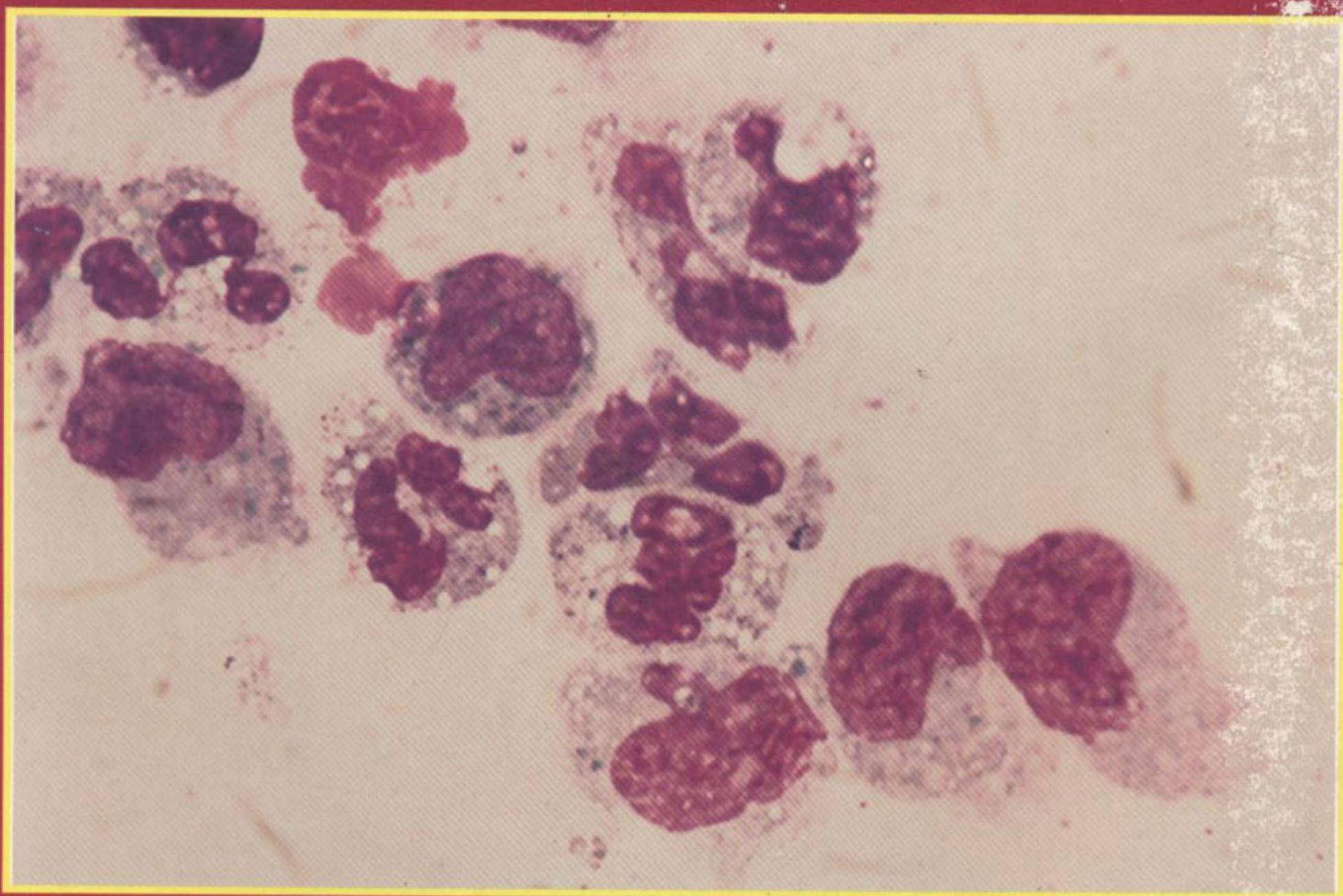


ACTA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS

Vol 3 Nº1 1994
ISSN - 1315 - 1746
pp - 92 - 0487



CONTENIDO

Editorial.....	1
Trabajos Originales	
Hallazgos clínicos y microbiológicos en pacientes con vaginosis bacteriana <i>Omaira A. Bermúdez Romero; Yudith M. Martínez Valera; Beatriz M. Nieves Blanco.....</i>	2
Erlichiosis en animales y humanos en Venezuela <i>Tamí, Irene; Garcia, Francisco; Tamí, Manuel; Arcía, Reny</i>	19
Diagnóstico serológico de tuberculosis pulmonar por la técnica de contraelectroforesis (C.I.E) <i>Ernesto Montoro; Raúl Díaz; Fe Crespo; Caridad Ferrá; Miguel Echemendía; José A. Valdivia.....</i>	25
Septicemia a moraxella (branhamella) catarrhalis. Reporte de un caso <i>Isabel Martínez Motas; Ana Sonia Patton Marisy; Franklin Sotolongo Padrón; Osvaldo Rico Cordeiro; Estrella Rodríguez Bocanegra.....</i>	28
Caracterización de cepas de Neisseria meningitidis. Grupo B <i>Isabel Martínez Motas; Ana Sonia Patton Marisy; Franklin Sotolongo Padrón; Alina Llop Hernández; Jorge Sosa Puente.....</i>	31
Trabajos de Revisión	
La historia de un gran descubrimiento científico <i>Rosario Beaupertuy de Benedetti.....</i>	35
Testimonios para la Historia de la S.V.B.E.	
VII Jornadas científicas S.V.B.E. <i>Discursos de Instalación</i>	39
Normas para Publicación de Trabajos en el Acta Científica de la S.V.B.E.	42
Programación de Eventos Científicos.....	47

Tiraje: 2.000 ejemplares

Impresión: Poligráfica Industrial

Edición electrónica: Desarrollos Compumedia

Diseño, diagramación y producción: Avvizi CA.

PORTADA

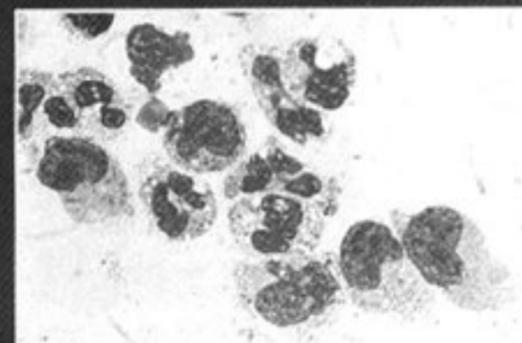
Estudio de quimiotaxis en paciente con infección a repetición: se observa migración de los polimorfonucleares y macrófagos al cabo de 6 horas de exposición

Técnica: ventana de piel (ventana de Rebeck)

Coloración de Wright

Aumento 1000 X

Cortesía: Lic. Irene Tamí



EDITORIAL

Hemos culminado con éxito las VII Jornadas Científicas de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas que, en esta oportunidad, fueron realizadas conjuntamente con las II Jornadas Científicas del Colegio de Bioanalistas del Estado Mérida.

Fué para nosotros una grata experiencia realizar por primera vez estos eventos en conjunción con un Colegio de Bioanalistas, el cual, por intermedio de su Junta Directiva, aportó su más sincera colaboración para que los mismos tuvieran el éxito logrado, comenzando por la escogencia del Comité Organizador presidido por la licenciada Iraida Medici de Jugo quienes en colaboración estrecha con la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas y el propio Colegio sede, alcanzaron sacar adelante tan ardua empresa.

Es interesante destacar la gran diversidad de tópicos escogidos en el temario científico, donde se presentaron los más variados temas de la actualidad del Bioanálisis, ubicados entre conferencias, simposium y mesas redondas. La incorporación de los cursos pre-jornadas lograron llenar las expectativas deseadas, permitiendo a los Bioanalistas y futuros colegas, refrescar sus conocimientos sobre los temas propuestos. En esta oportunidad se presentaron 46 trabajos libres de un alto nivel científico, lo cual obligó a otorgar por vez primera una premiación triple. Cabe destacar de igual manera los premios "Profesora Franca Billi" al mejor trabajo de estudiantes otorgado a dos de ellos y dos menciones honoríficas; además en esta oportunidad fueron conferidos dos premios de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Sería uno de nuestros mayores anhelos la publicación de todos ellos en el Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Por último se incorporó el premio al mejor trabajo libre otorgado a los Bioanalistas del estado sede.

Es para todos los miembros de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, un orgullo el que nuestras jornadas hayan logrado su madurez científica, demostrado por el éxito obtenido. Sin embargo, queremos recordar que nuestra misión no ha concluido y debemos seguir adelante ya que el año próximo, en la ciudad de Caracas, celebraremos el VII Congreso de Bioanálisis y VIII Jornadas Científicas de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, un nuevo reto, un nuevo compromiso para que nuestros colegas encuentren en ellos, todas sus aspiraciones para mantenerse actualizados y que puedan continuar al día en esta hermosa profesión que todos ejercemos y por la que tanto hemos luchado, para mantenerla a la altura de lo que es y será siempre nuestro horizonte, la salud del pueblo venezolano.

Dr. Axel Rodolfo Santiago
Presidente S.V.B.E.

HALLAZGOS CLINICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA

*Omaira A. Bermúdez Romero; Yudith M. Martínez Valera; Beatriz M. Nieves Blanco
Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica "Dr. Roberto Gabaldón", Departamento de Microbiología,
Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes.*

RESUMEN

Se estudiaron 63 pacientes que asistieron a consulta de planificación familiar con la finalidad de determinar la frecuencia y etiología de la Vaginosis Bacteriana (VB) en dichas mujeres, así como también se compararon los distintos procedimientos para su diagnóstico. El diagnóstico de VB se llevó a cabo tanto clínicamente como microbiológicamente. Se consideró que una paciente clínicamente tenía VB cuando presentaba tres de los cuatro indicios clínicos establecidos por Amsel y col. en 1983. La coloración de Gram se evaluó mediante los criterios de Spiegel y col. 1983 y Nugent y col. 1991. El estudio de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos se efectuó utilizando procedimientos convencionales. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante las pruebas de hipótesis intervalos de confianza y técnicas interpretativas. De las 63 pacientes estudiadas 33 (52,38%) presentaron VB diagnosticada clínicamente. De estas 33 pacientes, solamente a 23 (36,5%), se les corroboró el diagnóstico por estudios microbiológicos. El criterio clínico más sensible y específico resultó ser la célula clave. La combinación de 2 o menos morfotipos (*Gardnerella* y otro morfotipo distinto a lactobacilo) más células claves, observadas mediante coloración de Gram demostró la más alta sensibilidad (73 - 91%) y especificidad (100%) para diagnóstico de VB.

La asociación entre *G. vaginalis* y bacterias anaeróbicas representó el más alto porcentaje 56,62% entre los agentes bacterianos involucrados en la etiología de la VB. Al comparar los diferentes métodos usados para el diagnóstico de VB, se encontró que existe diferencia significativa ($p=0,05$) entre los métodos clínicos y microbiológicos, no así entre los criterios de Spiegel y Nugent, y entre la coloración de Gram y el cultivo. La imagen microscópica de la secreción vaginal teñida al Gram permitió realizar un diagnóstico definitivo de VB, de ayuda valiosa para el médico. Por otra parte, la difi-

cultad para realizar los cultivos y el alto costo de los mismos justifican su uso en estudios de investigación sobre VB, pero no es tan importante en el trabajo clínico de rutina.

Palabras Claves: Vaginosis bacteriana, células claves, morfotipos, células clave, bacterias aeróbicas y anaeróbicas.

ABSTRACT

Clinical and microbiological findings in bacterial Vaginosis patients

Sixty three patients attending a family planning center were studied in order to determine the frequency and the etiology of bacterial vaginosis (BV). Different diagnostic methods were also compared in this study, which comprised both clinical and microbiological diagnosis. A patient was considered clinical BV positive if she presented three clinical signs as established by Amsel et al., 1983. Evaluation of the Gram-stain was done by the criterion of Spiegel et al., 1983 and Nugent et al., 1991. The study of aerobic and anaerobic microorganisms was done using conventional procedures. The statistical analysis of the results was done through trials of hypothesis intervals of reliance and interpretative techniques.

Out of 63 patients studied, 33 presented clinical diagnosis of BV (52.38%). Out of these 33 patients, only 23 (36.5%) were found to have BV after the microbiological studies. The clue cells resulted in the most sensible and specific clinical criterion. The combination of 2 or less morphotypes (*Gardnerella* and other morphotypes distinct to lactobacillus) plus clue cells, observed by means of Gram-stain proved to show the highest sensitivity (73.91%) and specificity (100%) for the diagnosis of BV. The association of *G. vaginalis* and anaerobic bacteria represented the highest percentage (56.62%) between the bacterial agents involved in the BV etiology. Comparison of the clinical and microbiological methods for the diagnosis of BV showed that there exist

a significant difference between them ($p=0.05$). Nevertheless, no difference was obtained between the criterion of Spiegel and Nugent, nor between Gram-stain and culture. The microscopic image of the vaginal secretion stained allowed to make a definitive diagnosis of BV, which is of great help to the physicians.

On the other hand, the difficulty and high cost of the cultures justifies their use in studies of research about BV, but it is not important in routine clinical work.

Key Words: bacterial vaginosis, clue cells, aerobic and anaerobic bacteria, morphotypes.

INTRODUCCION

La vaginosis bacteriana (VB), es una infección vaginal polimicrobiana, en la cual existe desequilibrio en el ecosistema vaginal, caracterizado por un aumento en los organismos anaerobios y aerobios y una disminución en la población de lactobacilos. Además, dicha infección se caracteriza clínicamente por la presencia de pocos síntomas irritativos, abundante flujo y ausencia de una respuesta inflamatoria (Eschenbach y col., 1988; Weaver y Mengel, 1988).

Durante los últimos años se ha estudiado el espectro bacteriano de la flora vaginal de mujeres con VB; sin embargo, aún se desconoce su etiología exacta. Como agentes etiológicos de dicho síndrome se ha dedicado particular atención a *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, bacterias anaerobias de los géneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella* y *Propionibacterium*, y más recientemente a especies del género *Mobiluncus* (Holst, 1990; Hillier y col., 1991).

La VB, es una infección que se presenta en la población femenina en general. Así tenemos que Hallen y col. (1987), encontraron que de 405 pacientes con enfermedades de transmisión sexual (ETS), 164 cumplían con los criterios generalmente aceptados para VB. Eschenbach y col. (1988), determinaron un 33% de VB en 640 mujeres atendidas por ETS. Dichos autores señalan que la prevalencia de VB es alta en pacientes con ETS, por cuanto muchas de estas pacientes no toman cuidado de sus síntomas genitales, además porque la actividad sexual puede ser un factor predisponente de la VB. Con respecto a la actividad sexual, Holst (1990), señala que la misma no es muy importante en la transmisión de la vaginosis bacteriana, debido al hecho que *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp y *Mycoplasma hominis* pueden ser aislados del recto de mujeres, hombres y niños, por lo que es probable su diseminación a la vagina a partir del recto.

Por otra parte, la prevalencia de VB fue estudiada en 700 pacientes de una clínica de salud de estudiantes

universitarias. La ocurrencia de VB en la población de estudiantes fue aproximadamente de un 4%, en contraste al 33% en la población de pacientes con ETS (Eschenbach y col., 1988). Lo cual coincide con el resultado reportado por Sobel (1990), quien sostiene también que la frecuencia de vaginosis bacteriana aumenta considerablemente en las clínicas de ETS, alcanzando valores de 24 a 37%. En este estudio se señala además un 16 a 19% de VB en mujeres embarazadas. Las cifras más bajas de VB se encontraron entre las pacientes que asistieron a clínicas privadas y la mayor prevalencia en las que asistieron a las clínicas de ETS y universitarias.

Cristiano y col. (1989), estudiaron la frecuencia de vaginosis bacteriana en 793 mujeres, de las cuales 680 eran fértiles, 32 embarazadas y 72 menopáusicas. En los grupos de mujeres fértiles y embarazadas, encontraron vaginosis bacteriana en un 20.9% (142) y en 21.9% (7) respectivamente, mientras que en el grupo de mujeres con menopausia hallaron una frecuencia de 12.7% (9). Además investigaron 10 mujeres que sufrieron histerectomía de las cuales 5 (50%) tenían VB.

Con respecto a las pacientes que asisten a las clínicas de planificación familiar, Riordan y col. (1990), señalan que 26% de dicha población presenta una prevalencia de hallazgos positivos para vaginosis bacteriana. Por otra parte, Angelitti y Nieves (1992), reportaron un 43,10% de vaginosis bacteriana en pacientes que acuden a dicha consulta.

La VB por sí sola no representa un grave problema en la población afectada, sin embargo su importancia viene dada porque se cree que existe una relación muy estrecha entre la VB y la aparición de ciertas afecciones, tales como endometritis, salpingitis, abscesos de trompas y ovarios, infecciones sépticas en los abortos y partos prematuros, entre otras; cuyos agentes etiológicos eran los mismos organismos que originaron la VB presente inicialmente en las pacientes (Eschenbach y col., 1988; Holst, 1990; Schwebke, 1991).

A pesar de las investigaciones que se han llevado a cabo al respecto, todavía no están claros muchos aspectos relacionados con la etiología, patogénesis y epidemiología de la VB; razón por la cual creemos necesario su estudio sistemático en las pacientes que asisten a las distintas clínicas ginecológicas.

En este trabajo nos propusimos realizar un estudio prospectivo de la frecuencia y etiología de la VB en mujeres que asisten a consultas de Planificación Familiar, así como también, se compararon los distintos procedimientos para su diagnóstico. El diagnóstico

de VB se llevó a cabo tanto clínica como microbiológicamente. La coloración de Gram se evaluó mediante los criterios de Spiegel y col. (1983) y Nugent y col. (1991).

OBJETIVOS

Determinar la proporción de vaginosis bacteriana en los pacientes que asisten a la consulta de planificación familiar en el Ambulatorio "El Llano", diagnosticada tanto clínica como microbiológicamente (cultivo y Gram).

Determinar el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de los parámetros (combinados e individuales) usados en el diagnóstico clínico de la vaginosis bacteriana.

Comparar los criterios usados por Spiegel y col. (1983) y Nugent y col. (1991) para la interpretación de frotis teñidos al Gram.

Determinar la relación que existe entre el diagnóstico clínico y microbiológico (Gram y cultivo) de la vaginosis bacteriana.

Determinar el valor predictivo positivo y negativo de los morfotipos y las células claves observadas en la coloración de Gram como método diagnóstico de la vaginosis bacteriana.

Identificar y conocer la proporción en que se encuentran presentes los agentes bacterianos involucrados en la etiología de la vaginosis bacteriana.

Comparar la frecuencia de aislamiento de *Mobiluncus* sp en el medio RLK y AS107.

Correlacionar la presencia de vaginosis bacteriana con infecciones causadas por *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.

VAGINOSIS BACTERIANA

Definición

La vaginosis bacteriana es una infección vaginal caracterizada clínicamente por la presencia de pocos síntomas irritativos, abundante flujo y ausencia de una respuesta inflamatoria (Torres y Conde, 1986; Weaver y Mengel, 1988; González y Bellorín, 1991).

En la vaginosis bacteriana existe un estado de desequilibrio del ecosistema vaginal, caracterizado por un aumento de la flora bacteriana anaerobia y aerobia del tracto cervico-vaginal y por una marcada disminución de la población de lactobacilos (Torres y Conde, 1986; Weaver y Mengel, 1988; Thomason y col., 1990; Livengood y col., 1990; Pahlson y Larsson, 1991; Majeroni, 1991; González y Bellorin, 1991; Larsson y col., 1992).

ETIOLOGIA

Desde 1955, en que Gardner y Dukes realizaron trabajos sobre vaginitis inespecífica, actualmente denominada vaginosis bacteriana, dicha afección se ha relacionado con una bacteria no móvil, variable al gram o gramnegativa, llamada por sus descubridores *Haemophilus vaginalis*, después *Corynebacterium vaginalis* y más recientemente, en base a estudios taxonómicos, *Gardnerella vaginalis*.

La concentración de *Gardnerella vaginalis* es baja en el flujo vaginal de mujeres sanas, a diferencia de las mujeres con vaginosis bacteriana en las que dicho microorganismo es predominante (Spiegel y col., 1980; Cristiano y col., 1989; Ortiz y col., 1990; Soper y col., 1990; Klebanoff y col., 1991; Heather y col., 1990; Livengood y col., 1990; Sobel, 1990; Holst, 1990; Burns y col., 1992; McDonald y col., 1991; Pahlson y Larsson, 1991; Majeroni, 1991; Sjoberg y Hakansson, 1991; Jones y Willcox, 1991; Briselden y col., 1992; Larsson y col., 1992; Easmon y col., 1992; Catlin 1992, razón por la cual se hace necesario su aislamiento y estimación semicuantitativa en medios selectivos utilizados en el diagnóstico de dicho proceso.

Otros estudios señalan, además de *Gardnerella vaginalis* como agente etiológico de la vaginosis bacteriana, a microorganismos anaeróbicos, entre los cuales están los bacilos y cocobacilos gramnegativos que no forman esporas, del género *Prevotella* (*Prevotella bivia*, *P. disiens* y *P. melaninogenica*), cocos gram positivos de los géneros *Peptococcus* y *Peptostreptococcus*, y bacilos grampositivos, pleomórficos del género *Propionibacterium* sp. (Spiegel, 1980; Weaver y Mengel, 1988; Soper y col., 1990; Sobel, 1990; Pahlson y Larsson, 1991; McDonald y col., 1991; Larsson y col., 1992; Jones y Willcox, 1991; Sjoberg y Hakansson, 1991; Briselden y col., 1992; Easmon y col., 1992). Recientemente las investigaciones sobre vaginosis bacteriana hacen referencia a bacilos curvos móviles, anaerobios, gramvariables o gramnegativos, aunque de pared celular grampositiva, de múltiples capas y no esporulados, agrupados en el género *Mobiluncus*. El género *Mobiluncus* posee dos especies *Mobiluncus curtisii* subespecie *curtisii* y *holmesii*, y *Mobiluncus mulieris*, los cuales aparentemente tienen un papel importante en el desarrollo de esta infección (Spiegel y Roberts, 1984; Torres y Conde, 1986; Hallen y col., 1987; Weaver y Mengel, 1988; Sobel, 1990; Livengood y col., 1990; Andreu y col., 1991; Burns y col., 1992; Jones y Willcox, 1991; Briselden y col., 1992; Easmon y col., 1992). Cabe señalar que la relación del género *Mobiluncus* con la etiología de la vaginosis bacteriana

ha sido de difícil establecimiento, por cuanto los métodos de cultivo comúnmente usados son muy laboriosos y complicados y dan rangos de aislamiento subóptimos (Fox y Phillips, 1984; Livengood y col., 1990; Burns y col., 1992; Easmon y col., 1992).

Otros microorganismos asociados a la etiología de la vaginosis bacteriana son los micoplasmas (González y Bellorín, 1992). *Mycoplasma hominis* puede estar presente como flora habitual de la vagina de la población de mujeres sanas, pero es numéricamente mayor en mujeres con vaginosis bacteriana (Holst, 1990; Sobel, 1990; Hillier y col., 1991; Briselden y col., 1992; Larsson y col., 1992; Easmon y col., 1992).

Igualmente, se ha asociado como agente etiológico de VB, a un grupo de microorganismos grampositivos, predominantemente cocobacilares, pertenecientes al género *Corynebacterium* (Pahlson y Larsson, 1991; González y Bellorín, 1992).

En la Tabla 1 se encuentran las especies más frecuentemente involucradas en la etiología de la VB.

PATOGENIA

Spiegel y col. (1980), señalan como causa de la vaginosis bacteriana a la actuación de conjunto de ciertos anaerobios con *Gardnerella vaginalis*, por cuanto algunos productos metabólicos tales como succinato producido por *Gardnerella vaginalis* y *Prevotella* sp. por un lado; butirato y acetato producido por *Peptococcus* sp., y el propionato originado por *Propionibacterium* sp. por otra parte, están aumentados en el fluido vaginal de mujeres que padecen dicha infección.

Existen otros estudios (Torres y Conde, 1986) que sugieren una relación simbiótica entre *Gardnerella vaginalis* productor de aminoácidos y las bacterias anaerobias productoras de aminas a partir de aminoácidos. La producción de aminas trae como consecuencia una elevación en el pH de la secreción vaginal, lo cual a su vez, favorece el desarrollo de *Gardnerella vaginalis*, patógeno involucrado en conjunto con los anaerobios en la etiología de la vaginosis bacteriana (Fig. 1).

Entre las aminas producidas están putrescina y cadaverina, las cuales son responsables a su vez del mal olor de la secreción vaginal y prueba de KOH positiva.

Otras investigaciones que intentan explicar la patogenia de la vaginosis bacteriana, son las realizadas por Eschenbach y col. (1989) y Klebanoff y col. (1991). En dichos estudios se señala que la falta de producción de peróxido de hidrógeno por parte de los lactobacilos,

TABLA 1 - AGENTES ETIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA VAGINOSIS BACTERIANA

<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Prevotella</i> sp.
<i>Peptococcus niger</i>
<i>Peptostreptococcus</i> sp.
<i>Mobiluncus</i> sp.
<i>Mycoplasma hominis</i>
Corinebacterias grupo JK

Fuente: Spiegel y col. (1980), Spiegel y Roberts (1984), Hallen y col. (1987), Weaver y Mengel (1988), Cristiano y col. (1989), Jawetz y col. (1990), Holst (1990), Ortiz y col. (1990), Majeroni (1991)

disminuídos en vaginosis bacteriana, puede permitir el crecimiento de organismos catalasa negativa encontrados en mujeres que padecen de dicha infección. Además, se indica que la producción de peróxido de hidrógeno por especies de lactobacilos, representa un mecanismo de defensa antimicrobial no específico del ecosistema vaginal normal contra el desarrollo de la vaginosis bacteriana en algunas mujeres.

La adhesión de las bacterias a las células epiteliales de la mucosa, es otro factor importante en la patogenia de la vaginosis bacteriana, por cuanto permite el establecimiento de la flora tanto patógena como indígena (Moi y Schoenknecht, 1983; Sobel, 1990). La capacidad de adherencia está influenciada por diversos factores, tales como el pH, número de bacterias presentadas a cada célula del epitelio vaginal, si las bacterias son piliadas o no, y también depende del estado hormonal de la mujer de quien se obtiene la célula epitelial vaginal. Con respecto al pH, se ha comprobado que la tasa de adherencia de ciertas bacterias, se ve aumentada cuando existe una disminución de la acidez del ecosistema vaginal, hallazgo característico de la vaginosis bacteriana, en la cual se presentan las llamadas células claves. Las células claves son células epiteliales vaginales cubiertas por bacterias, cuya morfología es por lo general sugestiva de *Gardnerella vaginalis* y *Mobiluncus* sp. (Moi y Schoenknecht, 1983; Sobel, 1990).

SECUELAS

La importancia de la vaginosis bacteriana está dada por la relación que existe entre la presencia de dicha infección y numerosos cuadros clínicos encontrados en mujeres con vaginosis bacteriana.

La participación de las bacterias anaeróbicas en

cuadros clínicos tales como abscesos pélvicos, enfermedad inflamatoria pélvica, salpingitis, abscesos de trompas y ovarios, infecciones sépticas en los abortos, endometritis, abscesos vaginales y de la vulva, infecciones en la parte inferior de la vagina, abscesos en las glándulas de Bartholini, celulitis repentina postoperatoria, infecciones del líquido amniótico y bacteremia, señalan la importancia de la vaginosis bacteriana, motivado a que en la misma los microorganismos anaerobios están aumentados mil veces más de lo normal, lo cual predispone a que las pacientes desarrollen dichas infecciones más por la presencia de anaerobios que por otros patógenos reales. (Spiegel y col., 1980; Heather y col., 1990; Soper y col., 1990; Thomason y col., 1990; Livengood y col., 1990; Sobel, 1990; McDonald y col., 1991; Jones y Willcox, 1991; Sjöberg y Hakansson, 1991; Briselden y col., 1992; Kurki y col., 1992; Larsson y col., 1992; Easmon y col., 1992; Eschenbach, 1993).

Por otra parte, se ha señalado que la vaginosis bacteriana puede inducir partos prematuros en mujeres embarazadas que presentan dicho síndrome (Eschenbach y col., 1983; Easmon y col., 1992). Es posible que una producción local de fosfolipasa por parte de las bacterias vaginales, incrementadas en mujeres con vaginosis bacteriana, pueda estimular el trabajo del parto prematuro, debido a la acción de la fosfolipasa sobre el ácido araquidónico, dicho ácido es el precursor de la prostaglandinas, las cuales son sustancias que provocan el parto (Eschenbach y col., 1983; Sjöberg y Hakansson, 1991; McDonald y col., 1991).

Igualmente el aislamiento de los microorganismos asociados con vaginosis bacteriana, de mujeres con síntomas clínicos de endometritis, unido al hecho que pacientes con *Gardnerella vaginalis* y anaerobios permanecieron febriles significativamente más tiempo, después de comenzar la terapia de antibióticos, son datos que sugieren que la vaginosis bacteriana podría estar asociada con infección postparto (Eschenbach y col., 1983; Livengood y col., 1990; McDonald y col., 1991; Sjöberg y Hakansson, 1991; Kurki y col., 1992; Easmon y col., 1992). También se ha asociado a la coriamnionitis (Sobel, 1990, Schwebke y col., 1991; McDonald y col., 1991).

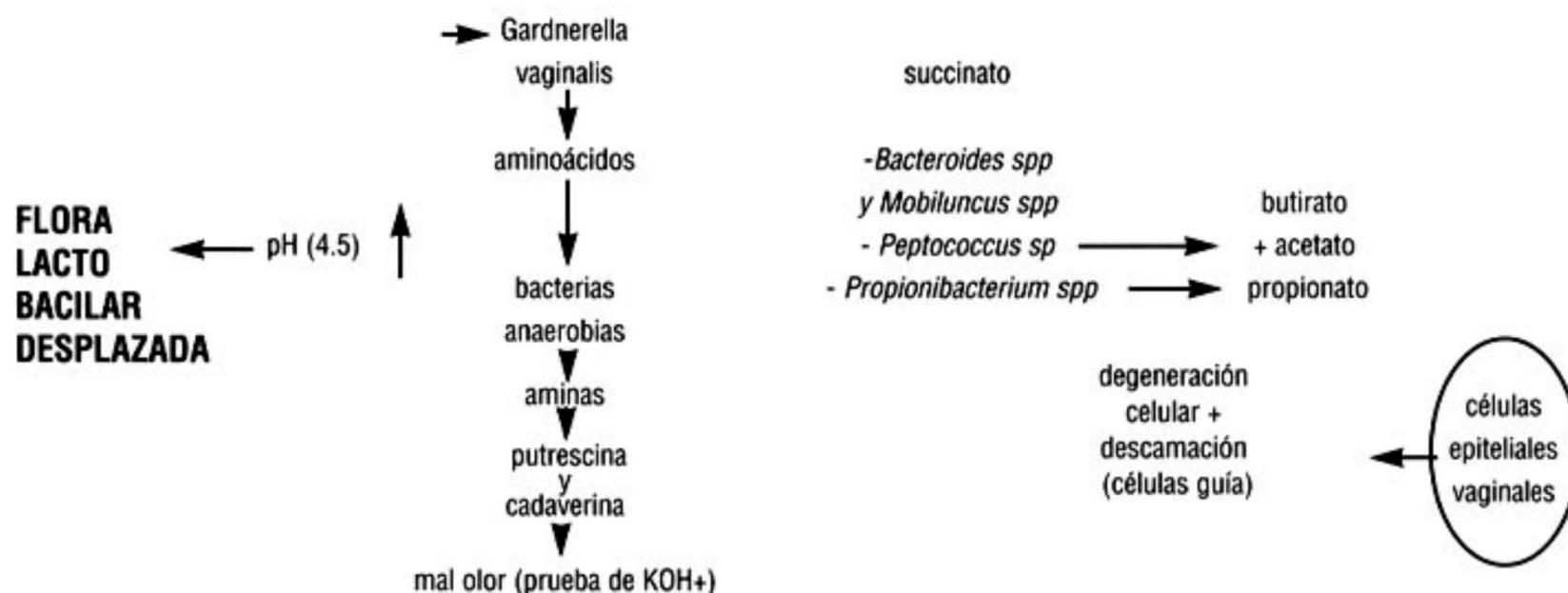
DIAGNOSTICO CLINICO

En 1983, Amsel determinó que deberían estar presentes al menos tres de los cuatro criterios siguientes para establecer el diagnóstico de vaginosis bacteriana: secreción homogénea, pH > 4.5, prueba de KOH positiva, presencia de células claves.

Por otra parte, Hallen (1987) además de la prueba de aminas positiva y la presencia de células claves, señala la ausencia de lactobacilos como otro criterio que puede ser usado en el diagnóstico de vaginosis bacteriana. Este autor expone que la característica del flujo vaginal es un criterio subjetivo. De igual forma indica que el pH > 4.5 no es un dato confirmativo, debido a que también se puede encontrar en mujeres sin vaginosis bacteriana.

Martius y col., (1988), propone un criterio ligeramente diferente, en el cual, elimina el flujo homogéneo y considera el pH = 4.7 como el punto límite estableci-

FIGURA 1 POSIBLE RELACION ENTRE *G. vaginalis* Y LAS BACTERIAS ANAEROBIAS EN LA PATOGENESIS DE LA VAGINOSIS BACTERIANA



Fuente: Piot, P y Vanderheydek, 1984, citado por Torres y Conde 1986, Mobiluncus ¿nuevo patógeno microbiano?

levadura 25% e inhibidores tales como ampicilina, anfotericina y acetato de talio. Para su desarrollo, los micoplasmas requieren una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 3 a 10 días, al cabo de los cuales aparecen colonias de color azul intenso, con un tamaño que varía de 50 a 500 u, lisas, con forma de huevo frito (Balows y col., 1992; González y Bellorín, 1992).

Las corinebacterias Grupo JK se aíslan en un medio selectivo que contiene agar tripticasa soya, extracto de levadura 0,5%, Tween 80 0,1%, fosfocina 10 ug/mL, carbenicilina 100 ug/mL y sangre humana al 5%. El medio se incuba a 37°C, en atmósfera de CO₂ por un período de 48 a 72 horas, al cabo de las cuales se desarrollan colonias puntiformes, blanquecinas, opacas, lisas, circulares, enteras y no hemolíticas (González y Bellorín, 1992).

TABLA 2 INTERPRETACION DE FROTIS TEÑIDOS AL GRAM SEGUN EL CRITERIO DE SPIEGEL Y COL. (1983)

Morfotipos por campos	Evaluación
< 1	1+
1 - 5	2+
6 - 30	3+
> 30	4+

Fuente: Spiegel y col. (1983)

TABLA 3.- INTERPRETACION DE LOS FROTIS TEÑIDOS AL GRAN SEGUN EL CRITERIO DE NUGENT Y COL. (1991).

Registro	Morfotipos de lactobacilo	Morfotipos de Gardnerella y Bacteroides sp	Bacilos curvos Gramvariables
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ó 2+
2	2+	2+	3+ ó 4+
3	1+	3+	
4			

Fuente: Nugent y col. (1991)

0: Ningún morfotipo

1: < 1 morfotipo

2: 1 a 4 morfotipos presentes

3: 5 a 30 morfotipos presentes

4: 30 ó más morfotipos presentes

OTROS METODOS DE DIAGNOSTICO

Existen otros métodos para el diagnóstico de vaginosis bacteriana tales como: Hibridización del ADN (Schwebke y col., 1991), anticuerpos monoclonales (Schwebke y col., 1991), cromatografía de gases del

fluido vaginal (Spiegel y col., 1980), determinación de aminas (diaminas, putrescina y cadaverina) en lavados vaginales mediante cromatografía de capa fina (Easmon y col., 1992), detección de prolina aminopeptidasa en las secreciones vaginales (Schoonmaker y col., 1991), y determinación de sialidasa en líquido vaginal (Briselden y col., 1992). Estos métodos se utilizan principalmente en laboratorios especializados.

HIPOTESIS

Existe una alta proporción de vaginosis bacteriana (VB) en las pacientes que asisten a la consulta de planificación familiar.

De los criterios clínicos individuales usados para el diagnóstico de VB, las células claves observadas mediante coloración de Gram tienen el mayor valor predictivo positivo para las mujeres con VB y el mayor valor predictivo negativo para las mujeres sin VB.

De los criterios clínicos combinados usados para el diagnóstico de VB, la presencia de células claves, pH > 4.5, flujo homogéneo y una prueba de olor a aminas positiva posee el mayor VPP.

No existe diferencia significativa entre los criterios de Spiegel y col., (1983) y Nugent y col., (1991) para evaluar los frotis directos coloreados al Gram.

No existe diferencia significativa entre el diagnóstico clínico y microbiológico (Gram y cultivo) de la VB.

La presencia de morfología bacteriana distinta a la morfología de lactobacilo en un frotis teñido al Gram, tiene un valor predictivo positivo para el diagnóstico de VB.

Existe una mayor proporción de VB ocasionada por bacterias anaerobias, especialmente del género *Mobiluncus*.

Existe una mayor recuperación de las especies del género *Mobiluncus* en el medio de cultivo RLK que en el medio AS107.

La VB puede presentarse asociada a infecciones producidas por *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.

MATERIALES Y METODOS AMBIENTE FÍSICO

La toma de la muestra se realizó en el Servicio de Planificación Familiar del Ambulatorio "El Llano", Mérida y el procesamiento de las mismas se efectuó en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica Dr. Roberto Gabaldón, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes.

POBLACIÓN

De la población de mujeres que asistió a la consulta de planificación familiar, entre los meses de febrero - abril de 1993, se seleccionó una muestra aleatoria de 63 pacientes con edades comprendidas entre 20 a 50 años, con vida sexual activa, quienes como requisito indispensable no debían estar recibiendo tratamiento antimicrobiano durante los ocho días anteriores a la toma de muestra, ni haberse practicado lavados vaginales durante las 24 horas previas. A cada paciente se le registraron los datos personales, clínicos, y microbiológicos en un formulario elaborado para tal fin.

COLECCION DE LA MUESTRA

Previa inserción del esp^oculo estéril en la vagina de cada paciente, se introdujeron secuencialmente 12 hisopos estériles tamponados. Los cuatro primeros se utilizaron para la toma de muestra del endocervix y los ocho restantes del fondo de saco vaginal, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

Hisopos	Finalidad
1	Agar Thayer Martin y Agar chocolate.
2	Frotis (Coloración de Gram).
3	Limpiar endocervix.
4	Investigar C. trachomatis.
5	Medio de transporte Stuart reducido.
6 y 7	Frotis (Coloración de Gram).
8	Solución Salina Fisiológica.
9	Agar Bilis.
10	Agar Vaginalis.
11	Medio de transporte Stuart.
12	Medición de pH, prueba de KOH 10%.

EXAMEN CLINICO

En cada paciente se examinó la presencia y tipo de secreción, igualmente se le practicó la prueba de las aminas con KOH al 10%, medición del pH del flujo vaginal con cinta pH meter y el exámen de la secreción en fresco para la búsqueda de células claves, tricomonas y levaduras.

ESTUDIO MICROBIOLOGICO

Exámen directo: Tanto del endocervix como del fondo de caso vaginal se realizaron frotis, los cuales fueron teñidos con la coloración de Gram modificada por Kopeloff (citado en González y Bellorín, 1992). Los dos frotis del fondo de saco vaginal fueron evaluados según los criterios de Spiegel y col. (1983) y Nugent y col. (1991) para el diagnóstico de vaginosis bacteriana.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS AEROBICAS Y LEVADURAS.

Para el aislamiento de bacterias aeróbicas se transportó la muestra obtenida del fondo de saco vaginal en el medio de Stuart, a partir del cual se cultivó en agar sangre, agar vaginalis, y agar azida para la investigación de especies del género *Corynebacterium*. La incubación de dichos medios se realizó a 37°C durante 48 - 72 horas para la posterior identificación de los microorganismos de interés según los procedimientos convencionales (Balows y col., 1991).

Para la investigación de *Candida albicans* se utilizó el medio de agar bilis incubado a temperatura ambiente durante un lapso de 24 - 48 horas.

Del endocervix se sembró directamente en el medio de Thayer Martin y agar chocolate para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* y en agar vaginalis para la búsqueda de *Gardnerella vaginalis*. De igual forma se tomó una muestra de endocervix para la investigación de *Chlamydia trachomatis*, mediante la coloración de Giemsa y la prueba de inmunofluorescencia directa (BioMerieux).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS ANAEROBICAS

Del medio de transporte Stuart reducido, se procedió a realizar una suspensión en 1.5 ml de caldo tioglicolato reducido, a partir del cual se efectuó la siembra con pipeta Pasteur en los siguientes medios de cultivo: RLK (Smith y Moore, 1988) para el aislamiento de *Mobiluncus sp.*, agar sangre base Schaedler (OXOID) más suplemento 107 (OXOID), agar sangre base Schaedler más suplemento 108 (OXOID) y agar sangre fenil etil alcohol (DIFCO) para el aislamiento de *Mobiluncus* y otros anaerobios.

Las condiciones de anaerobiosis se proporcionaron mediante la jarra anaeróbica (BBL) y el sobre generador de gases (OXOID). Dichas jarras se incubaron a una temperatura de 37°C, durante 7 días, al cabo de los cuales se subcultivaron las colonias de interés a caldo carne y caldo Schaedler y se procedió a efectuar la identificación bioquímica a través de un Kit comercial de identificación rápida (RAPID-AN, BIOMERIEUX).

PRUEBAS ESTADISTICAS

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante las pruebas de hipótesis, intervalos de confianza y técnicas interpretativas (Camel, 1966; Colimon, 1978).

RESULTADOS

De las 63 pacientes estudiadas en este trabajo, 33 (52,38%) presentaron vaginosis bacteriana, diagnosticada clínicamente de acuerdo a los criterios establecidos por Amsel y col. (1983) Tabla 4. De estas 33 pacientes, 20 (60,60%) mostraron los cuatro indicios clínicos (presencia de flujo homogéneo, pH > 4.5, prueba de olor a aminas positiva, presencia de células claves), mientras que 10 (30,30%) presentaron la combinación de tres de tales indicios, como se puede observar en la Tabla 5.

Mediante estudios microbiológicos se pudo constatar que solamente 23 (36,50%) de las 63 pacientes padecían VB, según el resultado del exámen directo teñido con la coloración de Gram e interpretado por el criterio de Spiegel y col. (1983) Figura 2 y Figura 3, y según los resultados del cultivo. Estos 23 casos se consideraron como las pacientes que verdaderamente padecían de VB. En la Figura 2 también se puede observar que según el criterio de Nugent y col. (1991), 31,74% de las pacientes tenían VB.

Al evaluar los criterios individuales del método clínico para el diagnóstico de VB, se encontró que las células claves presentaron una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de 100%, en segundo lugar encontramos la prueba de olor a aminas con una sensibilidad y especificidad de 100% y 60% respectivamente. El VPP fue del 59% y el VPN del 100% (Tabla 6). Al interpretar las combinaciones de los criterios clínicos para el diagnóstico de VB (Tabla 7), observamos que la combinación de los 4 criterios presenta la más alta sensibilidad (86,95%, especificidad (100%), VPP (100%) y VPN (93,02%).

La combinación de dos o menos morfotipos (*Gardnerella* y otro morfotipo distinto a lactobacilo) más células claves, observada en la coloración de Gram, demostró la más alta sensibilidad (73,91%) especificidad (100%), VPP (100%) y VPN (86,96%) para el diagnóstico de VB (Tabla 8). En esta tabla se nota que en los exudados vaginales de las pacientes con VB se observó además de la marcada ausencia de lactobacilos, una flora bacteriana mixta abundante conformada por bacilos gramnegativos o gramvariables, cocos grampositivos, bacilos grampositivos (difteroides) y bacilos curvos gramvariables.

La asociación entre *G. vaginalis* y bacterias anaeróbicas representó el más alto porcentaje (56,62%) entre los agentes bacterianos involucrados en la etiología de la VB (Figura 4). En cuanto a las bacterias anaerobias

asociadas a los cuadros de VB, observamos que las prevotellas se aislaron con mayor frecuencia (Tabla 9).

Las sensibilidades, especificidades y los valores predictivos positivos y negativos de los diferentes métodos diagnósticos de VB, con el criterio de Spiegel como el estándar de referencia se muestran en la Tabla 10.

Mediante una prueba de hipótesis ($\alpha = 0,05$) se determinó que existe diferencia significativa entre los métodos clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de VB, mientras que no existe diferencia significativa entre los criterios de Spiegel y col. (1983) y Nugent y col. (1991) y entre la coloración de Gram y el cultivo para el diagnóstico de dicha enfermedad.

En las mujeres con VB no se encontraron asociadas otras patologías infecciosas del tracto genital inferior originadas por *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*.

El porcentaje de pacientes con VB que tenían dispositivo intrauterino (DIU) fue del 73,91% (Figura 5).

TABLA 4- PORCENTAJE DE VAGINOSIS BACTERIANA (VB) EN PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA DE PLANIFICACION FAMILIAR SEGUN DIAGNOSTICO CLINICO

Ambulatorio " El Llano ". Mérida Febrero - Abril 1993

PACIENTES	FRECUENCIA	PORCENTAJE(%)
CON VB	33	52,38
SIN VB	30	47,62
TOTAL	63	100

TABLA 5 PORCENTAJE DE LAS COMBINACIONES DE LOS CRITERIOS CLINICOS UTILIZADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

Ambulatorio " El Llano ". Mérida Febrero - Abril 1993

COMBINACIONES	FRECUENCIA	PORCENTAJES (%)
A*1+B*2+C*3+D*4	20	60.6
A + B + C	10	30.3
A + B + D	0	0
A + C + D	3	9.1
B + C + D	0	0
TOTAL	33*	100

*1 A: Presencia de Flujo Homogeneo *2 B: PH > 4.5

*3 C: Prueba de Olor Aminas Positiva *4 D: Presencia de Células Claves

* Total de pacientes con Vaginosis Bacteriana según diagnóstico Clínico.

DISCUSION

La vaginosis bacteriana (VB) es una entidad nosológica vaginal caracterizada por un aumento en el

TABLA 6

EVALUACION CON TECNICAS INTERPRETATIVAS DE LOS CRITERIOS INDIVIDUALES DEL METODO CLINICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA * (N=63)

Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

Criterio	Verdadero positivo	Verdadero Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores Predictivos	
							Positivo	Negativo
Flujo Homogeneo	23	10	30	0	100	25	43.4	100
Olor Aminas	23	24	16	0	100	60	59	100
PH > 4.5	20	18	22	3	87	45	47.6	85.7
Células Claves	23	40	0	0	100	100	100	100

* Diagnosticada por Método Clínico y Microbiológico (Cultivo y Gram)

• • •

TABLA 7

EVALUACION CON TECNICAS INTERPRETATIVAS DE LAS COMBINACIONES DE LOS CRITERIOS CLINICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA *1 (N=63)

Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

Criterios Combinados	Verdadero positivo	Verdadero Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores Predictivos	
							Positivo (%)	Negativo (%)
A+B+C+D	20	40	0	3	86.95	100	100	93.02
A+B+C	0	30	10	23	0	75	9.1	56.6
A+B+D	0	40	0	23	0	100	-*3	63.5
A+C+D	3	40	0	20	13.04	100	100	66.7
B+C+D	0	40	0	23	0	100	-	63.5

*1 Diagnosticada por Método Clínico y Microbiológico (Cultivo y Gram)

*2: A: Presencia de Flujo Homogeneo

B: PH > 4.5

*3 El Valor predictivo Positivo quedó indeterminado

C: Olor Aminas Positivo

D: Presencia de Células Claves

• • •

TABLA 8

EVALUACION CON TECNICAS INTERPRETATIVAS DE LAS COMBINACIONES DE LOS MORFOTIPOS Y CELULAS CLAVES OBSERVADAS EN LA COLORACION DE GRAM PARA EL DIAGNOSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA (N=63)

Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

Morfotipos	Verdadero positivo	Verdadero Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores Predictivos	
							Positivo (%)	Negativo (%)
1	17	40	0	6	73.91	100	100	86.96
2	1	40	0	22	4.35	100	100	64.5
3	2	40	0	21	8.7	100	100	65.6
4	1	40	0	22	4.35	100	100	64.5
5	1	40	0	22	4.35	100	100	64.5
6	1	40	0	22	4.35	100	100	64.5
7	0	0	40	23	0	0	0	100.0

1: Dos o menos Morfotipos (Gardenerella y otro Morfotipo distinto a Lactobacilo) + Células Claves

2: Gardenerella + Bacilos(-) + Cocos(+) + Células Claves

3: Gardenerella + Bacilos(-) + Curvos(GV) + Células Claves

4: Gardenerella + Bacilos(-) + Bacilos(+) + Curvos(GV) + Células Claves

5: Gardenerella + Cocos(+) + Bacilos(+) + Células Claves

6: Gardenerella + Bacilos(-) + Bacilos(+) + Cocos(+) + Curvos(GV) + Células Claves

7: Lactobacilos predominantes

• • •

TABLA 10

EVALUACION CON TECNICAS INTERPRETATIVAS DE LOS CRITERIOS: NUGENT, CLINICO Y CULTIVO, PARA EL DIAGNOSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA (N=63) *

Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

Método	Verdadero positivo	Verdadero Negativo	Falso Positivo	Falso Negativo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores Predictivos	
							Positivo (%)	Negativo (%)
Nugent	20	40	0	3	87	100	100	93.0
Clínico	23	30	10	0	100	75	67.7	100
Cultivo	23	40	0	0	100	100	100	100

* 63 pacientes diagnosticadas con Vaginosis Bacteriana según el criterio de Spiegel

TABLA 10 PORCENTAJE EN QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES LAS BACTERIAS ANAEROBIAS ASOCIADAS A LOS CUADROS DE VAGINOSIS BACTERIANA

Ambulatorio " El Llano ". Mérida Febrero - Abril 1993

BACTERIAS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Prevotella sp	15	68.18
Fusobacterium nucleatum	2	9.09
Mobiluncus sp *	4	18.18
Peptostreptococcus niger	1	4.54
TOTAL	22	100

* Observados en la Coloración de Gram

número de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos y una disminución del número de lactobacilos presentes normalmente en la vagina de mujeres sanas. Desde el punto de vista clínico la infección se caracteriza por la presencia de pocos síntomas irritativos, abundante flujo y ausencia de una respuesta inflamatoria (Torres y Conde, 1986; Weaver y Mengel, 1988; Thomason y col., 1990; Livengood y col., 1990; Phalson y Larsson, 1991; Majeroni, 1991; González y Bellorín, 1991; Larsson y col., 1992; Biswas, 1993).

La VB se ha reportado en pacientes provenientes de diversos tipos de consulta, tales como servicios de atención a pacientes con Enfermedades de Transmisión Sexual, Clínicas de Salud de estudiantes universitarias, Clínicas Obstétricas, Consultas Ginecológicas y Consultas de Planificación Familiar (PF) (Hill y col., 1983; Hallen y col., 1987; Eschenbach y col., 1988; Smith y Moore, 1988; Cristiano y col., 1989; Ortiz y col., 1990; Riordan y col., 1990; Thomason y col., 1991; McDonald y col., 1991; Joa-Granados, 1991; Angelitti y Nieves, 1992; Kurki y col., 1992) Figura 2.

En Mérida, Angelitti y Nieves (1992) reportaron una frecuencia de 43,10% de VB en pacientes que asisten a consulta de planificación familiar. En la presente investigación, realizada en 63 pacientes provenientes del mismo servicio, se encontró, con un nivel de confianza de 95%, que el porcentaje (36,5%) de VB obtenido estaba dentro del rango esperado para este tipo de población. (Figura 3).

A pesar que la mayoría de los pacientes con VB atendidas en la consulta de PF no refieren sintomatología, existe el riesgo de la aparición de ciertas afecciones, donde la causa primaria son los mismos agentes asocia-

dos a la VB. Se piensa que hay una relación entre la VB y afecciones, tales como endometritis, salpingitis, abscesos de trompas y ovarios, enfermedad inflamatoria pélvica, entre otras (Eschenbach y col., 1988; Holst, 1990; Schwebke, 1991). De igual manera se ha reportado que la VB es causa de aproximadamente el 45% de vaginitis, estando por tanto las pacientes más predispuestas a desarrollar infección del tracto genital inferior si padece de VB que si padeciera de una infección por *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis* (Eschenbach, 1993).

El diagnóstico clínico de VB puede realizarse sobre la base del hallazgo de una secreción vaginal con un pH > 4.5, olor a aminas positivo y la presencia de células claves al exámen microscópico (Amsel y col., 1983). El diagnóstico microbiológico se efectúa a través de la realización de frotis coloreados al Gram evaluados mediante los criterios de Spiegel y col. (1983) o Nugent y col. (1991), y a través del cultivo de la muestra de secreción vaginal en medios selectivos (Spiegel y col., 1980; Sheppard y col., 1990; Balows y col., 1991; González y Bellorín, 1991).

Al evaluar los criterios individuales del método usado en el diagnóstico de VB se encontró que la detección de las células claves era el criterio más sensible y específico para dicho diagnóstico, con un alto VPP y VPN (Tabla 6). Algunos investigadores, en estudios realizados en consultas ginecológicas, también observaron células claves en la secreción vaginal de la mayoría de las pacientes con VB y esto los llevó a concluir que las células claves era el indicador más adecuado de VB (Thomason y col., 1990; Sobel, 1990; Easmon y col., 1992; Biswas, 1993). No obstante, su detección es dependiente del operador; detritus o restos celulares se pueden confundir con células claves, dificultando de esta manera el diagnóstico (Easmon y col., 1992), por lo que es aconsejable no limitarse solamente al exámen directo de las preparaciones húmedas; la coloración de Papanicolaou o la de Gram son mejores alternativas para visualizar las células claves en la secreción vaginal de las pacientes con VB (Joa-Granados, 1991; Biswas, 1993).

En cuanto a los otros criterios clínicos individuales, el pH > 4.5 del flujo vaginal, se mostró como indicador sensible de VB pero de baja especificidad (Tabla 6). El pH también se ha encontrado elevado en mujeres con flora vaginal normal después de las relaciones sexuales, durante la menstruación o cuando el moco cervical está presente inadvertidamente en la muestra (Hallen y col., 1987; Hay y col., 1992; Easmon y col., 1992). En la

FIGURA 2 PORCENTAJE DE VAGINOSIS BACTERIANA EN PACIENTES DE PLANIFICACION FAMILIAR SEGUN LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

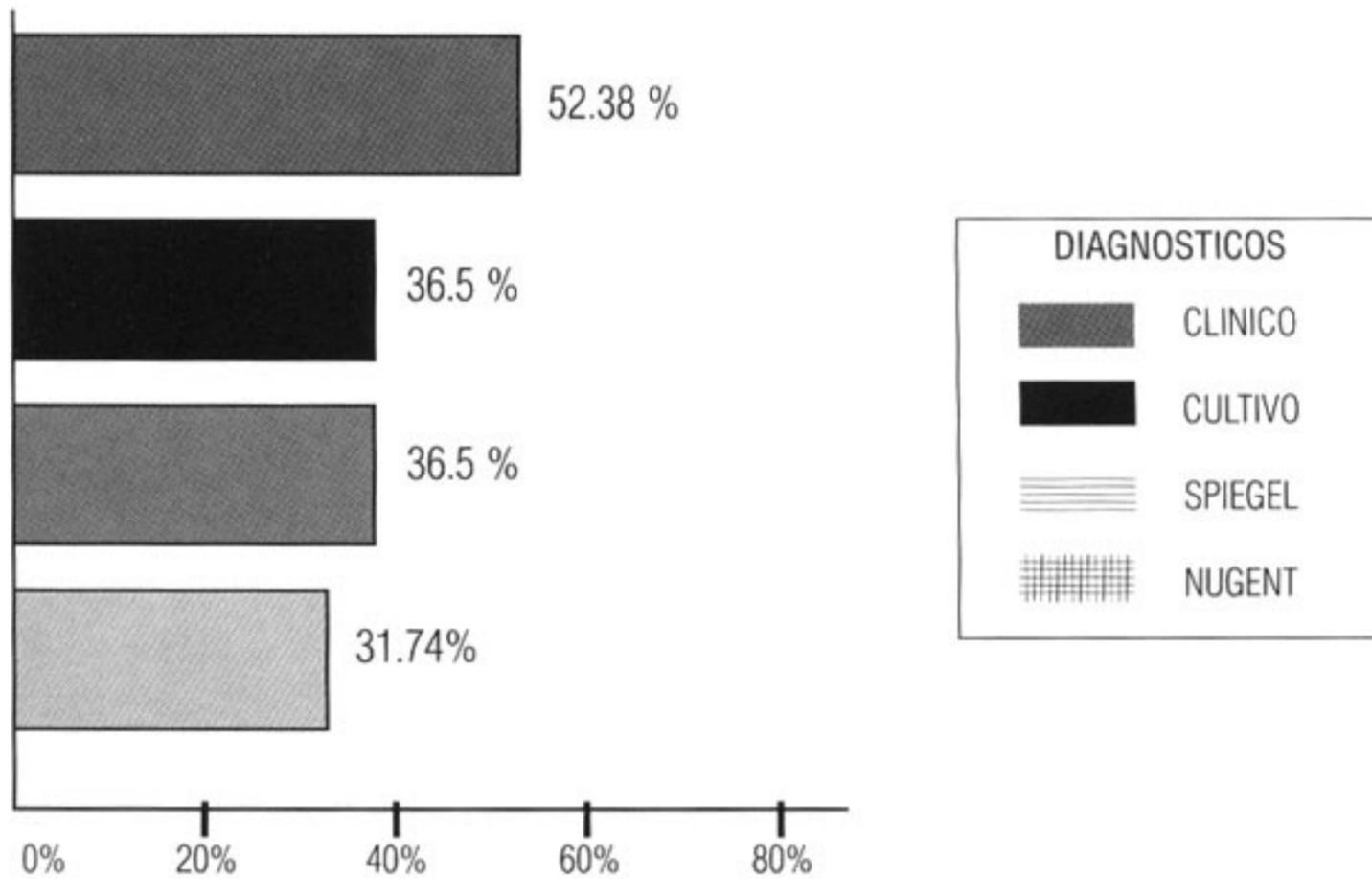


FIGURA 3 PORCENTAJE DE VAGINOSIS BACTERIANA (VB) EN PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA DE PLANIFICACION FAMILIAR Ambulatorio El Llano Mérida Febrero-Abril 1993

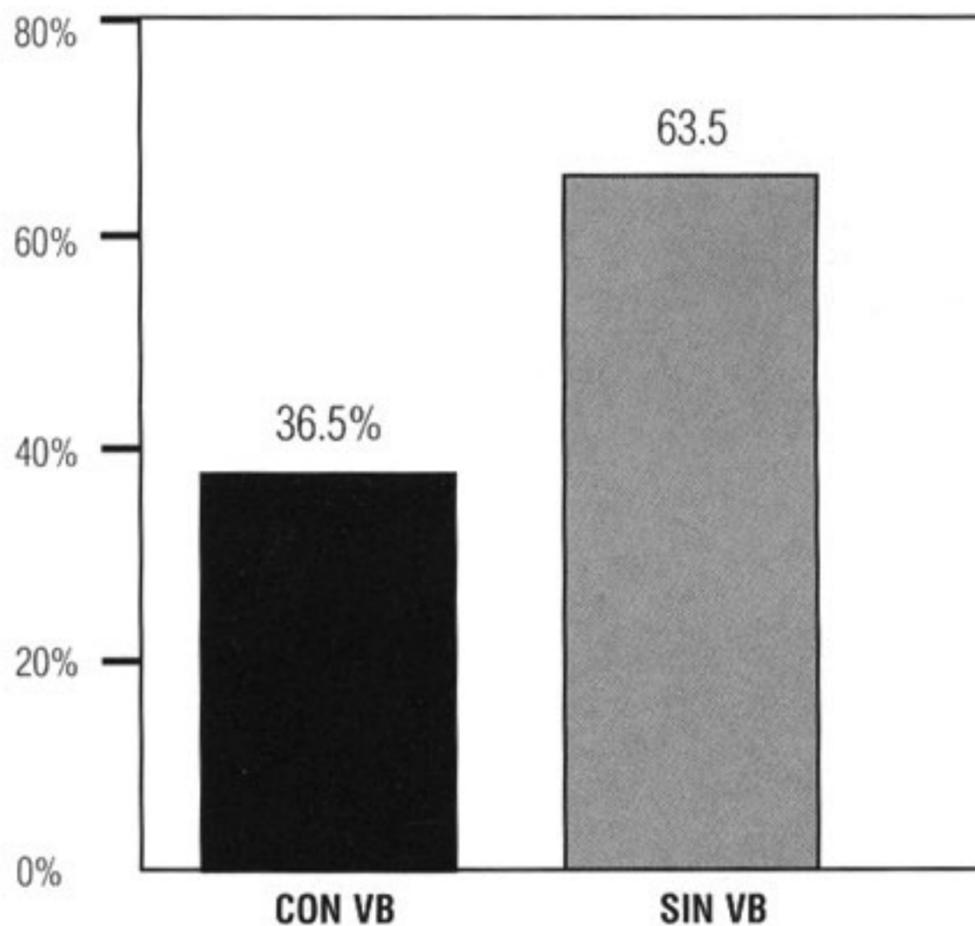


FIGURA 4 PORCENTAJE EN QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES LOS AGENTES BACTERIANOS INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGIA DE LA VB Ambulatorio El Llano Mérida febrero-Abril 1993

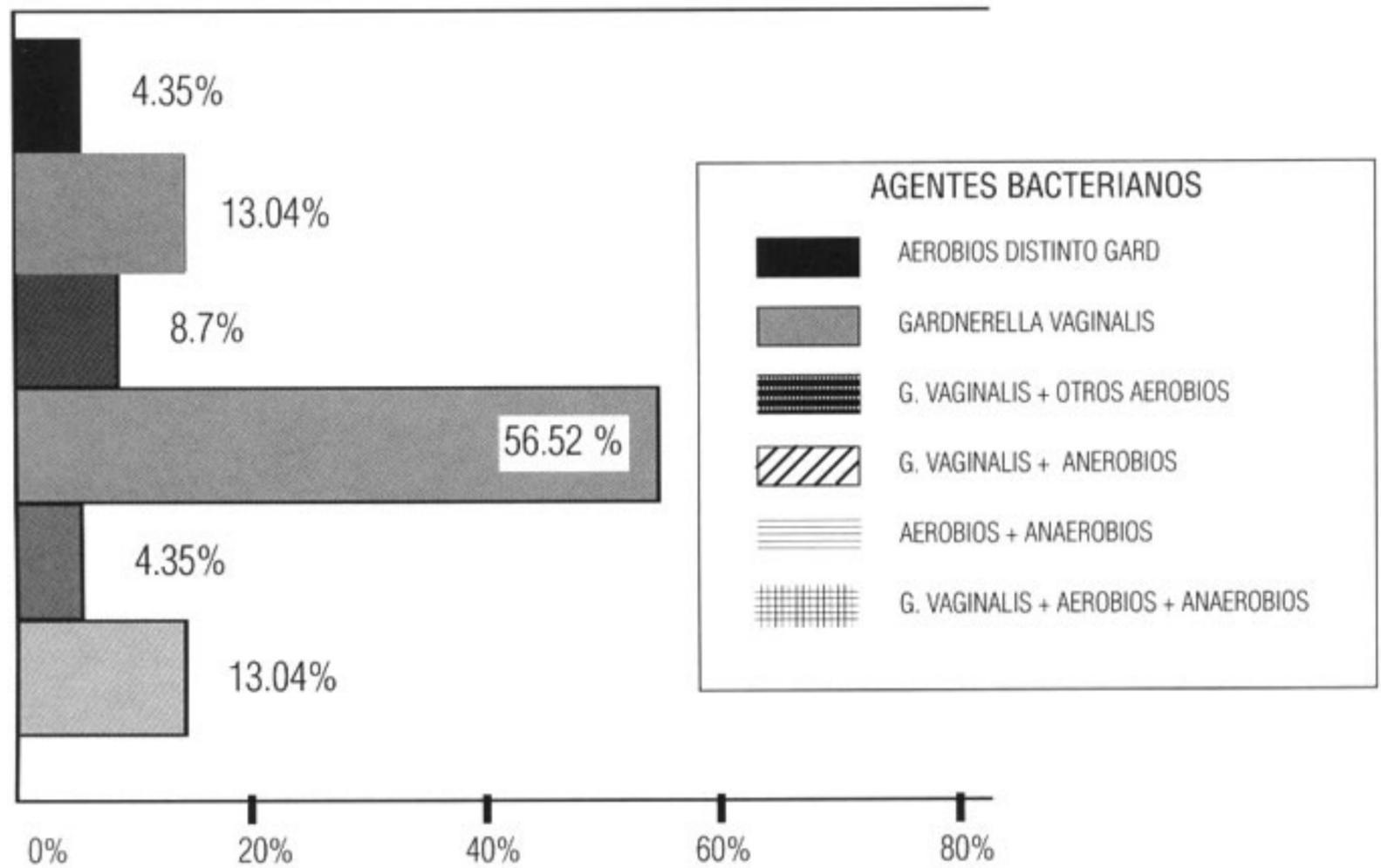
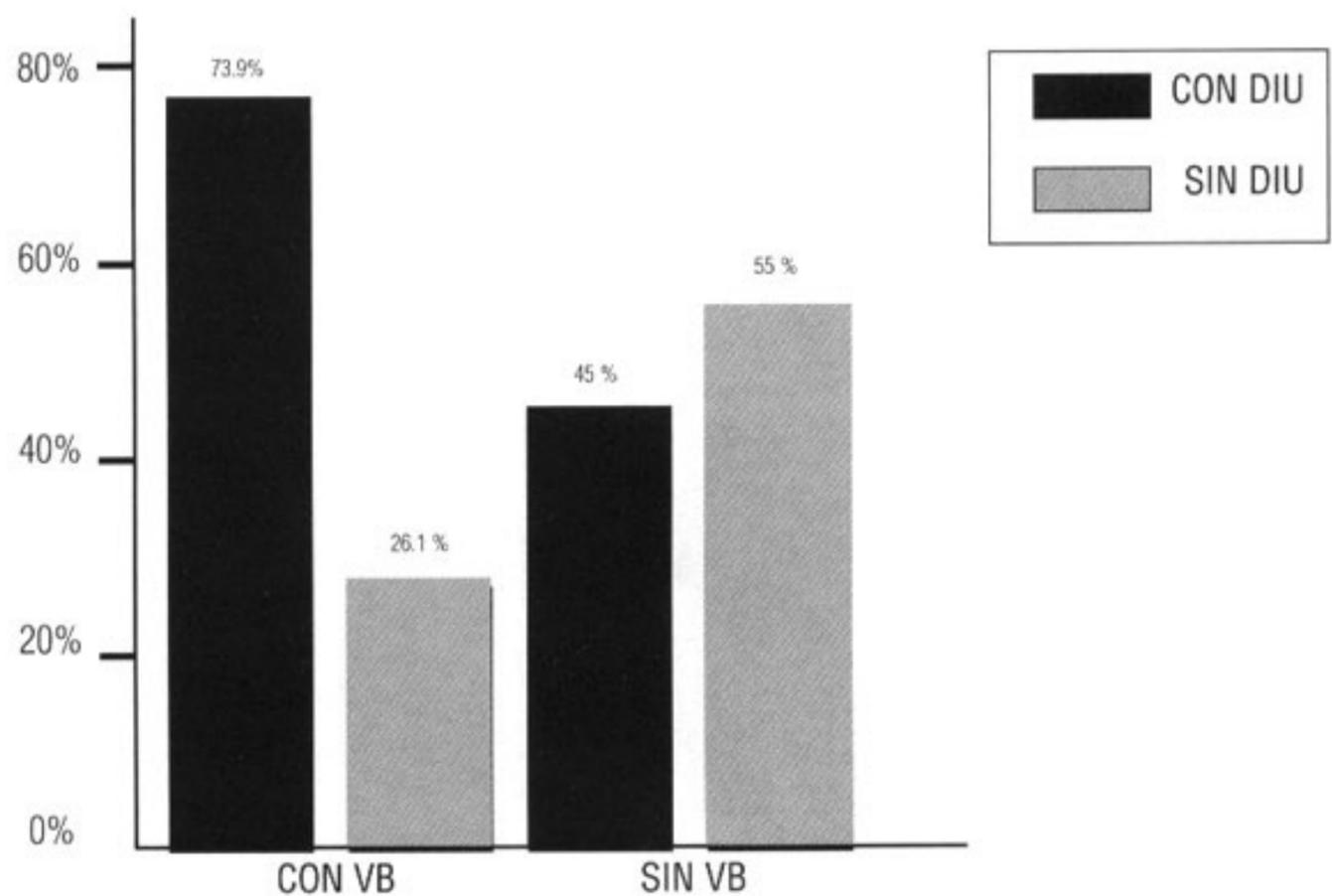


FIGURA 5 PORCENTAJE DE VAGINOSIS BACTERIANA DE ACUERDO AL USO DEL DISPOSITIVO INTRAUTERINO (DIU) (N=63) Ambulatorio El Llano Mérida Febrero-Abril 1993



investigación realizada por Thomason y col. (1990), señalan que el 92% de las mujeres con VB y el 35% de las mujeres sin VB tenían secreción con $\text{pH} > 4.5$.

Al igual que el $\text{pH} > 4.5$, el olor a aminas positivo resultó ser altamente sensible pero de poca especificidad (Tabla 6), en contraste a lo sostenido por otros autores (Sobel, 1990; Easmon y col., 1992; Hay y col., 1992) quienes afirman que dicha prueba es usualmente específica para VB, pero de sensibilidad moderada.

Easmon y col. (1992), reportan que falsos olores a aminas pueden ocurrir cuando el semen está presente, debido a que el mismo tiene un pH relativamente alto y libera las aminas responsables del olor a pescado. Por otra parte, el semen contiene la putrescina (amina responsable del olor a pescado) de tal manera que mujeres con sensibilidad a los olores podrían notar tal olor y además dar la prueba del hidróxido de potasio positiva, no porque padeciera de VB sino por la práctica de relaciones sexuales recientes.

Otro parámetro clínico observado fue la existencia y característica del flujo vaginal asociado a la VB. Entendiéndose éste como una secreción vaginal homogénea adherida usualmente a las paredes vaginales (Holst, 1990; Majeroni, 1991; Biswas, 1993). Nuestros resultados indican que tal indicio clínico posee poca especificidad y una alta sensibilidad (Tabla 6). Estos datos concuerdan con los publicados por Thomason y col. (1990), en el sentido que, existe un considerable porcentaje de mujeres sin VB (22%) con flujo homogéneo. Por su parte Eschenbach y col. (1988) detectaron secreción anormal en 69% de las mujeres con VB y solamente en 3% de las mujeres sin VB. Easmon y col. (1992), señalan que esta diferencia de resultados podría deberse a una variación en la capacidad del clínico para detectar la secreción.

La combinación de los cuatro criterios clínicos usados en el diagnóstico de VB mostró una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN elevado (Tabla 7), lo cual nos lleva a sugerir que para dar un diagnóstico clínico confiable de VB se debe tomar en cuenta los cuatro parámetros. Es importante señalar que cuando se encontró la combinación de tres de estos cuatro criterios, el resultado fue la presencia de 10 casos falsos positivos y solamente 3 verdaderamente positivos (Tabla 7). Por otra parte, investigadores como Sobel (1990), Easmon y col. (1992) y Biswas (1993) reportan que basarse solamente en los signos y síntomas no es confiable como método de diagnóstico de VB, por cuanto los mismos son sutiles y su detección depende de la agudeza y habilidad del clínico que realiza la prueba, por tal razón

investigadores como Nugent y col. (1991) recomiendan la realización de una coloración de Gram para confirmar el diagnóstico clínico de VB, nuestros resultados corroboran esta idea por cuanto hubo diferencia significativa entre el examen clínico (cuando se tomaron en cuenta solamente 3 de los 4 indicios clínicos) y el examen microscópico de la secreción vaginal teñido al Gram, como métodos diagnósticos de VB.

La coloración de Gram interpretada por cualquiera de los criterios reportados, conjuntamente con los hallazgos clínicos, es una manera económica, sencilla, rápida y confiable que permite certificar la impresión clínica en forma inmediata y de esta manera orientar el tratamiento adecuado (Mazzulli y col., 1990; Joa-Granados, 1991; Rotimi y col., 1991).

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre el criterio de Spiegel y col., (1983) y Nugent y col., (1991) para evaluar la coloración de Gram, como método de diagnóstico de VB, consideramos que el criterio de Spiegel y col., (1983) es más confiable que el de Nugent y col. (1991). Nugent y col. no toman en cuenta a los cocos grampositivos por tener una concordancia pobre con la enfermedad, estableciendo además un registro intermedio de mujeres que no son normales, pero que tampoco tienen VB pudiendo dejar de detectarse algunos casos.

Microscópicamente con la coloración de Gram, en los exudados vaginales de las pacientes con VB se observó, además de la marcada ausencia de lactobacilos, una flora bacteriana mixta abundante. En este trabajo, al valorar las combinaciones de los morfotipos y las células claves en pacientes con o sin VB, pudimos notar que la mayoría de las mujeres con VB presentaban un predominio de cocobacilos gramvariables sugestivos de Gardnerella y otros tipos morfológicos, tales como, bacilos gramnegativos, bacilos grampositivos, cocos grampositivos, bacilos curvos gramvariables, además de la presencia de células claves y una disminución en la población de lactobacilos. Por el contrario, en las pacientes sin VB, se observó un predominio de lactobacilos en la secreción vaginal (Tabla 8).

Es decir, la característica clave fue la ausencia de bacilos largos grampositivos (lactobacilos) y su reemplazamiento por bacilos gramvariables o gramnegativos, como lo indican Spiegel y col. (1983) y Nugent y col. (1991). En este estudio encontramos que, utilizando el sistema de Spiegel y col. la coloración de Gram tiene una sensibilidad y especificidad del 100% (Tabla 8). Easmon y col. (1992), reportan que en términos de especificidad y VPP, la coloración de Gram fue mejor

que la cromatografía de gas líquido o cultivo para *Gardnerella vaginalis*, aunque fue menos sensible.

A pesar que este estudio reveló una relación estrecha entre la positividad de la coloración de Gram para el diagnóstico de VB y el aislamiento de *G. vaginalis*, es importante señalar que el cultivo requiere de un laboratorio y personal especializados por lo que el mismo es recomendable no en el trabajo de rutina sino en estudio de investigación sobre VB.

G. vaginalis, se aisló como único patógeno en un 13,04% de las pacientes con VB y asociado en un 100% con la presencia de células claves. No obstante, en la mayoría de las pacientes con VB (56,62%) se encontró, además de *G. vaginalis*, un incremento en la población de bacterias anaeróbicas representadas por especies de los géneros *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, y *Bacteroides*, principalmente (Tabla 9); además, bacilos curvos, sugestivos de *Mobiluncus*, se detectaron en un 18,18% de los casos.

Los hallazgos de los cultivos incubados en condiciones anaeróbicas ha contribuido grandemente al conocimiento de la etiología de la VB; sin embargo, actualmente no es recomendable su uso de rutina por las razones expuestas anteriormente.

Datos de cultivos microbiológicos realizados por Cook y col. (1992) muestran que los anaerobios obligados se aislaron en un 71% de los especímenes obtenidos de la vagina de 31 pacientes con VB aguda, igualmente indican que los géneros *Prevotella* y *Peptostreptococcus* se aislaron en más del 10% de dichas mujeres.

Varios investigadores han reportado un incremento en el número de anaerobios en mujeres con VB sintomática (Spiegel y col., 1980; Weaver y Mengel, 1988; Thomason y col., 1991; Cook y col., 1992) destacando el papel que juegan dichas bacterias en la etiología de VB. Señalan que son las enzimas producidas por las bacterias anaeróbicas y no por *Gardnerella*, las responsables del olor a pescado asociado con tal condición.

Por otra parte, virtualmente todas las mujeres que tenían *Mobiluncus* en la secreción vaginal padecían de vaginosis bacteriana; sin embargo, no todas las mujeres con VB tienen *Mobiluncus* como parte de su bacteriología vaginal anormal (Hallen y col., 1987). Spiegel y col., (1984) consideran a *Mobiluncus* como un marcador más útil y específico de VB que la misma *Gardnerella*, pero todavía existe el inconveniente de identificarlo en exámenes de preparaciones húmedas y la dificultad de aislarlo por técnicas de cultivos a partir de las secreciones vaginales.

En el presente estudio, se incluyó el medio de RLK, además de los medios utilizados de rutina en el ais-

lamiento de bacterias anaeróbicas. No obstante, en ninguno de los casos en que se observó morfología de bacilos curvos al Gram, se pudo detectar *Mobiluncus* en los cultivos anaeróbicos. Parece ser que la flora asociada presente en mayor cantidad que los bacilos curvos interfiere en su crecimiento (Smith y Moore, 1988).

Algunos investigadores (Gravett y col., 1986; Barbone y col., 1990; James y col., 1992) han reportado la asociación de VB con infecciones microbianas, tales como tricomoniasis, clamidiasis y gonorrea. En esta investigación, no encontramos tal asociación, quizás este hallazgo se debe a la naturaleza de la población estudiada.

La alta asociación entre los casos de VB y el uso de DIU (17/23) reportada en el presente trabajo concuerda con lo descrito anteriormente por Amsel y col. (1983), quienes encontraron en su estudio que más del 50% de las usuarias de DIU tenían VB. Adicionalmente Galdacre y col. (1979) (citado en Weaver y Mengel (1988) demostraron una asociación de anaerobios gramnegativos con el uso de DIU y con secreción sintomática, con la posibilidad de que desarrollasen además una enfermedad inflamatoria, pélvica, sobre todo las pacientes con VB que utilizan DIU con "cola" (Mardh, 1991).

CONCLUSIONES

Con un nivel de confianza del 95% el porcentaje (36,5%) de VB obtenido en este estudio está dentro del rango esperado para las pacientes que asisten a consulta de Planificación Familiar.

Al evaluar los criterios individuales del método clínico usados en el diagnóstico de VB se encontró, que la detección de las células claves era el criterio más sensible y específico para el diagnóstico de VB, con un alto VPP y VPN.

Para dar un diagnóstico clínico confiable de VB se deben tomar en cuenta los cuatro parámetros clínicos: pH > 4,5, presencia de células claves, olor a aminas y flujo homogéneo.

No se encontró diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre el criterio de Spiegel y col., (1983) y Nugent y col., (1991) para evaluar la coloración de Gram, como método de diagnóstico de VB. La coloración de Gram interpretada por cualquiera de estos criterios conjuntamente con los hallazgos clínicos es una manera económica, sencilla, rápida y confiable que permite certificar la impresión clínica en forma inmediata y de esta manera orientar el tratamiento adecuado.

La coloración de Gram de la secreción vaginal de mujeres con VB evaluada por el criterio de Spiegel y

col., (1983) tiene una sensibilidad, especificidad y un VPP del 100%. A pesar que este estudio reveló una relación estrecha entre la positividad de la coloración de Gram para el diagnóstico de VB y el aislamiento de *G. vaginalis* y bacterias anaerobias, es importante señalar que el cultivo requiere de un laboratorio y personal especializado por lo que el mismo es recomendable no en el trabajo de rutina, sino en estudio de investigación sobre VB.

Gardnerella vaginalis conjuntamente con bacterias anaeróbicas (56,62%) de los géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Mobiluncus* fueron los agentes causales de VB en la mayoría de las pacientes investigadas.

No se encontró la asociación de VB con otras infecciones del tracto genital inferior.

(recibido para publicación el 11-04-94)

BIBLIOGRAFIA

- Ansel, R., Totten, P.A., Spiegel, C. A., Chen, K.C.S., Eschenbach, D., Holmes, K.K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.*, 74 (14): 14-22, 1983.
- Andreu, A., Giménez, M., Elcuaz, R., Cresco, E., Roig, G. Aislamiento e identificación de *Mobiluncus curtisii* y *Mobiluncus mulieris* en muestras genitales. *Rev. Clin. Esp.*, 189: 18-20, 1991.
- Angelitti, G. y Nieves, B. Vaginosis bacteriana en pacientes que acuden a la consulta de planificación familiar. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.*, 12 (1): 39, 1992.
- Ballows, A., Hausler, W., Herrmann, K., Isenberg, H., Shadomy, H. *Manual of clinical microbiology*. 5ta. Edición, pp. 538-551, 1991.
- Barbone, F., Austin, H., Louv, W.C., James, A. Am. A follow up study of methods of contraception, sexual activity, and rates of trichomoniasis, candidiasis, and bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163 (2): 510-514, 1990.
- Biswas, M. Bacterial Vaginosis. *Clin. Obstet. and Gynecol.*, 36(1): 166-176, 1993.
- Briselden, A. M., Moncla, B. J., Stevens, C. E., Hillier, S. L. Sialidases (Neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J. Clin. Microbiol.*, 30(3): 663-666, 1992.
- Burns, F. M., Gould, I.M., Patterson, A., Wood, W.J. Diagnosis of bacterial vaginosis in a routine diagnostic laboratory. *Med. Lab. Sci.*, 49: 8-11, 1992.
- Camel, F., *Estadísticas Médicas y de Salud Pública*. Universidad de Los Andes. Mérida, 1966.
- Catlin W. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5(3): 213-217, 1992.
- Coliman, K.M. *Fundamentos de Epidemiología*: Medellín, 1978.
- Cook, R.L., Redondo, V., Schmitt, Ch., Meriwether, C., Sobel, J. D. Clinical, microbiological, and biochemical factors in recurrent bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 30(4): 870-877, 1992.
- Cristiano, L., Coffetti, N., Dalvai, G., Lorusso, L., Lorenzi, M. Bacterial vaginosis: prevalence in out patients, association with some micro-organisms and laboratory indices. *Genitourin Med.*, 65: 382-387, 1989.
- Easmon, C., Hay, P., Ison, C. Bacterial vaginosis: A diagnostic approach. *Genitourin Med.*, 68: 134-138, 1992.
- Eschenbach, D. A., Gravett, M. G., Chen, K., Hoyme, U. B., Holmes, K.K. Bacterial vaginosis during pregnancy. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 40: 213-222, 1983.
- Eschenbach, D. A., Hillier, Sh., Critchlow, C., Stevens, C., Derouen, T., Holmes, K. K. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158: 819-828, 1988.
- Eschenbach, D. A., Davick, P.R., Williams, B., Klebanoff, S. J., Smith, K. I., Critchlow, C., Holmes, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27(2): 251-256, 1989.
- Eschenbach, D. A. Bacterial vaginosis and anaerobes in obstetric-gynecologic infection. *CID*, 16(4): 282-287, 1993.
- Fox, A. y Philips. Two curved rods in non-specific vaginitis. *Scand. J. Infect. dis. Suppl.*, 40: 213-222, 1984.
- Gardner, H. L. y Dukes, Ch. D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis a newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 69: 962-976, 1955.
- González, I. y Bellorín, E. Algo más sobre vaginosis bacteriana. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.*, 11(1): 9, 1991.
- González, I. y Bellorín, E. Metodología en el estudio de la vaginosis bacteriana. Hospital Vargas de Caracas. Unidad de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Sección de Enfermedades de Transmisión: 1-17, 1992.
- Gravett, M. G., Preston, N., DeRoven, T., Critchlow, C., Eschenbach, D. A., Holmes, K. K. Independent associations of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* infection with adverse pregnancy outcome. *JAMA*, 256 (14): 1899-1903, 1986.
- Hallen, A., Pahlson, C., Forsum, U. Bacterial vaginosis in women attending STD clinic: diagnostic criteria and prevalence of *Mobiluncus* spp. *Genitourin Med.*, 63: 386-389, 1987.
- Haroun, S. y Collins, D. *Prevotella*, a new to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40(2): 205-208, 1990.
- Hay, P. E., Robinson, D. T., Lamont, R. F. Diagnosis of bacterial vaginosis in a gynaecology clinic. *Br. J. of Obstet. and Gynaecol.*, 99: 63-66, 1992.
- Heather, D., Krohn, M., Hillier, Sh., Eschenbach, D. A. Bacterial vaginosis as a risk factor for post-cesarean endometritis. *Obstet. Gynecol.*, 75(1): 52-58, 1990.
- Hill, L. H., Ruparelia, H., Embil, J. A. Nonspecific vaginitis and other genital infections in three clinic populations. *Sex. Transm. Dis.*, 10: 114-118, 1983.
- Hillier, S. L., Critchlow, C. W., Stevens, C. E., Roberts, C. M., Walner-Hanssen, P., Eschenbach, D. A., Holmes, K. K. Microbiological epidemiological and clinical correlates of vaginal colonisation by *Mobiluncus* species. *Genitourin Med.*, 67:26-31, 1991.
- Holst, E. Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission. *J. Clin. Microbiol.*, 28(9): 2035-2039, 1990.
- James, J. A., Thomason, J. L., Gelbart, Sh. M., Osypowki, P., Kaiser, P., Hanson, L. Is trichomoniasis often associated with bacterial vaginosis in pregnant adolescents? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 166(3): 859-863, 1992.
- Joa-Granados, N., Arata, G., Castrillo, N., Carmona, O. La coloración de Gram en el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.*, 11(2 y 3): 3-8, 1991.
- Joesoef, M. R., Hillier, Sh. L., Josodiwondo, S., Linnan, M. Reproducibility of a scoring system for Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 29(8): 1730-1731, 1991.
- Jawetz E., Melnick J., Adelberg E., Brooks G., Butel J., y Ornston L. *Microbiología Médica*, 13a. Edición, México, D. F.:

- Editorial El Manual Moderno. 1990.
- Jones, B.M. y Wilcox, L.M. The susceptibility of organisms associated with bacterial vaginosis to spermicidal compounds, in vitro. *Genitourin Med.*, 67: 475-477, 1991.
- Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A., Waltersdorff, A. M. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂ - generating lactobacilli. *J. Infect. Dis.*, 164: 94-100, 1991.
- Kurki, T., Sivonen, A., Renkonen, O., Savia, E., Ylikorkala, O. Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.*, 80(2): 173-177, 1992.
- Larsson, P. G. y Platz, J. J. Enumeration of clue cells in rehydrated air-dried vaginal wet smears for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.*, 76(4): 727-730, 1990.
- Larsson, P., G., Platz, J. J., Thejls, H., Forsum, U., Pahlson, C. Incidence of pelvic inflammatory disease after first-trimester legal abortion in women with bacterial vaginosis after treatment with metronidazole: A double-blind, randomized study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 166(1): 100-103, 1992.
- Livengood, Ch. H., Thomason, J. L., Hill, G. Bacterial vaginosis: Diagnostic and pathogenetic findings during tropical clindamycin therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163(2): 515-520, 1990.
- Majeroni, B. New concepts in Bacterial Vaginosis. *AFP.*, 44(4): 1215-1218, 1991.
- Mardh, P. The vaginal ecosystem. *Am J. Obstet. Gynecol.*, 165(4): 1163-1167, 1991.
- Martius, J., Krohn, M. A., Hillier, S.L., Stamm, W.E., Holmes, K.K., Eschenbach, D. A. Relationships of vaginal lactobacillus species, cervical Chlamydia trachomatis, and bacterial vaginosis to preterm birth. *Obstet. Gynecol.*, 71: 89-95, 1988.
- Mazzulli, T., Simor, A., Low, D. Reproducibility of Interpretation of Gram-Stained Vaginal Smears for the Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 28(7): 1506-1508, 1990.
- McDonald, H. M., O'loughlin, J. A., Jolley, P., Vigneswaran, R., McDonald, P. J. Vaginal infection and preterm labour. *British J. Obstet. Gynecol.*, 98: 427-435, 1991.
- Moi, H., Danielsson, D., Schoenknecht, F. An in vitro study of the Attachment to Vaginal Epithelial Cells of Anaerobic Curved Rods, *Bacteroides bivius* and *Bacteroides disiens*. *Scand J. Infect. Dis. Suppl.*, 40: 185-190, 1983.
- Nugent, R.P., Krohn, M. A., Hillier, Sh. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.*, 29(2): 297-301, 1991.
- Ortiz, M. C., González, A., Morales, M., Camorlinga, M., Giono, S. Frecuencia de aislamiento de *Gardnerella vaginalis* y su relación con probables factores de riesgo en vaginosis bacteriana. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 32: 1-5, 1990.
- Pahlson, C. y Larsson, P. G. The ecologically wrong vaginal lactobacilli. *Med. Hypotheses*, 36: 126-130, 1991.
- Riordan, T., Macaulay, M. E., James, J. M., Leventhall, P. A., Morris, E. M., Neal, B. R., Rowland, J., Evans, B. M. A prospective study of genital infections in a family planning clinic. *Epidemiol. Infect.*, 104: 47-53, 1990.
- Rotimi, V. O., Yakubu, Z., Abudu, O. O., Banjo, T. O. Direct Gram's stain of vaginal discharge as a means of diagnosing bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.*, 35: 103-106, 1991.
- Roy, S. Nonbarrier contraceptives and vaginitis and vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165(4): 1240-1244, 1991.
- Sobel, J. D. Vaginal infections in adult women. *Med. Clin. North Am.*, 74(6): 1573-1602, 1990.
- Soper, D. E., Brump, R. C., Hurt, W.G. Bacterial vaginosis and trichomoniasis vaginitis are risk factors for cuff cellulitis after abdominal hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163(3): 1016-1023, 1990.
- Spiegel, C. A., Amsel, R., Eschenbach, D., Schoenknecht, F., Holmes, K. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N. Engl. J. Med.* 303(11) 601-607, 1980.
- Spiegel, C. A., Amsel, R., Holmes, K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 18(1): 170-177, 1983.
- Spiegel, C. A., 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.*, 34(2): 177-184, 1984.
- Shepard, A., Cammarata, C., Martin, D. Comparison of Different Medium Bases for the Semiquantitative Isolation of Anaerobes from Vaginal Secretions. *J. Clin. Microbiol.*, 28(3): 455-457, 1990.
- Schoonmaker, J., Lunt, B. D., Lawellin, D. W., French, J. L., Hillier, Sh., McGregor, J. A new proline aminopeptidase assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165(3): 737-742, 1991.
- Schwebke, J. R., Lukehart, S. A., Roberts, M. C., Hillier S. L. Identification of two new antigenic subgroups within the genus *Mobiluncus*. *J. Clin. Microbiol.*, 29(10): 2204-2208, 1991.
- Sjoberg, L., Hakansson, S. Endotoxin in vaginal fluid of women with bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.*, 77(2): 265-266, 1991.
- Smith, H.J., Moore, H. Isolation of *Mobiluncus* species from clinical specimens by using cold enrichment and selective media. *J. Clin. Microbiol.*, 26(6): 1134-1137, 1988.
- Thomason, J. L., Gelbart, Sh. M., Anderson, R. J., Walt, A.K., Osypowski, P. J. Statistical evaluation of diagnostic criteria for bacterial vaginosis. *Am J. Obstet. Gynecol.*, 162: 155-160, 1990.
- Thomason, J. L., Gelbart, Sh. M., Scaglione, N.J. Bacterial vaginosis: current review with indications for asymptomatic therapy. *Am. J. Obstet., Gynecol.*, 165 (4): 1210-1271, 1991.
- Torres, I. y Conde, C. *Mobiluncus* é Nuevo patógeno microbiano ?. *Infectología*, 2:44-49, 1986.

EHRlichiosis EN ANIMALES Y HUMANOS EN VENEZUELA

Tamí, Irene (1); Garcia, Francisco (2); Tamí, Manuel (2); Arcía, Reny (2)

(1) Centro de Quimioterapia Oncológica y Hematología. MSAS - UCV (C.Q.O.M.)

(2) Facultad de Ciencias Veterinarias. U.C.V. Maracay, Estado Aragua.

RESUMEN

La ehrlichiosis es una enfermedad sistémica aguda, transmitida por garrapatas y producida por microorganismos del género *Ehrlichia*, familia Rickettsiaceae; infecta a una amplia variedad de animales domésticos, salvajes y al hombre. Fué descubierto inicialmente en perros, habiéndose identificado el primer caso humano en los Estados Unidos en el año de 1986. Se han descrito diferentes especies, de acuerdo al hospedador que parasita, tropismo celular y vector. El propósito de este trabajo preliminar ha sido la identificación morfológica del germen en extendidos sanguíneos de perros y humanos. Otra intención, fue dar a conocer, al equipo de salud, la existencia en el país de esta enfermedad y alertar a los dueños de animales sobre la posible zoonosis. Hasta el momento se ha estudiado un total de 103 muestras de sangre, distribuidas así: 50 perros infestados por garrapatas provenientes de distintas clínicas veterinarias de Caracas y Maracay, 25 muestras de personas que tuvieron contacto con perros infectados y 20 sujetos sin contacto aparente con animales (controles). Se realizaron los siguientes exámenes: hematocrito, conteo de glóbulos blancos, estudio de frotis de sangre periférica y de concentrado de capa blanca, y detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta, en sueros humanos. Resultado: se identificó el parásito en el 32% de los perros estudiados hasta el momento y en los humanos en el 45%. Conclusión: debido a los datos arrojados, la investigación de este microorganismo puede aclarar muchos casos de neutropenias y trombocitopenias idiopáticas, así como de síndromes febriles sin explicación.

PALABRAS CLAVES: *Ehrlichiosis canina*, *Ehrlichiosis humana*, *Ehrlichia platys*, *Ehrlichia canis*, diagnóstico de laboratorio.

ABSTRACT

Ehrlichiosis in animals and humans in Venezuela

Ehrlichiosis is an acute systemic disease transmitted by tickbite and produced by microorganisms of the genus *Ehrlichia* of the family Rickettsiaceae. It infects a wide variety of domestic and wild animals as well as men. It was found initially in dogs and detected in humans, for the first time in U.S.A. in 1986. There are been described different species according to the host, the cellular tropism and vector. The purpose of this preliminary work has been: a) the morphological identification of the parasite in blood samples taken from dogs and humans. b) to make this illness known in the country and c) to alert animals owners about it. Up to the present a total of 103 blood samples have been studied: 50 samples from dogs infested by tick and attended in different veterinarian clinics of Caracas and Maracay; 25 samples from people who have been in contact with infected dogs, and 20 samples of people who apparently haven't been in contact with infected animals. At this moment, hematocrit, white-cell counts, morphology of peripheral blood, platelets concentration, smears studies and fluorescent antibodies techniques, are being made.

Findings: the parasite has been found in 32% of the studied dogs and in 45% of humans.

Conclusion: According to the findings the investigation of this microorganism in humans may help to clarify many cases of neutropenia, idiopathic thrombocytopenia as well as febrile syndromes of unexplained etiology.

KEY WORDS: *Canine ehrlichiosis*, *human ehrlichiosis*, *Ehrlichia platys*, *Ehrlichia canis*, laboratory diagnostic.

INTRODUCCION

Datos recientes indican que la *Ehrlichia canis* y/u otra especie estrechamente relacionada, provocan en humanos una enfermedad febril aguda. La ehrlichiosis fué observada inicialmente en perros (Donatien y col., 1935) habiéndose detectado el primer caso en humano,

Este trabajo compartió el premio al mejor trabajo libre ORTHO DIAGNOSTIC otorgado durante la celebración de las VII Jornadas Científicas de la S.V.B.E. y II Jornadas Colegio Bioanalistas Edo. Mérida.

en los Estados Unidos, en el año 1986 (Maeda y cols., 1987) a partir de entonces más de doscientos casos humanos han sido identificados en ese país. Se han descrito diferentes especies, de acuerdo al hospedador que parasita, tropismo celular y vector: *E. canis* (Walker y cols., 1970, Maeda y cols. 1987), *E. risticii* (Robl 1985, Holland y cols., 1985), *E. equi* (Stannard y cols., 1969, Madigan y col., 1987), *E. phagocytophila*, (Aronson y cols., 1990), *E. sennetsu* (Misao y col., 1955, Fukuda y cols., 1954, Ristic y col., 1984), *E. platys* (Harvey y cols., 1978, Simpson y cols., 1991) y *E. chaffeensis* (Dawson y cols., 1991).

Donatien y col., 1935, describen el microorganismo por primera vez en Argelia en perros y lo llaman *Rickettsia canis*. En 1945, fué renombrada como *Ehrlichia canis*, en honor al famoso bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. Posteriormente en Japón, en el año 1954, se aísla *E. sennetsu* en una persona con síndrome parecido a mononucleosis infecciosa (Misao y col., 1955). En 1957, es reconocida la enfermedad en perros de Aruba, por Bool y Suttmoller, luego, en 1969, es detectada también en Oklahoma por Ewing. En ese mismo año, Huxsoll y cols., identifican al microorganismo como causante de enfermedad hemorrágica fatal en perros militares norteamericanos, en Vietnam. En 1973, Clawson, reporta en perros, su presencia dentro de plaquetas, y posteriormente Fajardo (1974) publica similares hallazgos.

En 1973, Kallick y cols., describen un agente parecido a *Rickettsia*, la cual podía haber sido una *ehrlichia*, en un paciente humano con defecto en médula ósea.

En 1978, Harvey y cols., la aíslan de la sangre de un perro, en Florida, encontrándose localizada en el interior de plaquetas, produciendo en el animal trombocitopenia cíclica.

En 1980, Hemelt y cols., realizan propagación seriada de *E. canis*.

En 1986, en U.S.A. Maeda y cols., (1987) hacen la primera y mejor descripción de infección por *Ehrlichia canis* en humanos.

En 1988, Pearce y cols., reportan un caso de hipoplasia de médula ósea, en un paciente con estudio positivo para *E. canis*, mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta, siendo negativo para leptospira, brucella, tularemia, toxoplasmosis, mononucleosis infecciosa, hepatitis tipo A y B, y otras infecciones rickettsiales (*R. rickettsii*, *R. typhi*, y *Coxiella burnetti*). Ese mismo año, el Centro de Control de Enfermedades, Universidad de Oklahoma, U.S.A., reporta que la enfermedad es similar a la fiebre moteada de las Montañas

Rocosas, excepto que solamente el veinte por ciento de los pacientes con ehrlichiosis humana, presenta un salpullido (C.D.C. 1988).

Posteriormente, Dawson y cols. (1991), aíslan y caracterizan la *E. chaffeensis*.

En 1992, se reporta el primer caso de ehrlichiosis humana adquirido fuera de los Estados Unidos, presumiblemente en Mali, país situado al noroeste de Africa, fronterizo con Argelia; el diagnóstico fué realizada cuando la paciente de 24 años retornó a Norteamérica y se cree fué causada por *E. chaffeensis* (Uhaa y cols.).

La *Ehrlichia* es una bacteria intracelular obligatoria, gramnegativa, de forma cocoide o elipsoide, pero frecuentemente pleomórfica que mide entre 0,2 y 0,8 μ m de diámetro, localizándose en el interior de leucocitos y plaquetas circulantes. Es el agente causal de la ehrlichiosis. Pertenece al orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae, género *Ehrlichia*. Las diferencias antigénicas que se han detectado y el tropismo para cierto tipo celular, son características fenotípicas que han permitido distinguir varias especies (*E. canis*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. phagocytophila*, *E. equi*, *E. platys*, y recientemente, *E. chaffeensis*). Las especies patógenas para el hombre, son:

- La *E. sennetsu*, aislada en Japón en 1954, en un paciente con síndrome parecido a mononucleosis infecciosa (Misao y col., 1955).

- La *E. canis*, primer caso en humano reportado en U.S.A., con diagnóstico confirmado por estudios morfológicos de leucocitos y por pruebas serológicas (Maeda y cols., 1987). El paciente presentó síntomas parecidos a la fiebre moteada de las Montañas Rocosas.

- La *E. chaffeensis*, recientemente aislada y caracterizada (Dawson y col. 1991) e identificada en una paciente de 24 años, en los Estados Unidos, siendo el primer caso importado de una nueva forma de ehrlichiosis, adquirida probablemente en Mali.

La ehrlichiosis humana presenta un período de incubación entre 7 y 21 días. Los síntomas característicos son: fiebre, dolor de cabeza, náusea, pérdida de peso, escalofrío, falta de apetito, anemia, leucopenia y trombocitopenia; se puede confundir con una enfermedad gripal o con mononucleosis infecciosa, también pueden presentarse complicaciones gastrointestinales, bradicardia, erupciones en la piel, linfadenopatías, encefalopatía, epistaxis, hepatitis, esplenomegalia, neumonitis, vasculitis, flebitis, glomerulonefritis. La química sanguínea es normal excepto por elevación de las transaminasas séricas, fosfatasa alcalina, creatinina,

dehidrogenasa láctica y bilirrubina. Simultáneamente con la trombocitopenia se produce un incremento del diámetro de las plaquetas (megatrombocitos). (Smith y cols. 1975).

La partícula infectante, de aproximadamente 0,5 micras de diámetro, cuando permanece solitaria es denominada "CUERPO ELEMENTAL" localizándose en el interior de leucocitos y plaquetas incluida dentro de una vacuola, siendo posible pero difícil de identificar en frotis sanguíneos coloreados con Wright. Estos cuerpos elementales se multiplican dentro de la vacuola, formando inclusiones inmaduras denominadas "CUERPOS INICIALES", que luego dan origen a una "MORULA" o inclusión madura, que mide entre 2 y 5 micras de diámetro y son más fácilmente visualizadas al microscopio de luz, pudiendo estar constituida por un número variado de microorganismos (de 5 a 20 ó más). (Fig. 1 y 2).

FIGURA 1



Representación esquemática del ciclo de desarrollo de la *Ehrlichia canis* en una célula infectada (McDade 1990, modificado por Tami 1994)

La infección ocurre cuando la garrapata (probablemente *Rhipicephalus sanguineus*) ingiere sangre de su hospedero y libera en el sitio de alimentación secreciones salivales que contienen el agente infeccioso. Una vez introducida la ehrlichia al organismo, comienza un período de incubación que dura entre 7 y 21 días, el cual es seguido por una fase aguda que se prolonga por 2 a 4 semanas. Durante este lapso ocurre multiplicación secuencial del microorganismo, dentro de las células mononucleares sanguíneas, para luego diseminarse a las fagocíticas del bazo, hígado, ganglios linfáticos y pulmones. Las células mononucleares infectadas se adhieren a los endotelios vasculares produciendo vasculitis, o migran hacia otros tejidos induciendo una

FIGURA 2

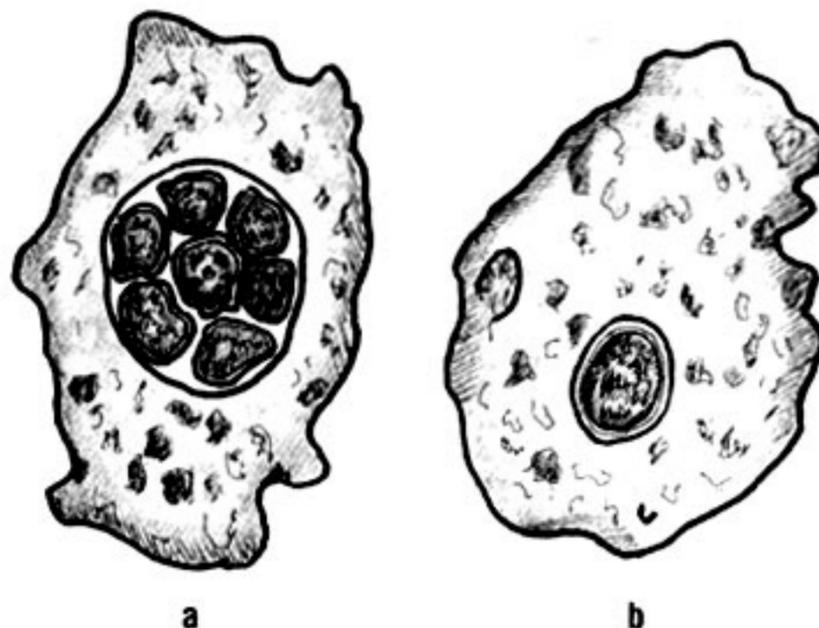


FIG 2- a) Representación esquemática de una plaqueta conteniendo un microorganismo (una subunidad) b) Representación esquemática de una plaqueta conteniendo un microorganismo (siete subunidades) (Harvey y col. 1978, modificado por Tami 1994) (Aumento x 20.000)

respuesta inflamatoria. Después de esta fase aguda de la enfermedad, se pasa a una subclínica, la mayoría de las veces, la cual se caracteriza por una persistente estimulación antigénica, rara vez se observan signos clínicos, para luego pasar a una fase crónica de la enfermedad la cual puede ser leve o severa, dependiendo del sistema inmunológico del individuo (McDade. 1990).

El objetivo de este trabajo preliminar ha sido, en primer lugar, la identificación morfológica del parásito en frotis de sangre de perros y humanos. Otra intención fue dar a conocer al equipo de salud la existencia en el país de esta enfermedad y en tercer lugar, alertar a los dueños de animales sobre la posible zoonosis.

MATERIAL Y METODOS:

MUESTRAS:

Hasta el momento se ha estudiado un total de 103 muestras de sangre, distribuidas por grupos:

- I) 50 perros parasitados por garrapatas, provenientes de distintas clínicas veterinarias de Caracas y Maracay.
- II) 33 personas que tuvieron contacto con perros parasitados.
- III) 20 individuos sin contacto aparente con animales (grupo control).

MÉTODOS:

Se realizaron los siguientes exámenes de laboratorio: Recuento y fórmula leucocitaria, hematocrito, concentración de capa blanca, investigación del parásito en frotis, inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos en suero humano.

La investigación del parásito se llevó a cabo examinando extendidos finos de sangre periférica y concentrado de capa blanca obtenida del hematocrito y coloreados con Wright.

La técnica de Fluorescencia Indirecta se realizó en tubo, usando como antígeno una suspensión, preparada en solución salina balanceada (PBS) pH 7.2, de elementos formes de la capa blanca de sangre, tomada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sedimentada, proveniente de un perro pastor alemán infectado con *Ehrlichia platys*. Como primer anticuerpo se utilizó el suero humano problema diluido 1:10, incubándolo por 30 minutos a 37°C, y como segundo anticuerpo, el conjugado fluoresceinado de gammaglobulina anti-humana, tratado en igual forma y lavándolo con PBS. Finalmente se montó entre lámina y laminilla y se observó en microscopio Zeiss, equipado con fuente de luz ultravioleta (epiiluminación, con aumento X1000).

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos demostraron que: en el grupo I, se identificó el parásito en 16 de los 50 perros estudiados (32%).

En este grupo, 7 de los que resultaron positivo, presentaron valores bajos de hematocrito, y 2 valores bajos de glóbulos blancos. En el grupo II, de las 33 personas evaluadas 15 resultaron positivas (45%), de las cuales dos presentaron anemia y leucopenia. Mientras que en el grupo III, formado por sujetos que reportaron no tener contacto con animales (con cifras de hematocrito y glóbulos blancos normales), no se observó el parásito. (0%).

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

Grupo	N° Muestras	N° Casos Positivos	% Positividad
I	50	16	32
II	33	15	45
III	20	0	0

En el presente estudio, se identificó morfológicamente el microorganismo en frotis finos de capa blanca sanguínea, concentrada y coloreada con Wright. Se observaron inclusiones principalmente en plaquetas (Fig. 3 y 4) y también en algunos linfocitos y monocitos. Además, pudimos apreciar un sistema fagocitario activo, que ingiere plaquetas infectadas por ehrlichias, reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico, con formación de vesícula fagocítica (fagosoma). (Fig. 5 y Fig. 6).

En la investigación observamos presencia de cariorrexis, tanto de granulocitos como de linfocitos, en los extendidos sanguíneos de los perros y humanos infectados con ehrlichia.

La prueba tentativa de inmunofluorescencia indirecta, realizada en suspensión celular, detectó inclusiones dentro de plaquetas, y en algunos linfocitos.

DISCUSION

En este trabajo "preliminar", el microorganismo que reportamos parece tener preferencia por las plaquetas, más que por otro tipo de célula sanguínea. Los reportes en humanos citados en la bibliografía, mencionan que los pacientes con ehrlichiosis, presentaron anemia, leucopenia y trombocitopenia, y en el frotis de sangre periférica observaron inclusiones en el citoplasma de los leucocitos, sugestivo del microorganismo, pero no indicaron haber detectado inclusiones en plaquetas, a pesar de que presentaron cifras bajas en circulación. La infección aguda en perros, tanto por *E. platys* como por *E. canis*, también se ha descrito que provoca anemia, leucopenia y trombocitopenia (Harvey y cols., 1978; Baker y cols., 1988).

El método de concentración de la capa blanca sanguínea y la coloración empleada, así como la realización de frotis finos en laminilla, y el uso de un microscopio de excelente óptica, nos permitió detectar con mayor facilidad y rapidez el parásito.

Con respecto al vector de la ehrlichiosis humana, no ha sido identificado. Todas las evidencias sugieren que la infección no se transmite directamente de perros a humanos. Se sabe que el vector biológico de la *Ehrlichia canis* es una garrapata (*Rhipicephalus sanguineus*), y el de la *E. platys*, parece no ser el mismo, según lo afirman estudios realizados por Simpson y cols. 1991, por lo que se requiere realizar más estudios.

Smith y cols. 1975, demostraron una incrementada destrucción plaquetaria, causante de trombocitopenia, en los caninos infectados; dicha destrucción ocurre principalmente en el bazo y es similar a la que se produce en la púrpura trombocitopénica idiopática mediada inmunológicamente, en el hombre.

El diagnóstico de ehrlichiosis se establece por los signos y síntomas compatibles con la enfermedad y por una historia de picada de garrapata. Esto es confirmado por pruebas de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos, contra alguna de las diferentes especies aisladas.

Con mucha frecuencia observamos, en los perros estudiados, inclusiones en los eritrocitos, semejantes a

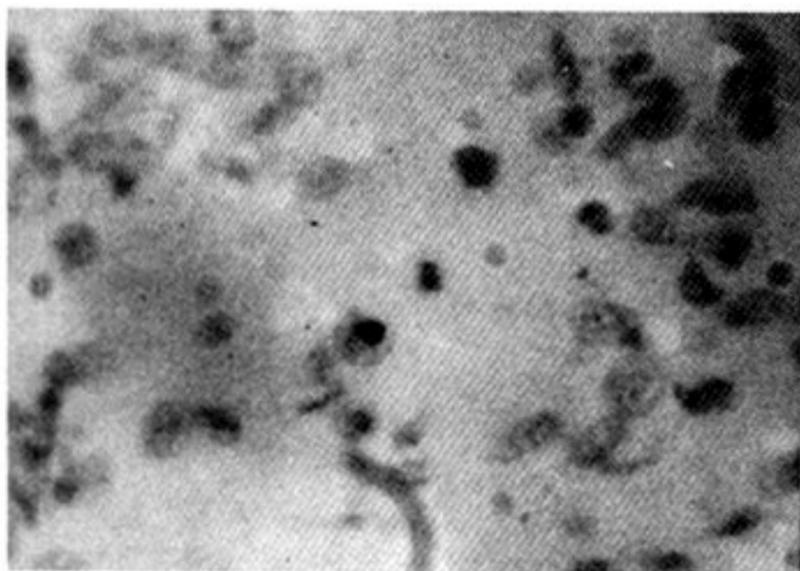


FIG. 3-
Plaqueta canina infectada con *Ehrlichia platys*. Frotis de capa blanca concentrada, coloreado con Wright (Microscopía óptica x 1000)

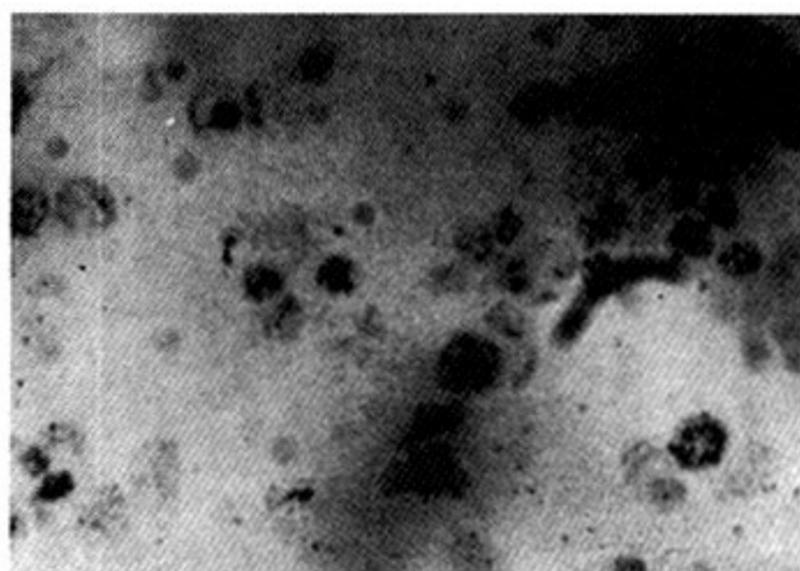


FIG. 4-
Plaqueta humana infectada con *Ehrlichia*. Frotis de capa blanca concentrada, coloreado con Wright (Microscopía óptica x 1000)

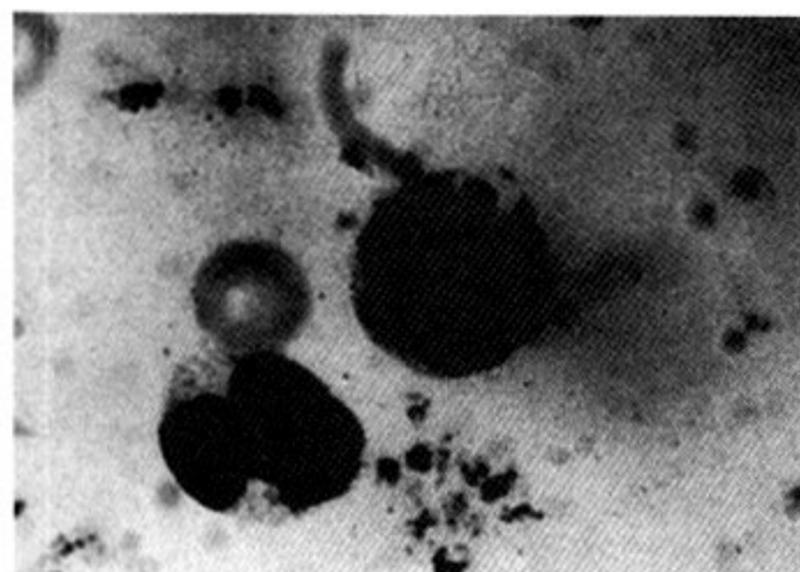


FIG. 5-
Monocito humano fagocitando una plaqueta. Colaración de Wriqth. (x 1000)

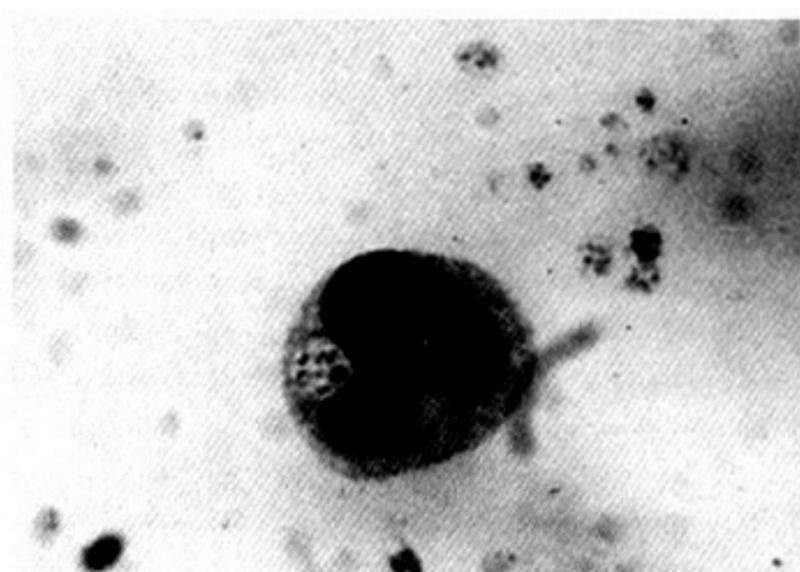


FIG. 6- Monocito, del mismo paciente de la figura anterior, presentando en su citoplasma una plaqueta infectada incluida dentro de una vesícula fagocítica (fagosoma)

los cuerpos de Howell Jolly (representan resto de núcleo). Revisando la literatura, vemos que se reportan inclusiones en glóbulos rojos, parecidos a *E. canis*, en infección rickettsial de ganado vacuno por *Anaplasma marginale*.

En el presente estudio, observamos monocitos fagocitando plaquetas que contenían cuerpos de inclusiones. Se reporta que en la fagocitosis de ehrlichias no ocurre la fusión entre lisosoma y fagosoma, con la subsiguiente descarga del contenido lisosomal de hidrolasas ácidas y otros agentes microbicidas, por lo que ellas aprovechan para multiplicarse y al final destruir la célula infectada, quedando en libertad para infectar rápidamente otras células, evitando así la exposición al medioambiente extracelular. La replicación se realiza por fisión binaria. (McDade 1990).

CONCLUSIONES

La identificación, en nuestro país, del género *Ehrlichia* en humanos, nos lleva a la necesidad de

realizar estudios adicionales, tanto clínicos como epidemiológicos, para determinar distribución, prevalencia y enfermedad, además de la demostración del vector transmisor y estudio de diferentes animales reservorios del parásito.

Por otro lado, perfeccionar los métodos diagnósticos para su aislamiento y educar a la población acerca de medidas preventivas para la eliminación del transmisor. Desde el punto de vista clínico, la identificación del microorganismo en humanos, podría aclarar muchos casos de neutropenias, trombocitopenias idiopáticas, así como de síndromes febriles sin explicación. Debido a que la parasitemia es, con frecuencia, baja en las plaquetas y leucocitos circulantes, la identificación del mismo resulta difícil y consume mucho tiempo. Las mórulas, que son las más fáciles de visualizar, por lo general, se pueden presentar en forma transitoria y en una baja concentración. Por todo lo expuesto se recomienda el empleo de inmunodiagnóstico: mediante inmunofluorescencia indirecta, especialmente para por-

tadores asintomáticos (crónicos). Además, recientemente han sido utilizadas técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) y de amplificación genética, (reacción en cadena de la polimerasa - PCR), para detectar el agente humano de la ehrlichiosis, en muestras de sangre provenientes de pacientes seropositivos. Este procedimiento puede presumiblemente identificar y diferenciar las ehrlichiosis humanas.

AGRADECIMIENTOS

A los médicos veterinarios doctores: María Fernanda De Agreda, Amalio Espinoza, José Gorrín, Yadira Chirinos y Carmen Ana Salazar, por proporcionarnos las muestras de sangre canina.

Al Dr. José Tamí Maury, por su apoyo, observaciones y sugerencias.

Los hermanos Atilio y Urupagua Villegas por auxiliarnos y aumentar nuestros conocimientos en computación.

A Irene María Tamí Maury, quien haciendo su pasantía odontológica en el IVIC sacó tiempo para realizar la búsqueda bibliográfica.

Prof. Zasuquia de Moncada por su colaboración en la traducción.

Al personal del C.Q.O.H.: bioanalistas, biólogos, médicos, químico, enfermeras, secretarías y vigilantes, por servir como controles normales.

A Dolly Yazmín Carriedo, por su valiosa ayuda y colaboración desinteresada.

Y al Dr. Manuel Tamí Luzardo... ..

(aceptado para publicación el 03-05-94)

BIBLIOGRAFIA

Aronson, J., Scimeca, J., Harris, D., Walker, DH.: Immunohistologic demonstration of Ehrlichia canis. Ann. N.Y. Acad Sci 590: 143 - 156, 1990.

Baker, DC., Gaunt, SD., Bobin, SS.: Anemia of inflammation in dogs infected with Ehrlichia platys. Am J Vet Res 49 (7): 1014 - 1016, 1988.

Boel, PH., Suttmoller, P.: Ehrlichia canis infections in dogs on Aruba. J Am Vet Med Assoc. 130: 418 - 420, 1957.

Centers for Disease Control. Human ehrlichiosis - United States. MMWR 37: 270, 275 - 277, 1988.

Clawson, CC.: Platelet interaction with bacteria. III. Ultrastructure. Am J Pathol. 70: 449 - 464, 1973.

Dawson, JE., Anderson, B., Fishbein, DB., Sánchez, J. Goldsmith, C., Wilson, K., Duntly, C.: Isolation and characterization of an Ehrlichia from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29 (12): 2741 - 2745, 1991.

Donatien, A., Lestoquard, F.: Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 28: 418 - 419, 1935.

Ewing, SA.: Canine ehrlichiosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 13: 331 - 353, 1969.

Fajardo, LF.: Malaria parasites within platelets (abstract). Lab. Invest. 30: 373, 1974.

Fukuda, T., Kitao, T., Keita, Y.: Study on the etiologic agent of Hyuga fever. I. Isolation of agent and experimental infection. Med Biol 32: 200 - 204, 1954.

Harvey, JW., Simpson, CF., Gaskin, JM.: Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia - like agent in dogs. J Infect Dis. 137 (2): 182 - 183, 1978.

Hemelt, IE., Lewis, GE Jr., Huxsoll, DL., Stephenson, EH.: Serial propagation of Ehrlichia canis in primary canine peripheral blood monocyte cultures. Cornell Vet 70: 36 - 32, 1980.

Holland, CJ., Ristic, M., Huxsoll, DL., Cole, AL., Rapmund, G.: Adaptation of Ehrlichia sennetsu to canine blood monocytes: preliminary structural and serological studies with cell culture - derived Ehrlichia sennetsu. Infect Immun. 48: 366 - 371, 1985.

Huxsoll DL., Hildebrandt PK., et al.: Ehrlichia canis the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs? Vet. Rec. 85: 587, 1969.

Kallick, CA., Levin, S., Reddi, KT.: Association of a rickettsia - like agent identified in human bone marrow failure with Ehrlichia canis and tropical canine pancytopenia. In "Program and Abstracts of the Thirteenth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy." Washington, DC: American Society for Microbiology, p 1, 1973.

Madigan, JE., Gribble, D.: Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968 - 1971). J Am Vet Med Assoc. 190: 445 - 448, 1987.

Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R., Ristic, M., Cox, D., McDade, J.: Human infection with Ehrlichia canis, a leukocytic Rickettsia. New Engl J Med. 316 (14): 853 - 855, 1987.

McDade, J.: Ehrlichiosis. A disease of animals and humans. J Infect Dis. 161: 609 - 617, 1990.

Misao T., Kobayashi Y.: Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow, and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. Kyushu J. Med. Sci. 6: 145 - 152, 1955.

Pearce, C., Conrad, P., Nolan, P., Fishbein, D., Dawson, J.: Ehrlichiosis: A cause of Bone Marrow Hypoplasia in Humans. Am. J. of Hematology 28: 53 - 55, 1988.

Ristic, M., Huxsoll, DL.: Ehrlichiae. In: Holt, JG., Krieg, NR., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins, 704 - 709, 1984.

Robl, MG.: Potomac horse fever closing in on an unknown killer. Vet Med 80: 49 - 58, 1985.

Stannard AA., Gribble DH., Smith RS. Equine ehrlichiosis, a disease with similarities to tick - borne fever and bovine petchial fever. Vet Rec 84: 149 - 150, 1969.

Simpson, RM., Gaunt, SD., Hair, JA., Kocan, KM., Henk, WG., Casey, HW.: Evaluation of Rhipicephalus sanguineus as a potential biologic vector of Ehrlichia platys. Am J Vet Res 52 (9): 1537 - 1541, 1991.

Smith, R., Ristic, M., Huxsoll, D., Baylor, R.: Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: Evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. Infect Immun. 11 (6): 1216 - 1221, 1975.

Uhaa, I., Maclean, D., Greene, C., Fishbein, D.: A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: Clinical and laboratory findings. Am J. Trop. Med. Hyg. 46 (2): 161 - 164, 1992.

Walker, JS., Rundquist, JD., Taylor, R., et. al.: Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. J Am Vet Med Assoc. 157: 43 - 55, 1970.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR POR LA TECNICA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (C.I.E.)

Ernesto Montoro, Raúl Díaz, Fe Crespo, Caridad Ferrá, Miguel Echemendía, José A. Valdivia.

Laboratorio Nacional de Referencia de Mycobacterias y Tuberculosis. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se estudiaron por la técnica Contrainmuno-electroforesis (CIE) 3 grupos de sueros, los cuales incluyeron 56 de pacientes con tuberculosis pulmonar, 50 con otras patologías pulmonares y 75 de individuos supuestamente sanos.

Se utilizaron en dicha técnica 2 extractos antigénicos celulares crudos de las cepas *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y *Mycobacterium bovis* BCG elaborados según Rojas - Espinoza y Quesada - Pascual; se discute la utilidad de la CIE para el diagnóstico serológico de la tuberculosis reportando una sensibilidad de 80,35% y una especificidad de 93,33%.

Palabras Claves: Contrainmuno-electroforesis, Tuberculosis Pulmonar, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis

ABSTRACT

Serodiagnosis of Tuberculosis by Counterimmuno-electrophoresis (CIE) test

The Counterimmuno-electrophoresis (CIE) test was evaluated for the serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis using 2 antigenic extract prepared from a BCG suspension and *Mycobacterium tuberculosis* H37a. The specificity of this test was 93,33% in 75 sera from healthy donors. The sensitivity was 80,35% as determined in 56 sera from Pulmonary Tuberculosis. 50 sera from patients with non tuberculosis diseases were also included in this study.

Key Words: Counterimmuno-electrophoresis, Pulmonary Tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis.

INTRODUCCION

La Tuberculosis continúa siendo un importante problema de salud pública mundial. De acuerdo a las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis (UIC), ocurren anualmente de 8 a 10 millones de nuevos casos y aproximadamente 3 millones de muertes en el mundo (1, 2, 3).

La baciloscopia constituye un método básico y es el más usado en el diagnóstico de la Tuberculosis, su especificidad es alta, pero su sensibilidad es baja (2). Otra forma de demostrar el microorganismo es a través de cultivos, pero presenta ciertas limitaciones debido a que los resultados se obtienen en forma tardía (4 a 8 semanas) y no alcanzan la sensibilidad suficiente para detectar todos los casos paucibacilares (2, 4, 5).

Los primeros estudios serológicos para el diagnóstico de la Tuberculosis se realizaron a finales del siglo pasado, pero no fue hasta la década de los setenta en que este procedimiento se consideró de utilidad con el desarrollo de métodos altamente sensibles para la detección de anticuerpos (2,4, 5).

En 1978 Rojas-Espinoza y cols. aplicaron la Contrainmuno-electroforesis (CIE) para detectar anticuerpos antimicobacterianos en sueros de pacientes con Tuberculosis, realizando otros estudios a partir de ese momento (5, 6).

En el presente trabajo utilizamos la técnica CIE en el diagnóstico serológico de la tuberculosis, empleando 2 extractos antigénicos celulares de micobacterias.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 181 muestras de sueros clasificados en 3 grupos:

Grupo I: 56 sueros de pacientes con Tuberculosis pulmonar confirmada por diagnóstico clínico, radiológico y bacteriológico.

Grupo II: 50 sueros de pacientes con otras patologías pulmonares (5 con neoplasia, 13 con micosis profun-

Este trabajo recibió ayuda financiera de la agencia sueca SAREC como parte del proyecto "Improvement of Novel Technology for Diagnostic and Research on Tuberculosis and other mycobacteriosis".

das, 22 con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), 5 con neumopatía inflamatoria y 5 con micobacteriosis). En este grupo se siguieron los criterios clínico, radiológico y a todos se les realizó colocación de esputo para la detección de bacilos ácido - alcohol resistentes (BAAR), obteniéndose resultados negativos.

Grupo III: 75 sueros de individuos supuestamente sanos, de diferentes edades, sexo y raza, de los cuales 65 correspondían a donantes de sangre y 10 a niños de 11 años de edad con huella de cicatriz y certeza de vacunación con BCG.

Como fuente de antígenos micobacterianos se emplearon extractos antigénicos celulares crudos, obtenidos a partir de la cepa avirulenta *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y *Mycobacterium bovis* BCG, ambas pertenecientes al cepario del Laboratorio Nacional de Referencia de *Mycobacteria* y Tuberculosis del IPK. El procedimiento empleado para la elaboración fue el reportado por Rojas-Espinoza y Quesada-Pascual (5, 6).

Como soporte de la reacción se utilizó agarosa de alta electroendosmosis (Pharmacia-LKB), al 0,7%, colocando en el pozo cercano al ánodo, 13 ul de suero a analizar; como solución reguladora para la corrida se usó barbiturato sódico pH 8,6; se empleó una cámara de electroforesis (LKB - Multiphor II) conectada a la fuente de poder (LKB Macro Driver 5) y se administró una corriente eléctrica de 30 mA durante 15 minutos.

Posteriormente se depositó un volumen de 13 ul de los antígenos en el pozo cercano al cátodo y se reanudó la corrida por un tiempo de 70 minutos. Todos los sueros fueron analizados frente a los 2 extractos antigénicos elaborados, se aplicó en cada lámina sueros controles positivos y negativos. La corrida se efectuó a 20°C.

Se tomó como criterio de positividad la aparición de bandas de precipitación con uno u otro antígeno o con ambos extractos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los 56 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar (grupo I), 45 resultaron positivos con uno u otro antígeno o con ambos extractos, no comportándose de forma homogénea y obteniéndose mejores resultados con el extracto elaborado a partir de la cepa *M. tuberculosis* H37Ra, para un 80,35% de sensibilidad.

Al analizar los 50 sueros de pacientes con otras afecciones pulmonares, pertenecientes al grupo II, 5 resultaron positivos; 2 correspondían a sueros de pacientes

con bronquiectasia (EPOC), 2 con neoplasias y uno con neumopatía inflamatoria, resultando 45 sueros negativos.

De las 75 muestras estudiadas, de individuos supuestamente sanos, 5 resultaron positivos pertenecientes a donantes de sangre, por su parte los 10 niños analizados fueron negativos, obteniéndose un 93.33% de especificidad para este grupo.

Al comparar los resultados con los obtenidos por otros autores, en cuanto a los parámetros cualitativos de sensibilidad y especificidad, tenemos que Rojas - Espinoza (1978), en un primer estudio obtuvo 76,7% y 100% y en un segundo reporte 82% y 100% respectivamente (6).

Quesada Pascual (1983), en su primer estudio, obtuvo 84% de sensibilidad y 100% de especificidad, en un segundo grupo de sueros analizados reporta 69% y 100% respectivamente (5).

De acuerdo a estos parámetros podemos decir que la sensibilidad lograda en este trabajo es muy parecida a la obtenida por ambos autores y que la especificidad es más baja, aunque razonablemente aceptable, lo que nos hace pensar que estos individuos supuestamente sanos, pertenecientes al grupo III de estudio, en algún momento de sus vidas estuvieron en contacto con el bacilo tuberculoso, sin llegar a tener manifestaciones aparentes de la enfermedad.

Otros autores reportan que el 40% de las infecciones se producen durante los 4 primeros años de la vida y el 80% antes de los 15, en términos globales, y de manera muy genérica, se estima que el paso de infección a enfermedad se efectúa aproximadamente en el 10% de los casos: un 5% durante el período de los 5 años siguientes a la infección y el otro 5% a lo largo de la vida (7). Otros estudios reflejan, que el antecedente de vacunación con BCG no interfiere en los resultados obtenidos para la detección de anticuerpos micobacterianos en sueros (7, 8, 9). Estos reportes apoyan nuestros resultados, ya que los sueros estudiados de niños, todos resultaron negativos, esto se corresponde igualmente con los hallazgos obtenidos por Rojas Espinoza (1978) y Quesada Pascual (1983), los cuales incluyeron en sus estudios sueros de individuos vacunados con BCG. (6, 5).

La razón de incluir en el presente trabajo, sueros de pacientes portadores de otras enfermedades pulmonares, se debe a la dificultad del diagnóstico clínico diferencial por la similitud de los síntomas presentes en estas patologías; además se observan con frecuencia las reacciones cruzadas entre los antígenos de micobacte-

rias y otros géneros bacterianos como *Nocardia*, *Corynebacterium* y algunos de los agentes de las micosis profundas (5).

En relación a la sensibilidad de la CIE para el diagnóstico de la tuberculosis, probablemente varios factores son responsables de obtener un porcentaje de sueros no reactivos en casos confirmados. Diferentes autores han postulado la existencia de un espectro inmunológico en la tuberculosis pulmonar, basado en varios parámetros (5, 10, 11, 12).

Por la utilidad que reporta el método de la CIE, con respecto a la rapidez de los resultados (90 minutos), buena especificidad, económica y no requerimiento de personal especializado, se recomienda su uso para el diagnóstico serológico de la tuberculosis.

(aceptado para publicación el 11-04-94)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Casal R. 1990. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. 1era. ed. Edit. AC Madrid, 1 - 18.
- 2.- Sada-Díaz E. 1988. Inmunología de Tuberculosis. Métodos diagnósticos. En: V Seminario Regional de Tuberculosis. Public. Cient. OPS. No. 511, 36 - 44.
- 3.- Sudre P, Dam Ten G, Kochi A. 1982. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull. of the World Health Organization. 70 (2): 149 - 159.
- 4.- Barrera L, Ritacco V, Eisele C, y cols. 1989. Evaluación del enzimoimmunoensayo para el diagnóstico rápido de la Tuberculosis paucibacilar del adulto. Medicina (B. Aires). 49: 561 - 566.
- 5.- Quesada P. F. 1983. Diagnóstico inmunológico de la Tuberculosis. Salud Publ. de México. 25: 6, 601 - 611.
- 6.- Rojas E. O., Quesada P. F., Anaya N, Estrada P. S. 1978. Antimycobacterial antibodies in Tuberculosis. 1 The Counterimmunoelectrophoresis (CIE). Test. Rev. Invest. Clin. (Mex.) 30: 121 - 126.
- 7.- Lara G. L., López D. A. 1990. Manual de Tuberculosis en atención primaria de salud. Junta de Andalucía. Consejería de Salud, 9 - 15.
- 8.- Neveu P. J., Buscot N, Soullion J. P., 1980. Dissociation between humoral and cellular responses to PPD after BCG vaccination. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 62: 409 - 414.
- 9.- Turner M., Van Vooren J. P., Nyabende J, et al. 1988. The humoral immune response after BCG vaccination in humans: consequence for the serodiagnosis of Tuberculosis. Eur. Respir. J. 1: 589 - 593.
- 10.- Brostoff J. 1981. Immune complexes in the spectrum of Tuberculosis. Tubercle. 62: 169 - 173.
- 11.- Daniel T. M., Oxtoby M. J., Pinto M. E., Moreno S. E. 1981. The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 123: 556 - 559.
- 12.- Daniel T. M. 1986. Circulating Immune Complexes in Tuberculosis. Am Rev. Respir. Dis. 134: 199 - 200.

SEPTICEMIA A MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS. REPORTE DE UN CASO.

*Isabel Martínez Motas (1), Ana Sonia Patton Marisy (1), Franklin Sotolongo Padrón (2),
Oswaldo Rico Cordeiro (3), Estrella Rodríguez Bocanegra (4).*

*(1) Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo, Subdirección de Microbiología,
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.*

(2) Instituto Finlay, Cuba.

(3) Subdirección de Vigilancia Epidemiológica del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Cuba.

(4) Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Matanzas, Cuba.

RESUMEN

Se aisló *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* en una muestra de sangre (hemocultivo) obtenida de una paciente de 3 años de edad, que acudió al hospital con un cuadro febril acompañado de vómitos y petequias. Se presenta el resumen de su historia clínica incluyendo los resultados de los exámenes de laboratorio, así como los criterios utilizados en el diagnóstico microbiológico de *Moraxella catarrhalis*.

PALABRAS CLAVES: *Moraxella catarrhalis, Branhamella catarrhalis, Septicemia, Diagnóstico Microbiológico.*

ABSTRACT

Septicemia due to *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. A case Report.

Moraxella (Branhamella) catarrhalis was isolated in a blood sample (bloodculture) obtained from a three years old patient who came to the hospital with fever, vomit and petechias.

The summary of the clinical history is presented including the results of the laboratory tests as well as the criteria used in the microbiologic diagnosis of *Moraxella catarrhalis*.

KEY WORDS: *Moraxella catarrhalis, Branhamella catarrhalis, Septicemia, Microbiological diagnostic.*

INTRODUCCION

Descrita tempranamente desde 1886 por Frosch y Kolle, como otra de las especies del género *Neisseria*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, no tiene aún definida su ubicación taxonómica (1). El primer nombre propuesto fué *Micrococcus catarrhalis* y en 1920, Holland la clasificó como *Neisseria catarrhalis*. Por estudios genéticos realizados en el año 1964, se

demostró que podía estar más relacionada con el género *Moraxella* que con el de *Neisseria* (2). En publicaciones recientes aparece ya denominada como *Moraxella catarrhalis* (3, 4). Este microorganismo ha sido considerado como un comensal inocuo del tracto respiratorio superior del hombre, encontrándose como miembro de la flora normal en el 40 a 50% de los escolares sanos (4).

Desde la descripción por primera vez en 1978, de la aparición de cepas productoras de penicilinas, y la demostración de su compromiso en procesos infecciosos diversos, se ha incrementado el interés de esta especie bacteriana en el campo de la medicina humana (5).

En los últimos 10 a 15 años se ha encontrado como agente etiológico importante de otitis media, sinusitis e infecciones broncopulmonares; este microorganismo es la tercera causa más común de la primera patología citada (6).

La septicemia por esta bacteria, es un hallazgo poco frecuente, pero no excepcional; su reconocimiento como patógeno subraya la necesidad de conocer e identificar este microorganismo, por los laboratorios de microbiología clínica (7).

No teniendo conocimientos de informes similares a éste en nuestro país, consideramos de interés el reporte de este caso.

PRESENTACION DEL CASO.

Paciente del sexo femenino de 3 años de edad, con antecedentes de haber padecido enfermedad diarreica aguda, que motivó varios ingresos anteriores. En esta ocasión acudió al hospital por presentar un cuadro febril acompañado de vómitos y pequeñas manchas rojas en la piel de la cara, las cuales aparecieron durante su traslado al hospital. Fué atendida en el cuerpo de guardia de la unidad hospitalaria donde se le realizaron

exámenes complementarios (leucograma, conteo de plaquetas y punción lumbar para el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR)). Al concluirse ésta, las manchas rojas de la piel le cubrieron todo el cuerpo, aumentando de tamaño, por lo que se decidió ingresarla en el servicio de terapia intensiva del hospital pediátrico "Noel Camaño" de la provincia de Matanzas, donde se comenzó de inmediato la terapéutica.

Impresión Diagnóstica al Ingreso: Meningococcemia sin shock.

Datos Positivos al Examen Físico: Presencia de petequias en la piel con tendencia a extenderse, localizadas en cara, tronco y miembros inferiores. No se detectaron signos meníngeos.

Exámenes Complementarios: -Leucograma realizado el día del ingreso: *Conteo total de leucocitos: $7,1 / 10^9/L$, Conteo diferencial: Stabkerniger: 0.07%, Segmentados: 0.57%, Eosinófilos: 0.02%, Monocitos: 0.00%, Linfocitos: 0.34%.

Exámenes realizados al día siguiente del ingreso:

- Leucograma: Conteo total de leucocitos: $15,2 / 10^9/L$, Conteo diferencial: Stabkerniger: 0.00%, Segmentados: 0.77%, Eosinófilos: 0.00%, Monocitos: 0.00%, Linfocitos: 0.23%.

- Hemograma: Hemoglobina: 9,8 g/L, Hematocrito: 0.31 vol/L, Eritrosedimentación: 15 mm, Plaquetas: $6/10^9/L$.

- Examen Citoquímico del LCR: *Aspecto: Hemorrágico - traumático, Glucosa: 6,8 mM/L, Proteínas: 22 mg, Células: $18/10^6/L$.

- Estudios bacteriológicos realizados:

* Examen microscópico directo de petequias y LCR: No se observaron gérmenes.

* Cultivo de petequias y LCR: No se obtuvo crecimiento bacteriano.

* Hemocultivo: Crecimiento de un microorganismo con características morfológicas y tintoriales de diplococos gramnegativos, cuyas colonias eran lisas, brillantes (2 - 4 mm de diámetro), de color grisáceo, no pigmentadas, productoras de citocromo - oxidasa, que no produjeron ácido de la glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructosa y manitol.

- Tratamiento: Recibió terapia con esteroides (hidrocortisona) y antibióticos (cloranfenicol y penicilina) a la dosis estandar normadas en pediatría.

- Control epidemiológico: Se realizó quimioprofilaxis a los familiares con rifampicina, a la dosis establecida y vigilancia personal por 10 días (por ser considerado de inicio un caso de enfermedad meningocócica). No aparecieron casos secundarios entre los mismos.

Evolución: La paciente no presentó signos de shock y respondió favorablemente al tratamiento utilizado, siendo dada de alta sin secuelas aparentes.

Identificación de la cepa: La cepa aislada fué enviada al Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo para su estudio y clasificación, aclarándose, por parte del Laboratorio Provincial de Higiene y Epidemiología de Matanzas, la negatividad del resultado en las pruebas de fermentación de los carbohidratos.

En el Laboratorio Nacional de Referencia se confirmaron las características ya descritas anteriormente, realizándosele otras pruebas complementarias cuyos resultados fueron los siguientes:

- No hubo crecimiento en medios selectivos para Neisserias patógenas; Crecimiento en medio de Agar Mueller Hinton a 22 °C., Prueba de catalasa: positiva; Reducción de nitratos y nitritos: positivas; Prueba de detección de la beta - galactosidasa (ONPG): negativa; Presencia de desoxirribonucleasa (DNAsa); Hidrólisis de la Tributirina: positiva; No actividad de la Ganmaglutamil - transferasa; Aglutinación con anti-sueros de grupo para N. meningitidis: negativa.

DISCUSION

Durante la década pasada, *M. catarrhalis* era considerada un comensal inocuo de la orofaringe, sin embargo en los últimos años se ha visto involucrada en infecciones humanas diversas (8), tales como uretritis (9), oftalmía neonatorum (10), meningitis purulenta (11), endocarditis (6) e infección sistémica (12).

La septicemia por *M. catarrhalis* se presenta en una forma indistinguible del cuadro clínico de la meningococcemia, con fiebre, aparición de petequias en la piel y también lesiones en órganos internos (13); este microorganismo ha sido aislado además en sangre de pacientes con neumonía (13, 14).

El crecimiento de *M. catarrhalis* en el hemocultivo, es un indicador importante en la etiología de esta enfermedad, sobre todo cuando se trata de un cuadro clínico como el de esta paciente (muy semejante a la meningococcemia), lo cual coincide con los casos de sepsis generalizada por *M. catarrhalis* (13, 14, 15) que presentan fiebre, vómitos y hemorragias petequiales, pudiendo en algunos casos evolucionar en forma fatal (7).

En las infecciones causadas por *M. catarrhalis* juegan un papel muy importante las patologías de base (diabetes, inmunodeficiencias, leucemias, etc.) que actúan como factores predisponentes y permiten que estos gérmenes comensales se comporten como patógenos (4, 16). Sin embargo, otros autores plantean que estos

mecanismos aún no han sido bien dilucidados (6).

En este caso, no aparecen datos en la historia clínica de la paciente, que nos haga pensar que algún factor predisponente haya estado involucrado en el desarrollo de la enfermedad.

Los primeros estudios sobre el comportamiento de *M. catarrhalis*, ante diferentes antimicrobianos, demostraron su sensibilidad a la penicilina G, ampicilina, estreptomycin, polimixina B y tetraciclina, pero a partir de 1977 fueron aisladas cepas productoras de betalactamasa (17). La producción de esta enzima es la causa de la resistencia de *M. catarrhalis* a las drogas betalactámicas más usuales, e indica la necesidad de una reevaluación de la terapia antimicrobiana en las infecciones por este microorganismo. Esto puede ser preocupante en áreas donde es alta la incidencia en cepas que producen betalactamasa (18).

La paciente de este informe, evolucionó satisfactoriamente con la terapia impuesta, lo que nos hace pensar que en este caso no se trató de una cepa resistente a la penicilina, hecho que no se comprobó en el laboratorio por no haberse realizado las pruebas de sensibilidad in vitro.

La correcta identificación de *M. catarrhalis*, por parte del laboratorio de microbiología clínica, permite su diferenciación con las especies del género *Neisseria* (8, 19). El diagnóstico microbiológico de las infecciones por este microorganismo requiere de su aislamiento en las muestras clínicas investigadas.

Esta bacteria es capaz de crecer en agar sangre de carnero y agar chocolate a 35°C, así como en agar nutriente a 22°C; su posibilidad de crecer a esta temperatura es uno de los criterios utilizados para diferenciarlo de las neisserias patógenas, aunque algunos autores reportan que un porcentaje de estos microorganismos, son capaces de crecer en los medios selectivos utilizados para el aislamiento de meningococo y gonococo (6). La evidencia de la actividad lipolítica es también utilizada para este fin, ya que *M. catarrhalis* es capaz de hidrolizar la tributirina con la consiguiente producción de ácido butírico, no así las neisserias (20).

Otras dos pruebas adicionales útiles son: la producción de DNasa y la reducción de los nitratos y nitritos, ambas solamente positivas en *M. catarrhalis* (8).

Con estos resultados se pudo comprobar que la cepa aislada se correspondía con *M. catarrhalis* y no con una *N. meningitidis*, como se sospechó al momento del ingreso. Su patogenicidad quedó demostrada por el cuadro clínico y el aislamiento de este germen en el hemocultivo.

(aceptado para publicación el 11-04-94)

BIBLIOGRAFIA

1. Hellio, R.; Guibourdenche, M.; Collatz, E. and Riou, J. Y. 1988. The envelope structure of *Branhamella catarrhalis* as studied by transmission electron microscopy. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139: 515 - 525.
2. Catlin, B. W. and Cunningham, L. S. 1964. Genetic transformation of *Neisseria catharralis* by deoxyribonucleate preparations having different average base compositions. *J. Gen. Microbiol.* 37: 341 - 352.
3. Stefani, S.; Pelligrino, M. B.; D' Amico, G.; Privitera, A.; Maccarrone, G.; Russo G. and Nicoletti, G. 1992. In vitro activity of a new Broad - spectrum, betalactamase - stable oral, cephalosporin, cefiximine, in comparison with other drugs, against *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae*, *Chemotherapy.* 38: 36 - 45.
4. Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. 1992. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* Decimocuarta edición. Ed. Manual Moderno, México D. F. p. 271.
5. Philippon, A.; Riou, J. Y.; Guibourdenche, M. and Sotolongo, F. 1986. Detection, distribution and inhibition of *Branhamella catarrhalis* beta - lactamases. *Drugs.* 31, (Suppl. 3): 59 -64.
6. Morello, J. A.; Janda, W. M. and Doern, G. V. *Neisseria and Branhamella.* In Balows, A.; Hausler, W. J. (Jr.); Herrmann, K. L.; Isenberg, J. D.; Shadomy, H. J. 1991. *Manual of Clinical Microbiology.* 5th. ed. American Society for Microbiology. Washington. D. C. 258 - 276.
7. Orsini, A.; Tamalet, J. et Chanas, P. 1954. Septicémie mortelle a *Neisseria catarrhalis*. *Sem. Hop. Paris,* 30: 3498.
8. Christensen, J. J.; Gadeberg, O. and Bruun, B. 1986. *Branhamella catarrhalis*: Significance in pulmonary infections and bacteriological features. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect B,* 94: 89 -95.
9. Mac Cague, J. J.; Mac Cague, N. J. and Altman, C. C. 1976. *Neisseria catarrhalis* urethritis: a case report. *J.Urol.* 115: 471.
10. Martin, P.M.V.; Guibourdenche, M. et Riou, J. Y. 1981. A propos des *Neisseria et Branhamella* trouvées en localisation inhabituelle. *Ann. Biol. Clin.* 39: 273 - 278.
11. Cocchi, P. and Olivelli, A. 1968. Meningitis caused by *Neisseria catarrhalis*. *Acta Paediatr. Scand.* 57: 451.
12. Ninane, G.; Joly, J.; Piot, P. and Kravtman, M. 1990. *Branhamella (Neisseria) catarrhalis* as a pathogen. *Lancet,* 2: 149.
13. Doern, G. V.; Miller, M. J. and Winn, R. E. 1981. *Branhamella (Neisseria) catarrhalis* systemic disease in humans. Case reports and review of the literature. *Arch. Intern. Med.* 141: 1690 - 1692.
14. Malkamaki, M.; Honkanen, E.; Leinonen, M. and Makela, P. H. 1983. *Branhamella catarrhalis* as a cause of bacteremic pneumonia. *Scand. J. Infect. Dis.* 15: 125-126.
15. Srinivasan, G.; Raff, M. J.; Templeton, W. C.; Givens, S. J.; Graves, R. and Melo, J. C. 1981. *Branhamella catarrhalis* pneumonia. Report of two cases and review of the literature. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 553 - 555.
16. McNeely, D. J.; Kitchens, C. S. and Kluge, R. M. 1976. Fatal *Neisseria (Branhamella) catarrhalis* pneumonia in an immunodeficient host. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114: 399.
17. Buu Hoi - Dang Van, A.; Brive - Le Bouguenec, C.; Barthelemy, M. and Labia, R. 1978. Novel Beta lactamase from *Branhamella catarrhalis*. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)* 129B: 397 - 406.
18. Shurin P. A. and Van Haren, G. F. 1986. Therapy of acute otitis media caused by *Branhamella catarrhalis*. Preliminary report. *Drugs* 31 (3): 122 - 124.
19. Beecham Laboratories. *Branhamella catarrhalis*: the forgotten pathogen. 1988. *Clinical Laboratory International.* 10.
20. Riou, J. Y.; Buissiere, J.; Guibourdenche, M.; Brault, G. et Carlier, J. P. 1981. Hydrolyse de la tributyrine par les *Neisseria* et les *Branhamella*. *Ann. Microbiol (Inst. Pasteur)* 132 A.159-169.

CARACTERIZACION DE CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS GRUPO B

Isabel Martínez Motas (1) Ana Sonia Patton Marisy (1) Franklin Sotolongo Padrón (2)
Alina Llop Hernández (1) Jorge Sosa Puente (1)

(1) Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo, Subdirección de Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

(2) Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" es el responsable de la vigilancia de la circulación de cepas de *Neisseria meningitidis*. En Cuba la misma se establece en base a diferentes marcadores epidemiológicos, siendo los más utilizados el serogrupo, el serotipo y la resistencia a la sulfadiazina. Se presenta la tipificación de cepas procedentes de enfermos, remitidas de los laboratorios de la red nacional, en los años comprendidos desde 1986 hasta 1992, utilizando para este fin la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). El patrón electroforético predominante dentro de las cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B estudiadas, resultó ser el correspondiente al tipo 4, subtipo 15.

Palabras Claves: Neisseria meningitidis, Marcadores epidemiológicos, Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

ABSTRACT

Characterization of *Neisseria meningitidis* Group B strains

The National Laboratory of Reference of Meningococcus of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kouri" is the one responsible for *Neisseria meningitidis* strains circulation surveillance. This is established in Cuba using different epidemiologic markers, being the serogroup, the serotype and the resistance to sulfadiazine the most common used. The typing of the strains from patients sent from the national network laboratories in the period between 1986 to 1992 using for this purpose the polyacrylamide gel electrophoresis technique is presented. The predominant electrophoretic pattern among the studied strains of *Neisseria meningitidis* group B was the type 4, sub-type 15.

Key Words: Neisseria meningitidis, epidemiologic

markers, polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE).

INTRODUCCION

Neisseria meningitidis es uno de los agentes etiológicos más frecuentemente aislado en la meningitis cerebroespinal. Esta patología es una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, manifestándose de forma endémica y epidémica (1), aunque los niveles de infección meningocócica fluctúan de 1-3/100000 en Estados Unidos y de 10-25/100000 en muchos países desarrollados, esta enfermedad es notable por provocar grandes epidemias con tasas de ataque que pueden llegar hasta 500/100000 (2).

Se han identificado 12 serogrupos de meningococos por medio de la especificidad inmunológica de sus polisacáridos capsulares (3). Las cepas de los serogrupos A, B y C causan el 90% de casos de infección meningocócica en el mundo y el resto son producidas por cepas de los serogrupos Y y W 135 (4).

Durante muchos años la enfermedad meningocócica se convirtió en un agobiante problema de salud para nuestro país, afectado por una epidemia que comenzó en la década del 70. En 1976, el brote epidémico estaba causado principalmente por el serogrupo C. Después de una inmunización masiva con la vacuna francesa de polisacárido A - C, producida por el Instituto Mérieux, la incidencia continuó en ascenso, pero a expensas del serogrupo B. El pico de la epidemia ocurrió en 1983 con una tasa de 14,4/100000 (1).

En el año 1988, comienza la utilización de la vacuna cubana Vamengoc B-C, producida por el Instituto Finlay de Cuba, disminuyendo el número de casos hasta alcanzar en 1992 una tasa de 1,4/100000 (1).

En 1985 Frasch, propone un esquema de designación de cepas de *Neisseria meningitidis*, basado en las diferencias inmunológicas de sus antígenos celulares superficiales. Esta nomenclatura incluye polisacáridos

(serogrupo), las proteínas de la membrana externa (serotipo) y el lipopolisacárido (inmunotipo) (5).

Las diferencias de las proteínas de las clases 2 y 3, se utilizan para distinguir el serotipo y las diferencias en las proteínas clase 1, para determinar subtipos (5).

Se han desarrollado diferentes técnicas que permiten una caracterización más completa de las cepas (6, 7, 8, 9). La importancia de la tipificación, teniendo en cuenta las proteínas de la membrana externa, ha sido claramente demostrada y resulta de gran valor en los estudios epidemiológicos de la infección meningocócica (5).

Esta investigación comprende un período de 7 años (1986 - 1992) de cepas de *Neisseria meningitidis*, aisladas de enfermos durante este período; las mismas se clasificaron en serogrupos, serotipos y subtipos.

MATERIAL Y METODOS

Cepas: Fueron estudiadas 1077 cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B, procedentes de las 14 provincias de Cuba y el municipio especial Isla de la Juventud, recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", durante los años 1986 - 1992. Todas fueron estudiadas mediante pruebas de citocromooxidasa, fermentación de carbohidratos, actividad de la Beta galactosidasa y seroagrupamiento por aglutinación en lámina con antisueros específicos para confirmar el diagnóstico.

Extracción del antígeno serotipo específico (STA): Para la extracción del STA, se sembraron las cepas en agar Mueller Hinton enriquecido con suero de ternera al 7,5%, incubándose durante 18 - 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. El crecimiento así obtenido, previa comprobación de pureza, se sembró en 100 ml de caldo Soya Tripticasa y se incubó 24 horas a 37°C en una zaranda incubadora a 150 rpm. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C, durante una hora. El sedimento se resuspendió en 5 ml de una solución 0,2 Molar de Cloruro de Litio en 0,1 Molar de Acetato de Sodio, pH 5,8; manteniéndose en agitación en baño de María a 50°C durante 2 horas, en frascos plásticos con perlas de cristal de 4 mm de diámetro. Este material se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 2 horas (10).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): Se obtuvieron mediante geles de poliacrilamida - SDS al 12,5%, según métodos descritos (11). Los patrones electroforéticos que correspondieron a las proteínas de

clase 1 y de clase 2/3 en el SDS - PAGE, fueron comparados con los patrones conocidos de las cepas estandar. Se utilizaron como controles las siguientes cepas: (B4 P1: 15); H 355 (B15 P1:15); 44/76 (B15 Pi: 16); B2 (B16 B6) y B4.

RESULTADOS Y DISCUSION

El número de cepas aisladas en Cuba, ha ido disminuyendo paulatinamente, en concordancia con el número de enfermos notificados (gráfico 1). A finales del año 1988 se inició la vacunación con Vamengoc - BC, observándose una apreciable baja de la incidencia del número de casos y de las cepas aisladas a partir de esa fecha. En 1992 sólo se reportaron 94 casos y se recibieron 59 aislamientos.

La distribución del total de cepas por serogrupos en el período analizado (tabla No. 1), arroja que *N. meningitidis* serogrupo A se aisló solamente en 1986 (1,2%) y 1987 (1,0%). Este serogrupo, históricamente, ha sido la principal causa de las mayores epidemias y pandemias en el mundo (2).

En Cuba no se comportó como predominante durante estos años epidémicos (1). No sucede así en países como Brasil, Nepal, China y Africa, donde ha provocado grandes epidemias (2). En el Africa Sub-Sahariana éstas se producen en forma periódica, a intervalos de 8 - 14 años, en un área endémica clásica denominada "cinturón de la meningitis", muy susceptible a este serogrupo (12).

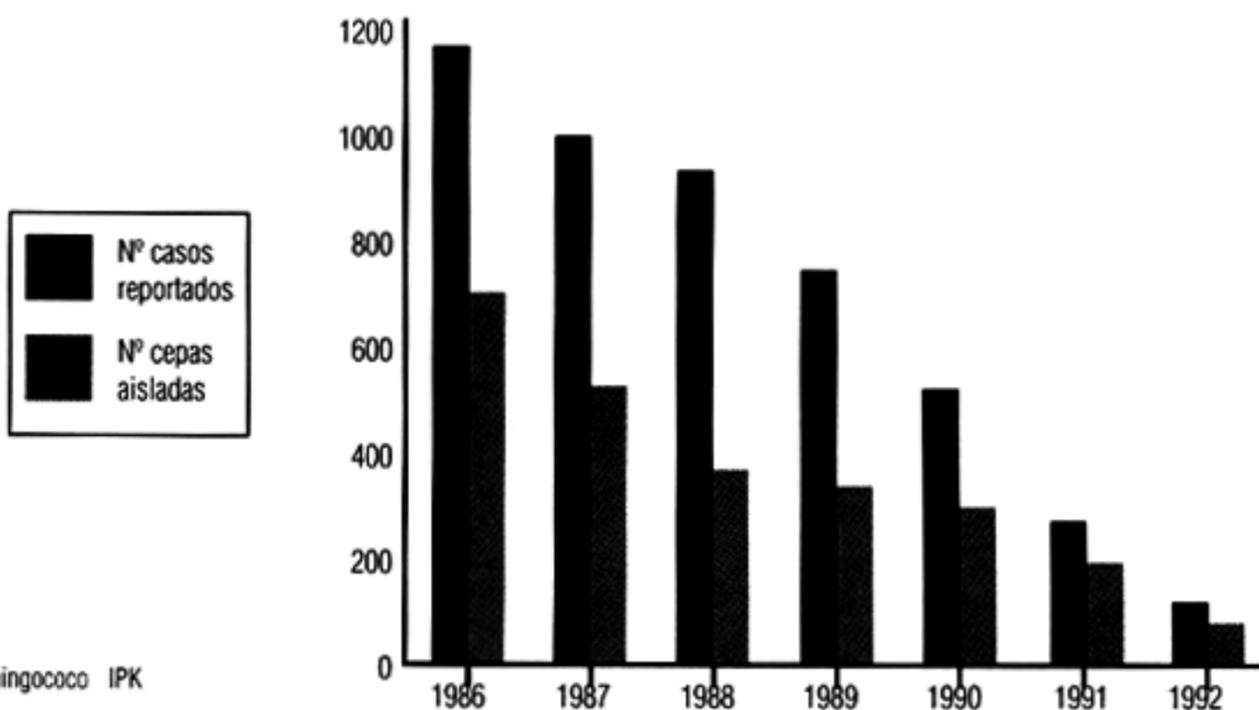
No tuvimos aislamientos de *N. meningitidis* serogrupo C, que ha sido implicado en epidemias, pequeños brotes y casos esporádicos (2).

N. meningitidis serogrupo B, ha predominado durante los años estudiados, manteniéndose por encima del 98%. Su aislamiento aumenta en Cuba, después de la aplicación masiva de la vacuna francesa de polisacárido A - C y se ha comportado como el principal agente etiológico de la enfermedad meningocócica (1).

El serogrupo B ha sido generalmente asociado con casos esporádicos y brotes localizados en países desarrollados, pero a comienzos de 1970, epidemias causadas por cepas de este serogrupo, han ocurrido en diferentes países de Europa incluyendo Noruega, Bélgica, Gran Bretaña, Dinamarca, Holanda, Islandia y España, así como muestra también un claro predominio en diferentes países de América y Asia (2, 6, 13, 14).

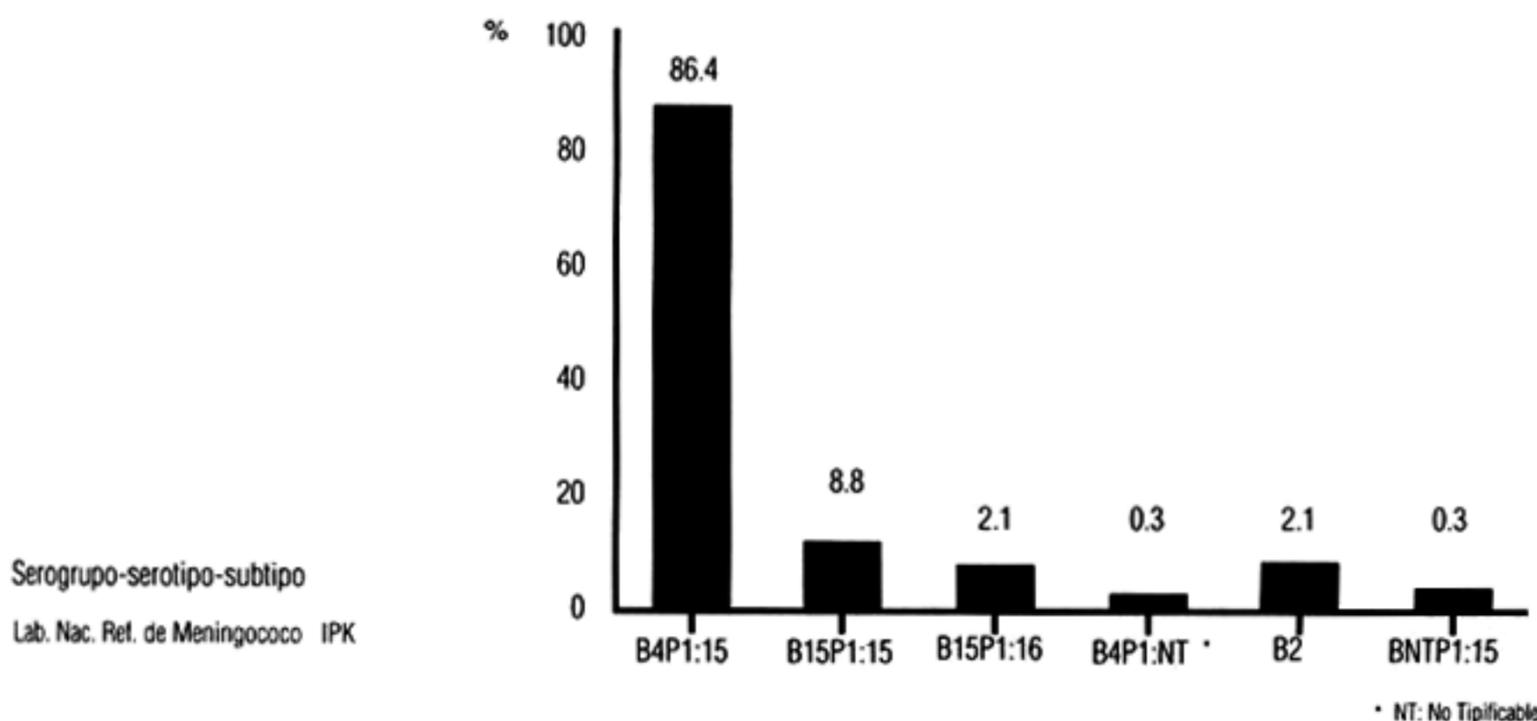
Dentro del serogrupo B de *N. meningitidis*, el serotipo y subtipo más frecuente (gráficos 2 y 3), resultó ser el B4 P1:15 (86,4%). Esta cepa predomina en nuestro

GRAFICO 1 CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE LCR y/o SANGRE 1986-1992



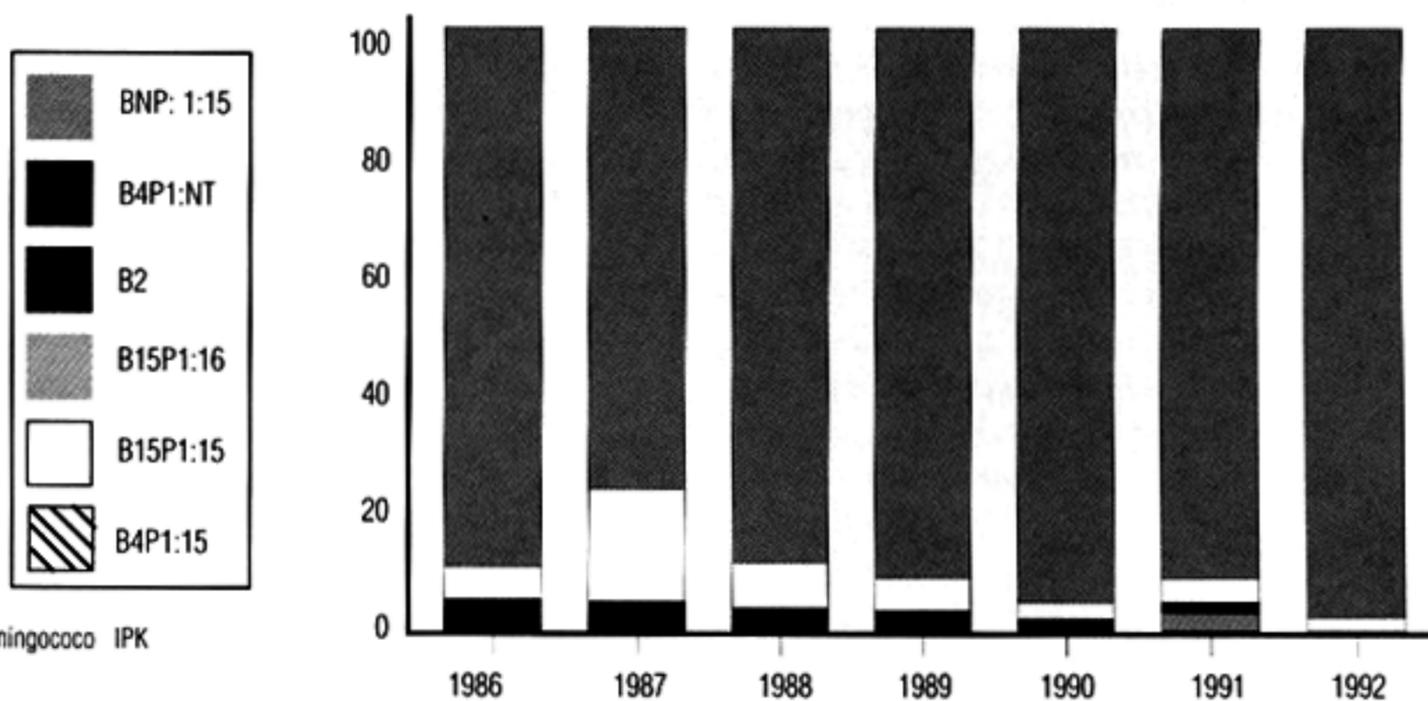
Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

GRAFICO 2 PATRONES ELECTROFORETICOS EN 1077 CEPAS DE MENINGOCOCO B. 1986-1992



Serogruppo-serotipo-subtipo
Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

GRAFICO 3 SEROTIPOS Y SUBTIPOS DE CEPAS DE MENINGOCOCO B. 1986-1992



Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

TABLA No. 1
SEROGUPOS DE MENINGOCOCO AISLADOS DE LCR Y/O SANGRE
(1986 - 1992)

Serogrupos	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992
A	1.2	1.0	0	0	0	0	0
B	98.8	99.0	100	100	100	100	100
C	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Lab. Nac. Referencia de Meningococo, IPK

país desde finales de la década del 70 y en otros estudios realizados muestra también su prevalencia en portadores (1).

El uso de marcadores epidemiológicos cada vez más sofisticados, ha permitido demostrar, que con frecuencia un solo clon es responsable de una epidemia y que éste puede dispersarse a otras áreas del mundo (6).

Las cepas B4 P1:15 fueron clasificadas por electroforesis de enzimas multilocus como pertenecientes al complejo ET5. Este clon es responsable de brotes en varios países europeos y se ha difundido a otras partes del mundo que incluyen a Cuba, Chile, Brasil y Estados Unidos (15).

Otros serotipos encontrados fueron: B15 P:15 (8,8%), B15 P1:16 (2,1%), B2 (2,1%), B4 P1:NT (0,3%) y B NT P1:15 (0,3%).

Durante los años estudiados no se observaron cambios en las cepas circulantes. No se comprobó variación en el serogrupo ni en los serotipos de *N. meningitidis* aislados.

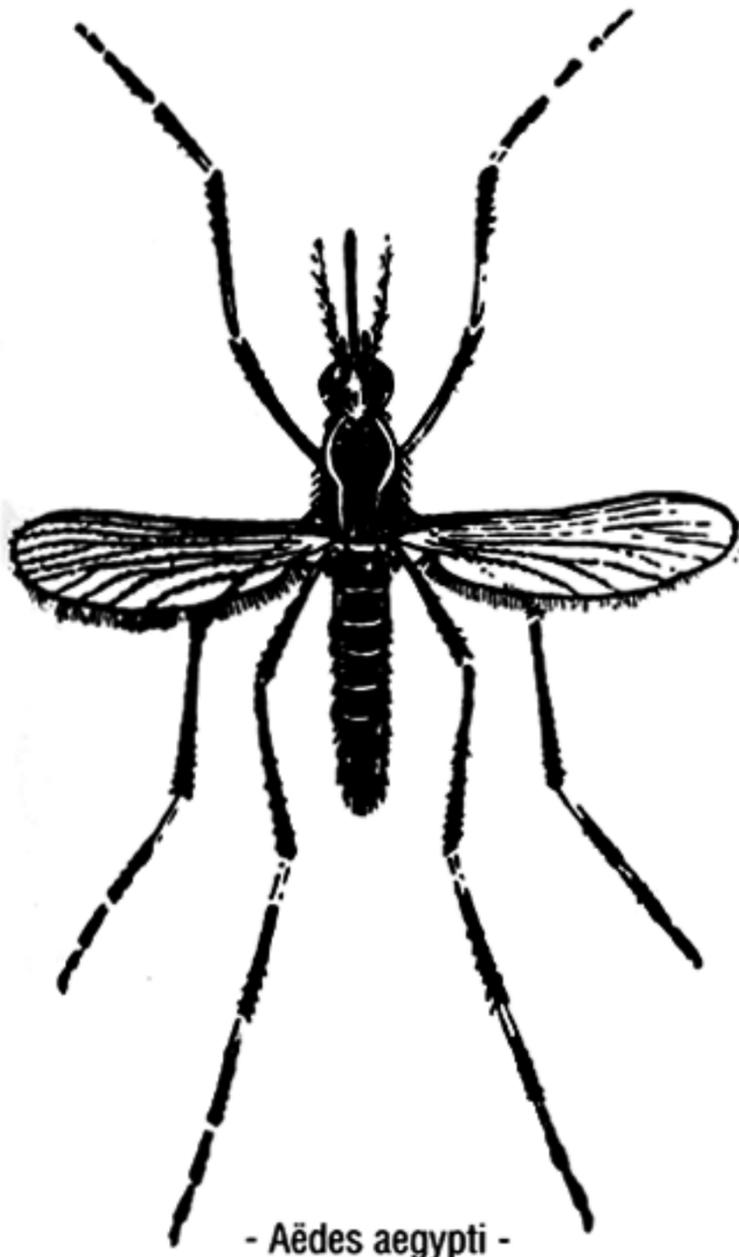
Este estudio ha permitido establecer la historia microbiológica de la epidemia que ha azotado a Cuba y ha contribuido a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad meningocócica.

(aceptado para publicación el 11-04-94)

BIBLIOGRAFIA

- 1 Valcárcel, Novo, M; Rodríguez, Cruz, R. y Terry, Molinert, H. 1990. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. Editorial Ciencias Médicas, Habana, Cuba.
- 2 Schwartz, B.; Moore, P. S. and Broome, C. V. Global Epidemiology meningococcal disease. Clin. Microbiol. Rev. 1989. 2: S 118 - 124.
- 3 Jawetz, E.; Melrich, J. L. and Adelberg, E. A. 1992. Microbiología Médica. Decimocuarta edición. Ed. Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D.F.
- 4 Peltola, H.; Kataya, J. M. and Makela, P. H. 1982. Shift in the age distribution of meningococcal disease as a predictor of an epidemic. Lancet. 595 - 597.
- 5 Frasch, C. E.; Zollinger, W. D. and Poolman, J. T. 1985. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and scheme for designation of serotypes. Rev. Infect. Dis. 7 (4) 504 - 510.
- 6 Caugant, D. E.; Mocca, L. F.; Zollinger, W. D. and Selander, R. K. 1986. Intercontinental spread of genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. Proc. Natl. Acad. 83: 4927 - 4931.
- 7 Wedege, E. E.; Hoiby, E. and Froholm, L. O. 1990. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by coagglutination, dot-blotting and Elisa. J. Medical. Microbiol. 31: 195 - 201.
- 8 Bygraves, J. A. and Maiden, J. C. J. 1992. Analysis of clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol. 138: 531 - 532.
- 9 Abdillahi, H. and Poolman, J. A. 1987. Typing of group B *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies in the Whole - Cell Elisa. Feems. Microbiol. Lett. 48: 367 - 371.
- 10 Frasch, C. E. and Chapman, S. S. 1972. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes II: Extraction of type - specific antigens for serotyping by precipitating techniques. Infect. Immun. 6: 127 - 133.
- 11 Laemli, V. K. and Farve, M. 1973. Maturation of the head Bacteriophage T4. DNA packagen events. J. Mol. Biol. 80: 575 - 599.
- 12 Moore, P. S.; Plikaytis, B. D.; Bolan, G. A.; Oxtoby, M. J.; Yada, A.; Zoubga, A. Reingoed, A. and Broome, C. 1992. Detection of meningitis epidemics in Africa: A population based analysis. Internat. J. Epidemiol. 21: 155 - 162.
- 13 Saez Nieto, J. A.; Marcos, C. y Casal, J. 1988. Diez años de meningitis meningocócica en España (1978 - 1987). Actividad del Laboratorio de Referencia de Meningococo y comentarios epidemiológicos sobre la onda actual. Monografía. Instituto Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.
- 14 Stroffolini, T. and Carbonari, P. 1989. Meningococcal disease in Italy. Eur. J. Epidemiol. 1982, 8: 114 - 116.
- 15 Caugant, D. A.; Froholm, L. O.; Bovre, K.; Holten, E.; Frash, C. E.; Mocca, L. F.; Zollinger, W. D. and Selander R. K. 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET5 complex. Antoine Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. 53: 359 - 394.

LA HISTORIA DE UN GRAN DESCUBRIMIENTO CIENTIFICO



- Aedes aegypti -

Rosario Beauperthuy de Benedetti

Individuo de número de la Academia Nacional de Historia de la Medicina

Miembro de la Sociedad Francesa de Historia de la Medicina

Ex-Vicepresidenta de la Sociedad Internacional de Historia de la Medicina

Laureada de la Academia de Medicina de París Premio Dr. Burgkly

-1966

He dedicado casi toda mi vida a investigar lo que se ha escrito sobre Luis Daniel Beauperthuy, principalmente de su descubrimiento del vector de la fiebre amarilla; gran parte de este material se encuentra en "Juicios y Comentarios a la Obra de Beauperthuy" 1964 - 1969. Prosiguiendo mi trabajo tengo otros muy interesantes que se publicarán en español como hice con los anteriores; entre los más recientes se encuentra la publicación, contenida en "Journal of the Royal College of Physicians of London" Vol. 20 Né 2 April 1986. Allí nos dice el profesor Alex Sakula:

"Louis Daniel Beauperthuy, es Pionero en la Fiebre Amarilla y en la Investigación de la Lepra" y más adelante afirma: "Las proezas en Medicina Tropical de Luis Daniel Beauperthuy han sido reconocidas desde hace tiempo por historiadores médicos"...

Beauperthuy nace el 26 de agosto de 1807 en Santa Rosa, Guadalupe, isla en el Caribe, posesión francesa, donde su padre Pierre Daniel Beauperthuy descendiente de una antigua familia de Perigord, ejerce la Medicina y se casa en 1805 con Marie Laurence Desbonnes Bélasse, también francesa. El segundo de sus seis hijos es Louis Daniel, educado en Francia desde los 13 años. Estudia Medicina en la Facultad de Medicina de París, que tiene como Decano a Mateo Orfila (1787-1853) y entre sus maestros figura Francois Magendie (1783-1855). Además sigue cursos de botánica, entomología y desarrolla un vivo interés por la historia natural. Se apasiona por las revelaciones del microscopio y como actividad extra en sus estudios, sigue el curso de microscopía impartido por Alfred Donné (1801-78).

Durante sus vacaciones estudiantiles, retorna a la región caribeña donde las enfermedades tropicales como la fiebre amarilla corriente, desde entonces comienza a germinar la semilla de su idea de la transmisión de enfermedades del hombre por insectos, especialmente mosquitos.

En 1837 obtiene el título de Médico en París con su tesis doctoral "De la Climatologie" donde desarrolla la teoría insectil. Luego el Museo de Historia Natural de París, le nombra "Viajero Naturista". Durante cuatro años recorre costas, llanos y llega a explorar la cuenca del Orinoco llevando a cabo investigaciones sobre la flora y fauna del país, de todo lo cual envía muestras al Museo de Historia Natural de París junto con sus importantes observaciones antropológicas.

Beauperthuy empieza a fijar su atención en los mosquitos o zancudos al descubrir que el gusano zancudo (cuterebra de Linneo) cava galerías en la piel del hombre. En su tesis doctoral describe al insecto e indica

como extraerlo. Estos insectos no volvieron a ser estudiados sino un siglo después por notables entomólogos. Al año siguiente, (1835), Beauperthuy está de regreso en París, continuando sus estudios médicos.

Además Beauperthuy estudia en París, microscopía y como consecuencia de sus investigaciones microscópicas, pierde la fé en la teoría de los miasmas, que se le había enseñado; su genio trata de penetrar el misterio de la causa y naturaleza exacta de las enfermedades endemo-epidémicas. Se comprende como nuestro hombre de ciencia quiso alejarse de las ideas que reinaban en esa época en los centros científicos, demasiado apegados a la vieja doctrina de los miasmas. Se dedica como todo un revolucionario apartando la ciencia oficial para consagrarse plenamente, y sin ninguna idea preconcebida, a sus investigaciones científicas. De 1838 a 1853 Beauperthuy observó la fiebre amarilla en Guadalupe, Caracas, Cumaná, Barcelona, Apure y la Guayana. En esta última fecha se desata una gran epidemia de fiebre amarilla, podríamos decir mundial; hace sus estragos en Venezuela, principalmente en Cumaná. A propósito dos eminentes entomólogos expresan:

En 1841, durante una de sus expediciones en Venezuela, hace alto en la ciudad de Cumaná, allí conoce a la dama venezolana: Ignacia Sánchez Mayz, con quien se casa en 1842, tuvieron tres hijos y definitivamente se instala en la Primogénita del Continente. En 1844 obtiene la reválida de su título de Doctor en Medicina en la Facultad de Medicina de Caracas; ejerce la profesión con la intención de consagrar su vida a la investigación de las enfermedades tropicales como podemos leer en su Libro: "I Congreso Venezolano de Salud Pública y III Conferencia Nacional de Unidades Sanitarias", Caracas 1956; encontramos que en "Estado actual de la fiebre amarilla" los doctores: Rumeno Isaac Díaz y Pablo Anduze, citan: "Continuando con los extractos tomados de los Archivos de Historia Médica de Venezuela por el preclaro médico historiador Plácido Daniel Rodríguez Rivero, llegamos a las primeras citas de 1693 en "Calenturas y vómitos" como llamaban para esa época a la Fiebre Amarilla... y del excelente Informe que presentan al Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, los doctores Arturo Guevara y A. González Puccini hace casi 20 años, no hemos titubeado en extraer párrafos enteros de citas históricas, pues nadie duda que difícilmente puede igualarse el estilo claro, conciso y ameno con que ellos exponen los datos históricos, nosotros hemos permitido copiar lo siguiente: "Uno de nuestros clásicos historiadores de antaño, Blas José

Terrero, escribiendo allá por los años de 1787, narra las calamidades de Caracas, aumentadas por haber sido acometida a un mismo tiempo del mortal vómito negro".

El historiador Rodríguez Rivero en "Epidemias y Sanidad en Venezuela" a propósito del brote de 1693 escribe: "Como promesa por su extinción, el obispo Diego de Baños construyó con limosnas de sus moradores un templo pajizo consagrado a Santa Rosalía de Palermo"... El Cabildo de Caracas consultó sobre medidas de prevención que había de tomar, al doctor Gabriel Rodríguez Liendo, quien en su contestación destaca: "En 1743 las fiebres atacaron la Expedición de Solano durante la navegación, desde la isla de Trinidad hasta Guayana, matando la mayor parte de su gente".

Otros señalan: "En los años: 1844, 1850 y 1853 la epidemia abarca gran parte de Venezuela".

En 1841 arribó a nuestras playas un médico francés, el Dr. Luis Daniel Beauperthuy, joven apasionado por las ciencias y embargado por las normas sublimes de su profesión. Ya en su tierra nativa de Guadalupe había tenido la oportunidad de estudiar casos de Fiebre Amarilla. Oyó decir lo que todo navegante del Caribe sabía, que Venezuela era uno de los peores focos endémicos del Continente y ese fué el aliciente que lo trajo a nuestra patria, a Cumaná. Desde su llegada hasta 1853 vislumbraron sus ojos el cuadro dantesco de una ciudad moribunda; cada año un nuevo brote de Fiebre Amarilla y el mismo carro macabro recogiendo cadáveres, de casas abandonadas marcadas con cruces. Ese último año el aspecto de la ciudad era aún más tétrico pues entre los escombros de la ciudad arrasada por el terremoto, sólo vagaban canes famélicos y sombras escuálidas de una soldadesca revolucionaria derrotada, hambrienta y enferma. Durante esos años logró aquel hombre encontrar tiempo para fundar una familia y tiempo para cristalizar una teoría de la que él mismo se asombra. Había comprobado lo que ya de la antigüedad se conocía, cierto paralelismo entre insectos y enfermedades. Había comprobado la relación entre los zancudos de las ciénagas y las fiebres palúdicas ("fiebres intermitentes") y entre los zancudos domiciliarios y la fiebre amarilla ("tifus icteroides").

Observó la manera como éstos picaban y viendo el flujo de líquido por sus trompas pensó: "al chupar la sangre introducen en el organismo humano un virus animal o vegeto-animal". Por primera vez en la historia de la medicina se culpa directa e inequívocamente al vector de una enfermedad.

He aquí la teoría científica expuesta por Beauperthuy:

"No se puede considerar a la fiebre amarilla como una afección contagiosa. Las causas de esta enfermedad se desarrollan en las condiciones climáticas que le permiten extenderse a la vez o sucesivamente sobre varias localidades". Esas condiciones son: la elevación de la temperatura, la humedad, el vecinaje de cursos de agua, de lagunas, la poca elevación del suelo sobre el nivel del mar. La primera víctima fué un hombre de la isla de Margarita, quien tomó allí el germen de la enfermedad y los mosquitos la propagaron.

No causa estragos en las regiones del interior de la provincia de Cumaná. Es desconocida en los fértiles valles de Cumanacoa, San Antonio, San Francisco, Guanaguana y Caripe, valles destinados a ser con el tiempo grandes centros de población y cuya altitud varía de 200 a 800 metros...

Más adelante describe: "Las tófulas introducen en la piel su chupón, compuesto de un aguijón canalizado punzante y de dos sierras laterales, ellos instilan en la herida un licor venenoso que tiene propiedades idénticas a aquellas del veneno de las serpientes con colmillos. Ablanda los glóbulos de la sangre, determina la ruptura de sus membranas tegumentarias, disuelve la parte parenquimatosa, facilita la mezcla de la materia colorante con suero. Esta acción es en cierto modo instantánea, como lo demuestra el exámen microscópico, ya que la sangre absorbida por estos insectos, al momento mismo de la succión, no presenta glóbulos. Esta acción disolvente parece facilitar el paso del fluido sanguíneo en el conducto capital del chupón. Si el insecto es interrumpido en la operación de la succión, todo el veneno queda en la herida y produce una viva picazón más que cuando una gran parte del fluido venenoso es rebombeado con la sangre. Se atribuye sin motivo la picazón a la ruptura del aguijón; este aguijón es una substancia córnea elástica, cuya ruptura no he observado jamás en mis numerosas observaciones".

Sobre la malaria, Lancisi en 1717 llegó cerca de la solución del enigma al sugerir su inoculación por medio de mosquitos; no obstante volvió a la teoría del miasma que prevaleció largo tiempo, ciento treinta y siete años hasta Beauperthuy, en perjuicio de la verdad.

Beauperthuy, contrariamente a la doctrina vigente de miasmas o exhalaciones, sostuvo su teoría hasta su muerte.

Su biógrafo Dr. Casey Wood, de paso por la Guayana, destaca que Beauperthuy, en 1868 mandó a construir canales de drenaje en la isla de Kaow, para evitar criaderos de mosquitos.

Nuestro sabio Rísquez, al establecer el orden

cronológico de este descubrimiento lo encabeza con Beauperthuy en 1854 al igual que el célebre historiador Aristides Moll: "1854 Beauperthuy conecta los mosquitos con la fiebre amarilla" Garrison en "History of Medicine" 1929; "1854, Beauperthuy formula la teoría de la transmisión de la fiebre amarilla por el mosquito". James y Harwood "Medical Entomology": "Beauperthuy (1854) formuló una excelente teoría que los mosquitos son responsables de la Fiebre Amarilla". El Dr. Antonio Sanabria en: "El papel de los mosquitos en la transmisión de la fiebre amarilla" 1971 demuestra que Beauperthuy es el descubridor y Sir John Boyd "Tropical Diseases Bulletin" 1972 escribe: "Beauperthuy aseguró que la fiebre amarilla se propaga por la picada del mosquito y no por contagio como se pensaba entonces" y asimismo la Academia de Ciencias de París en 1912 al premiar los trabajos sobre el papel de los mosquitos en la propagación de la fiebre amarilla, reconoció públicamente que "Beauperthuy lo adelantó desde 1854... Finlay lo defendió en 1881... y la Comisión Americana hizo la más completa demostración en 1900".

Beauperthuy seguro de la verdad que contenía su nueva doctrina insectil para la fiebre amarilla y convencido de que era una verdad que no pasaría mucho tiempo para que fuese aceptada, presintió también que vendrían otros que quisieran hacerla suya; no dudó en escribir: "quiero asegurarme la prioridad de mi descubrimiento" y asimismo nos dejó abundantes razones que nos permitieran reconocer el justo título que le corresponde: "Descubridor del agente transmisor de la fiebre amarilla".

Para los científicos contemporáneos de Beauperthuy la tarea fue dura, no contaban con laboratorios bien equipados y medios fáciles de comunicación mundial que permiten saber rápidamente, si un descubrimiento científico, lo es realmente.

No nos extraña que muchos se mantuvieran aferrados a la doctrina del miasma por largos años entre ellos el distinguido estudiante barinés Salvano Velazco al presentar su tesis en 1861, ante la Facultad de Medicina de París no cree en los mosquitos al igual que el renombrado Dr. Manuel Dagnino, quien al publicar su excelente trabajo sobre el tratamiento de la fiebre amarilla siguió creyendo en el origen miasmático hasta tan tarde como 1888.

En cambio: "El eminente Dr. Rafel Herrera Vegas, exilado desde 1870 condecorado en París de la teoría de Beauperthuy fue su difusor y propagador en los países meridionales de América del Sur: Argentina, Uruguay y Chile", cita el Dr. Julio de Armas.

El historiador francés, profesor Blanchard, escribió en 1914: "Beauperthuy ha visto justo en cuanto al papel desempeñado por los mosquitos en la transmisión de las grandes endemias de la América Tropical: la fiebre amarilla y el paludismo, y reconoció que en su ausencia no las hay". Además declaró al igual que el Dr. Montestruc y otros historiadores de la Medicina, "No puedo admitir la opinión de Guiteras, quien en su lucha por la prioridad, tergiversa la teoría de Beauperthuy, yendo en contra del sabio que rindió un gran servicio a la Humanidad, por el hecho de haberse adelantado 27 años a Finlay, olvidando que la ciencia no tiene patria; pertenece al patrimonio común de la Humanidad".

Mas, no son todos los historiadores cubanos, otros como el Dr. Luis Perna de Salamó en sus escritos sobre fiebre amarilla 1884 y 1896, así mismo el Dr. Nicasio Lugo Viña y Carta 1909 y el Dr. Arístides Agramonte en sus importantes trabajos en 1907, 1908 y 1915, reconocen la prioridad de Beauperthuy en el descubrimiento del vector de la fiebre amarilla.

En el Acta de la sesión Pública Ordinaria de la Academia de Ciencias de la Habana del 13 de diciembre de 1907, de la cual transcribo: "El Dr. Le-Roy dá lectura al siguiente párrafo del trabajo del Dr. Beauperthuy, exhumado de la "Gaceta Oficial de Cumaná" por el Dr. Agramonte: "Los agentes de esta infección (fiebre amarilla) presentan gran número de variedades, no siendo todas igualmente dañinas. La variedad zancudo bobo, de patas rayadas de blanco, es hasta cierto punto la especie doméstica, la más común y su picada es relativamente menos penosa que la de otras especies". Es bastante exagerado decir que exhumó dicha Gaceta, no olvidemos que entre los trabajos de Beauperthuy y los de Finlay no mediaron tantos años y cabe aquí la pregunta que hiciera nuestro ilustre compañero desaparecido, doctor Jesús Yerena: ¿és que una aseveración dicha 27 años antes puede considerarse vieja?.

Seguí con interés consultando la Revista "Anales de la Academia de Ciencias de La Habana" referente a la misma sesión del 13 de diciembre de 1907, se vuelve a hablar de Beauperthuy y a pesar de tergiversar sus escritos llegan a la conclusión de que "las respectivas teorías de los Dres. Beauperthuy y Finlay ofrecen de común el MEDIO TRANSMISOR de la fiebre amarilla, el mosquito".

Llevado de su afán científico y filantrópico por curar la lepra, se traslada a los sesenta y cuatro años de edad a la Guayana donde gracias a él, el Gobierno británico construye el Primer Hospital del Mundo para dar tratamiento a los enfermos de lepra. Le sorprende la

muerte por "appoplexi sudden" el día 3 de septiembre de 1871. Horas antes conversa cordialmente con el Dr. Gavin Milroy, enviado por el Real Colegio de Médicos de Londres; mostrándose complacido por la aprobación de notables mejorías alcanzadas con su Método, leemos en "The Lancet" "Sept. 6, 1873 p. 339 - 40.

He aquí su último pensamiento: "Que la palabra incurabilidad se borre de la historia de la lepra".

• • •

THE HISTORY OF A GREAT SCIENTIFIC DISCOVERY

-SUMMARY

In 1854, at a time when insect transmission of diseases was unknown in Medicine, Beauperthuy, in Cumaná - Venezuela - discovered and showed scientifically for the first time, that yellow fever and malaria were transmitted by mosquitoes. He used the mosquito-net to demonstrate his theory; he underlined the most important fact: that where there are no mosquitoes, yellow fever cannot propagate itself. The measures which he indicated to prevent that disease constitute the basis of the prophylaxis against yellow fever: the eradication of the mosquito, the use of the mosquito-net and modern immunization.

His discovery was published in Cumaná in 1854 and was communicated to the Academy of Sciences in Paris in 1856; the latter published it in the "Compte Rendu" this same year. It can also be found in his book "Travaux Scientifiques". His work had great repercussion and was known in Habana by investigating physicians of the period; reference was made of it six years later when investigations concerning yellow fever started in the island.

In 1912, the Academy of Sciences in Paris, when granting prizes to Finlay and the American Commission for their work on the transmission of yellow fever by mosquitoes, recognized that Beauperthuy had already anticipated them since 1854.

In the struggle for the priority of this discovery, certain authors wanted to ignore the importance of Beauperthuy's work, but for History Beauperthuy must remain as the man who discovered the scientific theory of the transmission of yellow fever by mosquitoes.

(aceptado para publicación el 11-04-94)