



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE

QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPORTANCIA DE LOS GÉNEROS *CHLAMYDIA* Y *GARDNERELLA*
EN LAS ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL**

TESINA TEÓRICA-PRÁCTICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JAIME CASTILLO ORTEGA

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLOTECA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, FEBRERO DEL 2000.

No. Adq. J50488

No. Título 245 QFB

Clas. Ts. 616.9

C 352i



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE

QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

LICENCIATURA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**IMPORTANCIA DE LOS GÉNEROS CHLAMYDIA Y GARDNERELLA EN LAS
ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL**

TESINA TEÓRICA-PRÁCTICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JAIME CASTILLO ORTEGA

DIRECTOR:

Firmas

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ

SINODALES:

Q.B. MA. ELENA VILLAGRAN HERRERA

M. en C. MA. DE LOS ANGELES MUÑOZ URQUIZA

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES

Director de la Facultad de Química

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO., 2000
U. A. Q.

AGRADECIMIENTOS

*Gracias a Dios por darme lo necesario para cumplir
esta meta*

*A mis Padres por su sacrificio, paciencia, confianza y
aliento en los momentos difíciles*

*A mis Familiares por estar siempre conmigo con su
comprensión, cariño y su ayuda desinteresada*

*A Berta por su compañía y su apoyo incondicional
cuando lo necesitaba*

*A mis Amigos por su amistad y por compartir tantos
momentos agradables*

*A la U.A.D. y mis Maestros por enseñarme sus
conocimientos*

*Tu puedes recibir todo lo que deseas en la vida, si ayudas a
los demás a recibir lo que ellos desean*

ÍNDICE GENERAL

Indice general	i
Indice de cuadros	iii
Indice de tablas	iv
Resumen	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
A) <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
a) Morfología y ciclo de crecimiento	
b) Epidemiología	
c) Toxicidad e inmunidad	
d) Cuadro clínico	
e) Patologías	
f) Aspectos de las infecciones genitales	
B) <i>Gardnerella vaginalis</i>	12
a) Características morfológicas y de cultivo	
b) Epidemiología	
c) Toxicidad e inmunidad	
d) Cuadro clínico	
e) Etiología	
f) Patología	
III. Objetivos	18

IV. Material y métodos	19
A) <i>Chlamydia trachomatis</i>	19
a) Material	19
Recolección de la muestra	
Material biológico	
Material de laboratorio	
Reactivos	
Aparatos y equipos	
b) Métodos	21
1.- Directos	21
Métodos directos previa tinción	
Técnica de Papanicolaou	
Método de cultivo celular	
Inmunofluorescencia directa	
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación de DNA	
Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR)	
Búsqueda de Ag por el método de epifluorescencia directa	
2.- Indirectos	28
Prueba de Fijación de Complemento (FC)	
Inmunofluorescencia Indirecta (IF)	
Micro Inmunofluorescencia (micro-IF)	
Enzimoimmunoensayos (EIA)	
Prueba de Frei	
B) <i>Gardnerella vaginalis</i>	31
a) Material	31
Material biológico	
Material de laboratorio	
Reactivos	
b) Métodos	32
Características del flujo vaginal	
Prueba de olor	
pH vaginal	
Descubrimiento de células guía	
V. Relevancia del estudio	35
VI. Resultados	36
VII. Discusiones	38
VIII. Conclusiones	40
IX. Bibliografía	42

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Ciclo de multiplicación de <i>Chlamydia</i>	5
Cuadro 2 Propiedades diferenciales de <i>Gardnerella</i> y otros géneros morfológica o fisiológicamente diferentes	12
Cuadro 3 Criterio para el diagnóstico de Vaginosis Bacteriana	16
Cuadro 4 Características macroscópicas y microscópicas de <i>G. vaginalis</i>	34
Cuadro 5 Características bioquímicas de <i>G. vaginalis</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Determinación de anticuerpos IgG	30
Tabla 2 Determinación de anticuerpos IgA	30

RESUMEN

En la actualidad las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) constituyen el grupo más frecuente de enfermedades infecciosas de declaración obligatoria en la mayor parte de los países, estas se presentan especialmente en personas entre 15 y 50 años de edad y con menor frecuencia en lactantes. Su control es importante teniendo en cuenta la elevada incidencia de infecciones agudas, complicaciones y secuelas, así como su impacto socioeconómico y el papel que desempeñan en el aumento de la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Se estima que la incidencia mundial de las ETS es de 125 millones de casos anuales; en México en 1995 se reportaron 194,443 casos nuevos de ETS.

Las bacterias *Chlamydia trachomatis* y *Gardnerella vaginalis* son dos de los principales agentes que se encuentran con mayor frecuencia, ocasionando ETS.

La búsqueda y diagnóstico de estos dos microorganismos debe de ser trascendental para disminuir la incidencia de las ETS, y considerando la frecuencia tan baja con que son reportados dichos microorganismos en nuestro medio es que se realiza este trabajo, el cual podrá servir como referencia para obtener información acerca de los métodos comunes más empleados para realizar su investigación y diagnóstico, así mismo en este documento se encuentra información epidemiológica, en la que se informa acerca de la frecuencia que estos microorganismos presentan, en nuestro medio.

I. INTRODUCCION

El diagnóstico de infección en casos de ETS no es muy complicado, sin embargo, en muchas infecciones agudas inespecíficas es difícil determinar el agente etiológico a pesar del examen detallado y prolongado de la muestra. El examen de estas muestras se ve complicado por la presencia de una gran cantidad de bacterias de la vagina normal por lo que además de los microorganismos considerados como patógenos deberán estudiarse aquellos considerados como flora normal (Ruiz, 1996).

Los síntomas presentados son leucorrea, prurito, dolor, ardor, siendo la disuria poco frecuente. Con objeto de ayudar en el diagnóstico, deberá examinarse el exudado para determinar si es purulento o mucoso, color y presencia o no de células epiteliales. También deberá tomarse el pH, puesto que este dato nos será de gran ayuda en la determinación del agente etiológico. La efectividad del diagnóstico depende grandemente de una adecuada recolección de la muestra. (Ruiz, 1996).

Durante mucho tiempo se pensó que las *Chlamydias* eran virus, sin embargo, al igual que otras bacterias, presentan: 1) ribosomas procarióticos y síntesis de sus propias proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, 2) DNA y RNA, 3) envoltura celular similar a bacterias gramnegativas y, 4) inhibición a una amplia gama de antibióticos (Amit, 1998).

El género *Chlamydia* es un patógeno bacteriano intracelular obligado, presenta 3 especies diferentes: 1) *Chlamydia trachomatis*, incluye 16 variantes serológicas de los cuales de D a K y M causan ETS; 2) *Chlamydia psittaci*, produce infecciones respiratoria agudas, habitualmente transmitidas por pájaros infectados y 3) *Chlamydia pneumoniae*, manifiesta desde un simple cuadro gripal, hasta una neumonía fatal, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Amit, 1998).

De los problemas de salud provocados por *Chlamydia* en mujeres embarazadas se encuentran : aborto, salpingitis postparto, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), embarazo ectópico, infertilidad; en recién nacidos: prematuridad, bajo peso al nacer, infecciones de oídos, oftalmia, neumonía y muerte fetal; y, en el hombre: uretritis, epididimitis, estenosis uretral y esterilidad (De Schryver 2, 1993).

Gardner en 1955 describió las características clínicas de la Vaginosis Bacteriana (VB) e identificó su posible agente causal, el estudio propuso que era en realidad una entidad específica causada por *Haemophilus vaginalis* (en la octava edición del Manual de Bergey's aparece como una especie incertae sedis, *Haemophilus vaginalis*, pero en el comentario de los redactores "esta especie no pertenece al género *Haemophilus*") por ello el síndrome se denominó "vaginitis relacionada con *H. vaginalis*". En 1963, el microorganismo se denominó *Corynebacterium vaginalis* debido a las diferencias fisicoquímicas con *Haemophilus sp.* (McGregor, 1993).

Los estudios de hibridación de DNA-DNA no demostraron una estrecha relación con éstos u otros géneros reconocidos. En 1980, se propuso la creación de un género separado llamado *Gardnerella*, en honor de H.L. Gardner. Después la situación se conoció como "vaginitis relacionada con *Gardnerella*". El género reciente contiene una sola especie, *G. vaginalis* (Joklik, 1997).

En 1982, Doderline estudio la flora vaginal y el *Lactobacilos* fue el primer microorganismo identificado como predominante en la flora vaginal normal. Se consideró que la flora vaginal normal es homogénea, consistente solo en bacilos Gram positivos, la flora mixta o heterogénea se consideró patológica y se utilizó el término de vaginitis "inespecífica" para describir esta situación. Al descubrirse que bacterias anaerobias eran causantes del olor característico a pescado de la VB, se acuñó el término "vaginosis anaeróbica". En 1984, el término VB se propuso para reflejar la compleja alteración de la flora bacteriana vaginal y para connotar la presencia del aumento de secreción sin respuesta inflamatoria evidente. Puesto

que el sufijo "osis" se aplica ampliamente a cualquier anormalidad se sugirió el término "bacteriosis vaginal"; sin embargo, hoy en día VB se utiliza de manera amplia y describe la situación de manera precisa (McGregor, 1993).

II. ANTECEDENTES

A) *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

a) MORFOLOGÍA Y CICLO DE CRECIMIENTO

Las *Chlamydias* son inmóviles, carecen de flagelos y no poseen pilis, sino proyecciones cilíndricas poco habituales en su superficie, estas permiten la captación de nutrientes del citoplasma celular del huésped (Villegas, 1994).

Existen 2 formas morfológicamente diferentes de *Chlamydia*:

- 1) Cuerpo elemental (CE), es un cuerpo esférico pequeño y denso de 0.2 μm de diámetro, es la forma infecciosa del microorganismo, responsable de la fijación a la célula blanco y de promover su ingreso, su rigidez de pared permite su supervivencia durante su limitada existencia extracelular.
- 2) Cuerpo reticulado o intermedio (CR), es la forma intracelular metabólicamente activa, se divide por fisión binaria, es más grande que el CE (alrededor de 0.6 a 1 μm de diámetro) y osmóticamente frágil; sintetizan su propio DNA, RNA y proteínas, pero algunas de sus capacidades metabólicas están limitadas (Deleón, 1992).

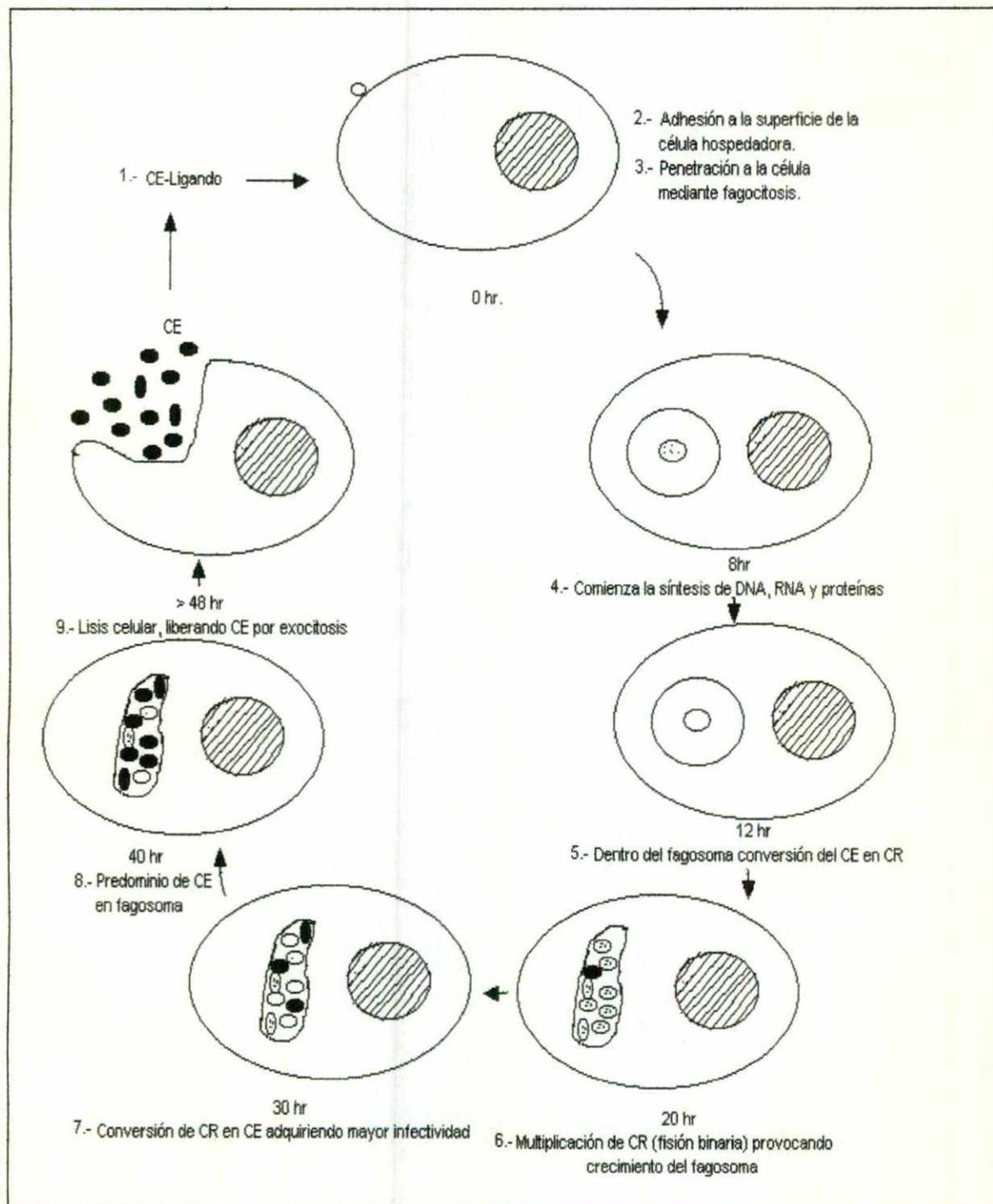
Ciclo de crecimiento en sus células huésped

El ciclo puede resumirse en 5 fases principales (**Cuadro 1**):

- 1) Fijación y penetración del CE.
- 2) Transición del CE metabólicamente inerte en CR metabólicamente activo.
- 3) Desarrollo y división del CR, produciendo una progenie abundante.
- 4) Maduración de CR no infecciosos a CE infecciosos.
- 5) Liberación del CE por lisis de la célula huésped.

(Joklik, 1997).

Cuadro 1 Ciclo de multiplicación de *Chlamydia*. El CE contiene al ligando y por ello es la forma celular encargada de infectar a la célula hospedera; por su parte el CR es la forma metabólicamente activa y por consecuencia corresponden a la estructura capaz de reproducirse (Garza, 1993).



La duración del ciclo de desarrollo es de 36 a 48 horas posteriores a las infección, pero puede variar dependiendo de la cepa infectante, tipo de célula infectada y temperatura (Deleón, 1992).

b) EPIDEMIOLOGÍA

Ibarra y Sosa en 1988 realizaron un trabajo de investigación de *Chlamydia* en el Instituto Nacional de Perinatología en la Ciudad de México D.F., determinándose de un total de 104 mujeres una incidencia de 14% (Ibarra, 1988). Las investigaciones hechas por Hernández y cols. en 1992 en pacientes con leucorrea de la Secretaría de Salud en México D.F. demostraron una frecuencia de 15%. Así mismo, en mujeres embarazadas que acudieron a control prenatal del IMSS, la prevalencia fue del 5.8% (Hernández, 1992).

Un estudio más reciente llevado a cabo en 1994 por el IMSS en el hospital rural solidaridad No. 36 de Tlacolutla, Oaxaca, mostró prevalencia de 7.3% en 545 mujeres entre 15 y 65 años que solicitaron atención médica (Acosta, 1996).

En E.U. la infección genital por *C. trachomatis* es la ETS más frecuente, 4 millones de nuevos casos ocurren cada año, más de 1 millón de mujeres padecen episodios de EPI, de las cuales casi 300 000 son hospitalizadas; es particularmente común entre adolescentes y adultos jóvenes. En Reino Unido desde 1966, las tasas de uretritis no gonocócica (UNG) son cuatro veces más elevadas que gonorrea en hombres y más de tres en mujeres. En Suecia causa del 40 al 60 % del total de las ETS, la incidencia de infecciones es más elevada en mujeres de 20 a 24 años de edad. En Papua Nueva Guinea se considera que 15 % de los ingresos ginecológicos y 40 % de las visitas a los departamentos externos de ginecología se deben a la EPI. La importancia relativa de *C. trachomatis* se confirmó recientemente en un estudio realizado en Gabón, donde 49 % de las mujeres con salpingitis presentaba infección por *C. trachomatis*. En Kenya se demostró que la

incidencia de infecciones postparto del aparato genital superior era 20.3 % (De Schryver 2, 1993).

En Africa, la prevalencia de infertilidad por *Chlamydia* está ampliamente difundida, ya que se observa en una amplia zona central que incluye Camerún, República Centroafricana, Sudán Sudoccidental, norte del Zaire, Congo y Gabón, países que constituyen la llamada franja de la infertilidad. Un estudio multicéntrico efectuado por la OMS ha demostrado que la tasa de oclusión tubárica bilateral fue tres veces más alta que en Asia y que en los países industrializados en los cuales entre 60 y 85 % de casos de infertilidad se puede atribuir a la EPI. En Lagos y Nigeria, 40 % de los esposos de las mujeres que asistieron a consultas de infertilidad eran infértiles y la mayoría de ellos refirió haber padecido dos o más episodios de uretritis que no fueron tratados o no lo fueron debidamente (De Schryver 2, 1993).

c) TOXICIDAD E INMUNIDAD

El género presenta un antígeno común 2-ceto-3-desoxioctanoico, es un complejo polisacárido lipoprotéico (LPS), específico y termoestable, el cual induce una respuesta de inmunoglobulinas de células T (Romero, 1994).

El anticuerpo con frecuencia es reactivo para más de una serovariedad, esto lleva a títulos mayores de 1:1000. La formación temprana de anticuerpos es de clase IgM y persiste durante aproximadamente 1 mes antes de que sean reemplazados por IgG. En raras ocasiones en las que se han realizado determinaciones seriadas de anticuerpos, el anticuerpo específico de tipo IgM ha disminuído con bastante rapidez después de la infección primaria, a menudo dentro de 1 a 2 meses. La reinfección por la misma serovariedad produce sólo un aumento de anticuerpos de IgG, mientras que la reinfección por una nueva serovariedad induce un aumento de los títulos de IgM para la nueva serovariedad y una elevación de los niveles de IgG para el inmunotipo anterior (Angel, 1996).

La toxina no ha sido aislada, sin embargo los macrófagos y células L, al fagocitar CE liberan enzimas lisosómicas que desempeñan un papel de patogénesis (Davis, 1984).

d) CUADRO CLÍNICO

Los síntomas pueden aparecer en una semana o un mes después de la infección dependiendo de la severidad de la infección. Si no existe tratamiento puede conducir a esterilidad en hombres e infertilidad en mujeres. *C. trachomatis* es conocida como "epidemia silenciosa" porque tres cuartas partes de las mujeres y la mitad de los hombres con la enfermedad no presentan síntomas (Amit, 1998).

e) PATOLOGÍAS

Destacan perihepatitis, cervicitis, endometritis, salpingitis y la EPI en mujer, en tanto que uretritis no gonococcica (UNG), epididimitis, prostatitis y síndrome de Reiter son de mayor prevalencia en el varón. Por su parte, en la variedad linfogranuloma venéreo (LGV) los 3 serotipos L1, L2 Y L3 son los responsables de esta enfermedad.

f) ASPECTOS DE LAS INFECCIONES GENITALES.

1. - Cervicitis: La bacteria invade células que forman parte de la zona de transición entre el epitelio cilíndrico y el plano estratificado, su reproducción en este tejido provoca hipertrofia folicular, formación de edemas, eritemas y una secreción mucopurulenta. Los análisis histológicos revelan que la infección causa daños tisulares severos cuyos procesos de reparación dan lugar a atipias tales como metaplasia y displasia. Durante el padecimiento aparecen ulceraciones cervicales microscópicas semejantes a las que ocurren en las afecciones de origen sexual, las cuales parecen incrementar el riesgo de adquirir y transmitir el VIH. La afección cervical por *C. trachomatis* es más frecuente en mujeres que emplean

anticonceptivos orales y se relaciona directamente con nacimientos prematuros y morbilidad perinatal.

2. - Endometritis: Padecimiento considerado intermedio entre cervicitis y salpingitis, ya que aproximadamente el 90 % de pacientes afectadas también presentan invasión de trompas. Entre los síntomas que la caracterizan también destacan dolor en la porción inferior del abdomen, fiebre, menorragia y episodios de sangrado irregular. Además, se ha observado que en casos de endometritis crónica pueden desarrollarse adherencias intrauterinas características del "síndrome de Ascherman" el cual se asocia con frecuencia a problemas de infertilidad.

3. - Salpingitis: Establecimiento de bacterias en células epiteliales de trompas de Falopio, dando lugar a edema, infertilidad por hidrosalpinge y exudados que generalmente se resuelven por fibrosis. Sus síntomas son similares a endometritis, aunque también se presentan vómitos, distensión de órganos pélvicos y aumento de la frecuencia en el sangrado menstrual.

4. - Enfermedad Pélvica Inflamatoria (EPI): Es una infección del útero y trompas de Falopio, que se acompaña frecuentemente por peritonitis pelviana y perihepatitis. Muchos de sus síntomas también ocurren en las salpingitis pero además, suelen aparecer abscesos anexos a la cavidad uterina.

5. - Perihepatitis: El síndrome de Fitz-Hugh-Curtis (FHC) o perihepatitis, incluye inflamación de la superficie del hígado y del peritoneo que recubre a la pared abdominal adyacente; se relaciona normalmente con EPI y es originado por el desplazamiento de bacterias de órganos genitales hasta las zonas mencionadas. Con respecto a su sintomatología, es frecuente un dolor intenso en el cuadrante superior derecho del abdomen, acentuándose con movimientos corporales comunes; ocasionalmente, dicho malestar se extiende hasta el hombro, imposibilitando el empleo adecuado del brazo (Garza, 1992).

6. - Uretritis No Gonocócica (UNG): Enfermedad clamidial más común en el varón, su calificativo de "no gonococcica" surgió de quienes deseaban diferenciar la uretritis debida a otras etiologías de la ocasionada por *N. gonorrhoeae*. El padecimiento tiene un periodo de incubación de 12 a 20 días, después del cual la uretra manifiesta lesiones foliculares en cuyos raspados puede detectarse la

presencia de inclusiones intracitoplásmicas e infiltrados subepiteliales de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares (PMN's); la infección en vías urinarias cura de 3 a 8 semanas, aunque ocasionalmente pueden presentar complicaciones como: epididimitis, prostatitis y estrechamiento uretral que agrava y prolonga el cuadro clínico.

7. - Epididimitis: *C. trachomatis* puede desplazarse a través del conducto deferente desde la uretra hasta el epididimo, originando una epididimitis caracterizada por crecimiento doloroso de uno o ambos testículos. La consecuencia más grave son oligospermia (liberación de menos de 20 millones de espermatozoides por ml) y/o probables procesos autoinmunitarios en los que se producen anticuerpos anti-esperma.

8. - Prostatitis: Existen evidencias de que ésta entidad clínica acompaña entre 30 y 100 % de UNG de origen clamidial; sus síntomas más frecuentes son molestias abdominales, micción frecuente, ardor al orinar y eyaculación difícil y dolorosa.

9. - Linfogranuloma Venéreo (LGV): Se le han asignado nombres tales como linfogranuloma inguinal, estiómetro y bubón climático o tropical. A esta afección frecuentemente se le confunde con manifestaciones clínicas similares, como granuloma inguinal, cuyo agente etiológico es *Calymmatobacterium granulomatis*. Su periodo de incubación de 3 a 30 días antecede al primero de 3 estadios; el primero se caracteriza por presencia de una pápula o vesícula indolora de 1 a 4 mm de diámetro que cura espontáneamente en algunos días; en el hombre dicha pústula puede aparecer en pene, uretra o escroto y en la mujer suele establecerse en genitales externos, mucosa vaginal, cérvix y/o recto. Durante la segunda etapa, el microorganismo se desplaza a través de los vasos linfáticos hasta nódulos inguinales, provocando linfadenopatías una o dos semanas después. Durante la última etapa ocurren los daños anatómicos y funcionales más serios, destacando estrechamiento rectal como consecuencia de proctitis y aparición progresiva de fístulas y úlceras en tracto urogenital (Garza, 1994).

10. - Síndrome de Reiter: Presenta como característica una triada de síntomas recurrentes que incluyen: conjuntivitis, poliartritis e inflamación de genitales. La enfermedad en general se produce en varones jóvenes de raza blanca y parece

iniciarse por infección en un sitio alejado de las articulaciones afectadas. Alrededor del 50-65% de los pacientes tienen infección genital aguda por *C. trachomatis*, al comenzar la artritis también presentan reactividad tumoral a antígenos de *Chlamydia* (Angel, 1996).

B) GARDNERELLA VAGINALIS

a) CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DE CULTIVO

Desde el punto de vista morfológico *G. vaginalis* tiene un aspecto de bacilo pleomórfico, en la tinción de Gram se observan formas en palo de golf y gránulos metacromáticos, no capsulados, no esporulados, sin pilis ni fimbrias, sin flagelos, algunos forman una capa mucilaginosa, su pared celular de forma trilaminar se asemeja a microorganismos Gram negativos, sin embargo su composición de aminoácidos y carbohidratos es similar a bacterias Gram positivas, por esto se considera un microorganismo Gram negativo a Gram variable. El microorganismo es inmóvil, la mayor parte de las cepas del género son anaerobias facultativas y en agar con sangre humana produce β -hemólisis difusa (Villegas, 1994).

Cuadro 2 Propiedades diferenciales de *Gardnerella* y otros géneros morfológica o fisiológicamente diferentes.

PROPIEDAD	<i>Actinobacillus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Cardiobacterium</i>
Prueba de oxidasa	-	D	-	-	+
Prueba de catalasa	+	D	-	+	-
Colonias de color amarillo-anaranjado	-	-	-	+	-
Nitrato a nitrito	+	+	+	D	-
Proliferación en agar-sangre, en: Aire Aire + CO ₂	-	-	+	-	d
	+	-	+	+	+
β -hemólisis, agar-sangre humana al 5%	-	-	+	-	-
Porcentaje molar de G + C de DNA	40-43	38-44	42-44	33-41	59-60

Típicamente positivo (+); Típicamente negativo (-) ; Difiere entre las especies (D); Difiere entre las cepas del género con una sola especie (d); Guanina más Citosina (G+C) (Joklik, 1997).

b) EPIDEMIOLOGÍA

Hasta la fecha se han realizado una gran cantidad de investigaciones de tipo epidemiológico para determinar la prevalencia de vaginosis bacteriana ocasionada por *Gardnerella vaginalis*, a continuación hacemos mención de algunas de ellas:

El Laboratorio de Bacteriología del centro de salud "Dr. José Castro Villagrana" de Tlalpan, México; de Enero de 1992 a Julio de 1996. Reporta que participaron: 3,142 mujeres, de 16 a 55 años con diagnóstico de cervicovaginitis, diagnosticándose en 33.1% VB. Las células clave fueron la mejor característica de VB (González, 1997).

En el Instituto Nacional de Perinatología de Lomas Virreyes en México D. F., se evaluaron la adhesión y penetración de *G. vaginalis* a las células epiteliales de la uretra del varón y la vagina de la mujer; encontrándose que en 50% de la parejas albergan al microorganismo (Villegas, 1997).

El Departamento de Ginecología y Obstetricia, de la Universidad de Cartagena, Colombia. Se analizaron 3421 citologías cervicovaginales obtenidas entre Junio de 1993 y Febrero de 1994 encontrándose *G. vaginalis* en 21 %, presentándose la porción más grande en mujeres de 25-39 años (Monterrosa, 1996).

En el Departamento de Microbiología del Hospital Central de Río Cuarto, Argentina, se estudiaron 169 mujeres con descarga vaginal endocervical y exocervical; a las muestras se le realizaron las siguientes pruebas: pH, olor, observación de células clave y complementando el análisis con pruebas bioquímicas; identificándose *G. vaginalis* en 23.4%. La relación entre el aislamiento de *G. vaginalis* y la presencia de células clave fue del 95.2% (Barberis, 1996).

En Rusia, en 1997 un análisis Microbiológico de muestras urogenitales de 5787 mujeres y 1496 hombres entre 20 y 40 años mostró que *G. vaginalis* es el agente

bacterias, sino por disminuir la respuesta inmune contra esta citotoxina (Cauci, 1998).

d) CUADRO CLINICO

Casi la mitad de mujeres con VB es asintomática, el síntoma común presente en 50 a 75 % de mujeres, es una secreción vaginal fétida que suele describirse con "de pescado", de "humedad" o "agrio", suele ser fina, gris y homogénea con tendencia a adherirse a la pared vaginal como leche o "engrudo". El olor se debe a la volatilización alcalina de los subproductos de aminas del metabolismo anaerobio bacteriano debido a un incremento en el pH vaginal; puede exacerbarse después del coito o durante la menstruación. El líquido vaginal normal es más viscoso, de una consistencia heterogénea, flocular y tiende a acumularse en huecos dependientes de la vagina.

A pesar de las concentraciones bacterianas elevadas prurito e irritación vulvar no son característicos de VB; las concentraciones aumentadas de succinato, un subproducto bacteriano de microorganismos relacionados con VB, este inhibe la migración de células polimorfonucleares y podría contribuir a la ausencia característica de inflamación en VB. En el **Cuadro 3** se presentan las principales diferencias entre infecciones vaginales (Vázquez, 1996).

Las complicaciones obstétricas relacionadas con VB incluyen trabajo de parto prematuro, parto pretérmino, rotura prematura de membranas, corioamnionitis y endometritis posparto o posintervención cesárea. Entre los problemas ginecológicos potenciales derivados de VB se encuentran EPI e infección consecutiva a aborto o histeroectomía, así como endometritis o salpingitis (McGregor, 1993).

comparación con mujeres sanas, las concentraciones de estas bacterias son de 100 a 1000 veces más. Se caracteriza por elevadas concentraciones de enzimas bacterianas, incluidas fosfolipasas A₂, mucinasas y sialidasas (neuraminidasas), así como endotoxinas e interleucina 1 (McGregor, 1993).

f) PATOLOGÍA

Se considera que los lactobacilos vaginales protegen contra infección por patógenos. La producción de estrógenos en mujeres en edad reproductiva aumenta el contenido de glucógeno del epitelio vaginal, el cual es metabolizado a glucosa y después a ácido láctico, principalmente por lactobacilos; la presencia del ácido láctico es la principal causa del bajo pH (3.8 a 4.2), el cual favorece la unión y crecimiento de los agentes acidófilos. En mujeres sanas, la producción de ácido láctico inhibe el crecimiento de *G. vaginalis* y de anaerobios como *Mobiluncus sp*, los cuales se relacionan con VB. El pH vaginal elevado se relaciona con pérdida de *lactobacilos*, además *G.vaginalis* produce aminoácidos que son transformados en aminas por los gérmenes anaerobios, elevando el pH y provocando que los lactobacilos no se unan a las células epiteliales vaginales recubiertas de fibronectina. Diversos factores no microbiológicos pueden elevar el pH vaginal e incluyen descamación por traumatismo local, hemorragia, moco ovulatorio, coito, menstruación, duchas vaginales y rotura de membranas. No se conoce su presencia en el medio ambiente, se encuentra sólo parasitando tejidos vivos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A) *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

a) MATERIAL

Recolección de la muestra

Se observan las características de la mucosa y se reconoce la presencia de sangrado, leucorrea, edema, úlceras genitales y presencia de dispositivo intrauterino. Con espejo vaginal estéril se obtienen raspando rigurosamente células epiteliales cilíndricas.

Material biológico

- 1.- En mujer: Secreciones vaginales, vulvovaginales, uretrales, cervicales, endocervicales, exocervicales, urogenitales, trompas de falopio, utero y recto.
- 2.- En hombre: pene, próstata, epidídimo y escroto.
- 3.- Células para cultivo: McCoy, HeLa 229, BHK-21, L 929 y de riñón de mono verde.

Material de laboratorio

Hisopos estériles de rayón, dacrón o algodón en varilla de metal o plástico o dispositivos para la toma de muestras citológicas.

Portaobjetos

Placas estériles de 24 pozos

Cubreobjetos redondos

Micropipeta

Aplicadores de madera

Reactivos

Agua destilada
Carbol fuscina
Cristal violeta
Azul de metileno
Yodo
Metanol
Fluoresceína
Etanol 96°
Acetona
Gamma globulina
Isotiocianato de fluoresceína
Alcohol absoluto, 50°, 70° y 90°
Xilol
Hematoxilina de Hams
Colorante Orange G6
Colorante EA36
Resina sintética

Aparatos y equipos

Incubadora 35°C
Refrigerador 3-5°C
Centrífuga clínica
Microscópio de fluorescencia y luz ultravioleta
Cámara húmeda

Se obtienen tres hisopos, el primero y segundo se utilizan para realizar exámen en fresco y tinción de Gram; el tercero destinado al cultivo celular se coloca en medio de transporte sacarosa 2-fosfato o sacarosa-fosfato-glutamato, refrigerarlo a 4°C y proceder dentro de las 48 horas posteriores (Joklik, 1997).

b) METODOS

Existen 2 diferentes formas de realizar el diagnóstico de las infecciones causadas por *Chlamydia*, estos son los métodos directos y los métodos indirectos, los primeros identifican la presencia del microorganismo y los segundos identifican la presencia de anticuerpos formados contra el microorganismo.

1.- METODOS DIRECTOS

METODOS DIRECTOS PREVIA TINCIÓN.

Si se presentan un gran número de cuerpos de inclusión de *Chlamydia*, puede establecerse el diagnóstico inmediato con facilidad con métodos de Giemsa o Giménez. La coloración de Giménez contiene carbol fucsina y las inclusiones se tiñen bien, están localizadas en el citoplasma de las células epiteliales, a menudo tienen una ubicación perinuclear y deben distinguirse de artificios, tales como núcleos fragmentados. La frecuencia de detección de inclusiones en los preparados es mínima en uretritis y cervicitis donde raras veces se encuentran inclusiones (Koneman, 1997).

La tinción con yodo tiñe inclusiones con *C. trachomatis* que contienen glucógeno, el portaobjetos teñido con yodo se contracolorea con el método de Giemsa, lo que permite conservarlo de manera indefinida. Sin embargo, la sensibilidad de este método es baja y poco confiable ya que el glucógeno está presente sólo durante ciertos periodos del ciclo de crecimiento.

TECNICA DE PAPANICOLAOU

La utilización de la técnica de Papanicolaou para diagnóstico ha dado lugar a una serie de controversias respecto a su uso. Los grupos de Geerling y Lindner con base en sus resultados, en los cuales no toman en cuenta la presencia de vacuolización ni de inclusiones características concluyen que la técnica no debe utilizarse, debiéndose emplear otra metodología como los cultivos celulares y la inmunofluorescencia directa. Dorman y cols. proponen que los frotis teñidos por Papanicolaou se deben trabajar con una técnica más sensible y específica. Gupta y cols. describieron la secuencia de alteraciones morfológica que se presenta en células infectadas; demostrando la relación que existe entre los casos diagnosticados por alteraciones celulares producidas por *Chlamydia* y su correlación con la técnica de fluorescencia y de cultivo, teniendo con la técnica de Papanicolaou hasta 90% de certeza diagnóstica. Sekhri y cols. proponen que si bien es cierto que el diagnóstico citológico no reemplaza la identificación bacteriana de *C. trachomatis*, el examen de los frotis teñidos por Papanicolaou debe considerarse como una prueba en pacientes de alto riesgo. Por otra parte, se reporta un trabajo realizando la técnica de Papanicolaou obteniendo una sensibilidad del 78% y especificidad de 92%.

TECNICA

- 1.- Procesamiento de la muestra (véase inmunofluorescencia directa).
- 2.- Fijar el frotis con alcohol de 96° durante 5-10 minutos.
- 3.- Dejar en alcohol de 70° durante 1 minuto.
- 4.- Pasar a alcohol de 50° durante 1 minuto.
- 5.- Lavar con agua destilada durante 3 minutos.
- 6.- Teñir con hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
- 7.- Lavar con agua corriente durante 6 minutos.
- 8.- Lavar con agua destilada durante 3 minutos.
- 9.- Pasar por alcohol de 50° durante 1 minuto.
- 10.- Pasar por alcohol de 70° durante 1 minuto.

- 11.- Pasar por alcohol de 96° durante 1 minuto.
- 12.- Teñir con el colorante orange G6 durante 6 minutos.
- 13.- Pasar por alcohol de 96° durante 1 minuto.
- 14.- Teñir con colorante EA36 durante 6 minutos.
- 15.- Pasar por alcohol de 96° durante 1 minuto.
- 16.- Dejar en alcohol absoluto 5 minutos.
- 17.- Pasar a alcohol absoluto-xilol v/v durante 15 minutos.
- 18.- Dejar en xilol durante 20 minutos .
- 19.- Montar la preparación en resina sintética y observar al microscopio.

Interpretación: La presencia de cuerpos de inclusión (CR dentro de vacuolas fagocíticas) que pueden ser eosinófilas, hematoxilínófilas o nebulosas en las células epiteliales nos hará sospechar la presencia de *C. trachomatis* (Deleón, 1992).

El riesgo de eventual progresión hacia el cáncer justifica que la técnica de Papanicolaou se utilice para búsqueda de bacterias y alteraciones celulares como neoplasia intraepitelial cervical. Se sabe que las mujeres con vida sexual activa deben efectuarse al menos una vez al año un estudio citológico con estudio de Papanicolaou, que tiene como objeto la detección precoz del cáncer; afortunadamente en nuestro país aumenta el número de mujeres que cumplen con esto, lo que debe aprovecharse para incluir la búsqueda de *C. trachomatis* (Deleón, 1994).

MÉTODO DE CULTIVO CELULAR

El aislamiento de *C. trachomatis* en cultivo celular es el método más sensible y específico, ya que cada cuerpo elemental que es liberado por la célula huésped da origen a una o varias inclusiones fácilmente observables, dando un efecto de ampliación en el reconocimiento del microorganismo. Sin embargo, no es un método estándar perfecto, ya que reconoce entre 70 y 80 por ciento de

los casos. Las líneas celulares que habitualmente se usan para aislamiento son McCoy, HeLa 229, BHK-21, L 929 y células de riñón de mono verde (Angel, 1996).

Este método emplea placas de 24 pozos estériles a las cuales se les colocan cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro. En cada pozo se inocula una concentración de 125 000 a 250 000 células McCoy/ml de tal forma que a las 24 horas de incubación a 37°C y con 5 % de CO₂ se obtiene una monocapa homogénea de células. Se elimina el medio de cultivo de la monocapa y se sustituye con 0.2 ml de muestra previamente agitada. Se incluye un control negativo (0.2 ml de medio de crecimiento para células McCoy) y uno positivo (0.2 ml de *C. trachomatis* serotipo D previamente amplificado) por cada placa de 24 pozos. La placa se centrifuga a 3 000 RPM durante 1 hora a 37°C para facilitar el contacto de las bacterias con las células. Posteriormente, se agrega a cada pozo 1 ml de medio de crecimiento para *Chlamydiae*. La placa se incuba a 37°C durante 72 horas en presencia de 5 % de CO₂. Después del periodo de incubación, se elimina el medio de cultivo de cada pozo y se fijan las células con 1 ml de metanol durante 5 minutos. Los cubreobjetos se sacan de los pozos, se secan a temperatura ambiente y se tiñen con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína. Las inclusiones de *C. trachomatis* se identifican con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 63X como estructuras redondas u ovaladas, color verde intenso, localizadas en el citoplasma de la célula, generalmente deformándola por su tamaño. El hallazgo de una sola inclusión se considera como cultivo positivo (Echaniz, 1992).

INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA

La sensibilidad de esta prueba en infecciones genitales ha oscilado entre 60-100 % y la especificidad es alta, puede resultar de gran valor cuando no es posible evitar grandes demoras entre la recolección de la muestra y la iniciación del cultivo. La interpretación de la prueba requiere personal bien entrenado y equipo de alta calidad. Aunque el anticuerpo es de origen monoclonal, por lo menos uno de los

antígenos de *C. trachomatis* se parece al lipopolisacárido de bacterias entéricas. Los cuerpos elementales son las formas infecciosas observadas en las muestras clínicas, son muy pequeños y en número reducido. Cuando la infección es muy densa, hay gran variedad en el tamaño de los cuerpos elementales y en ocasiones es posible observar cuerpos de inclusión.

TECNICA

- 1.- Procesamiento de la muestra. Extender la muestra contenida en el hisopo sobre el portaobjetos haciendo movimientos circulares, es importante no presionar la muestra ya que puede deformar las células observadas. Dejar secar y fijar con etanol al 96°.
- 2.- Fijar el frotis con acetona durante 15 minutos.
- 3.- Marcar un círculo de aproximadamente 0.5 cm en la parte inferior del portaobjetos.
- 4.- Colocar 30 μ l del conjugado (gama globulina morada con isotiocianato de fluoresceína) sobre el círculo marcado.
- 5.- Deje actuar el conjugado durante 15 minutos en cámara húmeda y obscuridad.
- 6.- Lavar con solución amortiguadora pH 7.2.
- 7.- Dejar secar al aire.
- 8.- Montar la preparación. Observar en un microscopio con luz ultravioleta.
- 9.- Realizar simultáneamente controles positivos y negativos.

Interpretación: La presencia de CE fluorescentes verdes indican que la muestra es positiva.

Es fundamental distinguir las partículas de desecho y los CE; las primeras aparecen como estructuras refringentes cuando son incididas por luz blanca y los segundos no se observan. Antes de reportar una preparación como positiva, debe observarse un número mínimo determinado de CE, así como observar completamente durante por lo menos tres minutos antes de considerarlo negativo.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) E HIBRIDACIÓN DE DNA.

La PCR representa un avance importante al aumentar la sensibilidad de la tecnología de sonda, amplificado pequeñas cantidades de ácidos nucleicos a niveles que se pueden detectar con facilidad por las técnicas de hibridación estándar.

En la hibridación se emplean sondas de DNA y RNA para el DNA cromosómico y el plásmido críptico presente. También se han empleado plásmidos de *Chlamydia* clonados como una sonda en hibridaciones in situ para la detección de *Chlamydia* en biopsias y en extendidos cervicales. Un ensayo comercial usa una sonda de DNA quimioluminiscente en lugar de marcada con isótopos, para la detección de secuencias conservadas de RNA ribosómico, las que se encuentran en un número elevado de copias en las células de *Chlamydia* (Steven, 1995).

REACCIÓN EN CADENA DE LA LIGASA (LCR)

La primera orina (First-Catch-Urine, FCU) es el espécimen de elección para el diagnóstico de infección uretral y cervical. Su sensibilidad (detecta <1 cuerpo elemental) y especificidad de 90 y 99 % respectivamente, es atribuible a la existencia de múltiples copias de plásmidos en cada CE. Para la amplificación del DNA se microcentrifuga la muestra con 4 oligonucleótidos y una enzima termoestable que hace posible la existencia de múltiples copias de plásmidos de cada CE (Schachter, 1995).

BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS POR EL MÉTODO DE EPIFLUORESCENCIA DIRECTA

Este procedimiento utiliza muestra urogenital o rectal para pacientes adultos y ocular para pacientes pediátricos; emplea como conjugado un anticuerpo

monoclonal fluorescente, que reaccionará con las proteínas principales del exterior de la membrana del CE y CR; detectando los 15 serotipos de *C. trachomatis*. La sensibilidad y especificidad de este método es de 86 y 99 % respectivamente.

Técnica:

- 1.- Se prepara la muestra frotando el hisopo en círculo uniformemente sobre un portaobjetos, dejando secar de 5 a 10 min.
- 2.- Cubrir la placa con 0.5 ml de metanol y dejar evaporar.
- 3.- Trabajar simultáneamente con la muestra una placa control (incluida en el equipo)
- 4.- Colocar las placas en una cámara húmeda.
- 5.- Adicionar una gota de anticuerpo monoclonal e incubarlas por 15 min.
- 6.- Enjuagar de 5 a 10 seg. con agua destilada para remover el exceso.
- 7.- Adicionar una gota de medio (incluido en el equipo) y colocar un cubreobjetos.
- 8.- Observar en un microscopio fluorescente utilizando un objetivo de 400 a 500 X y confirmar a 1000 X con aceite (leer inicialmente la placa control para verificar la reacción completa).

Interpretación:

Muestra control positiva: Es aceptable si se observan 100 o más CE por prueba.

Muestra control negativa: Es aceptable en ausencia de fluorescencia.

Interpretación de muestra positiva: Presenta CE extracelulares los cuales serán visibles como pequeños puntos de luz a 400 X y redondos con borde uniforme a 1000 X, de color verde fluorescente. Ocasionalmente se pueden observar CR como un halo periférico de color indefinido. Con un CE presente se considerará positiva a excepción de la muestra urogenital.

Interpretación de muestra negativa: Cerciorarse de la existencia de células epiteliales pigmentadas de color rojo debido al contraste. Mostrará una mínima fluorescencia no específica.

Limitaciones del procedimiento

El secado del anticuerpo durante la incubación invalida el resultado. Es desconocido su funcionamiento en pacientes con terapia antimicrobiana. Una

pequeña prevalencia en la población requiere una interpretación cautelosa (Manual Direct Antigen Detection System, 1989).

2.- MÉTODOS INDIRECTOS:

PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)

Detecta anticuerpos anti-*Chlamydia* IgG, IgM e IgA en suero, lágrimas y secreciones genitales, utiliza un antígeno específico de género ("LPS") y se aplica para infecciones de LGV. Muchos pacientes sin enfermedad documentada son seropositivos, lo que disminuye la sensibilidad de esta prueba, por lo tanto, para el diagnóstico de LGV se recomienda un título de 1:64 o superior. Presenta exigencias técnicas y requiere estandarización estricta para lograr un rendimiento adecuado.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IF)

Con suero del paciente en una reacción antígeno-anticuerpo, se puede diagnosticar empleando antígenos de *Chlamydia*, poniendo de manifiesto la presencia de anticuerpos. Los títulos de alarma son en el hombre de 1/16 y en mujer 1/64, en hombres, los títulos generalmente son más bajos por ser lesiones más superficiales y menos agresivas que en mujeres.

MICROINMUNOFLUORESCENCIA (micro-IF)

Este método detecta anticuerpos específicos de inmunotipo contra las 16 serovariedades del microorganismo, hace la medición de IgG, IgM y de anticuerpos locales en diferentes secreciones. En la mayoría de pacientes con identidad de

serovariedad infectante existe una respuesta de anticuerpos específica de tipo con un título de 2:8 o mayor (Angel, 1996).

ENZIMOINMUNOENSAYOS (EIA)

Utiliza como antígeno CE o CR enteros para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia*. Se detectan anticuerpos específicos de género y se pueden realizar determinaciones de IgG o IgM. Su sensibilidad varía del 70-100%, es poco sensible y específica (Koneman, 1997).

El EIA puede automatizarse y se le puede aplicar un gran número de muestras, con un entrenamiento y equipamiento mínimos, proporciona resultados cuantitativos (Angel, 1996).

BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS POR EL MÉTODO DE ELISA DIRECTA

Se basa en la formación de un complejo al unirse el antígeno de *C. trachomatis* (fase sólida) con el anticuerpo (IgG e IgA) presente en suero o plasma, seguido de unión al conjugado anti-anticuerpo humano; para posteriormente tener una reacción enzimática al adicionarle el sustrato cromogénico. Tiene una sensibilidad del 91.7 % y una especificidad de 94.1 % para IgG mientras que, para IgA 100 % y 98.3 % respectivamente.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG.

Colocar 10 μ l de muestra y controles en la fila A y continuar como se describe en la **tabla 1**.

Tabla 1 Determinación de anticuerpos IgG.

Paso	Fila	Proceder como se indica para IgG
Reacción Ag-Ac	A	Mezclar; incubar 10 min.; absorber.
Lavar	B	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Unión del conjugado	C	Mezclar; incubar 20 min.; absorber.
Lavar	D	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Lavar	E	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Reacción de color	F	Mezclar; incubar 10 min.
Paro de la reacción de color	E	Incubar 1 min.; secar al aire.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgA.

Colocar 25 μ l de muestra y controles en la fila A y continuar como se describe en la **tabla 2**.

Tabla 2 Determinación de anticuerpos IgA.

Paso	Fila	Proceder como se indica para IgA
Reacción Ag-Ac	A	Mezclar; incubar 40 min.; absorber.
Lavar	B	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Unión del conjugado	C	Mezclar; incubar 20 min.; absorber.
Lavar	D	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Lavar	E	Agitar; incubar 2 min.; absorber.
Reacción de color	F	Mezclar; incubar 10 min.
Paro de la reacción de color	E	Incubar 1 min.; secar al aire.

(Manual en inmunodiagnóstico).

PRUEBA DE FREI

Es una reacción intradérmica que detecta una respuesta de hipersensibilidad retardada contra el antígeno de especificidad de género, se emplea para el diagnóstico de LGV, sin embargo el ensayo no es sensible ni específico (Angel, 1996).

B) GARDNERELLA VAGINALIS

a) MATERIAL

Material Biológico:

Secreciones vaginales, vulvovaginales, uretrales, cervicales, endocervicales, exocervicales y urogenitales.

Material de laboratorio:

Incubadora

Autoclave

Mechero

Soporte

Cajas de petri

Papel de estrasa

Asa de platino

Reactivos:

Solución salina isotónica

Papel indicador

KOH al 10 %.

Agar columbia

Agar vaginalis

b) MÉTODOS

Puede diagnosticarse mediante diversas técnicas, en más del 90 % de los casos el diagnóstico se establece al llenar tres de los cuatro criterios de Amsel:

Características del flujo vaginal, el cual debe ser fino, homogéneo y grisáceo.

Prueba de "olor". Se realiza mezclando unas gotas de hidróxido de potasio al 10 % con secreciones vaginales, reacción química que desprende el mal olor característico, a esta prueba se llama "test de tufo". Al agregar el álcali, las aminas volátiles se disocian provocando el olor característico a pescado, que tiene un valor pronóstico positivo del 90-70 % de especificidad. Con técnicas de laboratorio se han podido identificar: putrecina, cadaverina, trimetilamina y niveles relativos de succinato y lactato, así como prolina aminopeptidasa (Flores, 1997).

pH vaginal. Se determina con papel indicador, las muestras deben obtenerse del fondo del saco vaginal anterior o pared lateral, teniendo cuidado de no entrar en contacto con moco cervical, ya que el pH de las secreciones cervicales es de aproximadamente 7; un pH vaginal elevado es el criterio más sensible pero menos específico del criterio clínico para el diagnóstico de VB.

Descubrimiento de "células guía". Se prepara en fresco mezclando líquido vaginal con una gota de solución salina, también en extendidos con coloración de Gram o Papanicolaou; pueden ser la herramienta clínica sencilla más importante para el diagnóstico de VB. Las células guía son células epiteliales salpicadas con números importantes de bacterias adheridas que oscurecen el borde celular, la especie adherida es *G. vaginalis*, pero también pueden observarse *Bacteroides* y *Mobiluncus*, las bacterias no sólo rodean a las células epiteliales, sino que existe una adherencia con el glucocálix celular, posteriormente la bacteria fusiona su pared celular con la membrana plasmática o bien la célula emite prolongaciones que rodean a la bacteria y son el inicio de un fenómeno de endocitosis. *G.*

vaginalis se encuentra posteriormente en el citoplasma de las células epiteliales iniciándose una lisis de los elementos del citoesqueleto, posiblemente debido a toxinas liberadas por la bacteria (McGregor, 1993).

Por el método directo de cultivo, se recupera *G. vaginalis* de sitios extragenitales, como sangre, uretra masculina, abscesos perinéfricos, faringe, líquido intraabdominal y orina; Josephson y Thomason centraron su papel como causa de infecciones urinarias, citando varios casos informados en la literatura. *G. vaginalis* se considera un microorganismo Gram negativo exigente (Ver **Cuadro 4**), requiere biotina, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina y purinas/pirimidinas para crecer, por ende es necesario un medio basal rico como: agar Columbia, agar V (*vaginalis*) que contiene base de agar Columbia, proteasa peptona No. 3 y 5 % de sangre humana y agar bicapa semiselectivo con sangre humana (HBT), la hemólisis no se observa en agar con sangre de conejo o carnero. Después de la inoculación del medio e incubación a 35 °C en una jarra con vela o incubadora con CO₂ durante 48 horas, la aparición de diminutas (0.5 mm) colonias lisas y opacas rodeadas por una pequeña zona de β-hemólisis difusa es en extremo sugestiva de *G. vaginalis*. Hidroliza rápidamente el hipurato y almidón, la fermentación de hidratos de carbono deben efectuarse empleando grandes inóculos de cultivo de no más de 24 horas. *G. vaginalis* es susceptible a disco de polianetolsulfonato de sodio (SPS), 50 µg de metronidazol, 5 µg de trimetoprima y resistente a 1 mg de sulfonamida (Koneman, 1997).

Cuadro 4 Características macroscópicas y microscópicas de *G. vaginalis*.

Microorganismo	Morfología de colonias	Características microscópicas
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Puntiformes, redondas, lisas, opacas. Beta hemólisis en agar-sangre humana	0.5 X 1.5-2.5 μ , Gram variables, bastones rectos, sin filamentos

Cuadro 5 Características bioquímicas de *G vaginalis*

Microorganismo	Oxidasa	Catalasa	Indol	Red. de Nitratos a	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Xilosa	Manitol
<i>G. vaginalis</i>	-	-	-	-	+	+	d	d	d	-

+ = El 90% de las cepas es positivo en 1-2 días; - = El 90% o más es negativo después de 3-5 días; d = reacciones retardadas 3-5 días (Koneman, 1997).

V. RELEVANCIA DEL ESTUDIO

La lista de complicaciones y secuelas tardías asociadas con las ETS ha aumentado de forma considerable, porque muchas de ellas son evidentes en la actualidad. Se conocen más de 20 microorganismos patógenos que se transmiten por contacto sexual; entre estos *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, virus del herpes genital, papiloma humano y VIH, los cuales se pueden considerar como la segunda generación de ETS; estos son más difíciles de identificar, tratar, controlar y pueden causar graves complicaciones que desembocan en mala salud crónica, incapacidad e incluso la muerte. El espectro de la ETS que se identifica comúnmente en países en desarrollo como México se limitaba a las enfermedades de transmisión sexual clásicas (sífilis, gonorrea y chancro blando), sin embargo en estos países se han comenzado a identificar patógenos de segunda generación; ambos grupos constituyen problemas de salud importantes en la mayor parte de los países en desarrollo (De Schryver 1, 1993).

Las clamidiasis genitales están consideradas actualmente como las principales ETS, debido a su incidencia y a la frecuencia con la que provocan infertilidad, embarazos ectópicos y partos prematuros. En México, tal como sucede en otros países en vías de desarrollo, el diagnóstico de clamidiasis está limitado a algunos laboratorios especializados, debido a que las técnicas utilizadas resultan relativamente costosas, sin embargo dado su importancia, es necesario que su búsqueda sea incorporada al trabajo clínico general (Garza, 1992).

En el pasado los médicos solían considerar la Vaginosis Bacteriana como un problema sin importancia y sólo recetaban tratamiento cuando la paciente presentaba síntomas; en la actualidad se le relaciona con serias complicaciones en el embarazo como: parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, bajo peso al nacer y endometritis post-cesárea. El médico debe intentar la identificación del cuadro en base a la historia clínica, apoyándose en forma complementaria solicitando al laboratorio pruebas como frotis en fresco, tinción de Gram y cultivos en medios adecuados según el diagnóstico presuncional (Blanco, 1995).

VI. RESULTADOS

Las investigaciones realizadas para determinar la incidencia de *C. trachomatis* aportan los siguientes resultados:

En 1991, se aisló en 4% de mujeres aparentemente libres de infección, de una zona suburbana. (Echaniz, 1992).

En 1994 en Querétaro, en pacientes atendidas por leucorrea, de entre 2 y 64 años; se encontró una frecuencia del 22.3% (Cadena, 1994).

En México D.F. desde 1995, en mujeres fértiles de 15 a 50 años, que acudieron al médico general debido a secreción vaginal y/o mal olor genital, se demostró una prevalencia de 15 %; en mujeres con sospecha de cervicitis y otros síntomas clínicos mostró una incidencia del 27.5 % (Blanco, 1995), y en pacientes embarazadas de promedio 30 años se determinó un 10 % de positivos (Díaz, 1997).

En la ciudad de Querétaro en 1999 se encontró una incidencia del 10% en pacientes que acudieron a realizarse estudios en laboratorios clínicos privados.

Por lo que respecta a *G. vaginalis*, en mujeres con vida sexual activa y un solo compañero sexual, que acuden a efectuarse estudios cervicovaginales para descartar su presencia, 60 % presentaron todas las características de una VB y en 5 % *G. vaginalis* estuvo presente pero no estaba causando una infección aparente (Ruiz, 1996).

Las mujeres fértiles de entre 15 y 50 años de edad que acudieron al médico general debido a secreción vaginal y/o mal olor genital presentaron una prevalencia de 34 %.(Blanco, 1995).

En una encuesta realizada en 1999 a distintos laboratorios clínicos privados de Querétaro se encontró una incidencia < 5 % de *G. vaginalis*.

Estudios cervicovaginales de diferentes países muestran que *G. vaginalis* es frecuente aislarlo en 21-26% de los casos. La relación entre su aislamiento y la presencia de células clave es del 95%; su crecimiento puro es obtenido sólo en 5% de los casos, mientras que presentando asociaciones con otros microorganismos en 50-70 % (Barberis, 1996).

VII. DISCUSIONES

Los programas de control de las ETS han ocupado y continuarán ocupando el centro de atención en la gestión de salud pública, las estrategias para prevenir la transmisión de microorganismos que se diseminan por contacto humano íntimo deben seguir siendo flexibles y adaptarse a las realidades sociales, técnicas, clínicas y financieras. Una estrategia de prevención primaria basada en: modificación del comportamiento sexual, prestación de servicios clínicos adecuados, un examen regular y no esperar la presencia de síntomas tienen importancia vital para el control de las ETS.

La presencia de *C. trachomatis* en el tracto genital femenino, implica daño y riesgo de complicaciones, la mayoría de mujeres tiene un curso asintomático representando una fuente potencial de infección durante la vida sexual activa y la etapa reproductiva. A nivel mundial es el patógeno más comunmente aislado en infecciones del tracto genital femenino y es el agente más prevalente de las infecciones adquiridas por contacto sexual. En México se encuentra una prevalencia similar a la informada para población asintomática en sociedades industrializadas.

De manera general existe una frecuencia similar de infección por *C. trachomatis* tanto en el área rural como en la suburbana; las mujeres jóvenes presentaron mayor frecuencia y la prevalencia en mujeres con dos parejas fue de 28% y se incrementó conforme aumentó el número de parejas sexuales.

El continuo desarrollo de tecnología en las técnicas para el diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*, ha permitido crear una amplia variedad de métodos con alta sensibilidad y especificidad; sin embargo los métodos indirectos son los actualmente utilizados pues los métodos directos resultan relativamente costosos, consumen demasiado tiempo, requieren de equipo y personal especializado

y no se adaptan con facilidad a todos los laboratorios por lo tanto suelen reservarse para propósitos experimentales.

De las infecciones vaginales más comunes VB es una de las más frecuentes. Entre los pacientes que visitan clínicas de ETS la frecuencia de VB es de 32 a 64 %. Cerca de la mitad de las mujeres afectadas es asintomática, por ésta razón, las mujeres debieran estudiarse durante el embarazo y antes de cirugía pélvica; en VB no se presenta inflamación, prurito e irritación y a pesar de las concentraciones bacterianas elevadas, no suelen encontrarse cantidades importantes de leucocitos polimorfonucleares.

VIII. CONCLUSIONES

El riesgo de adquirir *C. trachomatis*, *G. vaginalis* y otras ETS se relacionan con numerosos factores, entre ellos se incluyen: menstruación, situación socioeconómica, métodos anticonceptivos como dispositivo intrauterino, estado inmunitario, uso de antibióticos, patología genital, sangrado uterino anormal, experiencia coital temprana, gran número de compañeros sexuales y la presencia de otras ETS, en especial tricomoniasis.

En México aún no sabemos la magnitud real del problema, la Dirección General de Epidemiología reporta básicamente casos de sífilis y gonorrea; sabemos que incluso de estas enfermedades hay un subregistro faltando por notificar infecciones debidas a *C. trachomatis*, micoplasmas a asociaciones microbianas como *G. vaginalis* y anaerobios.

Dada la incuestionable importancia médica de las infecciones vaginales por *C. trachomatis* y *G. vaginalis*, es necesario que su búsqueda sea incorporada al trabajo diario del químico clínico, anexándolas a los exámenes ginecológicos y del embarazo en la mujer. Además de los microorganismos patógenos debe considerarse la gran cantidad de bacterias de flora normal.

Con base en los resultados obtenidos podemos decir que todavía se considera al cultivo celular como el método más sensible y específico para el aislamiento e identificación de *C. trachomatis*. Por ahora se reconoce como estándar para valorar otras técnicas, tales como la Inmunofluorescencia Directa y Papanicolaou; la primera se considera predictiva, no necesita personal experto para su aplicación y el material utilizado es costoso; en tanto que la técnica de Papanicolaou es confirmatoria, sencilla y menos costosa pero requiere de un patólogo para su diagnóstico.

El riesgo de una eventual progresión hacia el cáncer justifica que la técnica de Papanicolaou se utilice para la búsqueda de la bacteria y las alteraciones celulares para la detección precoz del cáncer. Por esto las mujeres con vida sexual activa deben efectuarse al menos una vez al año este estudio citológico; las características más representativas de una evaluación citológica por el método de Papanicolaou en muestras de raspados cervicales de pacientes con diagnóstico de *C. trachomatis* son: reacción inflamatoria, vacuolización e inclusiones.

La Vaginosis Bacteriana es una situación sinérgica, microecológica caracterizada por una pérdida del protector normal, *Lactobacillus sp*, además de un crecimiento masivo de bacterias anaerobias y aerobias, entre ellas *G. vaginalis*, *E. coli*, especies de *Bacteroides* y *Mobiluncus spp*. Por esto es importante tomar en cuenta la realización de los métodos de cultivo para realizar la identificación del género y especie por medio de su morfología colonial, características microscópicas y bioquímicas de estos agentes.

El diagnóstico de VB en más del 90 % de los casos se establece llenando 3 de los 4 criterios de Amsel, de estos como herramienta clínica sencilla para su diagnóstico los más utilizados son: 1) la secreción vaginal fina, homogénea y grisácea que al mezclar con gotas de hidróxido de potasio desprende el mal olor característico a pescado y, 2) el descubrimiento de células guía salpicadas con números importantes de bacterias adheridas que oscurecen el borde celular, la especie adherida predominantemente es *G. vaginalis*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, C. B.: *Chlamydia trachomatis* como factor de riesgo de algunas complicaciones del embarazo. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 16: 142-145, 1996.

Angel M. G. y Angel, R. M.: *Chlamydia trachomatis*.: Interpretación clínica de laboratorio. Editorial Médica Internacional, Bogotá Colombia, 1996, pp. 139, 316, 977-984.

Amit, K.G.: ¿ Qué debería usted hacer ?. *Asociación Estadounidense de Salud Social*.1:1-7, 1998.

Barberis I.L., Pájaro M.C. y Godino S.: Evaluación Clínico y microbiologica de vaginosis en mujeres en un hospital desde Río Cuarto, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 14: 611-3, 1996

Bernier M., Bergemer E.S. y Marsan C.: El valor de un método automático de selección (PAPNET) para la detección de infecciones cervico – uterinas. *Arquee Anat Cytol Pathol*. 46: 184-7, 1998

Blanco D.E., Rodríguez R.A. y Aguilar C.: Vaginosis bacteriana. *Infectología*. 12: 527-530, 1995.

Cadena, I. M. E.: Incidencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres que acuden a realizarse exámenes vaginales determinada por las técnicas de Inmunofluorescencia y Papanicolaou. Santiago de Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro; 1994. 69 p. Tesis para obtener el título de Q.F.B. de Licenciatura en Q.F.B.

Cauci S., Driussi S. y Monte R.: *Gardnerella vaginalis*: Actividad bacteriológica de hemolisina y sialidasa en vaginosis bacteriana. Soy J Obstet Gynecol. 178: 511-5, 1998

Davis B. D., Dulbecco H.N. Y Eisen H.S.: *Chlamydia*: Tratado de microbiología. (Costas M. eds.) Editorial Salvat, Barcelona España, 1984, pp. 632-639.

Deleón R.I. y Hernández, J.T.: El diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Bioquímicas. 1:1-25, 1992

Deleón R.I., Hernández M.J. y Alonzo R. H.: El valor de la técnica de Papanicolaou en el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Bioquímica. 19: 177-181, 1994.

De Schryver A. D. y Meheus A.: Epidemiología de las enfermedades de transmisión sexual: panorama mundial (primera parte). Infectología.8:1-8, 1993

De Schryver A. D. y Meheus A.: Epidemiología de las enfermedades de transmisión sexual: panorama mundial (segunda parte). Infectología.9:1-5, 1993

Díaz-Barreiro P., Díaz L. E. y Servín R. J. F.: Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en el cérvix de pacientes embarazadas en control prenatal. Ginecología y obstetricia de México. 65:48-51, 1997.

Echaniz A.G., Calderón J.E. y Camalla B. N.: Prevalencia de infección cervicovaginal por *Chlamydia trachomatis* en población femenina de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Salud pública de México. 34:1-6, 1992.

Flores R.E., Casanova G. y Beltrán M.: Vaginosis bacteriana. Relación de la flora vaginal con las células epiteliales de vagina, con diferente tratamiento. Estudio ultraestructural. Ginecología y obstetricia de México. 65: 182-190, 1997.

Garza R.V., Peniche Q. E. y Manero B. S.: La importancia clínica de *Chlamydia trachomatis*. *Laborat-acta*. 4:55-70, 1992.

Garza R.V.: El diagnóstico de las enfermedades ocasionadas por *Chlamydia trachomatis*. *Laborat-acta*. 5:29-35, 1993.

Garza R.V., Peniche Q. E. y Barquín S. V. Los principales agentes causales de infecciones urinarias en la mujer sexualmente activa. *Laborat-acta*. 6:25-27, 1994.

González A., Inzunza M. y Ortiz Z. C.: Diagnóstico de laboratorio de vaginosis bacteriana. *Atención Primaria*. 19: 357-60, 1997

Gupta B. K., Kumar R. Y Sofat R.: El papel de *Gardnerella vaginalis* en vaginitis inespecífica en usuarios del anticonceptivo dispositivo intrauterinos. *J India Pathol. Microbiol.* 41: 67-70, 1998.

Hernández J. T. M., Alonzo R. H. y Deleón R. I.: Investigación de *Chlamydia trachomatis* utilizando 3 técnicas. *Bioquímica*. 17: 28-3, 1992.

Ibarra C.A., Sosa C.R. y Lugo F.G.: Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres estériles. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Bioquímicas*. 35:153-159, 1991.

Joklik D.P., Willett P.H. y Amos B.: *Pasteurella* y otros bacilos Gram negativos. En: *Zinsser microbiología*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina, 1997, pp. 819-822.

Koneman E. W., Allen D.S. y Dowell V. R.: Diagnóstico de infecciones causadas por patógenos intracelulares obligados. En: *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana, México D.F., 1997, pp. 820-822.

Manual en inmunodiagnóstico, Inmuno Comb II nueva generación, *C. trachomatis* IgA e IgG. ICN Farmacéutica, S.A. de C.V., Código 765304, México D.F., 1999.

Manual Direct Antigen Detecctin System , *C. trachomatis*, collection Kit-Kallestad, Cat. No. 629 or SDP cat. No. 30706, USA, 1989.

McGregor, J.A.: Vaginosis bacteriana. *Infectología*. 10:587-596, 1993.

Monterrosa C., Blaquicet A.L. y Cantillo Cabarcas: *Gardnerella vaginalis* en informes de citología cervico – vaginal. *Gac Med Mex*. 132:119-25, 1996

Pliutto E.S.: El diagnóstico bacteriológico de vaginosis. *Klin de Laboratorio Diagn*. 3: 16-8, 1997

Romero, C. R.: *Gardnerella*: Microbiología y parasitología humana. Editorial Médica Panamericana, México D.F., 1994, pp. 263-266, 287-288.

Ruíz J. M. y Aguirre L. E.: Infecciones Bacterianas de Transmisión Sexual. XIV Reunión Zona Centro de Química Clínica. Querétaro, México. 3 - 5 de Febrero de 1996. 15.

Schachter J., Moncada J. y Whidden R.: Noninvasive test for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection: application of Ligase Chian Reaction to First-Catch Urine specimen of women. *The journal of infectious diseases*. 172: 1411-1414, 1995.

Steven S., Kligman I. y Grifo J.: *Chlamydia trachomatis* detected by Polymerase Chain Reaction in cervices of culture-negative women correlates with adverse in vitro fertilization outcome. *The journal of infectious diseases*. 171: 1657-1659, 1995.

Thorsen P., Jensen I.P. y Jeune B: Pocos microorganismos asociados pueden constituir la patología de Vaginosis bacteriana. Soy J Obstet Gynecol. 178: 580-7, 1998

Vázquez, C.L.: Vaginosis bacteriana. Ginecología. 1:1-2, 1996.

Villegas H., Flores E. y González M. A.: La microscopía electrónica en el diagnóstico de enfermedades infecciosas de transmisión sexual. Experiencia institucional. Perinatología y reproducción humana. 8: 65-71, 1994.

Villegas H., Arias F. y Flores E.: Características ultraestructurales de infecciones por *Gardnerella vaginalis* en pareja heterosexuales. Arquee Androl. 39: 147-53, 1997.