuatro de esos factores de virulencia de este microorganismo.

2.6.2.1.- Producción de Enzimas: Sialidasas y citolisina

2.6.2.1.1.- Sialidasas: propiedades y mecanismo de acción

Las enzimas bacterianas sialidasas han sido consideradas factores de virulencia de microorganismos patógenos que colonizan mucosas como: *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. agalactiae*. Las mismas están asociadas con la patogénesis de distintas enfermedades como son: difteria, cólera, enfermedad respiratoria, septicemia, etc. (Taylor 1996).

Anteriormente estas eran conocidas como neuraminidasas, son enzimas que rompen las uniones α quetosídicas entre los residuos glicosil de las glicoproteínas, glicolípidos y ácido siálico (Briselden y cols.1992).

Este autor hizo un estudio en mujeres sexualmente activas y detectó altos niveles de actividad sialidasa en mujeres con VB y ausencia de ella en mujeres sin esta entidad clínica.

Varios autores encontraron correlación entre la presencia de sialidasa en el flujo vaginal y la VB. Se ha sugerido que las especies de los géneros *Prevotella* y *Bacteroides* recuperadas en este síndrome, serían las principales productoras de esta enzima (Briselden y cols.1992), (Smayevsky y cols. 2001).

En un trabajo del año 1955 de Odin, se menciona el hallazgo de residuos siálicos en mucinas presentes en el mucus y otros autores sugieren que la degradación de éstas, por enzimas de agentes microbianos, es un factor importante en la patogenia de la colonización bacteriana de las mucosas, por generarse un compromiso local de las defensas del huésped y una provisión de nutrientes a la flora invasora (Corfield 1992), (Gahmberg y cols.1996).

En enero del 2011 Cauci y cols. hacen referencia de la presencia de niveles altos de sialidasa en pacientes con VB dentro de los 12 meses de gestación y una fuerte asociación con trabajo de parto prematuro y posible pérdida del embarazo.

Por lo tanto, puede decirse que las sialidasas mejoran la capacidad de los microorganismos para colonizar y destruir tejidos, jugando un rol importante en la nutrición bacteriana, interacción celular y evasión de la respuesta inmune y por lo tanto en la patogenia.

2.6.2.1.2.- Producción de citolisina

La citolisina es una toxina extracelular descrita por Rottini y cols. en el año 1990, quienes hicieron su detección haciendo crecer cepas de *G. vaginalis* en un caldo tripteína soya suplementado con almidón y Tween 80.

Notaron que es capaz de hidrolizar eritrocitos humanos así como leucocitos polimorfonucleares y células endoteliales. Vieron que es una proteína con un peso molecular comprendido entre 61 y 63 kDa, que lograron purificar del sobrenadante de un cultivo en el medio líquido señalado anteriormente.

La presencia de esta hemolisina se vislumbra alrededor de la colonia de *Gardnerella vaginalis* al crecer en un agar enriquecido con sangre humana.

Esta citolisina tiene una marcada selectividad sobre los eritrocitos humanos, mientras que los glóbulos rojos de otras especies no son lisados o bien necesitan concentraciones mucho mayores que las necesarias para los glóbulos rojos humanos.

Rottini pudo comprobar también que la actividad citolítica fue marcadamente inestable en medios polares pudiendo estabilizarla mediante el agregado de detergentes no iónicos por unión o por inserción en la membrana de las células diana, lo que sugiere su naturaleza anfifílica.

En el año 1993 Cauci y cols. publican por primera vez la detección de Ig A contra la hemolisina en flujo de mujeres con VB.

Logran purificar la citolisina a partir del sobrenadante de un cultivo y señalan que posee un peso molecular de 59 kDa. La hemólisis que produce en glóbulos rojos humanos resulta de la formación de un poro de un radio aproximado de 2,4 nm y comprobaron que esto puede inhibirse por protectores osmóticos.

También pudieron detectar que se produce un proceso de agregación de las moléculas de hemolisina en la membrana de las células diana para crear la lesión. La magnitud y cinética de la hemólisis están relacionadas con la temperatura y una energía de activación de 64,0 kJ mol⁻¹.

Los lípidos de membrana pueden ser inhibidores eficaces de la hemólisis por la citolisina de *G. vaginalis*, siendo capaz de ligar la toxina con mucha avidéz. Para que se dé este efecto inhibitorio se requiere de la presencia de colesterol y resulta más fuerte cuando el colesterol es mezclado con fosfolípidos cargados negativamente en lugar de fosfolípidos bipolares. Según esto pareciera que una carga negativa superficial aumenta la afinidad de la toxina por la bicapa lipídica.

Este grupo de investigación comparó las propiedades funcionales de la hemolisina de *G. vaginalis* con la toxina de *Clostridium perfringens* y la hemolisina de *E coli*, dos hemolisinas, características de Gram positivos y Gram negativos respectivamente. Pese a algunas semejanzas con citolisinas producidas por

bacterias Gram positivas, no pertenecen al mismo grupo ya que son desactivadas por beta-mercaptoetanol y además son distintas antigénicamente.

Este mecanismo de producción de hemolisinas o citolisinas, lisan la célula huésped, resultando probablemente en la producción de compuestos que contienen hierro y la utilización de hierro reductasas (Litwin y cols.1993).

Es poco conocido el mecanismo de adquisición de hierro por *G. vaginalis*, se ha podido verificar que produce sideróforos y es capaz de expresar proteínas reguladoras del hierro.

Jarosik y Land en el 2000 pudieron ver la unión a la lactoferrina humana, presente en la mucosa vaginal en un ensayo de Western blot y detectaron que la actividad de la lactoferrina unida a estas proteínas era estable al calor.

Si *G. vaginalis* era cultivada para hacerla crecer en condiciones de restricción de hierro, se detectaba un incremento en el ligando de la lactoferrina a la proteína de 120 kDa, sugiriendo esto que su actividad puede ser regulada por el hierro.

Existe la hipótesis de que la citolisina está involucrada en la patogénesis de la VB, *G. vaginalis* puede adherir a las células epiteliales (células del amnio) así como a las células vaginales exfoliadas y células de cultivo de tejidos, gracias a la interacción de esta enzima (Sobel y cols. 1981), (Scott y col. 1987). Se piensa que podría contribuir a la virulencia tornando al contenido celular más accesible como sustrato para el crecimiento bacteriano. Esta misma acción citolítica hace al epitelio vaginal más permeable a los viriones del HIV.

Su actividad se ve disminuida notoriamente a pH 4 que es el que tiene una mujer en su estado de salud, pero a pH 5 incrementa su actividad gracias a la producción de aminos por bacterias anaerobias. Por lo que pareciera que la citolisina favorece la sobrevivencia de *Gardnerella vaginalis* mediante la provisión de metabolitos como el hierro necesarios para bacterias como *Bacteroides* y *Prevotella spp.*

Randis y cols. en una publicación del año 2008, dan a conocer la secuenciación y caracterización de la vaginolisina (VLY), la que reconoce la molécula regulatoria complementaria CD59 presente en la superficie de las células del epitelio vaginal.

Se cree que la interacción entre la vaginolisina y el receptor CD59 juega un papel crítico en la patogénesis de la VB así como el desarrollo de complicaciones (Gelber y cols. 2008).

La VLY es selectiva para las células humanas y la especificidad del hospedero se da por el reconocimiento de la molécula regulatoria complementaria CD59. Un residuo de prolina en el undecapeptido de dominio 4 de la VLY es crítico para la mediación en la formación del poro –VLY y la citotoxicidad.

Si se produce una mutación de ese residuo, esto da lugar a la formación de un toxoide que podría ser útil para el desarrollo de una vacuna, según sugieren Gelber y cols.

La caracterización de VLY y su relación evolutiva con otras citolisinas colesterol dependiente, provee más evidencia que *G. vaginalis* debe agruparse con las bacterias Gram positivas, pese a ser considerada Gram variable (Sadhu y cols. 1989).

Randis y cols. piensan que la interacción entre VLY y el CD59 juega un papel crítico en la patogénesis de la VB y el desarrollo de sus complicaciones asociadas. Tal es así que una interrupción en la interacción de VLY con los receptores de la célula del hospedero CD59, puede ser una nueva estrategia para el tratamiento de la VB.

Gelberg y cols. demostraron y publicaron que *G. vaginalis* produce una hemolisina tipo citolisina colesterol dependiente, del grupo de la familia de las citolisinas del CDC y sugieren el nombre *vaginolisina* según las especificaciones de nomenclatura del CDC. Se la define como selectiva para las células humanas y la especificidad del huésped ocurre por el reconocimiento de la molécula reguladora del complemento CD59.

2.6.2.2.- Adherencia

La adherencia es un paso clave en la patogénesis de un microorganismo, para ello *G. vaginalis* posee un pili y una cubierta de exopolisacárido que está ligado a la adherencia de la misma a la células epiteliales vaginales (Clue cells) y a los eritrocitos.

Los microorganismos requieren hierro para sobrevivir, para muchos patógenos la habilidad para adquirir hierro está ligada a su potencial de virulencia.

En el ser humano se puede encontrar hierro en forma de grupo hemo, ferritina, hemoglobina o confinado a proteínas con alta afinidad al hierro tales como la transferrina o lactoferrina.

Para superar esta capacidad de retención de hierro del huésped, las bacterias han desarrollado varios mecanismos de alta afinidad para obtener este nutriente esencial. Un mecanismo útil es el uso de sideróforos, los que son moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad, que actúan como quelantes que remueven hierro de moléculas transportadoras. Después de la unión al hierro, los sideróforos están obligados por los receptores de la superficie exterior de importar el hierro o complejo hierro-sideróforo dentro de la célula bacteriana.

Un segundo mecanismo es la unión directa al hierro que contienen compuestos como el grupo hemo, hemoglobina, lactoferrina y transferrina, a través de receptores específicos de la superficie celular. Para que esto ocurra es primordial que la bacteria tome contacto directo con la célula y éste se establece a través de la adherencia a las células epiteliales.

Mardh y Weström en 1976 demostraron que *G. vaginalis* tiene una tasa de adhesión mayor que las bacterias colonizantes de vagina.

Gardnerella adhiere bien, no solo a las células epiteliales del epitelio vaginal, sino que como lo demostraran Sobel y cols. en 1981 y Scott y Smyth en

el 1987 es capaz de atacar por igual a las células epiteliales exfoliándolas como a células de cultivo de tejidos.

El trabajo de Scott y Smyth por microscopía electrónica de células del epitelio vaginal provenientes de una paciente con vaginosis bacteriana les permitió observar que las bacterias se unían a las células mediante una capa externa fibrilar. Comparando la adherencia de cepas de *G. vaginalis* sobre capas de líneas celulares Mc Coy y eritrocitos humanos pudieron constatar que en el primer caso, la adherencia estaba mediada por una capa fibrilar externa, mientras que la adherencia a los glóbulos rojos podía vislumbrarse a través de fimbrias o pilis.

En el año 1985 Peeters y Piot publican un documento que demuestra el efecto de distintas variables sobre la adhesión de *G. vaginalis* a células del epitelio vaginal por ensayos in vitro.

Las células que usaron provenían de una misma donante que tomaba anticonceptivos orales. Se hicieron ensayos a distintos pH, pretratamientos de las bacterias con luz ultravioleta antes de observar la adherencia, tratamiento con distintos azúcares, además observaron el efecto de concentraciones subinhibitorias de metronidazol y ampicilina. Como resultado del estudio pudieron ver que el rango de pH entre 5 y 6 era el más propicio para la adherencia.

El tratamiento previo con luz ultravioleta así como la oxidación por peryodato afectó notablemente dicho fenómeno, mientras que ningún azúcar produjo inhibición completa de la adherencia. En cuanto al efecto de concentraciones subinhibitorias de metronidazol, éste reduzco apreciablemente la adherencia mientras que la ampicilina no.

Sobel y cols. pudieron comprobar que la adherencia de *G. vaginalis* al epitelio vaginal estudiado en distintos períodos del ciclo menstrual no varia y que la misma incrementa con el aumento del pH de 4 a 8.

Boustouller en 1987 junto a otros investigadores publican la observación de la presencia de pilis en *G. vaginalis* por microscopía electrónica, así como ya había sido estudiado anteriormente por Johnson y Davies en 1984 quienes

describen la presencia de pilis peritricos en estas células de un diámetro entre 3,0 a 7,5 nm.

En 1987 Scott y cols. hicieron un estudio de adhesión en cultivo de células McCoy, que les permitió observar que las células más adherentes se fijaron fuertemente a todas las células y que la propiedad de adherencia parece no verse afectada por subcultivos. El estudio por microscopía electrónica de los cultivos de tejidos con bacterias adheridas les permitió confirmar que la unión es a la membrana celular. De las 105 cepas de *G. vaginalis* un 43%(46) mostró un índice de adherencia mayor al 20%, de esas 46 un 14% (15) tuvieron un índice entre 21-40%, 9 (8,4%) mostraron un índice entre 41-60%, otros 9 tuvieron un índice entre 61-80% y un 12 % (13) tuvieron índice del 81-100%.

Ellos también encontraron correlación entre el índice de adherencia y la presencia de células guía en los extendidos de flujo vaginal, sugiriendo que la formación de estas células estaría relacionados con la capacidad de adhesión de las cepas de *G. vaginalis*. Podría esto ser una característica a favor del rol patógeno de este género.

2.6.2.3.- Producción de Biofilm

Según describen en su publicación Sadhu y cols. ya en el año 1989 por trabajos previos, la flora normal del epitelio vaginal esta conformada por uno o más morfotipos que crecen como microcolonias dentro de un nicho particular. Ellos hacen mención de la presencia de biofilms bacterianos, dentro de los cuales, las células bacterianas exhiben una asociación íntima con el epitelio vaginal a través de sus glicocálices compuestos de exopolisacáridos.

La *biopelícula* o *biofilm* representa una estrategia de supervivencia, por proporcionar una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana de la paciente, además cuenta con un sistema de canales que le permite establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de desecho.

Las biopelículas se comenzaron a estudiar a mediados de la década de 1970, cuando se hablaba de los efectos en los diversos ambientes naturales de estas organizaciones no muy bien comprendidas. Dos décadas después con el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas que permitieron entender la ultraestructura y dinámica de estas asociaciones, se pudo constatar este hecho y se comenzaron a involucrar en múltiples y distintos eventos, que tienen impacto sobre el bienestar del hombre y su entorno.

Otra característica de las biopelículas es su resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos, mientras que los microorganismos aislados (planctónicos) son susceptibles a estos factores de control, las colonias organizadas en el exopolímero forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados. Ni los anticuerpos ni las células del sistema inmune así como los antimicrobianos tienen acceso a los microorganismos más profundos, que por otro lado se encuentran en un estado metabólico reducido lo que los hace menos susceptibles a la acción de estos últimos (Costerton 1999).

También se sabe que los microorganismos se comunican unos con otros. Esto es lo que se ha denominado *quorum sensing*, lo que involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización que median la comunicación intercelular.

Hace mucho tiempo que las bacterias se estudiaban en base a su comportamiento, obteniéndolas de un cultivo puro actualmente denominado bacterias planctónicas. En realidad en la naturaleza los microorganismos tienden a combinarse en grandes colonias que se denominan biopelículas o biofilm.

El Biofilm se define como comunidades de microorganismos que crecen en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o tejido vivo. La composición del biofilm es de H₂O (puede llegar a ser tanto como el 97%), exopolisacáridos y en menor cantidad: proteínas, DNA y productos diversos provenientes de la lisis celular.

La adherencia es la primer etapa de la formación del biofilm, luego la bacteria comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión dando lugar a una microcolonia similar, posteriormente la bacteria comienza a secretar exopolisacárido que es la matriz del biofilm bajo la apariencia de setas entre las cuales se generan canales. Finalmente algunas bacterias del biofilm se liberan para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de formación del biofilm.

Existe un sistema de quórum sensing que regula el proceso de formación del biofilm, depende de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductora, que le permite a la bacteria conocer cuál es la densidad de población existente y responder ante eventuales condiciones de cambio. Los biofilm poseen un medioambiente muy dinámico, donde hay intercambio de material genético (plásmidos), enzimas y otras moléculas.

En los últimos tiempos hay publicaciones que indican que un 65 % de las infecciones bacterianas son producidas por biofilms (Potera 1991), (Lasa y cols. 2005).

Unos de los primeros en describir la capacidad de *G. vaginalis* de producir un biofilm en el epitelio vaginal de mujeres con VB, fueron Swidsinski y cols. en el año 2005. Estudiaron la estructura de la comunidad bacteriana y la organización espacial de la microbiota en las regiones vaginales de distintas biopsias que tomaron como muestras. En total fueron 60 pacientes: 20 con VB y 40 controles de las cuales 20 eran premenopáusicas y 20 postmenopáusicas. Para esto usaron sondas fluorescentes rRNA de oligonucleótidos dirigidos a una amplia gama de bacterias específicas de grupo, para hibridización in situ.

Como resultado del estudio señalan que el desarrollo de la VB está asociada a la participación de una amplia variedad de grupos bacterianos, donde sólo *G. vaginalis* genera un biofilm adherente que es característico de la VB.

Pudieron ver que el biofilm en la VB es altamente organizado y que las células guía son células del epitelio escamoso vaginal cuya superficie está densamente cubierta de bacterias. En su estudio describen que las células del epitelio escamoso se cubren de bacterias generando el biofilm in situ dentro de la mucosa. Por lo tanto con la descamación de esas células se da lugar a la formación de las clásicas *células guía* o *clue cells* (Figura 2.5).

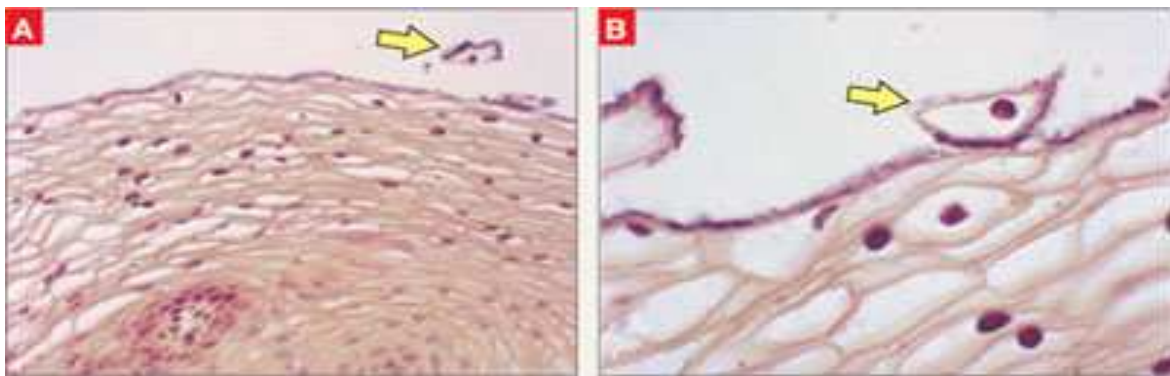


Figura 2.5: Detección de un biofilm continuo en corte histológico teñido con Brown-Hopps modificación de la coloración de Gram, **A:** observación con x 100; **B:** observación con x 250. Descamación de células superficiales vaginales conteniendo biofilm, que pueden verse como clue cells en extendidos vaginales. (Swidsinski y cols. 2005)

Swidsinski y cols. demostraron la presencia de biofilms bacterianos adherentes en un 90% de mujeres con VB mientras que en mujeres sanas solo un 10% se pudo encontrar que exhibieran un biofilm similar.

Patherson y cols. en el año 2010 desarrollan un sistema in vitro, para medir la adherencia, formación de biopelículas y toxicidad de distintas bacterias habitualmente presentes en el epitelio vaginal. Del resultado de esta investigación concluyen que *G. vaginalis* es la única de un grupo de los microorganismos colonizantes vaginales, que forma biofilm y demuestra un aumento de citotoxicidad. Parecería que el estado de biofilm favorece la capacidad de inducir

patología sobre las membranas celulares del epitelio, así como que se suele asociar con la expresión de mayor resistencia a la acción de los antimicrobianos.

2.6.2.4.- Antecedentes de investigación sobre el tema

El interés por el seguimiento de la etiología de las ITS en la población atendida en el servicio de nuestra Cátedra data de hace tiempo atrás. En el año 1999 hicimos un estudio para evaluar la prevalencia de vaginitis y vaginosis en un grupo de 241 mujeres que incluyó tanto a adolescentes como mujeres adultas con un rango de edades entre 13 y 52 años (Belmonte y cols. 2002). Dentro de esta población estaban comprendidas 113 adolescentes entre 13-19 años y 128 adultas entre 20-52 años.

Nuestra incidencia de VB en dicha población de 241 mujeres fue de 49,8% correspondientes a 64 casos dentro del grupo de 113 pacientes adolescentes y de 56 casos dentro del grupo de 128 adultas. La distribución de aislamiento de *Gardnerella vaginalis* según la edad en la población estudiada fue la siguiente (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Porcentaje de aislamiento de *G. vaginalis* en un grupo de 241 pacientes sexualmente activas

Grupo de pacientes	n	Frecuencia / %
Adolescentes	113	64 (26,5)
Adultas	128	56 (23,2)
Total	241	120 (49,7)

(Belmonte y cols.2002)

A su vez se realizó otro estudio retrospectivo dentro de la población adulta separándolas en dos grupos: 70 pacientes con síntomas de vulvovaginitis y 30 controles para analizar entre otros datos el aislamiento de este microorganismo

entre pacientes con y sin presencia de síntomas, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), según se muestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Porcentaje de recuperación de *G. vaginalis* en población de 100 mujeres adultas con y sin síntomas de VB

Tipo de paciente	Sintomáticas % (n=70)	Asintomáticas % (n=30)	Nivel de significación
Agente aislado			
<i>G. vaginalis</i>	41,4	16,7	P<0,05

(Tozzini y col 1998)

En el análisis dentro del grupo de adolescentes también se detectó el predominio de *G. vaginalis* (56.31%) como agente etiológico con nivel de significación mayor ($p < 0,05$) en las pacientes sintomáticas (n=87) respecto de las asintomáticas (n=26).

De esta evaluación de resultados en ambos seguimientos poblacionales se tuvo una frecuencia de aislamiento preponderante de *Gardnerella vaginalis* entre otros agentes etiológicos recuperados en los distintos casos de consultas ginecológicas, lo que se asocia a la prevalencia de la Vaginosis Bacteriana como entidad clínica predominante, pudiendo darse el aislamiento de este germen también dentro de la población asintomática.

Por todo lo visto hasta el momento, llama la atención la falta de claridad en cuanto a la patogenia de la Vaginosis Bacteriana y al rol de *Gardnerella vaginalis* en esta entidad clínica polimicrobiana. Esto generó la inquietud del estudio de la expresión de algunos de los factores de virulencia de *G vaginalis* así como la coexistencia, en nuestra población, con *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma spp* entre otros microorganismos anaerobios.

Es por tal razón es que se inicia esta tesis mediante el planteo de los objetivos que se señalan a continuación.

2.7.- OBJETIVOS

Ante la alta prevalencia de VB en mujeres en edad reproductiva, atendidas en nuestro Laboratorio de la Cátedra de Microbiología y la presencia de un alto porcentaje de pacientes asintomáticas entre ellas, se planteó la posibilidad de estudiar los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* y especies de Mycoplasmas, provenientes de pacientes con VB y pacientes sanas. En esta tesis se enfocó el estudio de la expresión fenotípica de los factores de virulencia de los aislamientos obtenidos de pacientes de ambos grupos, con la finalidad de abordar los siguientes objetivos:

2.7.1.- Objetivos generales

Analizar los factores de virulencia de los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* y valorar el significado clínico de los Micoplasmas presentes en la Vaginosis Bacteriana, provenientes de muestras genitales de pacientes atendidos en nuestro laboratorio de la Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología de la Facultad de Cs Medicas de la UNR, en forma conjunta con profesionales del servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario de la Ciudad de Rosario.

2.7.2.- Objetivos específicos

- 1- Investigar en una población de mujeres sexualmente activas, la presencia de actividad sialidasa en secreción vaginal de pacientes con VB y pacientes asintomáticas, para luego comparar los niveles en ambas.
- 2- Analizar la expresión fenotípica de algunos factores de patogenicidad de *Gardnerella vaginalis* como: capacidad de producción de biofilm y producción de citolisina (vaginolisina) tanto de los aislamientos provenientes de pacientes asintomáticas como en pacientes sintomáticas.

- 3- Estudiar cuál es la frecuencia de aislamiento de los Mycoplasmas recuperados entre los microorganismos asociados a Vaginosis Bacteriana con el fin de conocer la incidencia en nuestra población respecto de pacientes asintomáticas sin evidencia de infección.

3.- DESARROLLO

3.1.- MATERIALES Y METODOS

3.1.1.- Muestras para los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* y Micoplasmas

Los aislamientos clínicos de *Gardnerella vaginalis* fueron obtenidos de hisopados vaginales de fondo de saco previa colocación de espéculo y de los hisopados endocervicales se recuperaron los *Micoplasmas*.

Se estudió un grupo de mujeres atendidas conjuntamente por consultorio externo de ginecología del Hospital Provincial del Centenario y el Laboratorio de Microbiología Parasitología y Virología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Previo a la toma de muestra se acordó con la paciente un consentimiento informado, cuyo modelo se presenta en el Anexo I, para acceder a los resultados obtenidos para los estudios posteriores. Asimismo se contó con la aprobación del tribunal de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas del proyecto de estudio formulado para este fin.

En el momento previo a la toma de muestra se realizó un interrogatorio acerca de: edad de la paciente, motivo de la consulta, tiempo de evolución, si tenía vida sexual activa, su última fecha de menstruación, menarca y ritmo menstrual, también se interrogó sobre alguna medicación actual, uso de bidet, apósitos con desodorantes, tampones, desodorante íntimo, antisépticos. Se interrogó acerca del método anticonceptivo utilizado: dispositivo intrauterino, diafragma, profilácticos, espermicidas, también se tomó constancia del número de embarazos y partos. Juntamente con el ginecólogo se recolectaron otros datos que surgieron de la revisión de la paciente como ser: presencia de dolor en fondo de saco uterino, ardor miccional o dolor, fiebre, tenesmo, puño percusión positiva, poliaquiuria, adenopatías, presencia de lesiones externas. Se indagó también sobre el nivel de instrucción y ocupación.

En la toma de muestra se registró acerca del aspecto del flujo vaginal, pH, test de aminas. Luego se continuó con el estudio en el laboratorio y todos estos datos fueron volcados en la primera parte de la ficha.

En la segunda mitad de la ficha luego de terminados los estudios se asentaron los resultados tanto del registro de pH, test de aminas como los correspondientes a todo lo realizado en el laboratorio.

Se llevó a cabo el estudio de la reacción inflamatoria mediante:

- observación en fresco
- observación por coloración de Gram Nicolle (x 1000 aumentos)
- observación por coloración de Giemsa (x 400 aumentos)
- observación por coloración de Giemsa de la relación de leucocitos/Células epiteliales/campo (x 400 aumentos)
- reacción de leucocito-esterasa.

Se determinó el valor numérico en cada caso según BACOVA y realizó la semicuantificación del hallazgo de *Gardnerella vaginalis* en los cultivos. También se transcribieron los resultados tanto del examen parasitológico como el micológico, además de los datos de detección de micoplasmas.

Esta ficha se encuentra disponible en el Anexo II.

3.1.2.- Aspectos clínicos

3.1.2.1.- Población en estudio

Se estudiaron 154 mujeres en edad fértil (15-50 años) y no grávidas, sin tratamiento antibiótico local ni sistémico en el mes previo a su estudio, con el requerimiento de 48 hs de abstinencia sexual, sin utilización de desodorantes, cremas ni duchas internas (Figura 3.1).

Fueron incluidas en dos grupos que se distribuyeron de la siguiente manera:

- Un grupo de 77 mujeres con vaginosis bacteriana
- Otro grupo de 77 mujeres asintomáticas (controles)

En este segundo grupo se requirió que estuvieran en fecha posterior o anterior de 7 días a la fecha menstrual.

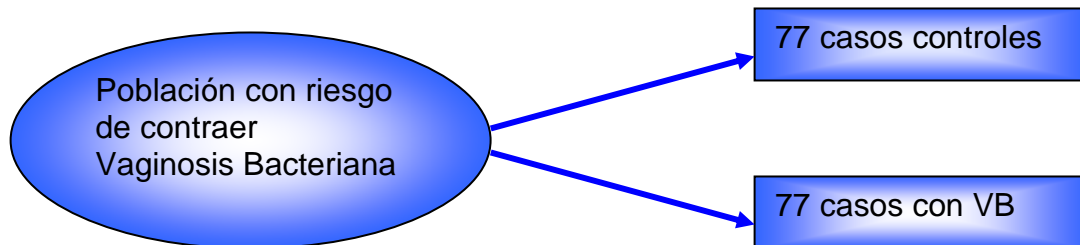


Figura 3.1: Esquema básico del estudio de casos y controles de una población de 154 pacientes sexualmente activas.

VB: Vaginosis Bacteriana

Se hizo un estudio epidemiológico analítico de casos y controles para determinar si la expresión de los factores de patogenicidad de *G. vaginalis* y los micoplasmas que se encuentran implicados dentro del grupo de bacterias anaerobias que coexisten, difieren en ambos grupos.

3.1.2.2.- Criterios de selección de cada grupo

3.1.2.2.1.- Diagnóstico clínico

El diagnóstico de VB fue establecido por la presencia de tres de los cuatro criterios clínicos de Amsel y col.:

- presencia de flujo vaginal homogéneo, adherente, blanco grisáceo
- pH > 4,5
- olor a aminas tras el agregado a la muestra de KOH al 10% P/V
- presencia de células del epitelio escamoso de la vagina, con gran cantidad de bacilos adheridos a su superficie (denominadas células guías).

Los tres primeros criterios fueron evaluados en el consultorio médico. La apreciación de las características del flujo como homogéneo, se consideró como

tal al observarse una secreción blanco grisácea homogénea que cubría las paredes de la vagina al colocarse el espéculo.

El pH se tomó con una cinta de pH sujeta con una pinza que se humectó sobre las paredes del espéculo una vez retirado y sobre el mismo posteriormente se colocaron un par de gotas de KOH al 10% para el test de aminas. Esta prueba fue considerada positiva cuando dio como resultado la presencia de olor a pescado.

3.1.2.2.2.- Diagnóstico bacteriológico

Posteriormente en el laboratorio se realizó el estudio por microscopía con 400 aumentos (objetivo 40x) a partir de la secreción vaginal tomada con el hisopo y descargada en 0,5 ml de solución fisiológica estéril. En esta suspensión se hizo la búsqueda de levaduras y formas flageladas compatibles con *Trichomonas* spp. La presencia de levaduras o parásitos se consideró como condición de exclusión.

También se preparó un extendido entre porta y cubreobjetos para buscar la presencia de células guía (células con muchas bacterias adheridas y bordes oscuros), que son un porcentaje de las células de descamación vaginal. Suelen verse en pacientes con infecciones no crónicas, es por ello que no siempre están presentes (Figura 3.2).

La evaluación mediante el puntaje de Nugent fue otro de los criterios bacteriológicos realizados utilizando los extendidos de flujo vaginal secados al aire y teñidos por coloración de Gram, sobre los cuales se hizo el conteo de los distintos morfotipos visualizados mediante microscopía de inmersión (objetivo 100x). El resultado final luego de la lectura de 10 a 20 campos microscópicos se dio como consecuencia de un promedio de la suma del número de bacterias distintas teniendo en cuenta los criterios de Nugent y aplicando la corrección de Lanzafame de adicionar dos puntos ante la presencia de células guía en valores entre 4 y 6. (Valor Numérico intermedio) (BACOVA)

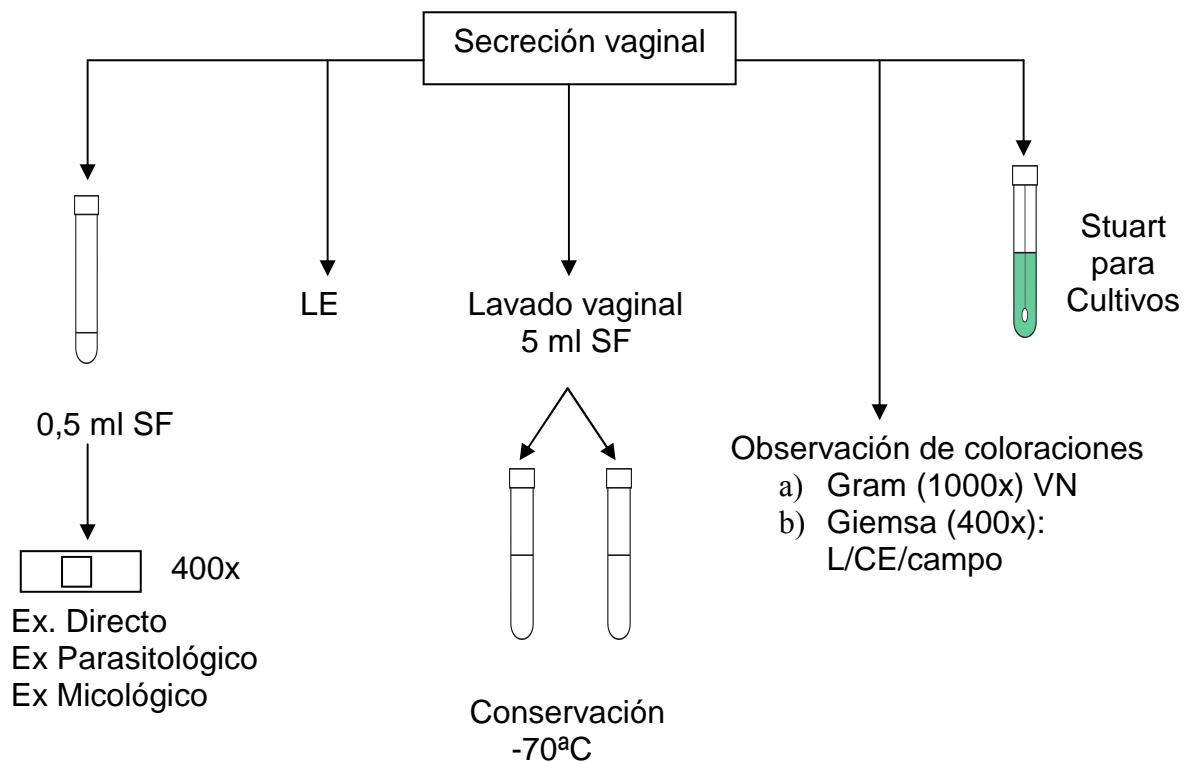


Figura 3.2: Diagrama que señala los distintos pasos seguidos en el estudio de la secreción vaginal de la población estudiada.

SF: Solución Fisiológica estéril; **LE:** Test de Leucocito esterasa; **VN:** Valor numérico; **L/CE/campo:** relación leucocito/célula/ campo con el mismo aumento

Se asignó un valor de 0 a 10 en base a la cuantificación de morfotipos bacterianos presentes: lactobacilos, *Gardnerella vaginalis* o *Bacteroides* spp (bacilos pequeños Gram variables o Gram negativos) y bacilos curvos Gram negativos. Fueron considerados compatibles con VB aquellos patrones microscópicos con puntaje de Nugent mayor o igual a 7, sin reacción inflamatoria. En estas pacientes la recuperación por cultivo fue predominantemente de *G. vaginalis* incluyéndose también aquellas que tuvieron *Mycoplasma hominis* y/o *Ureaplasma* spp. como flora acompañante, pero fueron excluidas aquellas donde se recuperaron otros patógenos ya sea de fondo de saco o de endocervix.

Este grupo correspondió en su totalidad al estado vaginal básico IV: Vaginosis Bacteriana. (BACOVA 2011).

El diagnóstico de pacientes asintomáticas se consideró como tal ante la presencia de los siguientes signos:

- pH \leq 4,5
- test de aminas negativo
- Coloración de Gram-Nicolle con patrones microscópicos que correspondieran al puntaje de Nugent entre 0 y 3 (*)
- Ausencia de reacción inflamatoria

(*) Estado vaginal básico I (Microbiota normal) según BACOVA

Además en los cultivos se debía recuperar *Lactobacillus* spp en forma predominante, pudiendo o no tener muy escasa cantidad de *Gardnerella vaginalis* y/o Micoplasmas como flora acompañante, sin patógenos tanto a nivel de endocérvix como vaginal.

El estudio de reacción inflamatoria se realizó mediante observación en el frotis con coloración de Gram Nicolle con 1000x la relación de leucocitos por campo. También otro frotis de secreción vaginal se fijó con alcohol 96° por 30 minutos para luego realizarle la coloración de Giemsa. Este se observó con una fina capa de aceite de inmersión para contar leucocitos/ campo con 400x y se buscó la relación leucocito/ células epiteliales/campo con el mismo aumento.

Se utilizaron las tiras diagnósticas URS-10 de Teco Diagnostics (California U.S.A.), para la detección de leucocitos en orina mediante la búsqueda de leucocito esterasa (LE). Este test se basa en la detección de indoxil como consecuencia de la hidrólisis por la enzima del ester ácido indoxil carboxílico, reaccionando el indoxil con una sal de diazonio para dar un compuesto de color púrpura. Tiene una escala de colores para comparar que permite relacionar cada color con distintas concentraciones que van de 0, 15, 70, 125 a 500 hematíes/ μ l.

Como criterio de inclusión para la población estudiada (casos controles y casos de VB) no debía haber reacción inflamatoria, por lo tanto en todas las pacientes que conformaron los dos grupos, sólo se detectaron escasos leucocitos.

3.1.3.- Aislamientos de *Gardnerella vaginalis*

3.1.3.1.- Toma de muestras

Se recogió secreción del fondo de saco vaginal, utilizando un espéculo estéril descartable sin lubricar e hisopos estériles. Uno de los hisopos se usó para realizar un frotis de la muestra y la toma del pH, otro se colocó en medio de transporte Stuart (Britania. Bs. As. Argentina) para ser conservado a temperatura ambiente hasta su procesamiento dentro de las dos horas de extraído así como un tercer hisopado que se descargó en 0,5 ml de solución fisiológica para el estudio en fresco. Todas las pacientes tuvieron estudio de búsqueda de patógenos vaginales y cervicales para ser incluídas sólo aquellas que resultaran casos netos de VB o controles.

3.1.3.2.- Examen y procesamiento de las siembras

Las muestras de fondo de saco vaginal se cultivaron como puede verse en la (Figura 3.3), en Agar Base Columbia (Britania) con sangre humana al 5%, Agar Rogosa (Oxoid. Basingstoke Hampshire U.K.), Columbia CNA Agar (Difco Becton Dickinson. BD. Franklin Lakes, NJ. USA) + 5% sangre humana (Golberg y col 1976) en atmósfera de 5% CO₂ incubadas a 37° C por 48hs. Además se sembró en agar Sabouraud (Britania) y Sabouraud Cloranfenicol a 35 y 28°C por 5 días.



Agar Base Columbia
+ 5% Sangre Humana



Columbia CNA Agar
+ 5% Sangre Humana



Agar Rogosa



Agar Sabouraud y
Sab. Cloranfenicol

Figura 3.3: Medios de cultivo utilizados para la siembra de flujo vaginal de la población de 154 mujeres estudiadas

Todo el material como placas e hisopos utilizados para los distintos procedimientos fueron descartables (Greiner bio-one, Mosonmagyaróvár, Hungary).

Las muestras cervicales fueron sembradas en Agar Base Columbia (Britania) con sangre humana al 5%, Agar Chocolate y Agar Thayer Martin (Britania) por 48 hs a 37°C. Además en estas mismas muestras se realizó detección de clamidias por test de ELISA (Abbot Laboratorios Bs As Argentina) y cultivo en medio líquido para micoplasmas (bioMérieux. Marcy l'Étoile, France). De este modo se excluyeron aquellas pacientes con infecciones endocervicales por clamidias, gonococos u otros patógenos (Figura 3.4).



Agar Base Columbia
+ 5% Sangre Humana



Agar Chocolate



Agar Thayer Martin



Medio transporte para clamidias



Medio de transporte e hisopo para Mycoplasmas

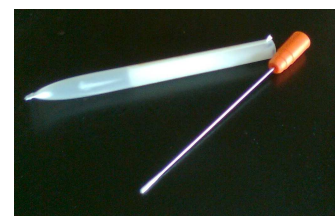


Figura 3.4: Medios de cultivos y equipos comerciales utilizados para el estudio de muestras endocervicales de la población de 154 mujeres estudiadas

En los cultivos vaginales se realizó un recuento semicuantitativo de las colonias resultantes de la siembra realizada a partir del hisopo, conservado en medio de transporte, con el cual se hizo un depósito en un cuarto de placa y luego con asa calibrada se procedió a aislar por agotamiento en cuatro estrías, ver Figura 3.5.

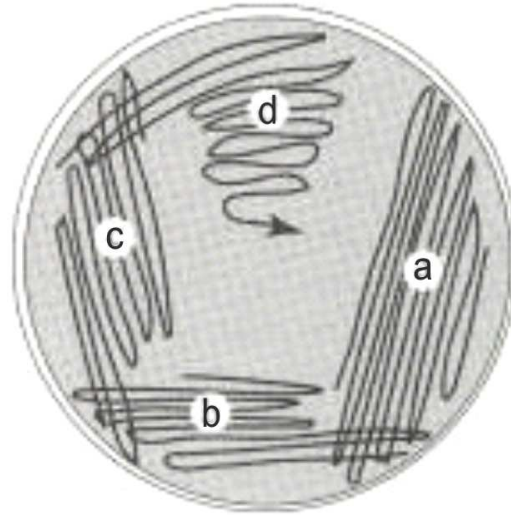


Figura 3.5: Cultivo en placa con asa por agotamiento: **a:** primer depósito del material con hisopo conteniendo la muestra, luego se estría con ayuda del asa siguiendo el orden **b, c** y por último **d**.

Se establecieron 4 grados de interpretación:

0: *Sin crecimiento*

1: *Escaso:* desarrollo hasta la primera estría (a)

2: *Regular:* desarrollo en primera y segunda estría (a y b)

3: *Abundante:* desarrollo hasta tercera y cuarta estría (a, b, c) o (a, b, c y d)

Los crecimientos de *Gardnerella vaginalis* fueron identificados presuntivamente, evaluando las características macroscópicas de las colonias observadas con iluminación brillante directa, de modo que la luz se reflejara de diversos ángulos, con la ayuda de una lupa se detectaron colonias minúsculas transparentes, beta hemolíticas.

Estas colonias fueron luego estudiadas microscópicamente, observándose que eran cocobacilos o bacilos Gram negativos o Gram variables, sin disposición

particular. Las pruebas mínimas de actividad bioquímica o metabólica implementadas para la identificación, son las que figuran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Pruebas mínimas para identificación de *Gardnerella vaginalis*.

Pruebas bioquímicas	Catalasa	Hidrólisis de hipurato	Fermentación de Glucosa	Fermentación de Manitol
Resultado	(-)	(+)	(+)	(-)

3.1.3.3.- Conservación de las cepas aisladas

Se efectuó un repique en Agar Sangre Suplementado (ASS: Agar Base Columbia + sangre humana 5% + Proteosa Peptona N° 3 + Extracto levadura 1%) de las cepas ya identificadas, a fin de enriquecer su desarrollo para posterior conservación.

Se ensayaron dos medios líquidos para la conservación:

- a) Medio CG: Caldo cerebro corazón suplementado con glicerol
- b) Medio MGY: leche descremada con Glucosa, Extracto de levadura y glicerol. Este medio fue propuesto anteriormente para la conservación de *Haemophilus influenzae* (Aulet de Saab y col. 2001).

En el primero (a) se empleó glicerol como crioprotector y en el segundo (b) además de éste se le adicionó leche descremada y un azúcar (glucosa 1%).

Se realizó una suspensión bacteriana en solución fisiológica con turbiedad equivalente al tubo N° 2 Mc Farland = 6×10^8 UFC/ml a partir de un cultivo puro en ASS. Posteriormente fue homogeneizado por toque en vortex a 2800 rpm (Decalab S.R.L. BsAs. Argentina) y sin demora se colocó 1 ml de esta suspensión en cada uno de dos tubos conteniendo 5 ml de medio CG y otros dos con 5 ml de medio MGY.

Estas suspensiones fueron homogeneizadas por vortereado y repartidas en lotes de viales en tubos Eppendorf conteniendo 0,5 ml cada uno (concentración final 1×10^8 UFC/ml), para ser conservados a las temperaturas de -20°C y -70°C .

Para el estudio de conservación se realizaron repiques del inóculo inicial (0 hs.) y posteriormente a las 24 hs., 7, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días, en Agar Sangre Suplementado.

Luego se procedió a evaluar el desarrollo cuantitativamente, verificándose la pureza y morfología microscópica por tinción de Gram.

Se observó que la sobrevida de las bacterias comparadas en los dos medios utilizados, resultó ser más eficaz en el MGY tanto a -20°C como a -70°C , manteniéndose viable hasta los 180 días inclusive con un 100% de recuperación. Estos resultados fueron publicados en la Revista Bioquímica y Patología Clínica (Belmonte A y cols. 2008).



Figura 3.6: Eppendorf conteniendo cepas de *G. vaginalis* en el medio de conservación MGY*

*MGY: Leche descremada, glucosa, extracto de levadura y glicerol

En base a estos resultados, se optó por conservar todas las cepas de *Gardnerella vaginalis* recuperadas de la población estudiada en el medio MGY a la

temperatura de -70°C (Figura 3.6), en dos freezer ubicados en distintos laboratorios para evitar pérdidas ante imprevistos por fallas en la refrigeración o energía eléctrica.

Cepas ATCC utilizadas:

Se utilizaron las cepas de referencia, adquiridas por compra a MicroBiologics (St. Cloud, Minnesota USA), procedentes del American type Collection Culture ATCC (Figura 3.7)

Gardnerella vaginalis ATCC 14018 Lote: 410-83-2

Gardnerella vaginalis ATCC 14019 Lote: 252251

Gardnerella vaginalis ATCC 49145 Lote: 643493



Figura 3.7: Cepas ATCC de *G. vaginalis*
(cepas ATCC de *G. vaginalis*: 14018; 14019 y 49145)

Inmediatamente de recibidas fueron repicadas en Agar Base Columbia suplementado con 1% de Proteosa Peptona N° 3 y 1% Extracto de levadura, adicionado de un 5% de sangre humana. Se dejó desarrollar por 48 hs en anaerobiosis a 37°C, se comprobó la viabilidad y pureza. Luego se procedió a su almacenamiento o guarda de referencia. Se conservaron en 20 viales en medio MGY; cada cepa de referencia a – 70 °C, en dos laboratorios de distinta localización para evitar pérdidas en caso de fallas de refrigeración con el fin de preservar el material original y lograr que no tenga más de 3 ó 4 pasajes.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento empleado para las cepas en estudio. Quedó un registro de cada una de ellas del número existente y ubicación.

Para poner en uso se extrajo un solo vial (Guarda de trabajo) el cual se conservó del mismo modo anteriormente mencionado y se utilizó en los distintos ensayos. Una vez agotado el stock, se procedió a extraer el segundo vial (Guarda de referencia).

3.1.4.- Investigación de Micoplasmas

3.1.4.1.- Siembra e identificación

Se utilizó el equipo comercial Micoplasma IST-2 (bioMérieux. Marcy l'Étoile, France) que permite la identificación y cuantificación tanto de *Mycoplasma hominis* como Ureaplasmas. Puesto que *Ureaplasma urealyticum-parvum* sólo pueden diferenciarse por estudios moleculares, en este estudio se hace referencia al género *Ureaplasma spp.* ya que la tipificación se realizó a nivel de fenotipo como se realiza comúnmente en los estudios de materiales clínicos.

La toma de muestra se realizó mediante colocación de un espéculo sin lubricante, previa limpieza del moco cervical con una torunda seca posteriormente descartada. A continuación, se comprimió suavemente el cérvix con el espéculo para introducir el hisopo en el cuello rotando varias veces.

Inmediatamente después de la toma de muestra el hisopo se colocó en el medio de transporte provisto por el equipo (frasco R₁), el que contiene una mezcla de antibióticos y un antifúngico para inhibir el crecimiento de otros microorganismos distintos de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp.. Estas muestras se procesaron dentro de las tres horas de su extracción o bien se conservaron en heladera, no más de 48 hs.

Para realizar la siembra se procedió a vortear el frasco R₁ para desprender la muestra del hisopo y posteriormente se volcaron los tres mililitros de este al frasco R₂ para rehidratar el medio liofilizado contenido en el mismo (Figura 3.8).

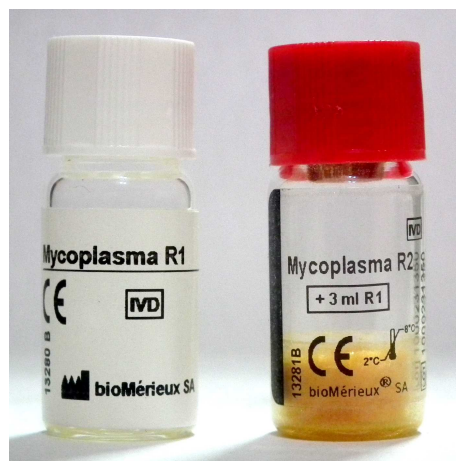
frasco R₁frasco R₂

Figura 3.8: Frascos con medios R₁ y R₂ para Micoplasmas (bioMérieux)
R₁: Medio transporte; R₂: Medio liofilizado

El frasco R₁ contiene 3,1 ml de caldo selectivo con capacidad de inhibición de los principales bacilos Gram positivos y negativos que pudieran interferir en la detección de los Micoplasmas.

El frasco R₂ contiene caldo Urea-Arginina con rojo fenol liofilizado.

La galería provista por el equipo contiene celdas, la 1ª sirve de testigo blanco, la 2ª detecta desarrollo de *Ureaplasma* spp. por contener su sustrato (urea) y Lincosamina como agente selectivo, la 3ª contiene Arginina y Eritromicina para la señalización de la presencia de *M. hominis* si estuviera en la muestra.

En cada celda se sembró 50 µl con micropipeta regulable (EAGLE. Sarasota. U.S.A.) del medio rehidratado y posteriormente se colocaron dos gotas de aceite mineral estéril mediante la cual se obtuvo una atmósfera anaeróbica esencial para el desarrollo de estos gérmenes.

Fueron incubadas a 37 °C por 24 hs. haciéndose una primera lectura y reincubadas por 24 hs más para hacer la lectura final.

3.1.4.2.- Interpretación de resultados

El desarrollo se detecta por viraje del caldo inoculado del amarillo al rojo por alcalinización pero no debe haber turbiedad.

El recuento indicativo se realiza en las celdas 4 y 5, en estas se determina la cantidad o título indicativo de los Micoplasmas presentes o sea:

- a) el viraje del indicador en la celda N°4 señala que *Ureaplasma* spp. está presente en cantidad mayor o igual a 10.000 UFC en la toma de muestra efectuada.
- b) El viraje en la celda N°5 indica presencia de *M. hominis* en cantidad mayor o igual a 10.000 UFC en la muestra extraída.

Las otras celdas permiten un estudio cualitativo de sensibilidad a los distintos antimicrobianos.

En todos los casos positivos se constató la ausencia de otros microorganismos como *Candida* spp que pueden estar presentes y utilizan el mismo sustrato que *Ureaplasma* spp. dando así un falso positivo de la presencia

del mismo. Para ello se efectuó un repique en agar base Columbia sangre para corroborar la ausencia de desarrollo de cualquier otro contaminante.

Por lo tanto para su identificación se tuvieron en cuenta las características metabólicas que los distinguen como se puede observar en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Sustratos metabólicos básicos requeridos por los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*

Géneros:	Sustrato metabólico	
	Arginina	Urea
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	-
<i>Ureaplasma</i> spp.	-	+

Se evaluó el crecimiento en caldo urea-arginina por hidrólisis de estos sustratos ante la presencia de enzimas que en el caso de *M. hominis* dan hidrólisis del caldo arginina degradándola a amoníaco, mientras que en el caso de *Ureaplasma* spp. produce viraje del medio de cultivo por hidrólisis del caldo urea en amoníaco.

Se cuantificó del crecimiento, interpretándose en caso de desarrollo según el siguiente criterio:

Negativo: dilución \leq 1000UFC

Positivo: dilución \geq 10000 UFC

3.2.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD

3.2.1.- Detección de actividad Sialidasa

Se realizó el estudio cuantitativo siguiendo la técnica colorimétrica descrita por Cauci (1998).

3.2.1.1.- Muestra utilizada

La muestra a estudiar fue obtenida por lavado vaginal con 5 ml de solución fisiológica estéril, recogiénose con pipeta Pasteur descartable y colocándolo en dos tubos estériles, los cuales se conservaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

3.2.1.2.- Procedimiento de detección

La cuantificación de la actividad de esta enzima se basa en la hidrólisis enzimática de un derivado del ácido metoxifenil acetil murámico. Esta reacción da lugar a la formación de metoxifenol que al reaccionar con aminoantipirina forma una quinona y en presencia de ferricianuro de potasio (que actúa como agente oxidante) desarrolla un producto coloreado cuya densidad óptica puede leerse a 492 nm.

Se realizó una curva estándar de metoxifenol puro (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, USA) con un rango de concentraciones entre 0.175 y 40 nmoles. Este espectro abarca la concentración de metoxifenol formado a partir de lavados vaginales provenientes de pacientes con VB, según relata la bibliografía de referencia.



Figura 3.9: Microplaca de 96 pocillos utilizadas para la detección de sialidasa

Las reacciones se efectuaron en microplacas (Greiner bio one. Mosonmagyaróvár, Hungary) (Figura 3.9), colocando en cada pocillo 100 μ l de metoxifenol puro en concentraciones decrecientes (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25, 0.175 nanomoles respectivamente), realizándose la dilución con buffer de acetato de sodio 0.1M, pH 5.

Se realizó una curva estándar con los datos obtenidos de las lecturas realizadas a 492 nm.

El estudio de las muestras de lavados vaginales se realizó en micro placas, incubando 100 μ l de los mismos con 100 μ l de sustrato (ácido 2-(3'-metoxifenil)-N-acetil-D-neuramínico) (Sigma), por el término de una hora a temperatura ambiente con agitación. El metoxifenol formado se reveló agregando 50 μ l de L-4 aminoantipirina de 4 mM (Sigma) en buffer Tris HCl 1 M con 1,33 % V/V de etanol y 50 μ l de ferricianuro de potasio 6 mM disuelto en el mismo buffer.

Las determinaciones fueron hechas por duplicado y las lecturas contra blanco de solución fisiológica, dentro de los 15 minutos de terminada la reacción.

La actividad de sialidasa de cada muestra se estableció por extrapolación de los valores de densidad óptica obtenida en la curva de metoxifenol puro y se expresó como nanomoles de metoxifenol formado en la reacción enzimática.

3.2.2.- Producción de Citolisina (VLY)

Se empleó el ensayo de detección de producción de hemólisis de la enzima vaginolisina según la técnica descrita por Rottini (1990).

Se estudiaron cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de la población anteriormente señalada, las que estaban conservadas a -70°C, en medio MGY. El ensayo se llevó a cabo con un inóculo de *Gardnerella vaginalis* expuesto a una suspensión de Glóbulos Rojos Humanos.

3.2.2.1.- Preparación del inóculo

Para realizar este estudio de producción de citolisina primeramente a las cepas conservadas se las repicó en Agar Base Columbia suplementado con 5% de sangre humana (Figura 3.10), en anaerobiosis usando sobres generadores GENbag anaer (bioMérieux) a 37°C por 48 hs.



Figura 3.10: Cultivo de placas sembradas con *G. vaginalis* en anaerobiosis

A partir de este desarrollo de 48 hs, se preparó una suspensión equivalente a $1,8 \times 10^8$ microorganismos por mililitro y se sembró en condiciones de anaerobiosis, 1 ml de dicha suspensión en 10 ml de Caldo Cerebro Corazón suplementado con 0,2 ml de Plasma Humano estéril, 1 ml de almidón al 1% y 0,15 ml de Tween 80 al 20%. Estos tubos fueron incubados por 36 hs a 37°C, en anaerobiosis. (A este desarrollo lo llamamos muestra).

3.2.2.2.- Preparación de la suspensión de Glóbulos Rojos Humanos (GRH)

Se obtuvo sangre de donantes voluntarios (Grupo O factor Rh positivo) por punción venosa con el agregado de citrato de sodio estéril como anticoagulante. Se separó del plasma el paquete de Glóbulos Rojos por centrifugación, para luego suspenderlos en solución Krebs-Ringer-Fosfato pH: 7,4 para tener una suspensión al 1%.

3.2.2.3.- Ensayo de producción de citolisina

Se colocaron 100 µl de la suspensión de Glóbulos Rojos con 1,90 ml del crecimiento de la muestra por un tiempo de 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugó por 5 minutos a 3.000 RPM para separar el sobrenadante conteniendo la hemoglobina liberada por la lisis de los Glóbulos Rojos. Luego se hizo una lectura del sobrenadante a 415 nm con espectrofotómetro (Metrolab S.A. Bs.As. Argentina). Esta determinación se realizó con cada una de los aislamientos, por duplicado en distintos días.

Se tomó como referencia de 2 unidades de hemólisis (UH) a la producida por la mezcla de 100 µl de suspensión de GRH con 1,90 ml de agua destilada (Rottini y cols. 1990).

Se realizó una curva estándar de Unidades de Hemólisis en función de Absorbancia. Para ello se efectuaron las lecturas de absorbancia de 2, 1, 0.5 y 0.25 UH efectuándose las lecturas en espectrofotómetro a 415 nm.

Las distintas lecturas de absorbancia de las cepas ensayadas se efectuaron contra blanco de caldo y luego los valores de las distintas lecturas fueron extrapolados en la curva estándar para así establecer los valores de UH producidos por cada cepa en particular.

Se utilizó la cepa ATCC 14018 (MicroBiologics) como testigo positivo (Figura 3.11).



Figura 3.11: *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 Lote: 410-83-2 (MicroBiologics)

3.2.3.- Detección de formación de Biofilm

La detección de Biofilm se realizó en aislamientos de *Gardnerella vaginalis* procedentes de la población estudiada. Se trabajó con el Sistema de placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con la parte inferior en forma de U, que sirvieron de soporte en un modelo in vitro para el desarrollo de biofilms (Greiner bio one. Mosonmagyaróvár, Hungary) (Figura 3.12).

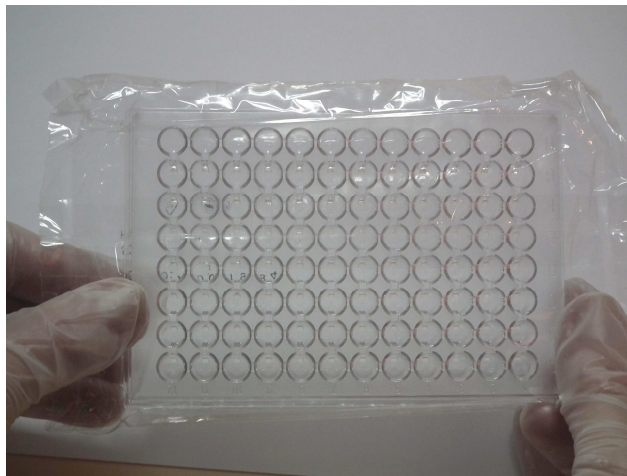


Figura 3.12. Microplacas de poliestireno utilizadas en la producción de biofilms de *Gardnerella vaginalis*

Se tomó como referencia el trabajo publicado en 2007 por Patterson y cols.

3.2.3.1.- Evaluación del medio de enriquecimiento óptimo

Primeramente se realizó un estudio de cinética de crecimiento de *G. vaginalis* en distintos medios de cultivo para su enriquecimiento previo al estudio de biofilms.

Para esto se ensayaron Caldo Tripteina Soja, Caldo Casman y Caldo Cerebro Corazón, con 7 aislamientos de *G. vaginalis* con las que se efectuaron curvas de crecimiento, con el fin de utilizar el medio más conveniente para este ensayo.

3.2.3.2.- Preparación del inóculo

Se estudiaron 10 cepas colonizantes cuyo origen corresponde a la población del grupo control y 10 cepas infectantes, provenientes de la población con VB.

Las cepas conservadas en MGY a -70°C se repicaron en anaerobiosis por el término de 48 hs a 37°C.

Posteriormente se hicieron crecer durante 18 h en CCC como medio líquido de enriquecimiento, con la finalidad de lograr una biomasa celular adecuada para el ensayo. A partir de dicho caldo se usó un inóculo de densidad aproximada 1×10^8 UFC/ ml estimada a DO de 650 nm, por lectura en espectrofotómetro.

3.2.3.3.- Formación del Biofilm

Se utilizó la adición de glucosa al 1% al caldo de siembra, tomando como referencia estudios hechos por otros autores acerca del efecto positivo del agregado de carbohidrato al caldo que se utiliza para la siembra en la formación de biofilm (Christensen y cols.1985), (Patterson y cols. 2007).

3.2.3.3.1.- Técnica de siembra

Se preparó CCC con glucosa al 1% y se inoculó 200 μ l de éste en los distintos pocillos. Posteriormente, en cada uno de ellos se sembró 50 μ l del inóculo de 1×10^8 UFC/ ml de 18 hs de crecimiento de *G. vaginalis* por cuadruplicado para cada aislamiento, dejando al lado de cada una de ellas un pocillo con medio de cultivo sin inocular como blanco de caldo sin cepa. Fue incubado en anaerobiosis por 24 hs a 37 °C. Al cabo de ese tiempo se adicionó nuevamente 200 μ l de CCC con 1% de glucosa, reincubándose nuevamente por 24 hs más en las mismas condiciones anteriores.

3.2.3.3.2.- Lavado y fijación

Cumplido ese tiempo se procedió a retirar el contenido de cada celda con ayuda de una jeringa con aguja colocado el bisel en el costado inferior del pocillo. De esta manera se intentó retirar las bacterias no adheridas al biofilm. Se lavaron cada uno de los pocillos con 200 μ l de PBS por tres veces, para remover totalmente las bacterias planctónicas. Este paso es fundamental, por lo que se debe trabajar con mucha meticulosidad a fin de preservar la capa de biofilm formada. También es importante evitar que queden bacterias que no formen parte del biofilm.

Seguidamente se fijaron con 200 μ l de metanol por 20 minutos, luego se dejaron en posición invertida toda la noche a temperatura ambiente.

3.2.3.3.3.- Revelado

Los biofilms formados en los distintos pocillos se colorearon con 200 μ l de safranina, dejándose en contacto por 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual se procedió a lavar con PBS como se hiciera anteriormente y se dejó secar en estufa a 37°C por 30 minutos más.

Para una mejor lectura del biofilm presente en el fondo y paredes de los pocillos se solubilizó la safranina con 200 µl de ácido acético glacial al 33% v/v colocados en cada pocillo y finalmente se realizó la lectura.

Se utilizó como control positivo a la cepa ATCC 49145 de *Gardnerella vaginalis* por ser formadora de biofilm (Braga y cols. 2010).

Cada cepa fue estudiada en tres oportunidades, por cuadruplicado en días distintos, con el fin de minimizar los errores de la metodología que afectan a la expresión fenotípica en la formación del biofilm, altamente susceptible a las diversas condiciones que se generan durante la experiencia in vivo.

3.2.3.3.4.- Lectura e interpretación

La producción de Biofilms se evaluó en forma cualitativa y cuantitativa.

a) La apreciación cualitativa se hizo en base a la cuantificación graduada del siguiente modo:

0: ausencia de biofilm

(+): producción débil de biofilm

(++): producción moderada de biofilm

(+++): fuerte producción de biofilm

b) La cuantificación se realizó con la ayuda de un lector de placas de microelisa (Teken SUNRISE) con lectura dual, a longitud de onda de medición a 450 nm y longitud de onda de referencia de 620 nm, dando una lectura final correspondiente a la diferencia, con una agitación previa a la lectura de 5 segundos.

Se tomó como punto de corte a un promedio de los blancos de Caldo Cerebro Corazón con 1% glucosa cuya lectura se denominó DO_c . Se estableció la siguiente escala de interpretación según el criterio propuesto por Stepanovic (2007) en su artículo publicado sobre cuantificación de biofilm en microplacas:

$DO < DO_c$ No produce biofilm
 $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$ Producción débil
 $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$ Producción moderada
 $4 \times DO_c < DO$ Fuerte producción.

Tomando como base esta referencia se determinó para cada aislamiento la magnitud de formación de biofilm, en este caso con una apreciación más certera.

3.3.- MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS

Reactivos utilizados en la detección de los criterios de Amsel

pH:

cinta comercial para pH rango (4,0-7,0) Spezialindikator pH (Merck Millipore Alemania)

Test de aminas:

Se utiliza una solución al 10% P/V de hidróxido de potasio, colocándose en el mismo espéculo con el que se extrajo la muestra.

Resultado positivo: olor a pescado.

Medios de cultivos utilizados para el cultivo y aislamiento de las muestras vaginales y cervicales

Medio de transporte Stuart:

Medio de transporte Stuart (Britania Lab. Bs. As. Argentina.) 1,41 g

Agua destilada 100 ml

pH final $7,4 \pm 0,2$

Se deja en contacto el medio comercial para su hidratación por 5 minutos se calienta a ebullición y se esteriliza a 121 °C por 15 minutos. Luego se fracciona en tubos con cierre hermético solidificado en posición vertical. Se conserva en heladera hasta su uso.

Agar Base Columbia Sangre al 5%:

Agar Base Columbia (Britania.)	42,5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 7,3 ± 0,2	

Se disuelve el medio comercial deshidratado calentando con movimiento envolvente. Se fracciona en frascos de 100 ml. Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos. Cuando baja la temperatura a 45-50 °C se adiciona por cada 100 ml 5 ml de sangre humana estéril citratada, se homogeniza y fracciona en placas estériles. (Greiner bio-one, Mosonmagyaróvár, Hungary). Se conservan en heladera hasta su utilización.

Agar Rogosa:

Agar Rogosa (Oxoid. UK)	8,2 g
Agua destilada	100 ml
Acido acético glacial	0,132 ml
pH final 5,4 ± 2	

Mezclar el polvo deshidratado y revolver calentando para su disolución llevando a 90-100 °C por 3 a 5 minutos añadir el ácido acético glacial y proceder a su fraccionamiento en placas. Conservar a 10°C hasta el momento de usar.

Columbia CNA Agar + 5 % sangre humana:

Columbia CNA Agar (Difco)*	4,4	g
Agua destilada	100	ml

pH final 7,3 ± 0,2

*Difco Becton Dickinson (BD) Franklin Lakes N.J.U.S.A.

Se disuelve el polvo deshidratado y se calienta con esterilización posterior durante 15 minutos a 121 °C.

Para preparar las placas se deja enfriar entre 45-50 °C para adicionar 5 ml de sangre humana citratada estéril y posteriormente distribuir en placas estériles.

Se conserva en heladera hasta su uso por no más de tres semanas.

Este es un medio selectivo que contiene 10 mg/l de Acido Nalidíxico y 15 mg/l de Colistín que permiten recuperar cepas de *Gardnerella vaginalis* de muestras vaginales. El agregado de peptona de proteasa mejora la recuperación de esta bacteria. La sangre humana permite distinguir la presencia de la misma por su característica producción de beta hemólisis difusa.

Thayer Martin Medio (Britania)

Se disuelve un frasco de 50 ml de Agar Base GC de doble concentración y se deja enfriar a 45-50 °C para adicionarle 50 ml de solución estéril de hemoglobina al 2%, 1ml de suplemento estéril Britalex y 1 ml de la mezcla antibiótica (Vancomicina, Colistin, Nistatina y Trimetoprima), ambos provistos por el mismo equipo. Se homogeniza y distribuye en placas estériles, pudiendo conservarse en heladera por no más de tres semanas.

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* de muestras endocervicales.

Sabouraud Glucosa Agar

Sabouraud Glucosa Agar (Britania)	6,5	g
Agua destilada	100	ml

pH final 5,6 ± 0,2

Mezclar el polvo, calentar hasta disolver, distribuir unos 6 ml en tubos de ensayo tapar con algodón y esterilizar por 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar a 50°C y colocar en plano inclinado para lograr picos de flauta. Conservar en heladera hasta su uso.

La utilización de este medio permite recuperar las especies de *Candida* que pueden estar presentes en pacientes con vaginitis.

Medios de cultivo y reactivos utilizados en la identificación presuntiva

Detección de beta hemólisis:

La observación de hemólisis se realizó sobre un crecimiento de 48 hs a 37°C en atmósfera de CO₂ en Agar Base Columbia (Britania) suplementado con 5 % de sangre humana.

Ensayo de catalasa:

Reacción en portaobjeto: Se tomó un ansada de cultivo puro y abundante de 18-24 hs de incubación, la que se depositó sobre un portaobjeto limpio y sobre el mismo se dejó caer una gota de H₂O₂ al 3% v/v.

Resultado positivo: La descomposición del H₂O₂ se observa por la aparición de burbujas al ser desdoblado por la presencia de la enzima en H₂O y O₂.

Test de hidrólisis de hipurato de sodio:

Se preparó la siguiente solución:

Hipurato de sodio	1	g
PO ₄ H ₂ K 0,067 M	73,2	ml
PO ₄ H Na ₂ 0,067 M	26,8	ml
pH final	6,4.	

Se prepara estérilmente y fracciona en tubos de Khan con 2 ml y conservan a -20°C.

Para realizar la prueba se descongela y fracciona 500 ul en cada pocillo de microplacas de ELISA (Greiner bio-one Mosonmagyarovar, Hungary) y se siembra una ansada abundante de un cultivo de 48 hs, se incuba por 2 hs a 37°C y luego se revela con Ninhidrina al 3,5% (Solución preparada en partes iguales de acetona y butanol).

Lectura a los 5 minutos.

Resultado positivo: color azul púrpura.

Fermentación de hidratos de carbono:(microtest rápido de Piot y col)

Se usó como medio base:

Proteosa peptona N° 3 (Difco)	1,5	g
PO ₄ H Na ₂ . 2 H ₂ O	0,207	g
Rojo fenol	0,005	%
Agua destilada	95	ml
pH final 7,5		

Se esteriliza 15 minutos a 121 °C y se agrega 5 ml de suero de caballo estéril (Hemo G. Rafaela. Sta. Fe Argentina) y 5 ml del azúcar al 20% preparado en solución acuosa estéril.

Se guarda en heladera por un tiempo máximo de un mes.

Para la siembra se fracciona 0,5 ml en tubos de Khan y se siembra un inóculo denso de no menos de 24 hs de crecimiento a 37°C en aerobiosis.

Resultado positivo: La acidificación del caldo se atribuye a la utilización del azúcar, por lo tanto el caldo vira al tono amarillo.

Medios de cultivo utilizados para la conservación de cepas

Agar Sangre Suplementado (ASS):

Agar Base Columbia (Britania)	42,5 g
Proteosa Peptona N° 3	10 g
Extracto de levadura (Britania)	10 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 7,3 ± 0,2	

Se disuelven todos los componentes se esterilizan por 15 minutos a 121 °C y luego al momento de usarse se lleva a 45-50 °C para adicionar 5ml de sangre humana estéril por cada 100 ml de medio de cultivo, para luego plaquear.

Debe conservarse en heladera hasta su uso.

Medio líquido CG:

Cerebro Corazón Infusión (Britania)	3,7 g
Agua destilada	100 ml
pH final 7,4 ± 0,2	

Calentar para disolver y esterilizar por 15 minutos a 121 °C. Una vez enfriado se le agrega 20 ml de glicerol estéril por cada 100 ml de medio. Conservar en heladera.

Medio MGY:

Extracto de levadura (Britania)	0,5 g
Glucosa	1 g
Leche descremada	10 g
Glicerol	15 ml

Se disuelven todos los componentes y se esterilizan a vapor fluente por el término de 30 minutos.

Medios de cultivo y reactivos usados en la detección de Factores de Patogenicidad

Detección de actividad sialidasa:

Buffer Acetato de sodio 0,1 M pH 5

Solución A: Acido acético 0,2 M

11,5 ml de Acido acético glacial (Cicarelli Sta. Fe. Argentina) y se completa a un litro con agua destilada

Solución B: Acetato de sodio 0,2 M

27,2 g de Acetato de sodio $3H_2O$ en un litro de agua destilada

Para lograr el Buffer pH 5 deben mezclarse:

148 ml de la solución A + 352 ml de la solución B + 500 ml de agua destilada.

Buffer Tris HCL 1 M

Tris Base 121,1 g

Disolver en 700 ml de Agua destilada

Se lleva a pH 7,4 con el agregado de 70 ml de HCL concentrado

Se completa a volumen de 1 litro con Agua destilada.

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

Solución de L-4 aminoantipirina 4mM

L-4 aminoantipirina (Sigma)* 0,813 g

Buffer Tris HCL 1M 1.000 ml

* Sigma Aldrich St. Louis, U.S.A.

Conservan en lugar fresco al abrigo de la luz.

Solución de Ferricianuro de Potasio 6 mM

Ferricianuro de potasio (Sigma) 2,21 g

Buffer Tris HCL 1M 1000 ml

Conservar a temperatura ambiente en frasco oscuro.

Detección de citolisina:

Caldo Cerebro Corazón:

Caldo Cerebro Corazón (Britania)	3,7	g
Agua destilada	100	ml

pH final 7,4 ± 0,2

Se esteriliza a 121 °C por el término de 15 minutos.

Solución de almidón:

Almidón soluble (Merck Millipore)	1	g
Agua destilada	100	ml

Se envasa en frasco oscuro y esteriliza a 121°C por 15 minutos.

Conservado a temperatura ambiente.

Tween al 20%

Tween 80	2	ml
Agua destilada	10	ml

Se envasa en frasco color caramelo y esteriliza a 121°C por 15 minutos.

Conservar en heladera.

Caldo de crecimiento para producción de citolisina:

Caldo Cerebro Corazón (Britania)	100	ml
Plasma humano estéril	2	ml
Almidón al 1%	10	ml
Tween 80 al 20%	1,5	ml

Este caldo para el desarrollo de *G. vaginalis* fue utilizado para la producción de citolisina. Debe ser preparado en el momento previo a la realización del ensayo.

Solución Krebs-Ringer-Fosfato pH 7,4

Cl Na	7,02	g
PO ₄ HNa ₂	3,41	g
PO ₄ H ₂ K	0,8165	g
Glucosa	2	g
Agua destilada	1000	ml
Llevar a pH final 7,4		

Producción de biofilms:**Caldo Tripteina soja:**

Tripteina soja caldo (Britania)	30	g
Agua destilada	1000	ml

pH final 7,3 ±0,2

Se calienta para disolver y esteriliza 15 minutos a 121°C

Caldo Casman:

Peptona de carne (Britania)	10	g
Extracto de carne (Britania)	3	g
Tripteína Bacteriológica (Britania)	10	g
Dextrosa	0,5	g
Almidón	1	g
Acido p-aminobenzoico (Sigma)	0,05	g
Nicotinamida (Sigma)	0,05	g
Agua destilada	1000	ml

pH final 7,3 ±0,2

Buffer PBS:

Cl Na	8	g
Cl K	0,2	g
PO ₄ HNa ₂	1,44	g
PO ₄ H ₂ K	0,24	g
Agua destilada	800	ml

Ajustar pH a 7,4 con HCL y llevar a un litro con agua destilada.

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C

Conservar a 4-8 °C. Es estable por tres o más meses.

Desechar si aparecen cambios de coloración o precipitados.

Caldo cerebro corazón con glucosa al 1%

Caldo cerebro corazón (Britania)	95	ml
Solución de Glucosa 20%	5	ml

Se prepara el caldo y esteriliza por un lado, la solución de azúcar se esteriliza por filtración y luego se adicionan ambos componentes en forma estéril.

Solución para solubilizar la safranina: (Ac. Acético al 33%v/v)

Acido acético glacial (Cicarelli)	33	ml
Agua destilada estéril	100	ml

4.1.- VALORACIÓN DE LOS CRITERIOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS

4.1.1.- Selección de los casos de VB

El estudio de esta tesis se realizó sobre una población constituida por casos y controles en un total de 154 pacientes mujeres en edad fértil con rango de edades entre 15 y 50 años.

La incorporación de pacientes como casos de Vaginosis Bacteriana se basó en el diagnóstico clínico ante la presencia de tres de los cuatro criterios clínicos de Amsel y col. y se debía constatar en el laboratorio de la presencia de un puntaje de Nugent mayor o igual a 7. Todos los casos seleccionados bajo estas premisas eran casos de vaginosis puros, puesto que previamente se descartaron otros patógenos tanto a nivel vaginal como endocervical, para su inclusión.

Los resultados obtenidos de las pacientes estudiadas fueron volcados en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Valores de frecuencia de los criterios clínicos de Amsel en Casos y Controles de la población estudiada de mujeres sexualmente activas (n=154)

Criterio Clínico	Frecuencia Casos Vaginosis Bacteriana n =77	Frecuencia Casos Controles n =77
Flujo abundante-homogéneo	60	10
pH > 4,5	75	10
Test aminas (+)	60	2
Presencia células guía	72	0

Los tres primeros parámetros descritos en la Tabla 4.1, se realizaron en el consultorio médico y el estudio de presencia de células guía, reacción inflamatoria y valoración numérica por visualización microscópica de la Coloración de Giemsa y Gram Nicolle, se llevó a cabo en el laboratorio.

En la figura 4.1 se muestra la observación de célula guía por microscopía de inmersión con 1000x.

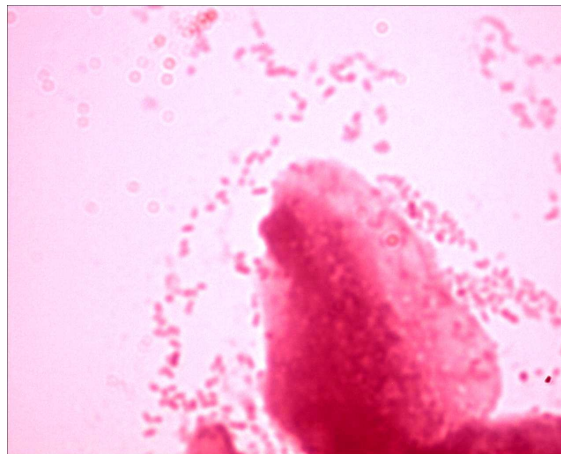


Figura 4.1: Imagen de la observación microscópica con 1000x de un extendido de flujo vaginal con células guía de paciente con Vaginosis Bacteriana. Célula del epitelio vaginal con predominio de bacilos Gram negativos que tachonan toda la célula y pueden observarse mejor en el borde de la misma

Para medir la eficacia de cada uno de los parámetros clínicos utilizados en el diagnóstico de los casos de vaginosis se realizó el estudio de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de cada uno de ellos, mediante el test Exacto de Fisher resultando todos ellos altamente significativos con una $p > 0,0001$ lo que puede verse expresado como distribución porcentual de los parámetros de Amsel en Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Evaluación de los parámetros de Amsel en población estudiada de 154 mujeres sexualmente activas

Criterio Clínico	Frecuencia VB (n=77)	Frecuencia Controles (n=77)	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP* %	VPN** %
pH>4,5	75	10	97	87	88	97
Test aminas (+)	60	2	78	97	97	81
Flujo abundante homogéneo	60	10	78	87	85	79
Presencia Células guía	72	0	93	100	100	94

*VPP: Valor Predictivo Positivo; **VPN: Valor Predictivo Negativo

Los otros parámetros tienen una baja frecuencia de presentación, por ello es que al agregarse la visualización de la flora vaginal presente, según sugiere Nugent se incrementa la certeza del diagnóstico.

Para nosotros uno de los requisitos de inclusión como caso de VB fue que presentara una puntuación numérica de 7 o más y ausencia de reacción inflamatoria.

En la figura 4.2 pueden verse distintos campos microscópicos de un extendido de paciente con puntaje numérico de 10.

Cada frotis de las distintas muestras fue evaluado según el criterio mencionado en la Tabla 2.1.

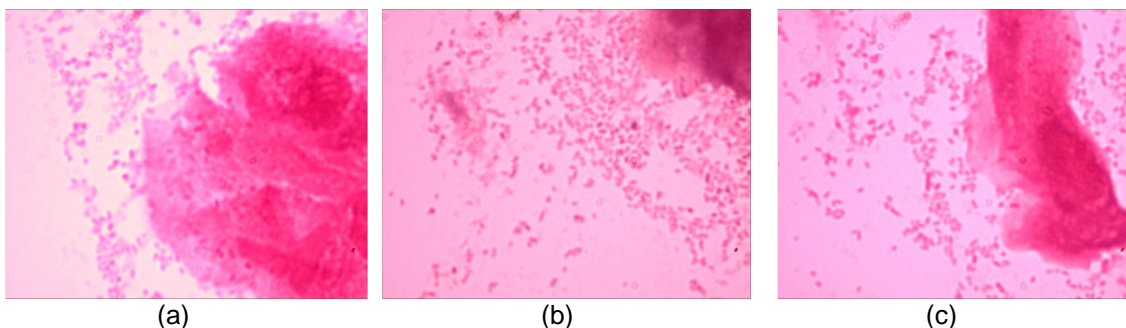


Figura 4.2: Observación de Coloración de Gram de distintos campos microscópicos de un frotis de Exudado vaginal de paciente con puntaje de Nugent =10 (VB según criterios de Amsel)
 (a): campo donde puede observarse una célula guía; (b): campo con gran cantidad de bacterias
 (c): campo con célula guía y gran cantidad de bacilos Gram negativos

En el caso de esta muestra el cálculo del valor numérico final es el siguiente:

- Lactobacillus* spp Ausencia VN:.....4
- Gardnerella* y bacilos gram negativos anaerobios>30 VN:.....4
- Mobiluncus 5-30 VN:.....2
- Siendo el valor numérico final.....10

Las 77 pacientes con VB estudiadas presentaron la frecuencia que se indica en la Tabla 4.3 de los puntajes de Nugent con la corrección de Lanzafame.

Tabla 4.3: Frecuencia de los distintos valores numéricos de Nugent en 77 pacientes con VB según criterios de Amsel

VN* de Nugent + corrección Lanzafame	Nº pacientes n=77
7	24
8	16
9	10
10	27

*VN: Valor Numérico

Un 35 % del grupo con VB presentó un valor numérico de 10, constituyendo todos casos con presencia tanto de células guía como bacilos Gram negativos curvos, estos últimos en cantidad mayor a 5 por campo microscópico de inmersión.

4.1.2.- Selección de los casos controles

El grupo de pacientes controles para su inclusión debían presentar tres de los cuatro parámetros siguientes: pH menor o igual a 4,5, test de amina negativo, valor numérico entre 0 y 3, flujo homogéneo. En todos los casos hubo aislamiento en forma predominante en el cultivo de flujo vaginal de *Lactobacillus* spp, pudiendo tener o no en escasa cantidad *Gardnerella vaginalis* o Micoplasmas como flora acompañante, pero con ausencia de reacción inflamatoria.

Dentro de este grupo hubo 10 pacientes con pH 5 las cuales presentaron tests de amina negativos, valores numéricos entre 0-3 y se aisló en todos ellos *Lactobacillus* en forma predominante. En la figura 4.3 se puede observar un caso de valor numérico 0, correspondiente a una paciente de la población estudiada.

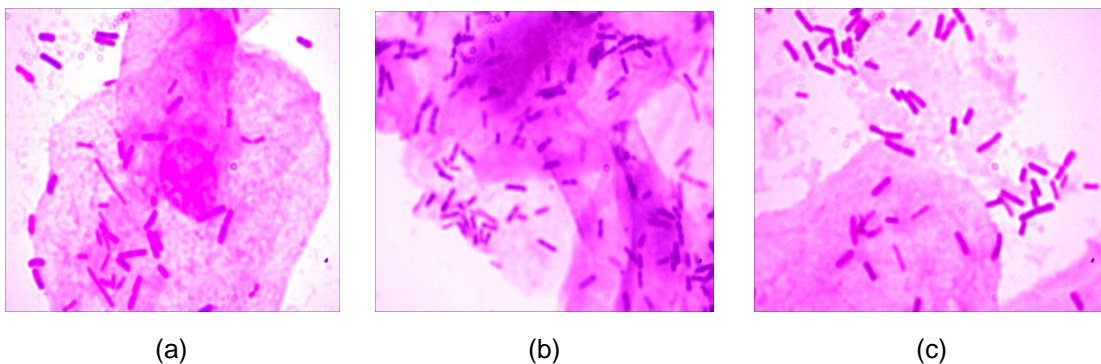


Figura 4.3: Observación de Coloración de Gram de distintos campos microscópicos de un frotis de Exudado vaginal de paciente con puntaje de Nugent = 0 (microbiota normal)

La cuantificación de cada morfotipo en esta muestra es la siguiente:

<i>Lactobacillus</i> spp >30 VN:.....	0
<i>Gardnerella</i> y bacilos Gram negativos anaerobios ninguno VN:.....	0
<i>Mobiluncus</i> spp ninguno VN:.....	0
Corresponde un Valor Numérico final.....	0

Debe tenerse en cuenta que las secreciones premenstruales tienden a llevar a pH menos ácidos, sin haber sangre visible, o también la secreción cervical incrementa el pH, como también la contaminación con semen. Es por esto que las pacientes incluidas dentro de este grupo todas estaban en tiempo de 7 días

posteriores o previos a su fecha menstrual. Y otros de los requisitos de inclusión era la abstinencia sexual por 48 hs. previas al estudio, afirmada por la paciente.

En la Tabla 4.4 se muestran los resultados del grupo seleccionado como control, respecto de los parámetros de Amsel.

Solo dos pacientes presentaron el test de amina positivo, diez tuvieron flujo abundante homogéneo, pero todas estas pacientes cumplieron con todos los demás requisitos para su inclusión y ninguna presentó ambas características al mismo tiempo.

Tabla 4.4: Frecuencia y porcentajes de los parámetros de Amsel en el grupo control de 77 pacientes sexualmente activas

Criterio Clínico	Frecuencia Controles	Porcentaje %
pH>4,5	10	13
Test aminas (+)	2	2,59
Flujo abundante homogéneo	10	13
Presencia Células guía	0	0

El reconocimiento del aspecto del flujo así como el olor a pescado correspondiente al test de aminas son dos pruebas subjetivas, es por ello que cumpliendo las pacientes con todos los demás requisitos fueron incorporadas dentro del grupo control.

Ocho pacientes de este grupo tuvieron recuperación de especies de Micoplasmas y diez tuvieron desarrollo de muy aisladas colonias de *Gardnerella vaginalis* sin dejar de tener un franco predominio de *Lactobacillus* spp.

Respecto de la frecuencia de los distintos puntajes en este grupo, la mayoría de las pacientes presentaron valor numérico de 0 (Tabla 4.5), o sea un 60% (n=46) con predominio neto de bacilos Gram positivos tipo *Lactobacilos* en el extendido vaginal, mientras que el 40 % restante (n=23) tuvo presencia de algunos cocobacilos Gram negativos en cantidades que fluctuaron entre <1/ campo o bien de 1-4/ campo y en solo un 5% la cantidad de bacilos Gram positivos fue \leq 30/ campo, con muy pocos cocobacilos, en cantidad de 1-4 / campo.

Tabla 4.5: Frecuencia de los distintos valores numéricos de Nugent en las 77 pacientes del grupo control

VN Nugent	Nº pacientes n=77
0	46
1	4
2	23
3	4

En este grupo la incidencia de aislamientos de *G. vaginalis* fue del 13% (n=10)

4.2.- ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS

El origen de todas las muestras de las que se obtuvieron los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* fueron realizadas a partir del flujo vaginal sacado de las paredes laterales de vagina, de las 154 mujeres integrantes de la población en estudio.

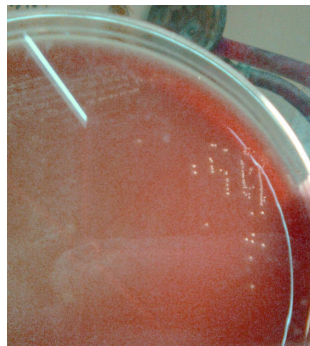
Se recuperaron en total 87 aislamientos de *Gardnerella vaginalis*, 77 provenientes del grupo de pacientes con VB y otros 10 del grupo control.

4.2.1.- Identificación y conservación de los aislamientos de *Gardnerella vaginalis*

4.2.1.1.- Identificación de *Gardnerella vaginalis*

Los 87 aislamientos de *Gardnerella vaginalis* se realizaron a partir de los crecimientos en Agar Base Columbia con 5% de sangre humana y del Columbia CNA agar con 5% de sangre humana. Todos fueron caracterizados en principio por identificación presuntiva, o sea:

- Colonias pequeñas con beta hemólisis difusa en agar sangre humana. Se utilizó como referencia la cepa ATCC de *G. vaginalis* 14018.
- Coloración de Gram: típica apariencia de cocobacilos Gram negativos.
- Reacción de catalasa: negativa (Figura 4.4).



a) Colonias de *G. vaginalis*



c) Catalasa negativa

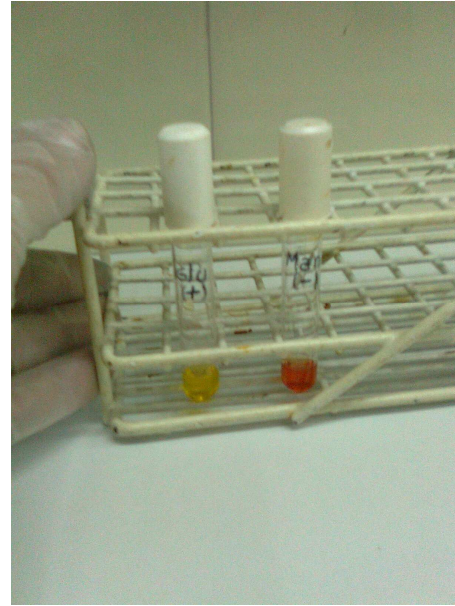
Figura 4.4: Pruebas mínimas realizadas para la identificación de *Gardnerella vaginalis*
a) Colonias de *G. vaginalis* en Agar Base Columbia+ 5%Sangre Humana; c) Prueba de catalasa

Posteriormente se realizaron las siguientes pruebas mínimas para una identificación más certera:

- Hidrólisis de hipurato
- Fermentación de glucosa y manitol (Figura 4.5)



d) Hidrólisis de hipurato



e) Fermentación de azúcares

Figura 4.5: Pruebas complementarias para la identificación de *Gardnerella vaginalis*
d) hidrólisis de hipurato en microplaca; e) fermentación de glucosa (+), fermentación de manitol (-).

Con el agregado de la hidrólisis del hipurato y fermentación de glucosa y manitol, se logró una mayor especificidad en la identificación de los aislamientos. Nos basamos en los estudios hechos por Piot y col. de donde elegimos implementar el uso de dos azúcares con resultados contrarios y contundentes como: Glucosa 100% (+) y Manitol 100% (-).

De todas las pruebas empleadas, la hidrólisis del hipurato fue la que presentó un 9% de resultados negativos, todas las demás dieron un 100% de positividad (todos se vieron como cocobacilos Gram negativos, presentaron beta hemólisis y fermentaron la glucosa) o 100% de negatividad (prueba de catalasa negativa y ausencia de fermentación del manitol) Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Características bioquímicas de los 87 aislamientos de *Gardnerella vaginalis* de una población de 154 mujeres sexualmente activas

Pruebas fenotípicas	Número de aislamientos positivos n=87	Porcentaje de aislamientos positivos
Colonias beta hemolíticas en agar sangre humana	87	100
Cocobacilos Gram negativos	87	100
Producción de catalasa	0	0
Hidrólisis de hipurato	79	91
Fermentación de glucosa	87	100
Fermentación de manitol	0	0

4.2.1.2.- Conservación de los aislamientos

Todos los aislamientos fueron conservados para efectuar con posterioridad los estudios de factores de patogenicidad.

Tras una evaluación previa de la conservación de seis cepas de *G. vaginalis* a -20°C y -70°C tanto en los medios de conservación CG y MGY se concluyó que la sobrevivencia de las bacterias, mantenidas a diferentes temperaturas de preservación, en el medio CG las conservadas a -20°C comienzan a disminuir después de los 60 días, y a partir de los 90 días las que estaban a -70°C . En cuanto a las conservadas en el medio MGY a -20°C el recuento de UFC comienza su disminución a partir de los 60 días, mientras que a -70°C se mantienen viables hasta los 180 días inclusive (Belmonte y cols.2008).

En las tablas siguientes figuran los porcentajes de recuperación a las dos temperaturas de conservación ensayadas (-20 y -70°C), en ambos medios, de seis aislamientos de *Gardnerella vaginalis*. Ver Tablas 4.7 y 4.8.

Tabla 4.7: Porcentaje de recuperación de *Gardnerella vaginalis* (n=6), conservadas a - 20 °C

Medios \ Tiempo (días)	0	1	7	30	60	90	120	150	180
CG	100	100	100	100	60	20	0	0	0
MGY	100	100	100	100	80	50	20	0	0

CG: Caldo cerebro corazón + 20% glicerol

MGY: Leche descremada 10%+ 1% Glucosa + 0,5 % Extracto de Levadura + 15% glicerol

Inóculo Inicial: $1,2 \times 10^8$ UFC/ ml (de cada vial)

100% se consideró ante una recuperación idéntica al inóculo inicial.

Tabla 4.8: Porcentaje de recuperación de *Gardnerella vaginalis* (n=6), conservadas a - 70 °C

Medios \ Tiempo (días)	0	1	7	30	60	90	120	150	180
CG	100	100	100	100	100	75	50	20	0
MGY	100	100	100	100	100	100	100	100	100

CG: Caldo cerebro corazón + 20% glicerol

MGY: Leche descremada 10%+ 1% Glucosa + 0,5 % Extracto de Levadura + 15% glicerol

Inóculo Inicial: $1,2 \times 10^8$ UFC/ ml (de cada vial)

100% se consideró ante una recuperación idéntica al inóculo inicial

En base a los resultados obtenidos se decidió conservarlas a -70°C en el medio MGY. Fueron guardarlas del mismo modo que se procedió para las cepas ATCC; conservadas en 10 viales en el medio MGY, con el fin de preservar el material original y lograr que no tengan más de 3 ó 4 pasajes.

4.2.2.- Conservación de muestras para estudio de Micoplasmas, cultivo e Identificación

4.2.2.1.- Conservación de las muestras

Las 154 muestras de endocervix fueron conservadas en el medio de transporte, frasco R₁, provisto por el equipo comercial Mycoplasma IST-2 (bioMérieux S.A. Marcy l'Etoile, France) (Figura 4.6). Las muestras que no eran procesadas dentro de las dos a tres horas de su extracción se conservaban en heladera por no más de 48hs.

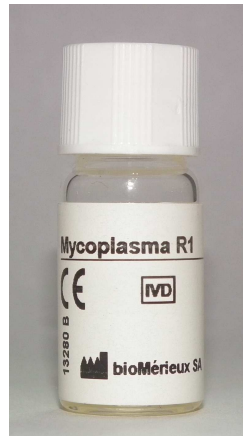


Figura 4.6: Frasco con medio de transporte para Micoplasmas (equipo Mycoplasma IST-2, bioMérieux S.A. Marcy l'Etoile, France)

4.2.2.2.- Siembra e identificación de Micoplasmas

Las muestras endocervicales contenidas en el medio de transporte se utilizaron para rehidratar el medio liofilizado y fueron sembradas en el panel provisto por el mismo equipo comercial (Figura 4.7).

Se efectuó una primera lectura a las 24 hs y otra final a las 48 hs.

Se realizó la cuantificación del crecimiento, interpretándose según el criterio señalado en el ítem 3.1.4.2.

Del total de la población estudiada (n=154), el porcentaje de positividad de micoplasmas en total fue del 22,7% (n=35).

En la figura 4.7 puede observarse el aislamiento de *Ureaplasma* spp. de una de las muestras estudiadas con crecimiento en dilución mayor a 10.000 UFC.



Figura 4.7: Cultivo de muestra endocervical para búsqueda de Micoplasmas en equipo Mycoplasma IST-2 (bioMérieux.S.A)
Hisopo endocervical utilizado en la toma de muestra, frasco con medio de transporte y frasco con medio de cultivo deshidratado en margen superior izquierda y frasco con medio de cultivo reconstituido con la muestra en el medio de transporte en margen superior derecha. Galería con siembra de una muestra endocervical con aislamiento de *Ureaplasma* spp.

En la Tabla 4.9 se presenta la distribución porcentual de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp tanto en el grupo con Vaginosis Bacteriana como en el grupo control, según la frecuencia de aislamiento de cada uno de ellos.

Tabla 4.9: Frecuencia de aislamientos de Micoplasmas en una población de 154 mujeres sexualmente activas

Género y especie	Pacientes con VB (n=77)	Pacientes Controles (n=77)	Totales (n=154)
<i>M. hominis</i>	6 (7,8%)	1 (1,3%)	7 (4,5%)
<i>Ureaplasma</i> spp.	17 (22,1%)	7 (9,1%)	24 (15,6%)
<i>M. hominis</i> + <i>Ureaplasma</i> spp.	4 (5,2%)	0 (0%)	4 (2,6%)

VB: Vaginosis Bacteriana

En la figura 4.8, se muestra una comparación entre los aislamientos clínicamente significativos obtenidos en ambos grupos, la gráfica A ilustra los

correspondientes a *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. y el hallazgo de ambos en forma conjunta *M. hominis* + *Ureaplasma* spp en el grupo de pacientes con VB. Mientras que en la gráfica B están los aislamientos de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* en el grupo control.

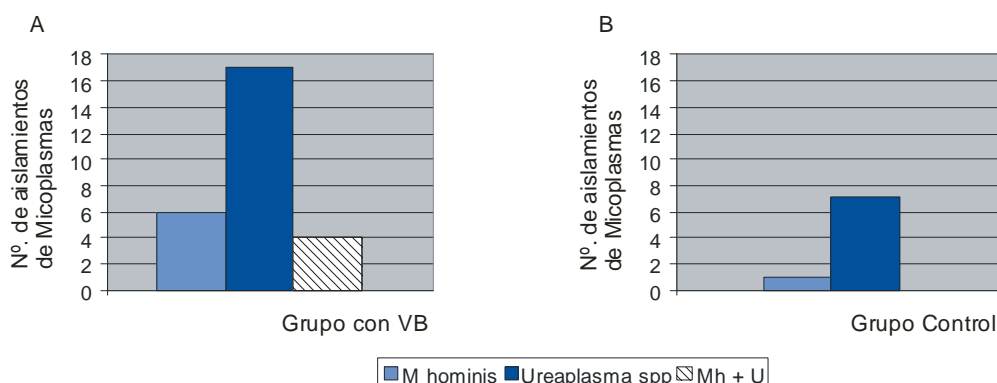


Figura 4.8: Distribución de aislamientos de Micoplasmas en una población de 154 mujeres sexualmente activas. **A)** Micoplasmas recuperados de los 77 casos de VB; **B)** Micoplasmas recuperados de los 77 casos controles.
VB: Vaginosis Bacteriana, **Mh:** *M. hominis*, **U:** *Ureaplasma* spp

Realizando un análisis por separado de cada género se observó que la frecuencia de aislamiento de *M. hominis* fue de 10 en el grupo de VB a 1 en el grupo control (Tabla 4.10).

Tabla 4.10: Frecuencia de aislamiento de *M. hominis* en una población de 154 mujeres sexualmente activas de casos controles y casos con VB

<i>M. hominis</i>	Casos de VB	Casos Controles	Totales
Presencia	10 (13%)	1 (1,3%)	11 (14,3%)
Ausencia	67 (37%)	76 (48,7%)	143 (85,7%)
Totales	77 (50%)	77 (50%)	154 (100%)

Entonces la proporción de veces que *M. hominis* puede estar presente en la VB la podemos expresar como:

Odds Ratio = 11,3 con un intervalo de confianza del 95% (1,41 – 90,99) y la probabilidad que *M. hominis* esté presente en la VB, sería:

P= 0,92 Podemos decir que la probabilidad de que *M. hominis* esté presente en la población con VB respecto del grupo control será del 92%

Según el test de Fisher tenemos una p= 0,0091 considerada muy significativa.

Por lo tanto el aislamiento de *M. hominis* es mucho mayor, tanto como diez veces más en la población de mujeres con Vaginosis Bacteriana que en el grupo control, contabilizando su presencia tanto en forma individual como junto a *Ureaplasma spp.*

Analizando por otro lado lo ocurrido en cuanto al hallazgo de *Ureaplasma spp.* encontramos los valores que se señalan en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Frecuencia de aislamientos de *Ureaplasma spp.* en una población de 154 mujeres sexualmente activas en grupo control y grupo con VB

<i>Ureaplasma spp.</i>	Casos VB	Casos Controles	Totales
Presencia	21 (27,3%)	7 (9,1%)	28 (36,4 %)
Ausencia	56 (22,7%)	70 (40,9%)	126 (63,6%)
Totales	77 (50 %)	77 (50%)	154 (100%)

Aquí se observa que la proporción de veces que este microorganismo está presente en la población con VB respecto de los casos controles da un:

Odds Ratio= 3,75 con un intervalo de confianza del 95% (1,48 - 9,45) y un valor de p de 0,0059 lo que resulta estadísticamente muy significativo.

Expresado en términos de probabilidades sería: 0,7894

Por lo tanto la probabilidad que *Ureaplasma spp.* esté presente en la VB respecto de los casos controles es del 78,94%.

Analizando este hallazgo de micoplasmas en la población estudiada del 22,7% (35/154) y considerando dentro del total recuperados hubo una incidencia del 69% del género *Ureaplasma spp.* (24/35), un 20% de *M. hominis* (7/35) y un 11% de ambos géneros encontrados a la vez en cuatro pacientes (4/35), que solo ocurrió en la población con VB (Figura 4.9).

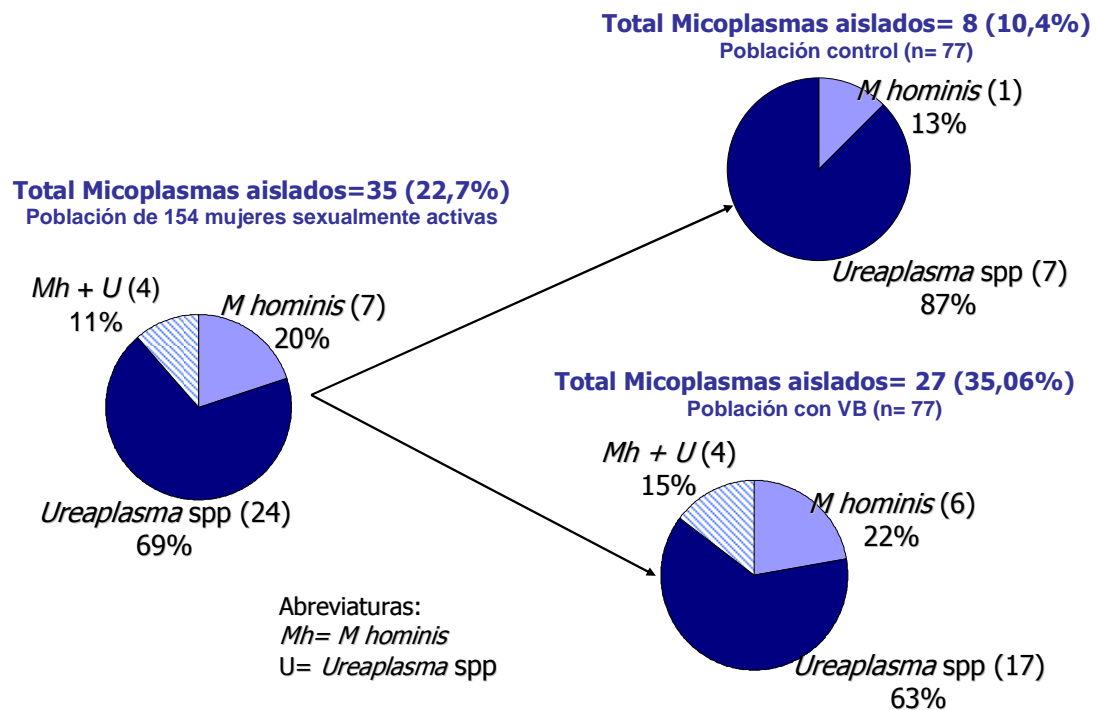


Figura 4.9: Gráfico descriptivo de la frecuencia de aislamiento de los dos géneros de Micoplasmas en la población de 154 mujeres sexualmente activas y su distribución dentro de cada grupo.

En el grupo control hubo un total de 10,4% de Micoplasmas correspondientes a 8 aislamientos, del que 7 de ellos pertenecieron al género *Ureaplasma spp.* (87%) y uno a *M. hominis* (13%).

En cambio en el grupo de VB la incidencia de micoplasmas fue del 35,06%, correspondiendo un 63% a *Ureaplasma spp.*, 22% a *M. hominis* y un 15% representado por ambas especies en forma conjunta.

4.3.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD

4.3.1.- Detección de actividad sialidasa en fluido vaginal

Se estudió la presencia de actividad sialidasa en el fluido vaginal del grupo de pacientes con Vaginosis Bacteriana y el grupo control a partir de las muestras de lavados vaginales realizados a las mismas.

De la población original de 154 pacientes se estudiaron sólo 112 mujeres. En esta oportunidad del grupo con diagnóstico clínico y bacteriológico de VB se estudiaron 51 pacientes y del grupo control con flora colonizante habitual, 61 pacientes.

La actividad de sialidasa de cada muestra se estableció por extrapolación de los valores de densidad óptica obtenida en la curva de metoxifenol puro y se expresó como nanomoles de metoxifenol formado (Figura 4.10).

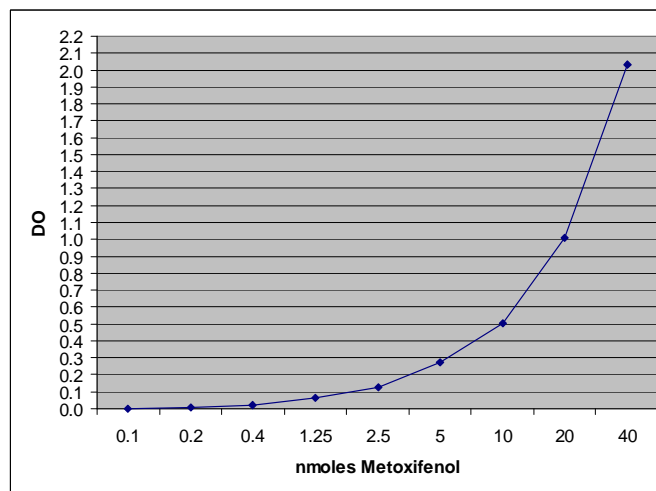


Figura 4.10: Curva Estándar de Metoxifenol puro

Curva de concentraciones decrecientes de metoxifenol puro (40, 20, 10,5, 2.5, 1.25, 0.4 y 0.2 nanomoles) revelado por el agregado de L aminoantipirina 4mM y ferricianuro de potasio 6mM con lecturas a 492 nm

Como resultado del estudio se obtuvo una gran dispersión de los valores de actividad sialidasa detectados en la población con VB, mientras que en la población control (mujeres con flora lactobacilar exclusiva), los valores estuvieron comprendidos dentro del rango de 0,2 a 5,1 nmoles (Figura 4.11).

En el grupo de mujeres con VB, cuyo contenido bacteriano vaginal estaba constituido por *G. vaginalis*, con presencia o no de Micoplasmas y bacilos curvos (compatibles con *Mobiluncus*), dicho rango fue de 0,5 a 17 nmoles.

Estos resultados fueron analizados estadísticamente por comparación de los dos grupos poblacionales usando el test no paramétrico de U Mann-Whitney.

La mediana para el grupo control fue de 2,4 y en el grupo con VB de 3,4. En la Tabla 4.12 se describen las medianas y rangos obtenidos en cada uno de los grupos estudiados.

Del análisis estadístico de la población estudiada surge que entre ambos grupos existe diferencia significativa ($p < 0,0001$).

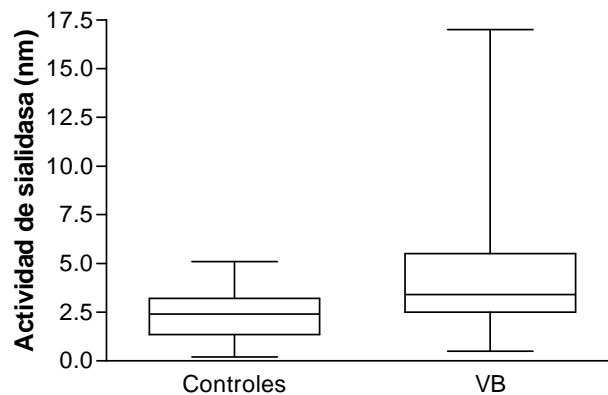


Figura 4.11: Actividad sialidasa expresada en nmoles de metoxifenol formado de lavados vaginales de una población de 112 mujeres sexualmente activas.

En nuestra población puede verse que ambos grupos compartieron valores comprendidos en el rango de 0,5 a 5,1 nmoles de metoxifenol, mientras que sólo 11 de 52 pacientes con VB (21,17%), registraron valores superiores a 5,1.

Tabla 4.12: Medianas y rangos de actividad sialidasa (nmoles de metoxifenol formado) en pacientes con y sin VB ($p < 0.0001$)

Grupo estudiado	Mediana	Rango
Pac. Control (N=61)	2,40	0,20-5,10
Pac. Con VB (N=51)	3,40	0,50-17,00

Ombrella y cols. 2006

4.3.2.- Producción de citolisina (vaginolisina) por distintos aislamientos de *Gardnerella vaginalis*

Se ensayó la producción de citolisina en un total de 20 aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de la población original, que incluyeron a 10 correspondientes al grupo control y 10 del grupo de pacientes con diagnóstico de VB.

Se siguió la técnica desarrollada por Rottini y col., según se describiera en la sección anterior.

Nuestra referencia de producción de hemólisis fue la curva efectuada con las distintas concentraciones de la suspensión de GRH en agua destilada, en las diluciones al 0.5, 0.25 y 0.125. Se partió de la premisa que una unidad de hemólisis era la correspondiente al volumen necesario para que se produzca un 50% de hemólisis y se hicieron las mediciones para el 100, 50, 25 y 12,5% de la hemólisis producida por la mezcla de 100 μ l de GRH en 1,9 ml de agua destilada que correspondían a 2, 1, 0.5, y 0.25 UH respectivamente.

Con las lecturas realizadas a DO₄₁₅ nm se realizó la siguiente curva (Figura 4.12).

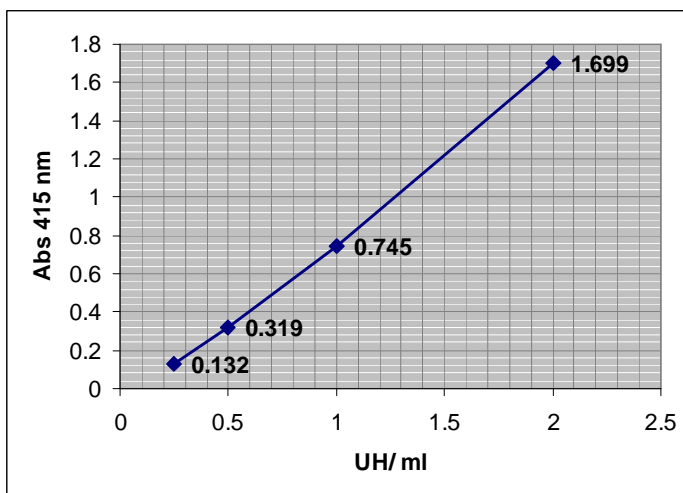


Figura 4.12: Curva Estándar de producción de hemólisis a distintas concentraciones de Glóbulos Rojos Humanos (GRH) en agua destilada
UH: Unidades de hemólisis

Tras 36 hs de estímulo de las cepas por crecimiento en el caldo suplementado con Tween 80, almidón y plasma humano, en anaerobiosis, se las enfrentó a una suspensión de GRH por 30 minutos para luego observar la producción de hemólisis.

Tabla 4.13: Valores de Unidades de Hemólisis producidas por los 20 aislamientos de *G. vaginalis* estudiados

Gv de población control (n=10) UH/ml	Gv de población con VB (n=10) UH/ml
1	2
2	2
1.8	1.2
1.8	2
1.1	1.2
2	1.8
2	2
1.2	1.7
1.1	1.8
1.1	1.2

UH: unidades de hemólisis; Gv: *Gardnerella vaginalis*

Luego de evaluar la acción de la enzima por cada aislamiento, se extrapolaron los valores obtenidos en la curva de hemólisis efectuada anteriormente

En la Tabla 4.13 se muestran los valores de unidades de hemólisis obtenidas de las dos poblaciones con cada aislamiento, cada valor representa el promedio de las dos repeticiones del ensayo con la misma cepa en distintos días.

El análisis de estos datos se hizo utilizando el Test de Mann-Witney para estas dos poblaciones independientes y se encontró que la media de producción de citolisina del grupo control y el de VB fue 1,5 y 1,68 respectivamente; con un IC 95%:1,18-1,82 (grupo control) respecto de 1,41-1,94 (grupo VB); las medianas resultaron de 1,45 en grupo control y 1,80 en el otro grupo. Se obtuvo un valor de P de 0.2912 considerándose no significativo.

La gráfica de la Figura 4.13 muestra que no hubo diferencia significativa en la producción de hemólisis por parte de los 10 aislamientos de *G. vaginalis* del grupo control con respecto de los correspondientes del grupo de VB.

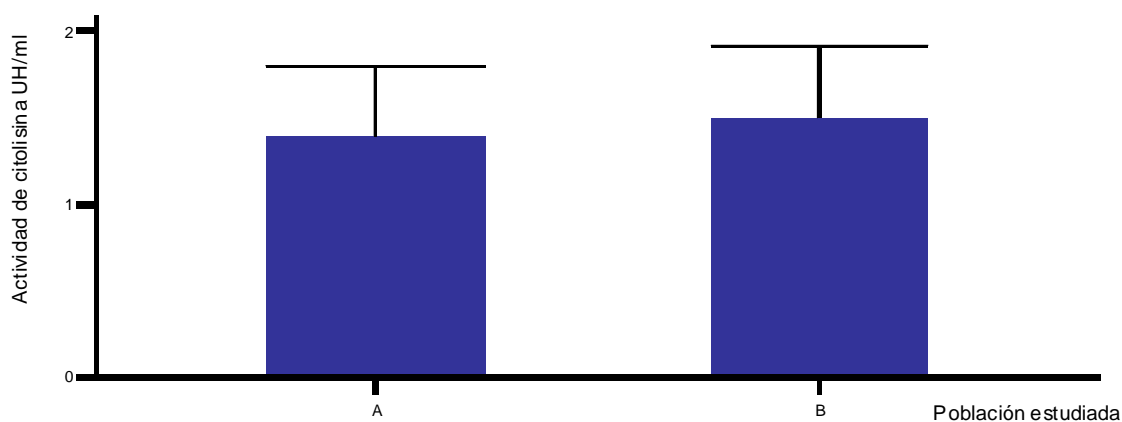


Figura 4.13: Gráfico de la Mediana y Desviación estándar de la detección de citolisina en 10 aislamientos de *G. vaginalis* del Grupo control vs. 10 del Grupo con VB

UH/ ml: Unidades de hemólisis/ mililitro.

Columna A: mediana y desviación estándar de actividad de citolisina (UH/ml) correspondientes a 10 aislamientos de *G. vaginalis* del grupo control. **Columna B:** mediana y desviación estándar de actividad de citolisina (UH/ml) correspondientes a 10 aislamientos de *G. vaginalis* del grupo con VB.

4.3.3.- Producción de Biofilm de cepas colonizantes e infectantes de *Gardnerella vaginalis*

Se estudiaron 20 aislamientos de *G. vaginalis* correspondientes a la población original. Siguiendo el diseño de casos y controles como para la detección de citolisina, se trabajó con 10 aislamientos provenientes de pacientes con vaginosis bacteriana y otros 10 de la población control.

4.3.3.1.- Evaluación del medio de enriquecimiento óptimo

El estudio previo para la elección del caldo de enriquecimiento se llevó a cabo mediante el cultivo de siete aislamientos de *G. vaginalis* en: Caldo Tripteína Soya, Caldo Casman y Caldo Cerebro Corazón. Se realizaron las curvas de crecimiento (0 a 24 hs.) para las siete cepas en cada uno de los caldos.

En las gráficas de las figuras 4.14; 4.15 y 4.16 pueden verse los resultados obtenidos con todas ellas en cada uno de los tres medios de cultivos probados:

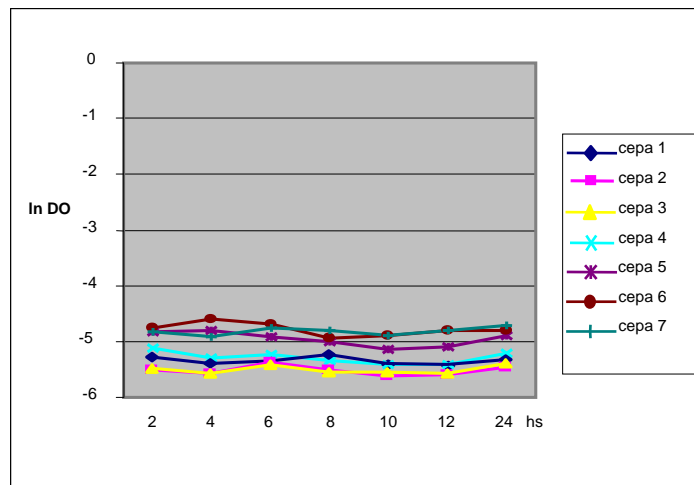


Figura 4.14: Cinética de crecimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis* en Caldo Tripteína Soya en aerobiosis a 37°C

En la figura 4.14, se puede observar que los cultivos en medio de Caldo Tripteína Soya presentaron una fase lag muy larga y las variaciones de Absorbancia en el tiempo de lectura empleado no fueron significativas para su valoración. Por lo que la escasez de nutrientes resultó insuficiente para las exigencias nutricionales de *G. vaginalis*.

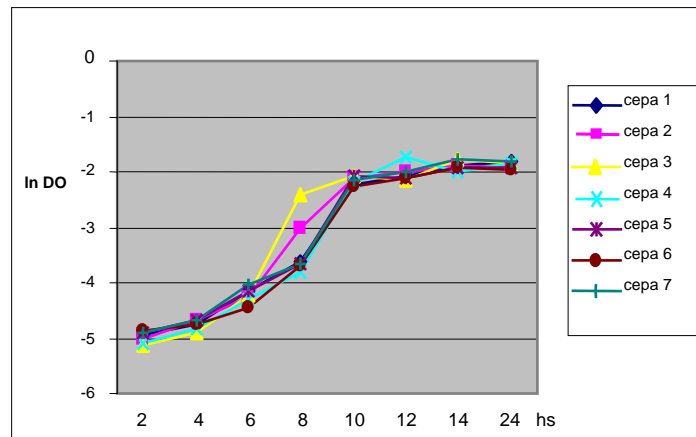


Figura 4.15: Cinética de crecimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis* en Caldo Casman en aerobiosis a 37°C

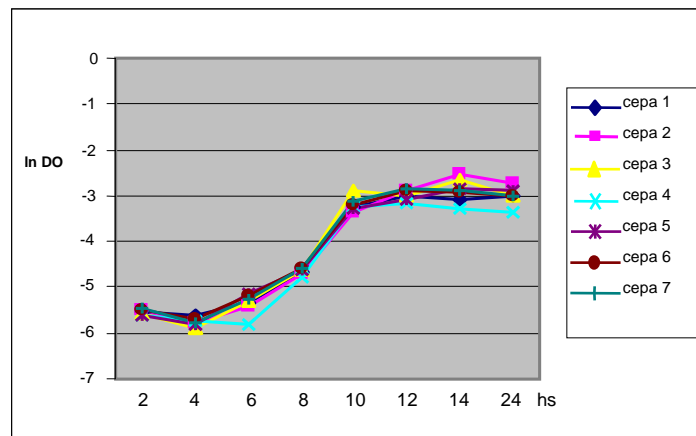


Figura 4.16: Cinética de crecimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis* en Caldo Cerebro Corazón en aerobiosis a 37°C

Siguiendo la cinética de crecimiento en el Caldo Casman como en el Caldo Cerebro Corazón (Figura 4.15 y Figura 4.16), se ve que la fase exponencial culmina entre las 10 a 12 hs. alcanzando la mayor concentración de microorganismos en ese tiempo donde comienza la fase estacionaria (Nogueras y cols.2007).

Estos dos últimos medios tienen mejor recuperación, los que mayor inóculo nos pueden proveer para los estudios posteriores sobre esta bacteria, pero por razones de practicidad se optó por usar Caldo Cerebro Corazón.

4.3.3.2.- Detección cualitativa de producción de biofilm

La detección de formación del biofilm para cada uno de los aislamientos se realizó en forma cualitativa por lectura a simple vista encontrando producción en todos los casos, calificándolos como débiles (+), moderadas (++) o fuertes productoras de Biofilm (+++), como puede verse en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Frecuencia de aislamientos de *G. vaginalis* según los distintos grados de producción de Biofilm por detección cualitativa

Aislamientos de <i>G. vaginalis</i> (Gv) n=20	Producción débil (+)	Producción moderada (++)	Producción fuerte (+++)
Gv de Gr. control (n=10)	6	3	1
Gv de Grupo VB (n=10)	0	0	10

La distribución de las cepas fue de modo tal que el 100% de las cepas provenientes de pacientes con VB (n=10), produjeron una fuerte biopelícula. Mientras que dentro del grupo de las cepas colonizantes, hubo un 60% (n=6) con producción débil, 30% (n=3) con producción moderada y solo un 10% (n=1) manifestó una fuerte producción.

En la figura 4.17 se muestra una foto con los pocillos con blanco de caldo-glucosa en las celdas 1, 4, 7 y 10 de ambas filas. En tanto que en los otros pocillos de ambas filas puede observarse una la producción de biofilm en distintos grados: fuerte, moderada y débil.

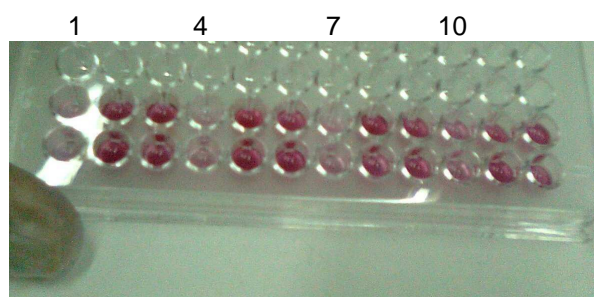


Figura 4.17: Lectura cualitativa de biopelículas de *Gardnerella vaginalis* desarrolladas en microplacas de poliestireno

Fuerte producción de biofilm: pocillos 2,3 y 5,6 de ambas filas

Moderada producción de biofilm: pocillos 8,9 de ambas filas

Débil producción de biofilm: pocillos 11,12 de ambas filas

4.3.3.3.- Detección cuantitativa de producción de biofilm

Siendo esta metodología muy subjetiva es que se decidió realizar la cuantificación mediante de un lector de microplacas.

Las mismas placas fueron evaluadas cuantitativamente con la ayuda de un lector de microplacas

(Tekan), previa agitación a una DO_{460nm} (Figura 4.18).

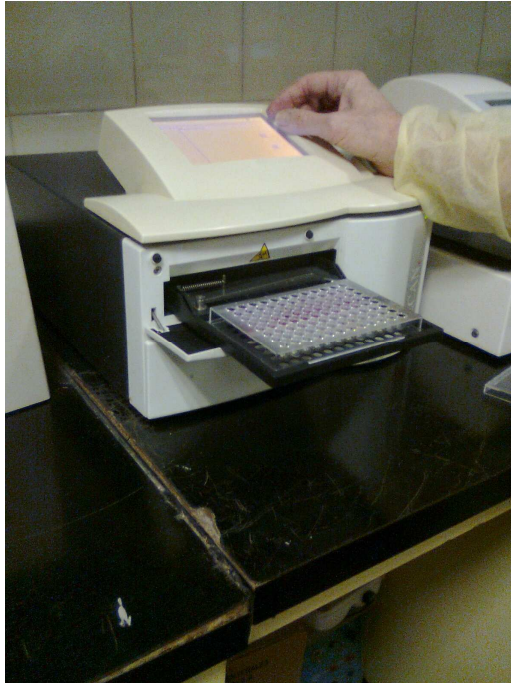


Figura 4.18: Lectura cuantitativa de formación de biofilms en microplacas sembradas con *Gardnerella vaginalis* a DO_{460nm} , en lector de microplacas

Las lecturas hechas a DO_{460nm} de las celdas donde se realizara la técnica para la formación de biofilm con los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* provenientes de ambos grupos estudiados, dieron valores cuya dispersión puede observarse en el gráfico de la figura 4.19.

La misma metodología fue realizada por cuadruplicado según puede verse en la Figura 4.17 y repetida en tres oportunidades distintas, puesto que hay variabilidad de un estudio a otro y la bibliografía recomienda hacer un promedio de valores obtenidos en las distintas oportunidades (Stepanovic 2007).

El blanco dio una lectura promedio de 0.041 (DO_c). Se adoptó como control negativo al valor de lectura correspondiente al blanco ($DO_c=0.041$) y el control positivo fue la cepa ATCC 49145 cuyo valor promedio de lectura a DO_{460} fue: 0.187nm

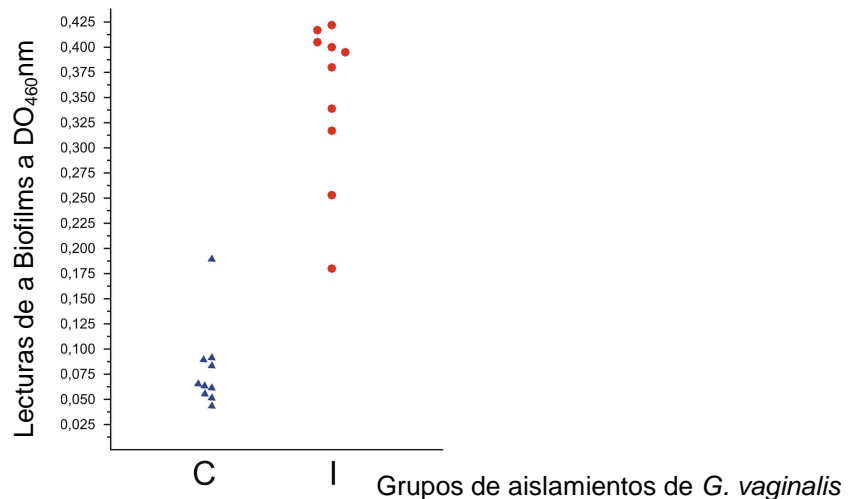


Figura 4.19: Gráfica de las lecturas a DO₄₆₀nm de los biofilms formados por aislamientos de *G. vaginalis* colonizantes e infectantes

C: *G. vaginalis* colonizantes; **I:** *G. vaginalis* infectantes

En rojo pueden verse las lecturas correspondientes a la producción de biofilm por *G. vaginalis* del grupo con VB y en azul las producidas por *G. vaginalis* del grupo control.

Se realizó el análisis estadístico comparativo de los resultados de las lecturas de ambos grupos. Para ello se utilizó el test no paramétrico de U Mann-Whitney obteniéndose para las *G. vaginalis* colonizantes una mediana de 0.06 y rango comprendido entre 0.044 y 0.190, con un IC 95% (0,05-0,11) y una desviación estándar de 0,04. La medida de DO₄₆₀ correspondientes a la producción biofilm de 0,190 correspondió a un único aislamiento dentro del grupo que produjo una fuerte biopelícula

Los aislamientos de *G. vaginalis* infectantes tuvieron una mediana de 0.39 y un rango comprendido entre 0.18 y 0.42, con un IC 95% (0,29-0,41) y una desviación estándar de 0,08.

En la gráfica de la figura 4.20 pueden apreciarse las diferencias entre los dos grupos de *G vaginalis* estudiadas ($p < 0,0001$).

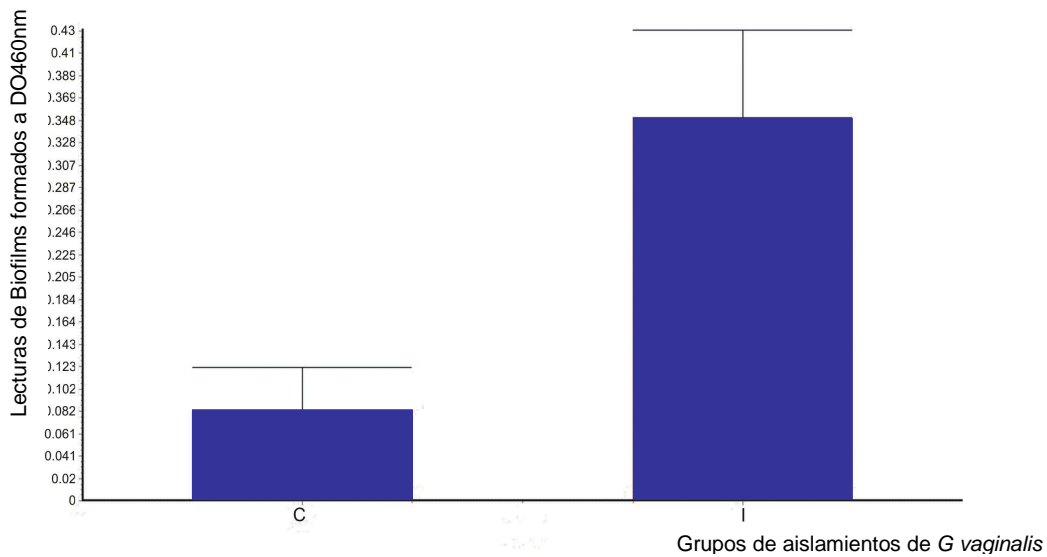


Figura 4.20: Gráfico de la Mediana y Desviación estándar de la producción de biofilm de aislamientos de *G. vaginalis* provenientes del grupo control (n=10) y grupo con VB (n=10) estudiados

C: Mediana y Desviación estándar de *G. vaginalis* colonizantes; **I:** Mediana y Desviación estándar de *G. vaginalis* infectantes ($p < 0,0001$)

Comparando los valores de medianas y desviaciones estándar de ambos grupos constituídos por los aislamientos colonizantes e infectantes puede observarse en el grupo de *G vaginalis* provenientes de la población con VB una mayor producción de Biofilm en el caso de todas ellas.

5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La Vaginosis Bacteriana es uno de los desórdenes vaginales más consultados por las pacientes en la etapa reproductiva. Su estudio y erradicación toma importancia durante la gestación por posibles complicaciones en el progreso del embarazo, sin menospreciar su tratamiento en la etapa sexualmente activa por el riesgo de facilitar la coexistencia de otros patógenos ya que se desplaza la flora que normalmente supervisa el mantenimiento del nicho ecológico vaginal.

En los últimos tiempos se dejó de señalar a *Gardnerella vaginalis* como único agente implicado en la patogénesis y se habla de patogrupo o grupo funcional patógeno que genera la fisiopatología a través de efectos sinérgicos del consorcio de bacterias (Dowd y cols.). En cuanto a esto, el estudio de la flora implicada en este síndrome permitió conocer una gran diversidad de especies de bacterias anaerobias y entre ellas especies de Micoplasmas. Pero el descubrimiento de la capacidad de formar biofilm de *G. vaginalis* y englobar otras bacterias la vuelve a señalar como una de las principales generadoras de la disbacteriosis que se origina, induciendo nuevamente en estos tiempos a su estudio, enfocándolo hacia sus determinantes de patogenicidad (Swidsinski y cols. 2005), (Gelber y cols. 2008).

Al tener en nuestro servicio una gran cantidad de pacientes con aislamiento de *Gardnerella vaginalis* es que surgió la inquietud de estudio sobre el tema en este proyecto de tesis.

Se intentó averiguar como era el comportamiento de los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* que provenían de pacientes donde sólo estaban presentes como colonizantes comparado con aquellos casos de aislamiento como germen preponderante en pacientes con diagnóstico clínico de VB. Interesaba relacionar la medida de expresión de sus factores de patogenicidad con la existencia de microorganismos con distintos grados de virulencia.

También nos interesó conocer el valor que tiene el estudio de micoplasmas en este síndrome y averiguar si existe un predominio de *Ureaplasma spp.* o *M. hominis*, especies que se aíslan más comúnmente en un laboratorio clínico en los

estados de VB respecto de la población normal, de modo que nos permita establecer o no una correlación con la VB.

Todos estos fueron los interrogantes planteados al inicio de esta tesis, ahora pasaremos a discutir nuestras conclusiones.

5.1.- VALORACIÓN DE LOS CRITERIOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS

5.1.1.- Selección de casos de Vaginosis Bacteriana

Para la inclusión de estos casos, primeramente se descartó la presencia de otros agentes etiológicos interferentes.

En nuestro estudio se tuvieron en cuenta los criterios de Amsel y Nugent con la adición de la corrección de Lanzafame como sugiere el programa BACOVA (Manual BACOVA 2011) en su publicación del valor de la expresión numérica para el diagnóstico de la VB. Todos los casos que estudiamos tuvieron un VN ≥ 7 y con ausencia de reacción inflamatoria.

Si bien estos son criterios que fueron formulados hace muchos años atrás como prueba de oro, siguen vigentes y se toman como referencia para comparar a este diagnóstico con estudios actuales mediante la utilización de técnicas de PCR, a través de las cuales se ha podido conocer mucho más sobre la composición de la microbiota en la VB (Verhelst y cols. 2004), (Menard y cols. 2008).

Sin embargo otro estudio compara los criterios de Nugent y Amsel con el uso de PCR cuantitativa para *G. vaginalis*, *M. hominis* y *Lactobacillus* spp. para el diagnóstico de VB en pacientes con HIV. Demuestran un incremento en la sensibilidad y especificidad respecto del puntaje de Nugent y los criterios de Amsel para ese grupo estudiado, en el cual el uso de Nugent y Amsel resultaron de muy bajo poder predictivo. Es de tener en cuenta que se trata de pacientes con una inmunosupresión donde la sintomatología puede estar enmascarada (Sha y cols. 2005).

Otra técnica diagnóstica utilizada por patólogos es la coloración de Papanicolau, Eriksson en el 2007, publica la utilidad de esta técnica y el uso de la coloración siguiendo la escala de clasificación de Nugent, con una sensibilidad del 85% y especificidad del 92% así como VPP 84% y VPN 93%.

Nuestros resultados mostraron para el grupo poblacional estudiado, en general, una buena sensibilidad usando los parámetros de Amsel, salvo en la detección de aminas (78%) al igual que el aspecto del flujo, pues se trata de dos parámetros de evaluación muy relativa. Es por este motivo que esta situación está contemplada en la probabilidad de la existencia de tres de estos cuatro criterios para establecer el diagnóstico. En cambio el pH tiene un buen valor de tamizaje ya que permite asegurar el diagnóstico de una vaginosis con bastante certeza, presenta un Valor Predictivo Negativo del 97%. Si bien en casos de vaginitis por *Trichomonas vaginalis*, se incrementa el pH, generalmente hay una reacción inflamatoria manifiesta, la que no se presenta en una VB.

Otro buen señalador de una VB es la presencia de células guías, como puede verse en la tabla 4.2, tiene un Valor Predictivo Positivo del 100%.

La elección de los casos de VB se basó en los parámetros microbiológicos tenidos en cuenta en este estudio como el Puntaje de Nugent ≥ 7 juntamente con el aislamiento por cultivo en forma predominante de *Gardnerella vaginalis*.

5.1.2.- Selección de casos controles

En la selección de casos controles también se tuvieron en cuenta los criterios de Amsel y Nugent, en esta oportunidad se tomaron todas pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión abarcando un número de diez pacientes con aislamiento de *G. vaginalis* presentes en escasa cantidad y con *Lactobacillus* spp. como flora predominante. Asimismo aquí se descartaron otros agentes

etiológicos interferentes como *C. trachomatis*, *Candida* spp. y *Trichomonas vaginalis*.

Según el puntaje de Nugent el 60% (46) casos tuvieron un puntaje de 0 y 30% (23) puntaje 2, el otro 10% se distribuyó en forma pareja entre los puntajes 1 y 3.

Todas las pacientes cumplieron con los requisitos de casos controles: provenían del consultorio externo de ginecología del Hospital Provincial del Centenario, de esta misma población se tomaron los casos de VB, todas dentro del mismo rango etario y supuestamente con el mismo riesgo de adquirir una VB, como se expresó en 3.1.1.

Se tomó un caso control por cada caso de VB. (77 vs. 77), adaptándose el número, en cada uno de los estudios posteriormente efectuados, pero siempre proviniendo de esta población original. Como ser el estudio de frecuencia de aislamientos de micoplasmas se realizó con una población de 154 constituida por 77 controles y 77 casos de VB, el estudio de detección de actividad sialidasa se realizó con 61 controles y 51 casos de VB, pues no todas las muestras que se obtuvieron de los lavados vaginales pudieron ser procesadas, no obstante ello se mantuvo una relación de más de un caso control por cada caso de VB.

Tanto el estudio de producción de citolisina como el de producción de biofilms fueron realizados con 10 casos controles y 10 casos de VB. Estas técnicas fueron más laboriosas por la necesidad de repetir cada ensayo por cuadruplicado en caso de estudio de producción de biofilm y por duplicado en el estudio de producción de citolisina, debido a la variabilidad innata de las mismas.

En cuanto a la incidencia de aislamiento de *G. vaginalis* en población sana, Aroutcheva y cols. en el 2001 señalan la recuperación de un 26,4%. Por otro lado Eschenbach ya en 1988 hacía referencia de la portación en mujeres asintomáticas

en cantidad entre un 15 a 50%. Nuestro hallazgo del 13%, se asemeja al valor inferior referido por Eschenbach.

En nuestro caso la incidencia fue algo inferior, esto podría deberse a que no sólo se incluyeron aquellas pacientes que clínicamente tuvieran la condición de salud vaginal sino también debían presentar un puntaje comprendido entre 0 y 3; tal vez aquellos casos con puntaje intermedio entre 4 y 6 asintomáticas que no se incluyeron en este estudio habrían incrementado la incidencia.

5.2.- IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

5.2.1.- Aislamientos de *Gardnerella vaginalis*

La característica diferencial que señala el desarrollo de *Gardnerella* es la presencia de colonias con beta hemólisis difusa cuando se utiliza sangre humana al 5%. Esto fue lo que se buscó en principio en los desarrollos tanto de agar Base Columbia sangre como en Columbia CNA agar sangre, para la búsqueda de *Gardnerella* en ambas poblaciones. De ambos medios, el Columbia CNA agar sangre fue el que permitió una mejor recuperación, fundamentalmente en los casos controles. Esto concuerda con los estudios de Golberg en el año 1976 quién señala al uso de este medio como una ventaja para la detección del desarrollo de *G. vaginalis*. Las características selectivas del medio de cultivo por la presencia de antibióticos que suprimen el sobrecrecimiento de otros microorganismos evita la interferencia en el reconocimiento de su desarrollo.

En cuanto a la identificación de los aislamientos, estuvo orientada hacia la búsqueda de características distintivas en base a las pruebas presuntivas señaladas por Piot en 1984, como ser: producción de beta hemólisis en Agar Base Columbia Sangre Humana, morfología cocobacilar y tinción de Gram variable, junto a la prueba de catalasa negativa. A diferencia del estudio más exhaustivo requerido por aislamientos de este género en otros materiales clínicos, estos al

provenir de zona genital no necesitarían una identificación más completa (Catlin 1992).

No obstante, si bien en principio se realizaron las pruebas presuntivas anteriormente mencionadas se adicionó la detección de hidrólisis de hipurato, la fermentación de glucosa y se constató la inactividad frente al manitol, permitiendo confirmar que se trataba de *Gardnerella vaginalis*.

Solamente en el caso de la hidrólisis del hipurato se obtuvo un 91% (n=79) de positividad, estando de acuerdo con los porcentajes de positividad planteados por distintos autores de un 90% (Piot y cols.1982) o un 92% (Greenwood y Pickett 1979). El 9% restante podría corresponder a biotipos distintos de *Gardnerella vaginalis* que dan negativa esta prueba (Benito y cols.1986).

La conservación de todos los aislados se realizó a -70°C en dos laboratorios con distinta ubicación a los fines de resguardar al menos un aislamiento debido a posibles interrupciones de suministro de luz por problemas de instalación. Uno de los inconvenientes que se detectaron al intentar repicarlas para ser utilizadas, es que si se cultivaban en microaerofilia después de descongelados los viales, disminuía mucho el porcentaje de recuperación por lo que se optó por realizar de rutina el repique en anaerobiosis con lo que logramos crecimientos más abundantes. En distintos trabajos hay autores que hacen referencia de un mejor crecimiento en anaerobiosis cuando el medio de donde queremos aislarlo es hostil como en el caso de infecciones urinarias o para la observación de determinadas propiedades que se incrementan en dicha atmósfera (Clarke y cols. 1989), (Lam y cols. 1988), (Rottini y cols. 1990).

5.2.2.- Identificación de micoplasmas y frecuencia de aislamientos

Los micoplasmas pueden colonizar el tracto genitourinario inferior e infectar tanto al hombre como a la mujer, pero ésta es mucho más susceptible y se los

considera un riesgo principalmente durante el período gestacional por la posibilidad de generar infecciones neonatales.

Nuestro objetivo fue conocer en nuestra población la incidencia de micoplasmas siendo la VB una de las infecciones prevalentes como ya se mencionó anteriormente. Se utilizó el método de tamizaje por cultivo en medio líquido y cuantificación que nos permite valorar el significado clínico del hallazgo.

En la bibliografía existen diferencias entre los hallazgos por distintos autores tanto sea en población sana como con VB.

Los porcentajes de incidencia de *M. hominis* en población sana van desde un 0% (Keane y cols. 2000), 2% (Cedillo y cols.2000) así como de 21 a 53 % según Cassell y cols. en su estudio del año 1993.

En nuestro caso la incidencia de ambas especies fue de un 22,7% en las 154 pacientes correspondientes al total de la población estudiada mediante la técnica de tamizaje por cultivo en medio líquido.

En pacientes sanas la recuperación de *M. hominis* fue del 1,3% resultando más acorde con los valores obtenidos por Keane y Cedillo pero inferior a los valores obtenidos por Cassell y cols. Mientras que en caso de *Ureaplasma spp.* fue del 9,1%, en comparación a los estudios hechos por Keane y cols. en el 2000 quienes refieren un 48% y Pfeifer y cols. en 1978 tienen un 40% . En el 2001 Smayevsky y cols. publican una incidencia de este género del 14% en población sana de nuestro país, siendo este un valor más semejante a nuestro hallazgo.

En la población con VB nuestra incidencia para *M. hominis* fue del 13%, comparado a un 53% publicado por Keane y cols., un 24 a 75% encontrado por Taylor-Robinson y col. (1996) . y un 42% por Smayevsky y cols. Todos estos valores resultan ser mayores al de nuestra investigación y es notoria la existencia de diferencias según los autores, pero en todos los casos se detectan en cantidad mucho mayor respecto de pacientes sanas habiendo empleado el mismo método de detección.

El estudio de *Ureaplasma* spp. hecho a nuestra población con VB reveló una incidencia del 27,3%, otros autores como Keane y cols. en el año 2000 en Inglaterra estiman una incidencia del 65%, en EEUU se indica un 63% (Blackwell y cols.1983) y en nuestro país publican un 21% (Smayevsky y cols. 2001).

Aquí también se observa diferencia según los autores y es sabido que hay una variabilidad según el área geográfica estudiada (Taylor-Robinson 1996), nuestros resultados nuevamente son más cercanos a los encontrados por Smayevsky en nuestro país.

Puede concluirse que de ambas especies la recuperada prioritariamente en nuestras pacientes con vaginosis fue *Ureaplasma* spp. y solamente en este grupo fue donde también se le detectó en forma conjunta con *M. hominis* en un 5,2% (4 de 77) en el grupo de pacientes con VB.

Como análisis de este estudio resultó un hallazgo de *M. hominis* fuertemente ligado a la VB, pues presentó un OR=11,34, como era de esperar y que también es lo expresado por otros autores (Keane y cols. 2000).

Mientras que el género *Ureaplasma* spp. tuvo un OR de 3,75 o sea tres veces menor, por lo tanto si bien se encuentra presente en la VB, la asociación con esta no es tan fuerte como en el caso de *M. hominis*.

5.3.- ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD

5.3.1.- Detección de actividad sialidasa en fluido vaginal

El conjunto de microorganismos implicados en la VB es diverso y comprende anaerobios como *Prevotella* spp, *Bacteroides* spp, *Porphyromonas* spp junto a micoplasmas y *Gardnerella vaginalis*, todos ellos con capacidad de producir sialidasas. Los receptores presentes en las células eucariotas corresponden a diversos tipos de proteínas y compuestos como glicopéptidos, glicoproteínas, proteínglicanos, que actúan facilitando el proceso de colonización y por ende el de invasión y las adhesinas bacterianas presentes en la superficie de

los microorganismos son las que interactúan con los carbohidratos o glicoconjugados en el mecanismo de colonización de las mucosas.

Las sialidasas son consideradas uno de los factores de virulencia de diversos microorganismos ya que ha sido demostrado que tienen la capacidad de modificar la habilidad del huésped para responder a un proceso infeccioso (Odin 1955), además de incrementar la posibilidad a otros microorganismos de adherir y destruir el tejido de las mucosas. Este proceso se lleva a cabo rompiendo la unión entre los residuos glicosídicos y el ácido siálico, confiriéndole a las bacterias con capacidad de producirles un mayor poder injuriante mediante un aumento de la adhesión.

El estudio de producción de sialidasa en pacientes con y sin VB fue planteado para comparar la actividad de esta enzima en lavados vaginales de una población con condiciones de salud genital respecto de otro grupo con VB, con el fin de averiguar si la existencia de la misma puede asociarse con este síndrome y ver su utilidad como método diagnóstico.

Para este estudio se tomó como referencia el trabajo de Briselden del año 1992, quien investigó la presencia de esta enzima en lavados vaginales, pero en lugar de realizar la cuantificación de la enzima con medición de fluorescencia, se realizó según la técnica descrita posteriormente en el año 1998 por Cauci, quién efectúa la medición del metoxifenol formado tras la hidrólisis enzimática del derivado del ácido metoxifenil acetil murámico.

En este análisis se pudo observar que ambos grupos compartían valores de actividad de enzima comprendidos entre 0,5 a 5,1 nmoles de metoxifenol, a diferencia de los resultados obtenidos por Cauci quien señala que sólo 5 de cada 100 mujeres sanas presentan actividad sialidasa (Cauci y cols.1998). En nuestro grupo de pacientes con VB sólo el 21,17% registraron valores mayores a 5,1 con una mediana de 3,4 (rango 0,5-17). El análisis estadístico entre ambos grupos evidenció una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en la actividad de la enzima, por lo que para nosotros sería indicativo de una VB un hallazgo mayor a 5,5 teniendo

en cuenta los valores encontrados en la población sana. Este sería un valor diez veces mayor al propuesto por Cauci, con una especificidad del 100%, sin discriminar si las pacientes poseen o no Ig A anti-hemolisina de *Gardnerella vaginalis*.

Según Cauci la presencia de bajos niveles de sialidasa en pacientes con vaginosis puede deberse a la presencia de IgA específica anti-hemolisina de *Gardnerella vaginalis*, puesto que encontraron una relación inversa entre Anti Ig A hemolisina de *G. vaginalis* y el tenor de sialidasas en casos de VB.

Smayevsky y cols. (2001), hicieron un estudio cualitativo en papel (spot) de presencia de sialidasa en una población con VB y otra sin VB. Se basaron en el trabajo de Briselden donde efectúan detección cualitativa de sialidasa mediante el uso en papel de ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetil-neuramínico y acetato de sodio.

Smayevsky y cols. informan una sensibilidad del 92% y una especificidad del 94%, en sus resultados, sin hacer referencia del límite del método utilizado.

Estos datos no son comparables con los nuestros por ser un método cualitativo, distinto al que nosotros empleamos.

Nosotros proponemos que el uso de la detección cuantitativa por la técnica del metoxifenol no debe ser asociada con VB salvo que se considere un valor de corte $\geq 5,5$ nm de metoxifenol (Ombrella y cols. 2006). Según nuestros resultados un 21,17% de pacientes con VB presentaron una producción de sialidasa superior a 5,5nm, como se expresó en el ítem 4.3.1.

Además se concluye que no resultaría útil esta determinación como única prueba para el diagnóstico de VB si tenemos en cuenta la posibilidad de la existencia en ciertas pacientes de Anti IgA hemolisina de *G. vaginalis* específica, la que está relacionada con bajos valores de sialidasa en pacientes con VB (Cauci y cols. 1998).

5.3.2.- Producción de citolisina por distintos aislamientos de *Gardnerella vaginalis*

La actividad hemolítica de un microorganismo se correlaciona con su virulencia. *Gardnerella vaginalis* es capaz de producir una exotoxina hemolítica que es selectiva de células humanas puesto que se comprobó que para que se produzca la hemólisis de los glóbulos rojos humanos (GRH) es necesaria la presencia de la molécula reguladora del complemento CD59. La interacción entre la vaginolisina (VLY) y la molécula CD59 se cree que juega un rol crítico en la patogénesis de la VB y el desarrollo de sus complicaciones (Gelber y cols. 2008).

El efecto tóxico de la VLY se basa en su habilidad de formar poros en la membrana celular del eritrocito humano provocando la lisis del mismo.

La activación del p38 MAPK (que es mitógeno activador de una proteinquinasa de las células epiteliales), por parte de bacterias con toxinas formadoras de poros es esencial para la defensa de la célula huésped de los ataques de la toxina. Gelber señala haber encontrado una activación del p38 MAPK y de IL8 en las células epiteliales humanas de pacientes con VB, hipotetizando que esto podría ser el mayor factor de inmunopatología del síndrome (Gelber y cols. 2008).

En este trabajo se estudió la capacidad de producción de citolisina en los aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de los grupos con y sin VB. El objetivo de este estudio fue conocer el comportamiento de este factor de virulencia en cuanto a su magnitud de expresión en aislamientos provenientes de casos de VB y en los de casos controles. Para esto se tomó como referencia el trabajo de Rottini de 1990, haciendo previamente un cultivo en caldo con almidón y Tween 80 para facilitar la liberación de la hemolisina de la bacteria al medio y prevenir su inactivación, para luego enfrentarla a una suspensión de GRH leyéndose a posteriori su producción con espectrofotómetro.

Lo que se pudo ver es que todas las cepas ensayadas incluso la ATCC 14018 produjeron citolisina y no se detectaron diferencias significativas en la

capacidad de producción en ambos grupos ($p=0.29$), con medianas del grupo control versus el de VB de 1,45 y 1,80 respectivamente.

En el estudio de Rottini realizan la detección de producción de actividad hemolítica de la citolisina en distintos medios de cultivo, de donde establecen como óptimo el suplementado con almidón y Tween 80, debido a un gran incremento de la actividad hemolítica bajo estas condiciones. En todos los ensayos realizados tuvieron más de un 98% de hemólisis en la totalidad de los cultivos luego de enfrentar el sobrenadante a los GRH. Hicieron una curva de crecimiento paralela a la curva de producción de hemólisis y el tiempo sugerido para realizar el ensayo de detección de hemólisis fue un desarrollo previo de 36 hs. Este autor trabajó con un aislamiento clínico cuyas pruebas bioquímicas dieron idénticas a la ATCC 14018.

Otro autor como Gelbert en el 2008 hace un ensayo en microplacas de poliestireno usando colesterol, eritrocitos y la toxina purificada para demostrar que una incubación previa de la toxina (VLY) con colesterol inhibe la lisis de los GRH, sin hacer referencia de valores de detección de hemólisis. Trabajó con las tres cepas ATCC de *Gardnerella vaginalis*.

En una publicación más reciente se describe una técnica de ELISA sándwich para detectar la producción de VLY por las 3 cepas ATCC de *G. vaginalis* más un aislamiento clínico, usando antisueros policlonales. La sensibilidad de esta técnica fue a nivel de ng/ml y las cuatro cepas ensayadas demuestran producción de VLY aproximadamente entre 600 y 1000 ng/ml a las 36 hs (Randis y cols. 2009).

En el 2010 Harwich y cols. realizaron un ensayo sobre una monocapa de células epiteliales cervicales exponiendo la misma al efecto de *G. vaginalis* proveniente de una paciente con VB y otra aislada de paciente sana y encontraron un mayor efecto por parte de las primeras

En los trabajos de los distintos autores se emplean otros ensayos para la detección de esta enzima y no se pueden comparar con el que se llevó a cabo en este estudio de tesis. En la observación de las 20 cepas estudiadas, encontramos

producción de esta enzima tanto en el grupo control como en la población con VB donde hubo de un 50 a 100% de hemólisis, sin diferencias significativas ($p=0,29$).

Por los resultados obtenidos podemos decir que este factor de virulencia no adopta una mayor expresión sobre los GRH en la experiencia in vitro cuando se trata de un aislamiento de *Gardnerella* infectante respecto de otro colonizante.

5.3.3.- Producción de biofilm de cepas colonizantes e infectantes de *G. vaginalis*

G. vaginalis puede adherir a las células del epitelio vaginal y atacar tanto a las células de descamación vaginal como a las células de cultivos. Swidsinski en el año 2005 demostró que este género es capaz de formar un biofilm adherente en el epitelio vaginal de mujeres con VB. Este biofilm incorpora otros grupos bacterianos como bacterias anaerobias que también colonizan la vagina, lo que funciona como un consorcio en la patogenia de la enfermedad.

Swidsinski y cols. estudiaron en el 2005 la formación de biofilm in vivo por hibridación in situ en el epitelio vaginal de pacientes con VB y pacientes sanas, encontrando que en VB la bacteria que predominaba era *G. vaginalis* junto a otros grupos bacterianos en un biofilm altamente organizado mientras que en las pacientes sanas no encontraron biofilm sino bacterias en acúmulos dentro de la propia secreción vaginal con predominio de lactobacilos.

En esta tesis se propuso estudiar si los aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de pacientes con VB eran distintos de los del grupo de pacientes con salud genital, en cuanto a la capacidad de formar biofilm. Nos basamos en el modelo planteado por Patterson en el año 2010, de formación de biofilms en microplacas.

La lectura se realizó en forma cuali y cuantitativa, se pudo observar una fuerte producción de biopelícula ($DO > 0,164$) en todos los aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de pacientes con VB, mientras que en las cepas colonizantes solo un 10 % tuvo una fuerte producción y el 90 % restante presentó

un grado moderado de producción en el 30% ($0,082 < DO < 0,164$) y débil ($DO \leq 0,082$) en el 60% restante. El análisis estadístico de los resultados de la lectura cuantitativa del biofilm formado en las microplacas, de ambos grupos dio una diferencia significativa ($p < 0.0001$), por lo que podemos afirmar que en ambos grupos se aprecia la capacidad de formar el biofilm, pero existe una mayor producción por parte de los aislamientos provenientes del grupo de pacientes con VB.

En el estudio de Patterson se compara la formación de biofilm entre tres aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de pacientes con VB y seis géneros distintos de anaerobios que suelen asociarse en la VB, generando *G. vaginalis* la formación de moderados o fuertes biofilms, *Fusobacterium nucleatum* fue otro formador de biofilm moderado y ningún otro anaerobio asociado a VB dio un biofilm significativo.

Otro estudio hecho por Harwich en el 2010 con un aislamiento proveniente de una paciente con VB comparado con otra *G. vaginalis* proveniente de paciente sin VB encontró que la producción de biofilm era mayor en la primera, con un ensayo en microplacas como el hecho en este estudio de tesis. Fue entonces que probaron con otras dos *G. vaginalis* provenientes de pacientes con vaginosis y notaron una biopelícula mayor a la cepa de paciente sana, estudiaron un segundo aislamiento de paciente sana y también mostró menor biofilm que los aislamientos de VB.

De esta experiencia *in vitro* sobre los 20 aislamientos de ambos grupos estudiados, surgen resultados concordantes con los de Harwich y se puede pensar en una mayor virulencia por parte de los aislamientos de *G. vaginalis* provenientes de una VB, como estos mismos autores lo expresan.

Si bien las condiciones de ensayo difieren con la situación *in vivo*, por la ausencia de otros factores presentes en el nicho ecológico vaginal, resulta igualmente informativo ya que permite explicar las recidivas o cronicidad de este síndrome que muchas veces parece resistir a la regresión hacia el estado de salud pese a los tratamientos antibióticos.

5.3.4.- Conclusiones

- La selección de casos de VB se hizo con una buena sensibilidad de los parámetros de Amsel (entre 87 y 100%) y con criterios microbiológicos categóricos: (Puntaje numérico ≥ 7) con aislamiento en abundante cantidad de *Gardnerella vaginalis*.

- La inclusión como casos controles se fundamentó en los siguientes criterios microbiológicos: a) un puntaje numérico entre 0 y 3; b) aislamiento predominante de *Lactobacillus* spp.

La incidencia de *G. vaginalis* en la población control estudiada resultó del 13%.

- La incidencia de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. en la población sana fue del 1,3 % y 9,1 % respectivamente; en la población con VB fue de 13 y 27,3% respectivamente. De ambas especies la recuperada en forma predominante en ambas poblaciones fue *Ureaplasma* spp. Dentro del grupo con VB también ocurrió lo mismo e incluso dentro de la misma población se encontró infección mixta por ambas especies en un 2,6% del grupo. El hallazgo de *M. hominis* resultó estadísticamente significativo de VB ($p < 0.0001$).

- La enzima sialidasa estuvo presente en el lavado vaginal de ambas poblaciones por lo que se sugiere un punto de corte para su interpretación como índice de VB a valores $\geq 5,5$ nmoles de metoxifenol. Consideramos que no puede usarse esta determinación como único parámetro para el diagnóstico ya que se han observado casos de VB sin enzima detectable.

- La capacidad de producción de citolisina estuvo presente en ambos grupos y no se detectó diferencia significativa en el estudio hecho in vitro de la enzima sobre los glóbulos rojos humanos ($p = 0,29$).

- En cuanto a la producción de biofilm, tanto el grupo control como el de VB lo produjeron, pero hubo diferencia significativa en cuanto a la magnitud de la producción, siendo mayor en el grupo con VB ($p < 0.0001$). Se infiere que hay mayor expresión de virulencia por parte de los aislamientos infectantes.

Finalmente se podría decir que *Gardnerella vaginalis* que es reconocida actualmente como uno de los principales microorganismos involucrados en la VB, tiene un potencial de virulencia innato, siendo la adherencia el requisito previo a la infección y por lo tanto la iniciadora tal vez del cuadro clínico.

Teniendo en cuenta que en la Vaginosis Bacteriana se produce un sobredesarrollo de este microorganismo aumentan sus probabilidades de actuar sobre el epitelio vaginal, ante la falta de control de los productos bactericidas como el H_2O_2 y bacteriocinas que secretan los lactobacilos para resguardar el nicho ecológico vaginal. Además llevarían a cabo el daño celular a través de la producción de vaginolisina y sialidasas aportadas por *G. vaginalis* y otros anaerobios incluso micoplasmas, debido al mayor número presente como consecuencia del desequilibrio.

El test de sialidasa no es útil por sí solo como herramienta diagnóstica para señalar una VB, sabemos que está presente en población sana como con vaginosis y puede dar negativa en esta última. Por lo tanto sería prudente tomar como referente el valor $\geq 5,5$ nmoles de metoxifenol para considerarla positiva y como prueba complementaria de los criterios de Amsel y puntaje de Nugent.

En cuanto a la investigación de micoplasmas en este cuadro clínico tiene relevancia sólo en pacientes con inmunodepresión o embarazadas por su potencial patógeno, siendo indicativo de una VB el hallazgo de *M. hominis*.

En base a los resultados obtenidos se observa que los aislamientos de *Gardnerella vaginalis* de pacientes con Vaginosis Bacteriana tienen mayor capacidad para adherir que los que provienen de pacientes sanas y que al producir enzimas como citolisina y sialidasa, las que actúan localmente sobre la

mucosa del epitelio vaginal degradando mucinas que tienen un rol protector, contribuyen a la exfoliación y pérdida de células del epitelio vaginal, tornando al epitelio más permeable para el ingreso de los virus de la inmunodeficiencia humana, virus Papiloma, entre otros microorganismos.

Se plantean nuevos desafíos para el diagnóstico de esta patología en pacientes con inmunosupresión para quienes deben buscarse métodos diagnósticos más sensibles que los empleados en una población normoinmune, puesto que la sintomatología puede pasar desapercibida.

En el medio ambiente natural los microorganismos conforman agregados microbianos donde distintas especies establecen una relación y dependencia que dan lugar a los hoy conocidos biofilms. Por lo tanto deberían estudiarse como consorcio bacteriano o patogrupo como lo denominara Dowd (2008), por su naturaleza multifactorial.

Tal vez el control de estos procesos como la VB que tienden a comportarse como crónicos debería enfocarse hacia el control de crecimiento del biofilm.

Los estudios realizados en esta tesis nos han permitido esclarecer algunos de los aspectos de la virulencia de *Gardnerella vaginalis* que es uno de los microorganismos implicados en la patogénesis de la VB. Queda por conocer el mecanismo por el cual este microorganismo cambia su comportamiento pasando de colonizante a infectante y persistente en algunos casos. Posiblemente pueda estar vinculado a la expresión de determinados genes, quedando esto planteado como un interrogante para estudios posteriores.

Abele-Horn M, Scholz M, Wolff C. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 973-8.

Al-Mushrif S, Jones BM. A study of the prevalence of hydrogen peroxide generating lactobacilli in bacterial vaginosis: the determination of H₂O₂ concentrations generated, in vitro, by isolated strains and the levels found in vaginal secretions of women with and without infection. *Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 18: 63-7.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.

Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Short S, Faro J, Simoes JA, Gurguis A, Faro S. Defense factors of vaginal lactobacilli. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001; 185: 375-9.

Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin A. Lactobacillus strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(3): 424-32.

Aulet de Saab O, Castillo M, Ruiz Holgado A, Nader O. A Comparative Study of Preservation and Storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2001; 96(4): 583-6.

Belmonte A, Nogueras M, Ombrella A, Ruiz Abad I, Nistal M, Sutich E, Caffarena G, Dlugovitzky D. Estudio microbiológico de vaginitis y vaginosis en mujeres sexualmente activas. *Medicina (Buenos Aires)* 2002; 62: 103-6.

Belmonte A, Nogueras M, Ombrella A, Ruiz Abad I, Sutich E. Detección de micoplasmas en pacientes con Vaginosis Bacteriana. Libro de Resúmenes Reunión Científica Microbiología Clínica 2003 SADEBAC Bs As (O-006).

Belmonte A, Nogueras M, Contigiani M, Gandini V, Sutich E. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Revista Bioquímica y Patología Clínica* 2008; 72: 15-8.

Benito R, Vazquez JA, Berron S, Fenoll A, Saez-Neito JA. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. *J Med Microbiol* 1986; 21(4): 357-9.

Bennett KW, Winstanley TG, Taylor AKM, Shorhouse AJ. Anaerobic curved rods in breast abscess and vagina. *Lancet* 1989 ; 1(8637): 564.

Boesen T, Fedosova NU, Kjeldgaard M. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesion. *Protein Sci* 2001; 10: 2577-96.

Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect* 2000; 2: 543-6.

Boustouller YL, Johnson AP, Taylor-Robinson D. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. *Journal of Medical Microbiology* 1987; 23 (4): 327-9.

Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis* 2006; 194(6): 828-36.

- Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Spallino A. Inhibitory activity of thymol on native and mature *Gardnerella vaginalis* biofilms: in vitro study. *Arzneimittel- Forschung* 2010; 60(11): 675-81.
- Briselden AN, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SI. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 663-6.
- Brotman RM, Ghanem KG, Klebanoff MA, Taha TE, Scharfstein DO, Zenilman JM. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(6): 628. e1-7.
- Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(1): 69-87.
- Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(3): 213-37.
- Cauci S, Monte R, Ropele M, Missero C, Not T, Quadrifoglio F, Menestrina G. Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin. *Mol Microbiol* 1993; 9(6): 1143-55.
- Cauci S, Driussi S, Monte R, Lanzafame P, Pitzus E, Quadrifoglio F. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(3): 511-5.
- Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, De Seta F, Quadrifoglio F, de Aloysio D, Guaschino S. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6): 2147-52.
- Cauci S, Thorsen P, Schendel DE, Bremmelgaard A, Quadrifoglio F, Guaschino S. Determination of Immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* Hemolysin, Sialidase, and Prolidase Activities in Vaginal Fluid: Implications for Adverse Pregnancy Outcomes *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 435-8.
- Cedillo-Ramirez L, Gil C, Zago I, Yanez A, Giono S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of nonspecific vaginitis. *Rev Latinoam Microbiol* 2000; 42(1): 1-6.
- Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Herpes simplex tipo 2 y vaginosis. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003; 37(3): 319-25.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 996-1006.
- Clarke R W, Collins L E, Maskell R. *Gardnerella vaginalis* as a urinary pathogen. *J Infect* 1989; 19(2):191-3.
- Cohn JA, Hashemi FB, Camarca M, Kong F, Xu J, Beckner SK, Kovacs AA, Reichelderfer PS, Spear GT. HIV-inducing factor in cervicovaginal secretions is associated with bacterial vaginosis in HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39(3): 340-6.
- Corfield T. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* 1992; 2(6): 509-21.
- Costerton JW. Introduction to biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11(3-4): 217-21.

Criswell BS, Ladwig CL, Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. *Obstet Gynecol* 1969; 33(2): 195-9.

Culhane JF, Rauh V, McCollum KF, Elo IT, Hogan V. Exposure to chronic stress and ethnic differences in rates of bacterial vaginosis among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(5):1272-6.

Cu-Uvin S, Hogan JW, Caliendo AM, Harwell J, Mayer KH, Carpenter CC. HIV Epidemiology Research Study: Association between bacterial vaginosis and expression of human immunodeficiency virus type 1 RNA in the female genital tract. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6): 894-6.

Daniele M, Ruiz F, Pascual L, Barberis L. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* sensitivity to bacteriocins produced by two Lactobacilli strains. *Curr Microbiol* 2011; 63(4): 360-5.

De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Algumber MA, Burton JP, Tagg JR, Temmerman M, Vanechoutte M. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol* 2007 ; 7: 115.

Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum*(biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 2004; 31(3): 192-5.

Dienes L, Edsall G. Observations on the L-organism of Klieneberger. *Proc. Soc Exp. Biol. Med.* 1937; 36: 740-4.

Döderlein A: Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. Verlag von Eduard Besold, Leipzig. 1892.

Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Smith E, Rhoads D. Polymicrobial Nature of Chronic Diabetic Foot Ulcer Biofilm Infections Determined Using Bacterial Tag Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One* 2008; 3(10): e3326.

Dunkelberg WE Jr, McVeigh I. Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 1969; 35(2): 129-45.

Dunkelberg WE Jr, Skaggs S, Kellogg DS Jr. A study and new description of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). *Am J Clin Pathol* 1970; 53(3): 370-7.

Eschenbach DA, Hillier S, Critchlow C, Stevens C, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158(4): 819-28.

Falsen E, Pascual C, Sjöden B, Ohlén M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterisation of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J Syst Bacteriol* 1999; 49: 217-21.

Forsum U, Jacobson T, Larsson PG, Smith H, Beverly A, Bjorneren A, Carlsson B, Csango P, Donders G, Hay P, Ion C, Kene F, McDonald H, Moi H, Platz-Christensen JJ, Schwbke J. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smears criteria of bacterial vaginosis. *APMIS* 2002; 110(11): 811-8.

Forsum U, Larsson PG, Spiegel C. Scoring vaginal fluid smears for diagnosis of bacterial vaginosis: need for quality specifications. *APMIS* 2008; 116(2):156-9.

Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353(18):1899-911.

Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3(Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(3): 487-91.

Gahmberg CG, Tolvanen M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(8): 308-11.

Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69(5): 962-76.

Gardner HL. "Non-specific" vaginitis: a non-entity." *Scand J Infect Dis* 1983; 40 (Suppl.): 7-10.

Geissdörfer W, Böhmer C, Pelz K, Schoerner C, Frobenius W, Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2788-90.

Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol* 2008; 190(11): 3896-903.

Goldberg RL, Washington JA II. Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from peptone-starch-dextrose agar and Columbia colistin-nalidixic acid agar. *J Clin Microbiol* 1976; 4(3):245-7.

Gorbach SL, Menda KB, Thadepalli H, Keith L. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117(8): 1053-5.

Gravet MG, Eschenbach DA. Possible role of *Ureaplasma urealyticum* in preterm premature rupture of the fetal membranes. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5(6 suppl): S253-7.

Greenwood J, Pickett M. Salient features of *Haemophilus vaginalis*. *J Clin Microbiol*. 1979; 9(2): 200-4.

Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30:170-8.

"Guía Práctica Integral (Clínica-Laboratorio) de diagnóstico de vaginosis-vaginitis en la atención primaria de la mujer en edad fértil". Enero a diciembre 2010 (disponible en www.fasgo.org.ar/).

Haggerty CL, Hillier SL, Bass DC, et al. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(7): 990-5.

Haggerty CL, Totten PA, Ferris M, Martin DH, Hoferka S, Astete SG, Ondondo R, Norori J, Ness RB. Clinical characteristics of bacterial vaginosis among women testing positive for fastidious bacteria *Sex Transm Infect* 2009; 85(4): 242-8.

Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF 3rd, Patterson JL, Oki AT, Girerd PH, Jefferson KK . Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. BMC Genomics. 2010;11:375.

Henrich B, Hoppe M, Kitzerow A, Hadding U. The adherence associated lipoprotein PI00, encoded by an opp operon structure function as the oligopeptide binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. J Bacteriol 1999; 181(16): 4873-8.

Holzman C, Leventhal JM, Qiu H, Jones NM, Wang J. Factors Linked to Bacterial Vaginosis in Nonpregnant Women. American Journal of Public Health 2001; 91(10): 1664-70.

Ingianni A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei R. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). FEMS Immunology and Medical Microbiology 1997;18(1): 61-6.

Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. Sex Transm Infect. 2002; 78(6): 413-5.

Jarosik GP, Land CB, Duhon P, Chandler R Jr, Mercer T. Acquisition of Iron by *Gardnerella vaginalis* Infect. Immun. 2000; 66(10): 5041-7.

Jian W, Zhu L, Dong X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001; 51(Pt 5): 1633-8.

Johnson JL, Phelps CF, Cummins CS, London J, Gasser F. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. Int. J. Syst. Bacteriol 1980; 30: 53-68.

Johnson AP, Davies HA. Demonstration by electron microscopy of pili on *Gardnerella vaginalis*. British Journal of Venereal Diseases 1984; 60(6): 396-7.

Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, et al. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. Int J STD AIDS 2000; 11: 356-60.

Keane FE, Maw R, Pritchard C, Ison C. Methods employed by genitourinary medicine clinics in the United Kingdom to diagnose bacterial vaginosis. Sex Transm Infect 2005; 81:155-7.

Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. Obstet Gynecol. 2004; 104(2): 267-72.

Klebanoff MA, Hillier SL, Nugent RP, MacPherson CA, Hauth JC, Carey JC et al. Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation? Am J Obstet Gynecol 2005; 192(2): 470-7.

Kurki T, Sivonen A, Renkonen OV, Savia E, Ylikorkala O: Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. Obstetrics and gynecology 1992; 80(2): 173-7.

Lam MH, Birch DF, Fairley KF. Prevalance of *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract. J Clin Microbiol 1988; 26(6):1130-3.

Lanzafame P, Cauci S. A modified Nugent score has a very high sensitivity for bacterial vaginosis. BV 2000. Third international Meeting on Bacterial Vaginosis. 2000, p.9, Ystad, Sweden.

Lapage SP. *Haemophilus vaginalis* and its role in vaginitis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1961; 52: 34-54.

Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos. An Sist Sanit Navar. 2005; 28 (2): 163-75.

Leopold S. Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. U S Armed Forces Med J. 1953; 4(2): 263-6.

Li YH, Brauner A, Jonson B, van der Ploeg I, Söder O, Holst M, Jensen JS, Lagercrantz H, Tullus K. *Ureaplasma urealyticum* production of proinflammatory cytokines by macrophages. Pediatr Res 2000; 48(1): 114-9.

Lin DP, Pan BJ, Fuh JC, Huang TH. Improving Gram-stained reproducible result by further adding clue cells in diagnosing bacterial vaginosis. Kaohsiung J Med Sci. 2002; 18(4) 164-70.

Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, Li L, Nelson KE, Xia Y, Xiang C. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. BMC Genomics 2010; 11: 488.

Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in the regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(2):137-49.

Lutz A, Grooten O, Wurch T. Etude des caractères culturels et biochimiques de bacilles du type '*Haemophilus hemolyticus vaginalis*'. Rev Immunol Ther Antimicrob. 1956; 20(3): 132-8.

Manual de Procedimientos BACOVA. MPB-2011. www.fba.org.ar. PROSAR consensos. Proyecto disfunción vaginal. 2011; 1-23.

Mardh PA, Westöm L. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. Infect Immun. 1976; 13(3): 661-6.

Martínez MA, Ovalle A, Gaete AM, Lillo E, de la Fuente F, Araneda F, Villaseca R, Salinas H. Comparación de los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana y análisis de los resultados discordantes por el método de Ison y Hay. Rev Med Chil. 2011; 139(1): 66-71.

McCormac WM, Hayes CH, Rosner B, Evrard JR, Crockett VA, Alpert S, Zinner SH. Vaginal colonization with *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). J Infect Dis 1977; 136(6):740-5.

Meltzer MC, Desmond RA, Schwebke JR. Association of *Mobiluncus curtisii* with recurrence of bacterial vaginosis. Sexually Transmitted Diseases. 2008; 35 (6): 611-3.

Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Gannerre M, Bretelle F. High Vaginal Concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in Women Undergoing Preterm Labor. Obstet Gynecol 2010; 15(1):134-40.

Mitchell CM, Hitti JE, Agnew KJ, Fredricks DN. Comparison of oral and vaginal metronidazole for treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: impact on fastidious bacteria. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9:89.

Morris M, Nicoll A, Simms I, Wilson J, Catchpole M. Bacterial vaginosis: a public health review. *BJOG* 2001; 108(5): 439-50.

Myer L, Denny L, Telerant R, Souza M, Wright TC Jr, Kuhn L. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. *J Infect Dis* 2005; 192(8): 1372-80.

Nogueras M, Belmonte A, Contigiani M, Gandini V, Sutich E. Cinética de crecimiento de *Gardnerella vaginalis* en distintos medios de cultivo. Presentación en el Congreso de Microbiología (Córdoba-Argentina) Organizado por la Asociación Argentina de Microbiología. 2007- 19612.

Nogueras M, Belmonte A, Ombrella A, Nistal M, Cansani E, Dlugovitzky D. Etiology of Sexually Transmitted Diseases (STDs) in Adolescent, Clinical and Bacteriological Evaluation. Publicación en revista *Biocell* - volumen 22 - numero 1 – abril 1998 - Mendoza, Argentina. Trabajo N° 49.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(2): 297-301.

Odin A. Sialic acid in human cervical mucus, in hog seminal gel, and in ovomucin. *Act Chem Scand* 1955; 9: 1235-6.

Ombrella A, Belmonte A, Nogueras M, Ruiz Abad I, Sutich E, Dlugovitzky D. Actividad sialidasa en mujeres con vaginosis bacteriana *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 131-4.

Park C, Fauber M, Cook CB. Identification of *Haemophilus vaginalis*. *American Journal of Clinical Pathology.* 1968; 49: 590-3.

Pascual L Bacteriocinogenia en el género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto. Argentina (2004).

Patterson JL, Girerd PH, Karjane NW, Jefferson KK. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am J Obstet Gynecol.* Aug 2007; 197(2): 170.e1-7.

Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilms formation and cytotoxicity suggest a greatervirulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology.* 2010; 156(2): 392-9.

Peeters M, Piot P. Adhesion of *Gardnerella vaginalis* to vaginal epithelial cells. Variables affecting adhesion and inhibition by metronidazole. *Genitourinary Medicine* 1985; 61: 391-5.

Pheifer TA, Forsyth PS, Durfee MA, Pollock HM, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N Engl J Med.*1978; 298:1429-34.

Piot P, Van Dyck E, Goodfellow M, Falkow S. A taxonomic study of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955. *Microbiology* 1980; 119(2): 373-96.

- Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK: Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol 1984; 20: 677-9.
- Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science 1999; 283: 1837-9.
- Povlsen K, Bjornelius E, Lidbrink P, et al. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 to nongonococcal urethritis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 97-101.
- Rabe LK, Hillier SL. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. J Clin Microbiol. 2003; 41(7): 3260-4.
- Randis TM, Kulkarni R, Aguilar JL, Ratner AJ. Antibody-Based Detection and Inhibition of Vaginolysin, the *Gardnerella vaginalis* Cytolysin. PLoS ONE 2009; 4(4): e5207.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacke C, Brotman R, Davis C. Vaginal microbiome of reproductive-age women. PNAS March 15, 2011;108 (1): 4680-7.
- Reid G, Bocking A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. Am J Obstet Gynecol. 2003;189 (4):1202-8.
- Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, Nardon E, Amirante GA, Patriarca P. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 1990; 58(11): 3751-8.
- Sadhu K, Dominguez PA, Chow AW, Nelligan J, Cheng N, Costerton JW. *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. J. Med. Microbiol. 1989; 29: 229-35.
- Scott TG, Smyth CJ. Hemagglutination and tissue culture adhesion of *Gardnerella vaginalis*. J Gen Microbiol. 1987; 133(8):1999-2005.
- Scott TG, Smyth CJ, Keane CT. *In vitro* adhesiveness and biotype of *Gardnerella vaginalis* strains in relation to the occurrence of clue cells in vaginal discharges. Genitourinary Medicine.1987; 63(1): 47-53.
- Sha BE ,Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women.J Clin Microbiol. 2005; 43(9): 4607-12.
- Smayevsky J, Fernández Canigia L, Lanza A, Bianchini H. Vaginal microflora asociated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. Infect Dis Obstet Gynecol 2001; 9(1): 17-22.
- Sobel JD, Schneider J, Kaye D, Levison ME. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. Infect Immun. 1981; 32(1): 194-7.
- Spiegel CA, Roberts M. Mobiluncus gen. nov. Mobiluncus curtisii subsp. curtisii sp. nov., Mobiluncus curtisii subsp. holmesii subsp. nov., and Mobiluncus mulieris sp. nov., curved rods from the human vagina. Int J Syst Bacteriol. 1984; 34: 177-84.

- Spiegel CA. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(4): 485-502.
- Srinivasan S, Fredricks DN. The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Volume 2008, Article ID 750479, 22 pages 2008. doi:10.1155/2008/750479.
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 2007;115: 891-9.
- Strus M, Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Kochan P, Heczko PB. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2006; 48: 56-63.
- Sturm AW, Sikkenk PJH. Anaerobic curved rods in breast abscess. Lancet 1984 ; 2:1216.
- Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, Lochs H: Adherent biofilms in bacterial vaginosis. Obstet Gynecol. 2005; 106:1013-23.
- Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffel Y, Scholze J, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. Am J Obstet Gynecol 2008; 198(1): 97.e91-6. doi: 10.1016/j.aog.2007.06.039.
- Taylor G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. Curr Opin Struct Biol. 1996; 6(6): 830-7.
- Taylor-Robinson AW, Borriello SP, Taylor-Robinson D. Identification and preliminary characterization of a cytotoxin isolated from *Mobiluncus* spp. Int J Exp Pathol. 1993; 74(4): 357-66.
- Taylor-Robinson D. Infection due to species of *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas*: an update. Clin Infect Dis. 1996; 23(4):671-84.
- Tozzini RI, Ruiz Abad I, Molteni OA, Belmonte A, Noguerras M, Ombrella A. Investigación de la flora autóctona y de transmisión sexual en 100 mujeres sintomáticas y asintomáticas. Obstetricia y Ginecología Latinoamericana 1998; 56(3):185-8.
- Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. Lancet. 2003 Mar 22; 361(9362): 983-8.
- Valore EV, Park CH, Igteti SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2002;187(3): 561-8.
- Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal *Lactobacillus* Flora of Healthy Swedish Women. J Clin Microbiol. 2002; 40(8):2746-9.
- Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vaneechoutte M Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis BMC Microbiol. 2004; 4: 16. doi:10.1186/1471-2180-4-16.

Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191(4): 1130-2.

Verstraelen H, Verhelst R, Vaneechoutte M, Temmerman M. The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. BMC Infectious Diseases 2010; 10: 81. doi:10.1186/1471-2334-10-81.

Vontver LA, Eschenbach DA. The role of *Gardnerella vaginalis* in nonspecific vaginitis. Clin Obstet Gynecol. 1981; 24(2): 439-60.

Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005 October; 18(4): 757-89.

Watts DH. Effects on pregnancy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2005; 38 suppl.1: S36-8. Review

Wells JI, Goei SH. Rapid identification of *Corynebacterium vaginale* in non-purulent vaginitis. J Clin Pathol. 1981; 34(8): 917-20.

Weström L. Effect of acute pelvic inflammatory disease on fertility. Am J Obstet Gynecol 1975 ; 121(5): 707-13.

Wurch T, Lutz A. Etude du contenu vaginal dans 500 cas de leucorrhées cytotogico-microbiologie. Revue de gynécologie et d'obstétrique. 1955; 50(9-10): 289-94.

Yeoman CJ, Yildirim S, Thomas SM, Durkin AS, Torralba M, et al. Comparative Genomics of *Gardnerella vaginalis* Strains Reveals Substantial Differences in Metabolic and Virulence Potential. PLoS ONE 2010;5(8): e12411.

Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002; 34(4): 277-81.

Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women cultivation-independent methods. Microbiology 2004;150(Pt 8): 2565-73.

Zinnemann K, Turner GC. The taxonomic position of "*Haemophilus vaginalis*" [*Corynebacterium vaginale*]. J. Pathol. Bacteriol. 1963; 85: 213-9.

ANEXO I: Consentimiento informado entregado a cada paciente

Por medio del este documento la investigadora responsable del proyecto "Estudio de factores de patogenicidad de cepas colonizantes e infectantes de *G. vaginalis* y su asociación con bacterias anaerobias" Bioq. Adriana Belmonte , DNI 10.594.591 y la Sra./Srta....., DNI.....hacen constar que ésta última presta su consentimiento para incorporarse a partir de este momento en la investigación que el citado profesional lleva adelante con el propósito de estudiar distintos aspectos de patología más frecuente en la mujer sexualmente activa como es la Vaginosis Bacteriana a partir de la extracción de mi exudado vaginal la cual será efectuada dentro de la tarea asistencial de la Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario.

Por otra parte, se deja constancia que la participación de la Sra./Srta.....en el estudio es voluntaria y que se acuerda expresamente que toda información personal que el equipo profesional obtenga con motivo de la investigación así como el hecho en sí de su participación en ella serán estrictamente confidenciales. Ante cualquier hallazgo significativo para su salud le será comunicado por la citada profesional.

La Sra./ Srta.enterada debidamente del contenido del presente y comprendiendo toda la información precedente, ratifica su participación en el proyecto y firma este documento conjuntamente con los señores.....y.....documento de identidad N°.....y N°respectivamente, que se encuentran presentes en este acto en calidad de testigos.

Se entrega un ejemplar al paciente en este acto, en la ciudad de Rosario, a losdel mes dedel dos mil cuatro.

Nombre y Apellido del paciente

Firma del paciente

Nombre y Apellido del profesional actuante

Firma del profesional

Nombre y Apellido del testigo

Firma del testigo

Nombre y Apellido del testigo

Firma del testigo

ANEXO II

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO – FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Nro.:	Sexo: F - M - H	Edad:	Fecha:
Motivo de Consulta:		Tiempo evol:	
APARATO URINARIO	Ardor miccional <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tenesmo vesical <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Dolor fondo de saco uterino	Dolor <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Poliaquiuria <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fiebre <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Puño Percusión (+) <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
APARATO GENITAL	Menarca: *FUM: Ritmo:	FARMACOS ACTUALES	
Vida sexual activa: SI – NO	**FURS:	Nro. Parejas:	
Prolapso <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	dispaurenia <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Vía: oral – vaginal – anal	
Secreción <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tampones <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Antisépticos <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Ardor <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Bidet <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Diafragma <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Prurito <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Desodorante Intimo <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	D.I.U <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Olor <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Apósitos c. /desod. <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Espermicidas <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Color:.....		Profilácticos <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Lesiones externas <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Nro. Embarazos:	***F.U. parto:	
Adenopatías <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Partos: Natural <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Abortos: Natural <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
	Cesárea <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Provocados: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Instrucción <input type="checkbox"/> Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Terciaria o universitaria			
Ocupación:.....			
MICROBIOLOGÍA	BACOVA	CULTIVOS	
ERIGE: Leuc/cpo: (GN x 1000)	Valor Numérico Nugent LD = Cbneg = B curvos = CC =	Bacteriológico:	
Leuc/cpo: (G x 400)			
Leu/Cel ep/cpo: (G x 400)			
Test de leucocito-esterasa:	VN final =	Ex.parasitológico Trichomonas presencia Si-No Rec. Inflamatoria Si-No	
pH:	Presencia de células No Habituales: Hematíes Si-No Cel. No Hab. Si-No	Micológico: Levaduras presencia Si-No Reacción inflamatoria Si-No	
Test de aminas:			
Aspecto:		Micoplasma – Ureaplasma	

* FUM: Fecha Ultima Menstruación; **FURS: Fecha de ultima relación sexual

*** FUParto: Fecha Ultimo Parto; LD: Lactobacillus spp; Cbneg.:cocobacilos Gram negativos

B curvos: Bacilos curvos; CC: clue cells; VN final: Valor Numérico final

Cel. No Hab.: Células No Habituales.