

Métodos diagnósticos de *Gardnerella vaginalis*

N. Rodríguez-Díaz, C. Pintor, A. Dorta, A. Sierra, C. Sanluis y J.C. Alberto

Departamentos de Obstetricia y Ginecología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife. España.

SUMMARY

The high insolation rate of *Gardnerella vaginalis* in a women that assists to gynecologic clinics or sexually transmitted diseases control centers, and the pathogenic role that actually is ascribed to it in the production of obstetrics complications, it may be associated with an increased rate of premature delivery, chorioamnionitis, puerperal endomyometrial infections, and endometritis in not pregnant women, make us to dispose of eassy and quick techniques to detect this agent.

By the HBT media (Human Blood Bilayer agar media with Tween 80) we had isolated *G. vaginalis* in 398 women. Other diagnostic tests that we used are the wet mount, the KOH test and the gram stain, as vaginal secretions as cervical secretions, valuing the utility of the amina presence, the due cells in the wet mount and gram stain, and also its relation with the lactobacilli, leukocytes and gram negative bacilli number in those tests.

We have obtained that with the observation of the clue cells in the wet mount and a decreased number of latobacilli, the existence of amina odour, the presence of clue cells and gram negative bacilli in the gram stain, we can obtained the diagnosis of *G. vaginalis*.

INTRODUCCIÓN

Gardnerella vaginalis es el principal agente causal de las vaginitis inespecíficas, actualmente llamadas vaginosis bacterianas que consiste en la presencia de una

leucorrea gris homogénea con test de aminas positivo, células clave en el examen en fresco y un pH superior a 4,5 y que resulta de la interacción entre *G. vaginalis* y varias especies de anaerobios¹.

La etiología de las vaginitis inespecíficas no está clara, sin embargo, en mujeres afectas se ha hallado *G. vaginalis* con una mayor incidencia que en otras pacientes, en asociación con bacterias anaerobias²⁻⁴.

Esta bacteria se descubrió en 1953 por Gardner y Dukes y se la incluyó primeramente en el género *Corynebacterium*, luego en el *Haemophilus* y, por último, en el *Gardnerella*⁵. El organismo carece de cápsula y es un bacilo gramnegativo y Gram variable, anaerobio facultativo⁶.

Estas pacientes presentan una leucorrea acuosa, de color grisáceo y aspecto homogéneo, que suele contener burbujas como consecuencia del gas producido por las bacterias anaerobias con las que la *G. vaginalis* se suele asociar^{4,7}. El olor a pescado que presenta la secreción vaginal se debe a un incremento de las aminas, sobre todo putrescina y cadaverina⁴, olor que aumenta tras un contacto sexual, al mezclarse el líquido seminal con esta secreción vaginal³. Mediante el examen en fresco con solución salina, esta secreción, observada al microscopio, presenta células epiteliales vaginales con un citoplasma de aspecto granulado y con sus bordes mal definidos; a estas células se las denomina células clave, y adquieren este aspecto debido a que los microorganismos se adhieren a su superficie⁷⁻⁸. Así mismo no se suelen observar lactobacilos ni leucocitos⁷.

El olor a aminas se incrementa al añadir hidróxido de potasio al 10 % a la secreción vaginal, debido a que las aminas se volatilizan ante un pH alcalino^{3,4,7}.

Al realizar una tinción de Gram de esta leucorrea se aprecian masas de cocobacilos en Gram variable y ausencia o un muy escaso número de leucocitos⁸.

Otra prueba diagnóstica es la determinación del pH de la secreción que será de 4,5 o más, en un 91 % de los casos⁷.

Recibido para su publicación el 15 de noviembre de 1988.

Aceptado para su publicación 22 de marzo de 1989.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Consejería de Sanidad del Gobierno Autónomo de Canarias, en acuerdo con la Universidad de La Laguna.

TABLA I. Valor de los diferentes hallazgos microbiológicos en el examen en fresco y tinción de Gram

MÉTODO	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	FALSOS POSITIVOS (%)	FALSOS NEGATIVOS (%)	VALOR PREDICTIVO (+) (%)	VALOR PREDICTIVO (-) (%)
Test aminas	69,6	86	13	30	66	87
Células clave (fresco)	86,2	80,6	19,3	13,7	63,4	93,7
Células clave (Gram)	82,9	90,9	9	17,4	78	93
Bacilos gramnegativos (vagina)	18,2	96,7	3,23	81,7	68,8	75,2
Bacilos gramnegativos (cérnix)	18,8	98	1,9	81,2	78,9	75,5

Por tanto, el diagnóstico de esta vaginosis se hará cuando se cumplan tres de los siguientes criterios: *a)* presencia de leucorrea típica; *b)* un pH superior a 4,5; *c)* células clave en fresco, y *d)* olor a aminas^{7,9}. No obstante, cuando el diagnóstico de vaginosis se basa sólo en la presencia de células clave o en la leucorrea descrita, no se correlaciona con un aislamiento de *G. vaginalis*⁷.

El medio de cultivo que presenta mejores resultados para la identificación de *G. vaginalis* es el *Human Blood Bilayer* agar media con *Tween* 80 (HBT) en el que las colonias producen un halo discreto de betahemólisis alrededor de las colonias¹⁰. Las muestras se deben sembrar directamente en el medio de cultivo ya que *G. vaginalis* tiene escasa supervivencia en los medios de transporte¹¹.

Otros medios de cultivo utilizados son el agar con guanina citosina, el agar con base Columbia o CNA, y el Casman medio sólido.

Una vez obtenido el cultivo, se realiza una tinción de Gram a las colonias sospechosas de ser *G. vaginalis*, apareciendo como cocobacilos gramnegativos a Gram variable o como bacilos cortos. La reacción a las catalasas se muestra negativa, mientras que formarán ácido a partir de dextrosa, maltosa, almidón y glucosa, pero no a partir de manitol. Con la cromatografía gas-líquido se objetiva que produce ácido acético⁷.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el diagnóstico de *G. vaginalis* hemos utilizado el examen en fresco, determinando la presencia de células clave, consistentes en células epiteliales vaginales que pierden la nitidez de sus bordes y su citoplasma y núcleo adquieren un aspecto granuloso cuando existen gran cantidad de gérmenes en su superficie de lactobacilos, y de leucocitos, los cuales no deben exceder de 1 o 2 por campo, y en todo caso no

deben superar el número de células epiteliales vaginales cuando se observan en un microscopio óptico a 400 aumentos.

Así mismo realizamos el test de la potasa, añadiendo a una muestra de la secreción vaginal una gota de hidróxido de potasio al 10 %, valorando la presencia de olor a aminas, consistente en un olor desagradable semejante al del pescado salado.

También efectuamos una tinción de Gram, tanto de la secreción vaginal como endocervical, en los que se evaluaba la existencia de células clave, lactobacilos, leucocitos y bacilos gramnegativos bajo observación en microscopio óptico a 400 aumentos.

El medio de cultivo utilizado fue el HBT. Para la toma de la muestra se utilizó un hisopo estéril con el que se recogió una gota de la secreción vaginal que se depositó sobre el medio de cultivo, que se encontraba a 37 °C, y posteriormente se sembraba con un asa de platino estéril, introduciendo la placa en estufa a 37 °C, con un ambiente de CO₂ del 5 %, durante 24-48 horas. Transcurrido este tiempo se observaron las placas para determinar la morfología de las colonias, que aparecen pequeñas y de color grisáceo, translúcidas, produciendo a su alrededor una hemólisis clara con bordes difusos. Una vez identificadas las colonias, se les efectuaba una tinción de Gram, observándolas al microscopio óptico a 400 aumentos, apareciendo con su morfología típica, como bacilos gramnegativos.

Las mujeres objeto de estudio habían acudido a nuestra consulta de enfermedades de transmisión sexual, en la que aislamos *G. vaginalis* en un total de 398 pacientes.

El estudio estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS, que incluía un subprograma Cross Tabs, mediante el cual se obtuvo la significación estadística, y se realizó un test de *screening* para establecer la sensibilidad y especificidad de cada test, en el diagnóstico de *G. vaginalis*.

RESULTADOS

Se observó que en el 69,6 % de las ocasiones en que diagnosticamos *G. vaginalis*, el test de aminas fue positivo ($p < 0,0001$), de tal manera que la sensibilidad del test de la potasa para su detección fue de un 69,6 %, con una especificidad de un 86 %. Sin embargo, hallamos un 13 % de casos en que este test fue positivo y no creció *G. vaginalis*, frente a los falsos negativos del 30 % (tabla I).

En el examen en fresco se objetivó que el 10 % de las mujeres con *G. vaginalis* presentaba lactobacilos, mientras que el 30,1 % mostraba leucocitos. El 86,2 % de estas infecciones se acompañó de células clave, y en el 63,5 % de las ocasiones en que las observamos se confirmó con cultivo la presencia de *G. vaginalis* ($p < 0,0001$).

La sensibilidad de las células clave en fresco fue de un 86,23 %, con una especificidad del 80,65 %. Los falsos negativos supusieron el 13,78 % y los falsos positivos el 19,3 %.

Mediante el Gram de vagina se detectaron lactobacilos en el 13,8 % de *G. vaginalis*, mientras que en el Gram de cérvix lo presentaron un 11,8 % ($p < 0,0001$), y se observaron leucocitos en el 58,9 % del Gram de vagina, y en el 55,4 % del Gram de cérvix de estas pacientes.

La principal asociación de las células clave en el Gram de vagina se produce con la *G. vaginalis*, el 82,9 % de éstas las presentaron, y en el 78,1 % de las ocasiones en las que encontramos células clave, este agente creció ($p < 0,0001$). La sensibilidad del Gram de vagina para su diagnóstico fue del 82,9 %, con una especificidad de un 90,9 %.

También se acompañaron de bacilos gramnegativos en el Gram vaginal ($p < 0,0001$), y la sensibilidad de este hallazgo fue de un 18,2 %, con una especificidad del 96,7 %.

De la misma manera se produce una asociación de las células clave del Gram cervical con *G. vaginalis*, con una sensibilidad de sólo un 4,23 %, pero una especificidad del 99,3 %, prácticamente no se encontró ningún caso de falsos positivos, con un 0,7 %, pero sí una tasa muy elevada de falsos negativos, 95 %.

El 18,8 % de las mujeres con *G. vaginalis* presentó bacilos gramnegativos en el Gram de cérvix y en el 78,9 % de las ocasiones en que éstos se visualizaron, creció *G. vaginalis* ($p < 0,0001$).

DISCUSIÓN

La presencia de olor a aminas en el test de la potasa, así como la tinción de Gram, el examen en fresco y el cultivo sirvieron para la detección de *G. vaginalis*.

En estas pacientes se libera un olor a aminas cuando se añade hidróxido de potasio al 10 % a la secreción vaginal, y dicho olor es uno de los criterios diagnósticos de esta infección^{7,1}. Nosotros lo hemos encontrado en el 70 % de las mujeres con *G. vaginalis*, y según los resultados obtenidos pensamos que ante un test de aminas positivo se debe confirmar su presencia.

En el examen en fresco de estas pacientes se observa una disminución considerable del número de lactobacilos, y no se constata un incremento en la presencia de leucocitos^{7,12,13}. Hemos encontrado también un escaso número de lactobacilos, ya que sólo el 10 % de éstas lo presentaron, por lo que coincidimos con los resultados que presentaron otros autores^{7,12,13}.

Este hecho se repite en el Gram de vagina, en el que sólo el 13,8 % presentó lactobacilos, y en el Gram de cérvix, donde se observó que el 11,8 % los tuvieron.

En nuestro trabajo el 30,1 % de *G. vaginalis* tuvieron leucocitos en fresco, que alcanzaron hasta un 58 % en el Gram vaginal; creemos que esta diferencia con los autores que refieren disminución en el número de leucocitos, se debe al alto porcentaje en que se diagnosticó *G. vaginalis* asociada a otra infección, en el 51,12 % de su aislamiento, ya que estas infecciones causales de vaginitis o cervicitis explicarían esta elevación en la cantidad de leucocitos¹⁴.

La existencia de células clave tanto en el fresco como en el Gram de vagina, se puede considerar como un signo patognomónico de *G. vaginalis*^{4,12,14}. Hemos hallado estas células clave en el 86,2 % de las mujeres con *G. vaginalis*, mientras que en la tinción de Gram de vagina se observaron en el 82,9 %.

Pheiffer⁴ encontró que estas células tenían una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 95 % y Dunkelberg¹⁵ las halló con una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 100 %, resultados similares a nuestros datos.

Holmes¹⁴ considera que la combinación del examen en fresco, junto con la tinción de Gram del exudado vaginal, es el método más fiable para el diagnóstico de *G. vaginalis*.

Así mismo, también es característica la presencia de bacilos gramnegativos a Gram variables en la tinción de Gram⁷, hecho también comprobado en nuestro estudio, donde el 18,26 % de las pacientes con esta infección los presentó.

Por tanto, mediante la observación de células clave en el fresco, junto con una disminución en el número de lactobacilos, la presencia de olor a aminas positivo y la existencia de células clave y bacilos gramnegativos en el Gram, se puede obtener el diagnóstico de *G. vaginalis*. No obstante, hemos realizado la confir-

mación diagnóstica por el cultivo en el medio HBT, cuyos resultados hemos tomado como referencia para establecer la utilidad de las diversas técnicas analizadas.

RESUMEN

Las altas tasas de aislamiento de *Gardnerella vaginalis* en mujeres que acuden a clínicas ginecológicas o a centros de control de enfermedades de transmisión sexual, junto con el papel patógeno que actualmente se le atribuye en la producción de complicaciones obstétricas como el parto prematuro, corioamionitis, infecciones puerperales, y endometritis, nos obliga a contar con técnicas sencillas, rápidas y al alcance de todos, para detectar este agente.

Mediante el medio de cultivo *Human Blood Bilayer agar media Tween 80* (HBT) hemos aislado *G. vaginalis* en un total de 398 mujeres. Otros métodos diagnósticos utilizados fueron el examen en fresco, el test de la potasa, y la tinción de Gram, tanto de la secreción vaginal como de la endocervical, valorando la utilidad de la presencia de aminas, de las células clave en el fresco y en el Gram, y objetivando así mismo su relación con el número de leucocitos, lactobacilos y bacilos gramnegativos en estas técnicas.

Se determinó que mediante la observación de las células clave en el fresco, junto con una disminución en el número de lactobacilos, la presencia de olor a aminas y la existencia de células clave y bacilos gramnegativos en el Gram, se puede obtener el diagnóstico de *G. vaginalis*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tsieh Sun MD. Sexually related infectious diseases: clinical and laboratory aspects. New York, 1986.
2. Baldson MJ, Taylor GE, Pead L, Maskell R. *Corynebacterium* vaginale and vaginitis. A controlled trial of treatment. *Lancet* 1980; 1:501-506.
3. Chen KSC, Forsyth PS, Buchanan TM, Holmes KK. Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with non-specific vaginitis. *J Clin Inv* 1979; 63:828-835.
4. Pfeifer 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 (26):1.429-1.434.
5. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella: G. vaginalis*. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30:170-178.
6. Moss CW, Dunkelberg WE. Volatile and cellular fatty acids of *Haemophilus vaginalis*. *J Bacteriol* 1969; 100:544-546.
7. Vontver LA, Eschenbach DA. The role of *Gardnerella vaginalis* in nonspecific vaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1981; 24 (2):439-460.
8. Dunkelberg WE. *Corinebacterium* vaginale. *Sex Trans Dis* 1977; 4:69-75.
9. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74 (1):14-22.
10. Totten A. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus*) *vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1982; 15:141-147.
11. Leighton PM. *Gardnerella vaginalis*: laboratory isolation and clinical significance. *Can J Public Health* 1982; 73:335.
12. Eschenbach DA. Vaginal infection. *Clinical Obst Gynec* 1983; 26 (1):186-202.
13. Spagna VA, Prior RB. Sexually transmitted diseases. A clinical syndrome approach. Ohio, 1987.
14. Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ. Sexually transmitted diseases USA, 1984.
15. McLennon MT, Smith JM, McLennon CE. Diagnosis of vaginal mycosis, trichomoniasis. Reliability of cytologic smear, wet smear and culture. *Obstet Gynecol* 1972; 40:231.
