

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

Obtención de un conjugado látex inmunoglobulina para el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*

Lic. Ivette Espinosa,¹ Dra. Elba Álvarez,² Lic. Cintia Amaral,³ Dra. Magaly Alonso⁴ y Lic. Maité Lorenzo³

RESUMEN

Para la obtención de un látex globulina anti-*Gardnerella vaginalis* se obtuvieron inmunosueros específicos, contra una cepa de referencia (ATCC 14018) y contra un *pool* de cepas de aislamientos clínicos; estos inmunosueros se caracterizaron por PAGE-SDS e *immunoblotting*, donde se observó una estrecha relación antigénica entre las cepas de aislamientos clínicos y la cepa de referencia. Los conjugados de látex globulina obtenidos a partir de estos 2 inmunosueros fueron evaluados *in vitro* y se obtuvo un nivel de detección 10⁶ ufc/mL de *Gardnerella vaginalis*. Estos 2 conjugados también fueron evaluados a partir de muestras clínicas y se compararon con el cultivo de *G.vaginalis* y los criterios tomados en cuenta para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana. El conjugado látex globulina anti *pool* de cepas (II) resultó más sensible y específico, que el látex globulina anti-*G. vaginalis* cepa ATCC (I).

Descriptor DeCS: GARDNERELLA VAGINALIS/aislamiento y purificación; VAGINOSIS BACTERIANA/diagnóstico; TESTS DE FIJACION DE LATEX.

El ecosistema vaginal es un medio complejo que consiste en la interrelación entre la microflora endógena, sus productos metabólicos, los niveles de estrógeno y el pH. La vaginosis bacteriana se produce cuando se altera el ecosistema local por la acción de antibióticos, hormonas, medicamentos, contraceptivos (oral y tópicos), enfermedades de transmisión sexual, estrés y los cambios de pareja.¹

La etiología de esta enfermedad no está totalmente definida, aunque desempeña un papel importante el reemplazo de los *Lactobacillus spp* predominantes en la flora vaginal por *Gardnerella vaginalis* en asociación con otras bacterias anaerobias y aerobias entre las que predominan: *Peptoestreptococcus spp*, *Bacteroides spp*, *Mycoplasma hominis*, *Peptococcus spp* y bacilos curvos anaerobios correspondientes a *Mobiluncus curtisii* y *Mobiluncus mulieris*.^{2,3} La vaginosis bacteriana resulta una infección molesta por la abundante secreción y el olor característico que

provoca, así como su recurrencia. En ocasiones se asocia también con fiebre posoperatoria, endometritis, salpingitis, inflamación pélvica, riesgos de infertilidad y otras complicaciones ginecoobstétricas como la infección del fluido amniótico y el bajo peso al nacer.⁴⁻⁶

El diagnóstico tradicional de la vaginosis se basa en el examen clínico y la identificación de 3 de los 4 criterios propuestos por *Amsel* y otros⁷: secreción vaginal homogénea, el pH superior a 4,5, prueba de olor a aminas con KOH positiva y presencia de células guías. También se reportan la detección de las diaminas producidas por el metabolismo bacteriano durante esta infección a través de electroforesis y cromatografía en capa delgada; estas pruebas resultan laboriosas y consumen tiempo.⁸⁻¹⁰ *Harvard Davis* en 1991¹¹ desarrolló una variante más rápida y menos laboriosa de la prueba de aminas. La inmunofluorescencia indirecta, los inmunoensayos ligados a fase sólida y la reacción

¹ Aspirante a Investigadora.

² Investigadora Agregada.

³ Reserva científica.

⁴ Investigadora Titular.

en cadena de la polimerasa con la utilización de los genes de los RNA ribosomales 16s y 23s, también se han usado en la detección de *G. vaginalis*.¹²⁻¹⁴

Este trabajo tiene como objetivo la obtención de un conjugado látex inmunoglobulina para la detección rápida de *G. vaginalis* en muestras clínicas.

MÉTODOS

Cepas: La cepa 14018 procedente de la *American Type Collection Cultures* (ATCC) y 4 cepas obtenidas a partir de aislamientos clínicos identificadas por Api 20 Strep y denominadas 18, 11, 13 y L.

Medios de cultivo: agar Columbia y suplemento de antibióticos procedente de la Oxoid enriquecido con sangre humana 5 % y medio líquido Casman. Los cultivos en placas se incubaron en jarras con la utilización de sobres de anaerobiosis.

Obtención de antígeno de la cepa 14018 y de los aislamientos clínicos: se realizaron pases sucesivos en volúmenes de 5, 50, 250 mL de medio Casman. El cultivo final se centrifugó 12000 gravedades durante 30 min. y se realizaron 3 lavados con solución salina, el sedimento final se resuspendió en 5 mL de solución salina y se sonicó con 5 ciclos de 20 amplitudes y de 10 s cada uno. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry modificado.¹⁵

Obtención de los inmunosueros: se inmunizaron 2 carneros raza Pelibuey con 2 antígenos, I (a partir de la cepa 14018) y II (mezcla de las 4 cepas de aislamientos clínicos) en una dosis de 2 mg/ mL de proteína. Los inmunosueros se evaluaron por inmunodifusión doble con agarosa 1 % a los 10 d de cada inoculación. Cuando se alcanzaron títulos altos se precipitaron las inmunoglobulinas totales con sulfato de amonio 70 % y se dializaron contra tampón glicina.

Caracterización de los antígenos de las cepas clínicas y de la cepa ATCC por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE según la técnica de Laemmli:¹⁶ Los antígenos se utilizaron en

concentración 1 mg/mL diluidos en *buffer* muestra (62,5 mmol tris HCl pH 6,8, 10 % mecaptopetanol, 0,25 % bromofenol azul, 5 % glicerol y 2 % de SDS). Se utilizó un patrón de peso molecular de amplio rango de la Biorad. La determinación de los pesos moleculares se realizó por el método de los mínimos cuadrados, mediante el sistema automatizado para el análisis de electroforesis bandas (ISACA. Bandas-Grupo de Cibernética. Centro de Bioplantas. 1994).

Las bandas separadas por SDS-PAGE se examinaron por *immunoblotting* según procedimiento descrito por Kynse y Andersen,¹⁷ las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se enfrentaron con el inmunosuero de carnero obtenido con el antígeno I y conjugado anti-IgG de carnero, diluidos en tampón fosfato tween 20 (PBS-T).

Preparación del conjugado látex-inmunoglobulina: A partir de los 2 inmunosueros obtenidos se prepararon 2 conjugados I y II. Se utilizaron partículas de látex de poliestireno de 0,81 μ m a 10 %, albúmina sérica bovina 1 % diluida en tampón glicina pH 8,2. Se evaluaron diluciones de los conjugados frente a suspensiones de *G. vaginalis* de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 ufc/mL y otros microorganismos (*Candida albicans* 10^6 ufc/mL, 10^4 *Trichomona vaginalis* y 10^8 ufc/mL de *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Listeria sp*). Se utilizaron tampón glicina y solución salina como controles negativos, así como un conjugado látex-inmunoglobulina de carnero no inmunizado diluido 1/64.

Ambos conjugados se evaluaron en muestras clínicas tomadas del fondo del saco vaginal de pacientes que se atendían en el hospital ginecoobstétrico "Ramón González Coro" y se compararon con el cultivo microbiológico para *G. vaginalis* y los criterios establecidos por Amsel para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana.

RESULTADOS

Se obtuvieron inmunoglobulinas con título de 1/64 por IDD a los 73 d posinmunización con el antígeno I y a los 103 d con el antígeno II.

CARACTERIZACIÓN POR SDS-PAGE E INMUNOBLOTTING

La cepa ATCC 14018 y las 4 cepas de aislamiento clínico mostraron un patrón electroforético similar. En todas las cepas se encontraron las bandas de 90 K, 65 K, 48 K, 35 K, 28 K y 19 K. Las bandas de 109 K y 54 K sólo estaban presentes en la cepa 14018 ATCC y en 2 aislamientos clínicos 18 y 11 (fig. 1).

En la optimización de las condiciones del *immunoblotting* la concentración de 500 µg/mL permitió una buena resolución en la separación y transferencia de las bandas. Las diluciones óptimas de los sueros de carnero y el conjugado anti- IgG fueron de 1/100 y 1/1000, respectivamente. Se detectó que el suero control negativo reconoció 2 bandas de 74 y 53 K en todos los aislamientos clínicos, pero la intensidad de la señal fue muy débil.

El antisuero obtenido a partir de la cepa 14018 reconoció las proteínas de 90 K, 74 K, 65 K, 48 K y 35 K en todas las cepas analizadas, lo que demuestra la estrecha relación inmunogénica entre

éstas (fig. 2). Por otra parte el inmunosuero obtenido por inmunización con el inmunógeno II sólo reconoció las bandas de 65 K, 48 K y 35 K en todas las cepas.

Las diluciones óptimas de los conjugados látex-inmunoglobulina I y II fueron 1/64 y 1/16, respectivamente; no se observó aglutinación con la solución salina, el tampón glicina ni con las suspensiones de los microorganismos incluidos en el estudio. En esta dilución el conjugado I detectó 10^6 ufc/mL de todas las cepas de *G. vaginalis* y el conjugado II, 10^6 de las cepas 18 y 13, y 10^7 de las cepas L, 11 y 140018 ATCC.

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de la evaluación de ambos conjugados en el Hospital "Ramón González Coro". Del total (41) de muestras 9 fueron indeterminadas porque aglutinaron con el conjugado látex control negativo. En la tabla 1 se observa la comparación de ambos conjugados con la identificación microbiológica de *G. vaginalis* y en la tabla 2 en relación con el diagnóstico de la vaginosis bacteriana al considerar positivo 3 de los criterios propuestos por *Amsel* y otros⁷ (células guías, amino olor, pH y secreción vaginal).

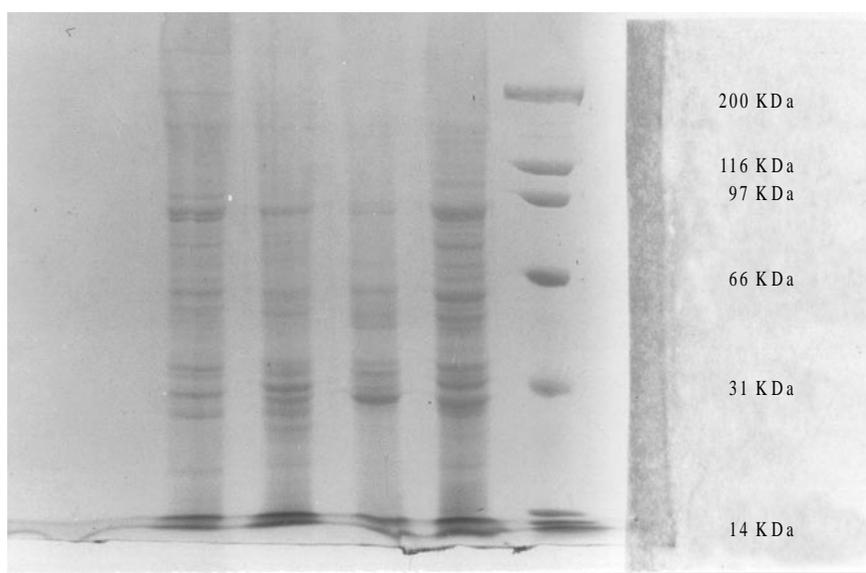
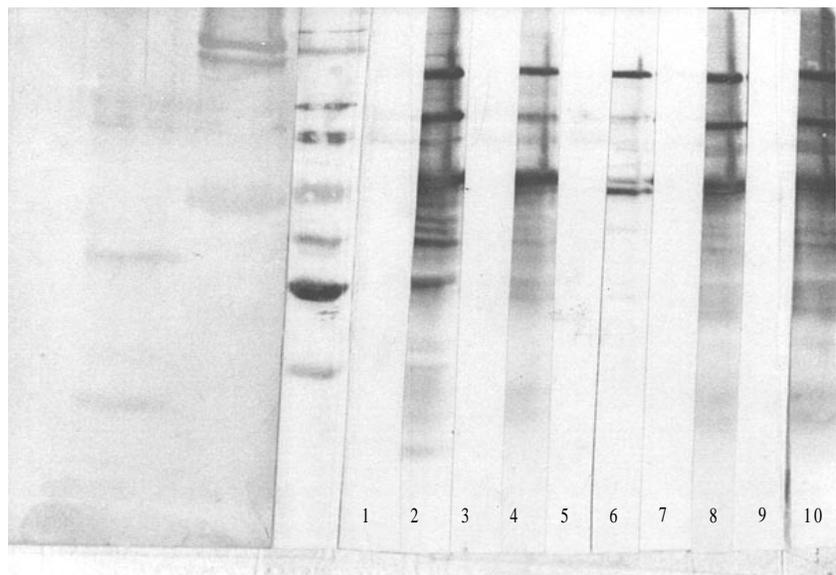


Fig. 1. PAGE-SDS de los antígenos de *G. vaginalis*. De izquierda a derecha: cepa 11, 13, 18 y cepa ATCC 14018 y patrón de PM.



Patrón, 1 suero negativo / cepa 18; 2 inmunoglobulina 1/cepa 18; 3 suero negativo / cepa 13; 4 inmunoglobulina 1/cepa 13; 5 suero negativo / cepa 11; 6 inmunoglobulina 1/cepa 11; 7 suero negativo / cepa ATCC; 8 inmunoglobulina 1/cepa ATCC; 9 suero negativo / cepa ATCC; 10 inmunoglobulina 1/cepa ATCC.

Fig. 2. Immunoblotting de la inmunoglobulina I de carnero frente a los antígenos de la cepa ATCC 14018 y 3 aislamientos clínicos de esta especie.

TABLA 1. Comparación de los látex inmunoglobulina I y II con el cultivo microbiológico de *G. vaginalis*

	Cultivo	Sensibilidad	Especificidad	Coincidencia
Látex I	+ -			
	+ 8 10	80 %	54,5 %	62 %
	- 2 12			
Látex II	+ -			
	+10 4	100 %	80,4 %	87 %
	- 0 18			

TABLA 2. Comparación de los látex inmunoglobulina I y II con el diagnóstico de vaginosis bacteriana

	Vaginosis bacteriana		Sensibilidad	Especificidad	Coincidencia
Látex I	+ -				
	+ 9 8		82 %	62 %	69 %
	- 2 13				
Látex II	+ -				
	+ 8 6		73 %	71 %	71 %
	- 3 15				

DISCUSIÓN

Las bandas de 65 K, 48 K y 35 K reconocidas por el antisuero II evidencian la prevalencia antigénica de estas proteínas, pues este antisuero se obtuvo a partir de la mezcla de 4 aislamientos clínicos. El látex conjugado con este antisuero presentó una sensibilidad superior al látex I con respecto al cultivo microbiológico y a la vaginosis

bacteriana. Ambos látex presentaron una coincidencia mayor con respecto al cultivo para *G. vaginalis*, mientras ésta fue menor en relación con los criterios de amino olor, pH y a la presencia de células guías como indicadores de vaginosis bacteriana. Esto se debe a que los parámetros considerados, también pueden ser provocados por el efecto de otras bacterias que junto a *G. Vaginalis* provocan la vaginosis bacteriana.^{2,18,19} Estos resultados difieren de los obtenidos por *O' Dowd* y otros⁵ al evaluar un *test* rápido para el diagnóstico de vaginosis bacteriana basado en la detección de diaminas, la sensibilidad y especificidad fueron 86 y 81 % respectivamente en relación con el cultivo; sin embargo la coincidencia de estos valores fue mayor cuando se comparó con los criterios de *Amsel*, 97 y 83 % con respecto a las células indicadoras, 94 y 84 % con respecto a la presencia de aminos.⁸

Los síntomas clínicos no son suficientes como criterio para determinar la presencia de vaginosis bacteriana. Los parámetros propuestos por *Amsel* que tienen un uso tradicional en el diagnóstico de esta enfermedad también presentan limitaciones, la prueba positiva de aminos revelada por la adición de hidróxido de potasio 10 % que provoca un olor característico, es también posible encontrarla en mujeres con tricomoniasis; de manera que se plantea que esta prueba tiene un valor predictivo en forma exacta de 94 %.²⁰

Por otra parte el cultivo microbiológico de *G. vaginalis* resulta insuficiente para este diagnóstico, pues además de ser costoso para un uso rutinario, se debe tener en cuenta que de 5 a 60 % de las mujeres sanas pueden portar esta bacteria, de manera que el cultivo resultaría en muchos casos engañoso además de conducir al sobretratamiento médico. Los cultivos presentan un valor productivo de 41 %.

La posibilidad de disponer de un ensayo cuyo fundamento sea la detección de *G. vaginalis* en una concentración superior a 10^6 ufc/mL resulta útil, si se tiene en cuenta que a pesar de la naturaleza polimicrobiana de la vaginosis bacteriana, *G. vaginalis* se reconoce como el principal agente causal,^{5,10} además su propio metabolismo facilita la implantación de las bacterias anaerobias.^{2,19} Los resultados obtenidos en la evaluación de los conjugados látex globulina I y II y la comparación con los diferentes parámetros establecidos como diagnóstico de rutina de esta entidad revelan una especificidad y sensibilidad adecuadas, pero se recomienda que se continúe evaluando en un número mayor de muestras.

SUMMARY

To obtain an anti-*Gardnerella vaginalis* latex globuline, specific immunosera to reference strain (ATCC 14018) and to a clinical isolation strain pool were produced. These immunosera were characterized using PAGE-SDS and immunoblotting where a close antigenic relation between the clinical isolation strains and the reference strain was observed. The latex globuline conjugates obtained from these 2 immunosera were evaluated *in vitro* with a resulting level of detection of 10^6 ufc/mL of *Gardnerella vaginalis*. These two conjugates were also evaluated in clinical samples and compared with the 6 vaginalis culture and the criteria considered for diagnosing bacterial vaginosis. The anti-strain pool (II) latex globuline conjugate turned out to be more sensitive and specific than anti-*G. vaginalis* ATCC strain (I) latex globuline.

Subject headings: GARDNERELLA VAGINALIS/isolation and purification; VAGINOSIS, BACTERIAL/ diagnosis; LATEX FIXATION TESTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Family. ACOG Releases Technical Bulletin Vaginitis 1996;56(6):-.
2. Andreu A, Navarro M, Fernández F. *Gardnerella vaginalis* como patógeno urinario. Enferm Infecc Microbiol Clin 1994;12:346-9.
3. Mikamo H, Kawasoe K, Izumi K, Ito K, Katoh N. Bacteriological epidemiology and treatment of bacterial vaginosis. Chemotherapy 1996;42(1):78-84.
4. Sobel JD. Bacterial vaginosis. Br J Clin Pract Symp 1990;711:65-79.
5. Dowd O, Parker S, Kelly A. Women experiences of general practitioner management of their vaginal symptoms. Br J Gen Pract 1996;46:415-8.
6. Moreton P. Developments in rapid immunoassays. International Labmate 1997;22(4):-.
7. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and epidemiologic association. Am J Med 1983;74:14-22.
8. Dowd T, West R, Winterburn S, Hewlins S. Evaluation of rapid diagnostic test for bacterial vaginosis. Br J Obstet Gynecol 1996;103:366-70.
9. Chen KCS, Amsel R, Holmes K. Biochemical diagnosis of vaginitis determination of diamines in vaginal fluid. Infect Dis 1983; 145:337-45.
10. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169:455-9.
11. Harvard DR, Hewlins M, O' Dowd TC, Winterburn P. Detection of diamines in biological fluids UK Patent GB 1996; 2215 044B.
12. Ferris D, Hendrich J, Payne P. Office laboratory diagnosis of vaginitis. Clinician performed test compared with a rapid nucleic acid hybridization test. J Fam Pract 1995;41(6):575-81.
13. Hansen W, Kray B, Miller K. Detection of *Gardnerella vaginalis* in vaginal specimens by direct immunofluorescence. J Clin Microbiol 1987; 25:1934-7.
14. Belkum Va Alex. Development of a species specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis*. Mol Cell Probes 1995;9:167-74.
15. Deutscher M. Guide to protein purification. Methods Enzimol 1990;(182).
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
17. Kyshe AJ. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrilamida to nitrocelulosa. J Biochem Biophys Methods 1984;10:203-9.
18. Peters N, Van L, Pieter W, Holleman H. Bacterial vaginosis important in the etiology of cervical neoplasia. - Sex Transm Dis 1995;22(5).
19. Blackwell A. Anaerobic vaginosis: therapeutic and epidemiological aspects. J Antimicrob Chemoter 1985;16:445-8.
20. Thomason JL, Gelbart SM, Scaglione NJ. Bacterial vaginosis current review with indications for asymptomatic therapy. Am J Obstet Gynecol 1991;165:1210-7.

Recibido: 4 de febrero del 2000. Aprobado: 21 de marzo del 2000.
Lic: *Ivette Espinosa* Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
Carretera Tapaste, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.