

## ARTÍCULOS ORIGINALES

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

# Evaluación de diferentes medios líquidos para el cultivo de *Gardnerella vaginalis* y caracterización del perfil de proteína por electroforesis PAGE-SDS

Lic. Ivette Espinosa,<sup>1</sup> Lic. Maité Lorenzo,<sup>2</sup> Lic. Yamilka Riverón,<sup>3</sup> Dra. Elba Álvarez<sup>4</sup> y Lic. Alejandra Villoch<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se evaluaron 3 medios de cultivo líquidos caldo triptosa soya suplementado con suero equino (CTS-se) / sin suplemento (CTS) y caldo Casman (CC) en diferentes condiciones de incubación: 10 % de CO<sub>2</sub> y en condiciones aerobias. No hubo diferencias significativas en los valores de densidad óptica para los medios CTS-se y CC. Sin embargo, al establecer el perfil de proteínas por PAGE- SDS para las condiciones evaluadas, la presencia de la proteína de 14 kDa y los valores de densidad óptica permitieron la selección del medio CC para el cultivo de *Gardnerella vaginalis*. Se estudió la sensibilidad a diferentes pH en este medio, resultó óptimo el pH 7,2 y se estableció la cinética de crecimiento. El análisis por PAGE-SDS de las células completas correspondientes a diferentes aislamientos clínicos de *G. vaginalis* con variaciones bioquímicas permitió caracterizar el perfil de proteínas en este medio y mostró similitud entre los aislados.

**DeCS:** GARDENELLA VAGINALIS/ crecimiento & desarrollo; VAGINOSIS BACTERIANA; MEDIOS DE CULTIVO; ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

La vaginosis bacteriana (VB) es una infección vaginal molesta que se presenta en mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por una descarga homogénea blanquecina con fetidez.<sup>1-3</sup> La VB tiene lugar cuando se altera el ecosistema vaginal por la acción de antibióticos, hormonas, estrés y enfermedades de transmisión sexual; lo cual conduce a un reemplazo de los *Lactobacillus* sp predominantes en la flora vaginal por *Gardnerella vaginalis* en asociación con otras bacterias anaerobias: *Bacteroides* sp, *Prevotella* sp,

*Mobiluncus* sp y *Peptostreptococcus* sp.<sup>4-6</sup> *G. vaginalis* se ha considerado el principal agente, pues presenta varios factores que facilitan su patogenicidad, una glicoproteína de 120 kDa que posee una elevada afinidad por la lactoferrina humana<sup>7,8</sup> y una citolisina que actúa sobre las células del amnios.<sup>9,10</sup>

La mayor cantidad de formulaciones reportadas en la literatura para el cultivo de *G. vaginalis* se refieren a medios sólidos. A pesar de la importancia de estos medios como herramientas para el

<sup>1</sup> Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Licenciada en Biología.

<sup>3</sup> Licenciada en Microbiología.

<sup>4</sup> Doctora en Medicina Veterinaria. Investigadora Auxiliar.

<sup>5</sup> Doctora en Ciencias. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Auxiliar.

diagnóstico de enfermedades infecciosas, aún no se han esclarecido totalmente las leyes que rigen el crecimiento de los microorganismos en las colonias. En cambio, este aspecto ha sido abordado en los cultivos líquidos donde además es posible conocer la cinética de crecimiento, cuestiones relacionadas con el metabolismo del microorganismo y obtener altos rendimientos de biomasa celular.<sup>11</sup> Sin embargo, para *G. vaginalis* existen pocas formulaciones, la mayoría utilizan como suplemento sangre humana y 10 % de CO<sub>2</sub>.<sup>12-15</sup>

En la identificación de *G. vaginalis* se ha descrito un número importante de variaciones fenotípicas.<sup>2,3</sup> Piot y otros en 1984 desarrollaron un sistema de tipificación estableciendo 8 biotipos diferentes.<sup>16</sup> Benito y otros utilizaron un sistema de tipificación modificado que incorpora la fermentación de azúcares y encontraron 17 biotipos diferentes.<sup>17</sup> También se han utilizado las técnicas moleculares como el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), disponible en el reconocimiento de al menos 3-4 genotipos diferentes de *G. vaginalis*.<sup>18</sup> Los análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE- SDS también constituyen una herramienta en los sistemas de tipificación para microorganismos, en los cuales se observan variaciones como es el caso de *G. vaginalis*.<sup>19</sup> Sin embargo, en la literatura sobre la temática no se han encontrado trabajos relacionados con los perfiles de proteínas caracterizados para diferentes aislamientos de este género, los cuales serían de utilidad fundamentalmente para el estudio de proteínas expuestas de superficie, que podrían constituir blancos de la respuesta inmune.

Los autores de este trabajo se propusieron como objetivo evaluar diferentes medios líquidos para la multiplicación de *G. vaginalis* de modo reproducible, definir el pH óptimo en el medio seleccionado, establecer la cinética de crecimiento en estas condiciones y caracterizar el perfil de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida de *G. vaginalis* en el medio de cultivo seleccionado, así como conocer el comportamiento en este de diferentes aislamientos de *G. vaginalis*.

## MÉTODOS

Cepa: se empleó la cepa de *Gardnerella vaginalis* 14018 procedente del *American Type Collection culture* (ATCC).

Medios de cultivo: se evaluaron 3 medios de cultivo caldo triptona soya (CTS), CTS suplementado con suero equino 10 % (CTS-se), caldo Casman (CC) que tiene la composición siguiente: peptona 10 g/L, extracto de carne 3 g/L, triptosa 10 g/L, dextrosa 0,5 g/L, almidón 1 g/L, ácido p-aminobenzoico 0,05 g/L y nicotinamida 0,05 g/L.

Preparación de los preinóculos: se partió de un ampulita de la cepa de *G. vaginalis* 14018, la cual se resuspendió en 500 µL de solución salina estéril 0,9 %, se sembraron 100 µL en placas de agar Columbia (Oxoid) suplementado con sangre humana 5 % y SR119E (Oxoid) antibióticos. Las placas se incubaron durante 48 h con 10 % de CO<sub>2</sub> (sobres Anaerogen, Oxoid). A partir de una colonia del cultivo se realizó una segunda siembra masiva en el mismo medio y se incubó en iguales condiciones. El cultivo se recogió en solución salina 0,9 % y se utilizó como preinóculo considerando un volumen correspondiente a 4 % del medio a inocular. Se utilizaron tubos de cristal (16 x 150 mm) que contenían 4,5 mL de los medios de cultivo.

Los cultivos se incubaron en condiciones aerobias y en atmósfera con 10 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de O<sub>2</sub>. La determinación de la concentración celular se realizó mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 540 nm. Los valores de DO y pH se procesaron según el análisis de varianza unifactorial por rango, *Kruskal wallis*.<sup>20</sup>

La biomasa celular se concentró y se eliminaron los componentes del medio mediante centrifugación a 800 g y 3 lavados con solución salina en iguales condiciones, la concentración se ajustó por turbidimetría mediante la lectura de DO a la longitud de onda de 640 nm para una DO final de 0,9. Se adicionó igual volumen de solución amortiguadora diluyente de la muestra y se trataron por calor a 100 °C durante 5 min.<sup>21</sup> Los polipéptidos se separaron electroforéticamente, en un sistema de soluciones amortiguadoras con gel concentrador 5 % y gel separador 12,5 %. Las corridas se

realizaron en minigeles (Bio rap Mini Protean II Dual Slab Cell Bio-Rap) utilizando un voltaje constante de 20 V/cm de gel. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango procedente de Sigma. Para revelar los geles se utilizó la tinción con plata como se describe por *Sambrook*.<sup>22</sup> A continuación se procesaron los geles mediante un equipo AcerScan Prisa 620P y se utilizó el programa Kodak digital science ID, a través del cual se determinó el peso molecular de cada banda por un análisis de regresión incluido en este sistema.

Se evaluaron diferentes pH iniciales (5- 6- 6,5- 7,2- 8- 8,5) en el medio líquido seleccionado y se realizó la lectura de los valores de DO a las 18 h de incubación; para el análisis estadístico se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Cinética de crecimiento: a partir de una suspensión de *G. vaginalis* obtenida como se describe anteriormente se inocularon erlenmeyers con 50 mL de caldo Casman, estos cultivos se incubaron en aerobiosis a 37 °C, en condiciones estáticas durante 16 h. Y se utilizó como preinóculo para erlenmeyers que contenían 250 mL de caldo Casman, en los cuales se siguió la cinética de crecimiento; los cultivos se incubaron en condiciones estáticas y de agitación a 90 y 120 rpm en zaranda orbital termostataada Biozart-2013 durante 16 h, se incluyeron 3 réplicas para cada uno y se tomaron muestras cada 2 h. La medición de la concentración celular se realizó por turbidimetría y se determinó la DO a una longitud de onda de 540 nm.

Análisis estadístico: se calculó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación para cada variante por ajuste con el método de los mínimos cuadrados y los resultados se analizaron

mediante la prueba no paramétrica Wilcoxon *test* con un nivel de significación de 0,05.

Para la caracterización del perfil de proteínas de diferentes aislamientos de *G. vaginalis* cultivados en caldo Casman se utilizaron 5 aislamientos de esta bacteria, identificados según los criterios de *Catlin*<sup>14</sup> y el sistema Api 20 Strep (Biomeriue), los cuales difieren en el perfil bioquímico según *Piot* y otros.<sup>16</sup> Las cepas se clasificaron como: cepa 14018 y 256 corresponden al biotipo 1, aislamientos 18 y 274 al biotipo 4 y los aislamientos 13 y L al biotipo 5. Estos aislamientos se multiplicaron en tubos de caldo Casman durante 16 h a 37 °C en condiciones aerobias. Los cultivos se concentraron a 800 g y se procesaron para su análisis por PAGE-SDS como se describió anteriormente.

## RESULTADOS<sup>10</sup>

### *Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación*

En la tabla se muestran los valores de DO y pH final alcanzados en los 3 medios evaluados a las 16 h en las condiciones de incubación (aerobia y 10 % de CO<sub>2</sub>). Se observaron diferencias significativas entre los valores de DO del medio CTS y los medios CTS-se y CC, así como los valores de pH en ambas condiciones de incubación para una  $p < 0,05$ . Los medios CTS-se y CC mostraron capacidades superiores para el crecimiento del microorganismo y cuando se sembraron en medio sólido se recuperaron las colonias típicas, lo cual no fue posible en CTS. Sin embargo, entre los valores de pH final alcanzados por los cultivos en estos medios se encontraron

**TABLA.** Valores de DO y pH final de los cultivos de la cepa de *G. vaginalis* ATCC 14018 en los medios de cultivo CTS, CTS-se, CC incubados en condiciones aerobias y con 10 % de CO<sub>2</sub>

Medios de cultivo	Condiciones aerobias		10 % de CO <sub>2</sub>	
	DO	pH	DO	pH
CTS	0,117 ± 0,008 b	7,01 ± 0,01 b	0,114 ± 0,00 b	7,01 ± 0,016 b
CTS-SE	0,562 ± 0,058 a	6,6 ± 0,18 a	0,542 ± 0,02 a	6,56 ± 0,14 a
CC	0,553 ± 0,029 a	5,10 ± 0,02 c	0,541 ± 0,023 a	4,93 ± 0,32 c

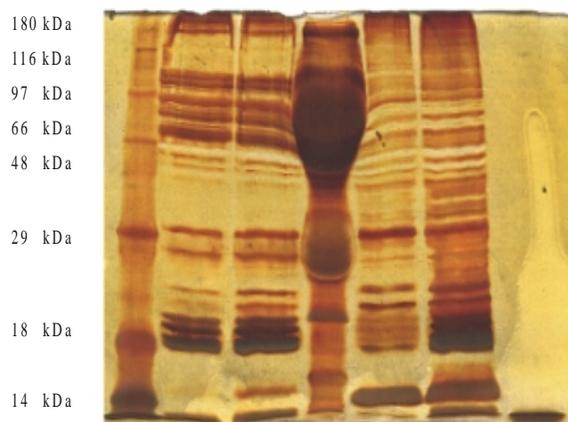
n=3 Letras desiguales indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

diferencias significativas. Los cultivos en el medio CTS-se alcanzaron un pH entre 6,56-6,60, mientras que para el medio Casman estos valores fueron inferiores 4,96-5,1.

Al analizar el perfil de proteínas por PAGE-SDS (fig. 1) se observó un patrón similar para todas las variables evaluadas, se identificaron 14 proteínas que comprenden los pesos moleculares relativos siguientes: 14, 18, 20, 33, 36, 42, 45, 48, 52, 55, 61, 84, 90, 97 kDa. La proteína de aproximadamente 14 kDa se expresó en todas las variantes, excepto para los cultivos en el medio CTS-se cuando se incubaron en aerobiosis.

#### Efecto del pH en el medio seleccionado para el crecimiento de *G. vaginalis*

En la figura 2 se puede comprobar que a pH 7,2 se obtuvieron los valores más altos de DO de los cultivos de *G. vaginalis* en el medio CC, aunque los valores de 6 y 6,5 también permitieron la multiplicación de la bacteria. Como muestran los resultados, a pH 5 los valores de DO, no evidencian crecimiento de *G. vaginalis*. Sin embargo, una vez sembrada una alícuota de los cultivos en el medio sólido se observaron las colonias de *G. vaginalis*, en todos los cultivos excepto para los pH 8 y 8,5.

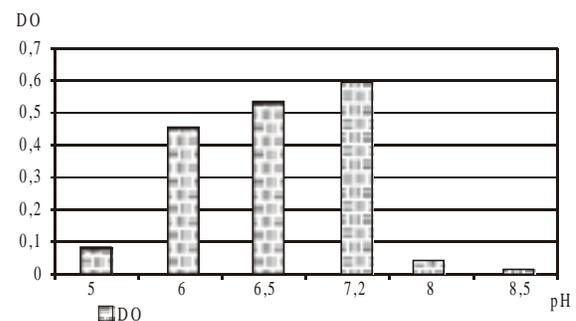


**Fig. 1.** Caracterización de las proteínas por electroferesis PAGE-SDS, de izquierda a derecha: 1: marcador de peso molecular, 2: medio de cultivo CTS-se en condiciones aerobias, 3: CTS-se en 10 % de CO<sub>2</sub>, 4: medio CTS-se sin inocular, 5: medio CC en condiciones aerobias, 6: CC en 10 % de CO<sub>2</sub>.

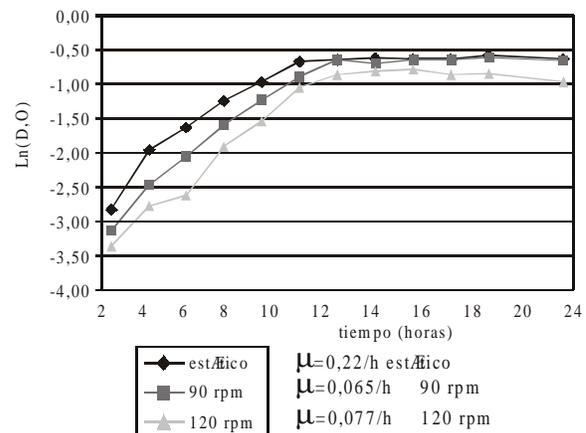
#### Cinética de crecimiento en CC

La figura 3 muestra el resultado de las cinéticas de crecimiento a las 3 velocidades de agitación. Los cultivos estático y agitado a 90 rpm desarrollaron desde el inicio una fase de crecimiento logarítmica cuya duración resultó entre 10 y 12 h respectivamente, mientras en el cultivo agitado a 120 rpm se evidenció una fase de latencia corta de 2 h que no fue observada en las demás condiciones evaluadas. La fase estacionaria se inició a las 10 h para el cultivo estático y a las 12 h para ambos cultivos agitados.

Aunque los valores de DO del cultivo estático fueron superiores con respecto a los cultivos agitados a 90 y 120 rpm, no se encontraron diferencias significativas entre las velocidades específicas de crecimiento para las 3 variables estudiadas con una  $p < 0,05$ .



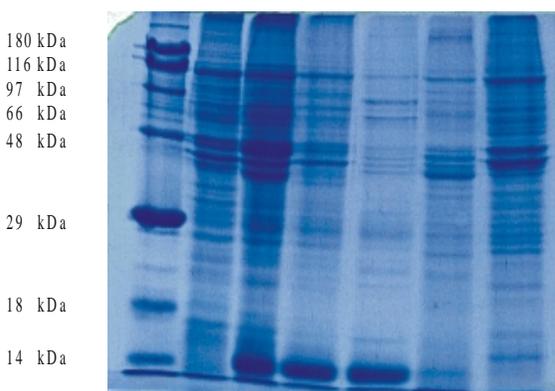
**Fig. 2.** Comparación del cultivo de *G. vaginalis* en caldo Casman a diferentes pH.



**Fig. 3.** Cinética de crecimiento para la cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 en caldo Casman en condiciones estáticas y agitación 90 y 120 rpm.

### Caracterización de diferentes aislamientos de *G. vaginalis* cultivadas en el medio seleccionado

De modo general los patrones de proteínas por PAGE-SDS entre diferentes aislamientos de *G. vaginalis* con respecto a la cepa 14018 fueron similares (fig. 4), aunque existen diferencias en algunas bandas fundamentalmente basadas en la intensidad y movilidad. Las bandas de bajo peso molecular 14 y 18 kDa muestran una fuerte señal en todos los aislamientos. Las siguientes bandas 20, 33, 52, 58, 78 y 90 kDa están presentes en todas las cepas. Las bandas de 48, 61 y 84 kDa se expresan en la cepa de referencia 14018.



**Fig. 4.** Caracterización de las proteínas expresadas en diferentes aislamientos clínicos: (AC) de *G. vaginalis* cultivados en CC, de izquierda a derecha cepa ATCC, AC256, AC 13, AC 18, AC L y AC 274 patrón de peso molecular.

## DISCUSIÓN

La diferencia encontrada en cuanto a los valores de pH para los 2 medios de cultivo evaluados puede deberse a una mayor conversión de la fuente de energía en ácido y por consiguiente mayor excreción de productos tóxicos producto del crecimiento celular. El medio Casman contiene 2 fuentes de carbono: dextrosa y almidón, ambas son utilizadas por *G. vaginalis* y a partir de la fermentación de las mismas esta bacteria puede dar lugar a ácido acético, mientras el medio CTS-se solo contiene dextrosa.

Con respecto a la proteína de 14 kDa, aun cuando no se conoce su función, se puede plantear que su expresión no depende de la composición del medio, sino de la interacción de este con la

atmósfera de incubación. Se está en presencia de un proceso común para muchos microorganismos anaerobios facultativos, los cuales responden a los contrastes particulares de sus diversos ambientes a través de la expresión y/o represión de un grupo de genes diseñados para conferir una ventaja selectiva bajo condiciones ambientales específicas.<sup>23</sup>

Aunque para el cultivo de muchos microorganismos se utiliza como suplemento el suero, la tendencia es a su sustitución por otros componentes con menores posibilidades de variaciones, pues en los sueros la composición puede variar en virtud del animal de procedencia, su estado de salud, así como de las condiciones de almacenamiento.<sup>24</sup> El medio Casman es recomendado para el aislamiento de microorganismos “fastidiosos”, que requieren una tensión reducida de oxígeno. En este trabajo se seleccionó este medio de acuerdo con los aspectos siguientes: los valores de DO de los cultivos en este medio en los 2 ambientes atmosféricos utilizados no difieren significativamente. Por otra parte, el patrón de proteínas caracterizado por PAGE-SDS, también resultó similar en las 2 atmósferas de incubación utilizadas, lo cual permite prescindir de la incubación en presencia de CO<sub>2</sub> para la multiplicación del microorganismo.

A pH 7 se obtuvieron los valores más altos de DO como expresión del crecimiento del microorganismo, aunque *Greenwood* y *Pickett*<sup>12</sup> plantean que el pH óptimo para el crecimiento de *G. vaginalis* es 6, los resultados coinciden con los obtenidos por *Boskey* y otros<sup>25</sup> quienes reportan un pH 7 óptimo para el crecimiento *in vitro* de *G. vaginalis* y pH asimptótico en un rango de 4,7 a 6,0, estos valores también coinciden con los obtenidos en el cultivo en CC.

La recuperación de colonias de *G. vaginalis* en medio sólido, posterior a la incubación durante 16 h en un medio líquido a pH 5, evidencia que a este pH las células conservaron su viabilidad después de 16 h. La tolerancia de *G. vaginalis* a las condiciones ácidas pudiera explicar su presencia en la vagina en concentraciones bajas a este pH y justificar el alto porcentaje de colonización detectado por cultivo en muestras de mujeres asintomáticas. En este sentido *Jansen*<sup>26</sup> plantea que *G. vaginalis* y *Prevotella anaerobius* son

entre los microorganismos más comunes de la VB los más resistentes a la acidificación presente en la vagina, producto de la actividad de *Lactobacillus* sp. La acidificación se considera uno de los mecanismos protectores en la vagina y se relaciona con la disminución del riesgo a infecciones vaginales.<sup>27</sup>

A diferencia del cultivo estático, con la agitación se homogeniza el cultivo, se logra una distribución uniforme de oxígeno y nutrientes, que permite se incremente la velocidad de crecimiento y los índices de biomasa.<sup>24</sup>

Sin embargo, los resultados del cultivo de *G. vaginalis* en agitación no muestran estos efectos. Durante la agitación también se incrementa la concentración de oxígeno, lo cual puede impedir el crecimiento para algunos microorganismos anaerobios facultativos por el agotamiento del potencial reductor celular, las células pueden morir debido a la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y de otros intermediarios activos del oxígeno incluido el superóxido (O<sup>2-</sup>).<sup>28</sup> Atendiendo a estos aspectos se recomienda el cultivo en condiciones estáticas, la agitación de los cultivos pudiera ser satisfactoria si se suministrara a estos una inyección de CO<sub>2</sub>.

Las proteínas de 33, 42, 48, 52, 58, 90, así como las bandas de 61 y 84 kDa, a pesar de provenir de células completas coinciden con el peso molecular reportado para proteínas de membrana por Jarosik y otros,<sup>7</sup> en un estudio relacionado con los requerimientos de hierro de *G. vaginalis*, en el cual realizaron la caracterización de la expresión de proteínas de membrana en ausencia de hierro.

En conclusión, se recomienda el uso del medio CC a pH 7,2 en condiciones aerobias para la multiplicación de *G. vaginalis* de modo reproducible. Se reportó el perfil de proteínas de células completas caracterizado por PAGE-SDS a partir del cultivo de *G. vaginalis* en estas condiciones, que abarca desde 14 hasta 97 kDa, el cual podría considerarse como un sistema de control de la multiplicación del microorganismo y adicionarse como un sistema de subtipaje y clasificación para aislamientos con diferencias fenotípicas. Además, al estudiar la influencia del pH en el cultivo de este microorganismo sería conveniente el estudio de cómo se regulan las proteínas de membrana bajo el efecto del pH, lo

cual puede probar ser importante en el entendimiento de la patogénesis de esta enfermedad que de modo general está regulada por el pH.

## SUMMARY

3 liquid culture media: triptose soya broth supplemented with equine serum (TSB-es)/without supplement (TSB) and Casman broth (CB) were evaluated under different incubation conditions at 10 % of CO<sub>2</sub> and under aerobic conditions. There were no significant differences in the values of optic density for the TSB-es and CB media. However, on establishing the protein profile by PAGE-SDS for the evaluated conditions, the presence of protein of 14 kDa and the values of optic density allowed the selection of the CB medium for the culture of *Gardnerella vaginalis*. The sensitivity to different pH in this medium was studied. pH 7.2 proved to be optimum and it was established its growth kinetics. The analysis by PAGE-SDS of the complete cells corresponding to different clinical isolates of *G. vaginalis* with biochemical variations made possible to characterize the protein profile in this medium and showed similarity between the isolates.

**Subject headings:** GARDNERELLA VAGINALIS/ growth & development; VAGINOSIS, BACTERIAL; CULTURE MEDIA; ELECTROPHORESIS, POLYACRYLAMIDE GEL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sobel JD. 1990. Bacterial vaginosis. Br J Clin Pract Symp (suppl) 71:65-79.
2. Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. Clin Infect Dis 2001;33(7):1022-7.
3. Goldstein EJC, Citron DM, Vren CM, Warren YA, Tyrrell KL, Fernández HT. *In vitro* activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* antimicrobial agents. Chemotherapy 2002;46(12):3995-6.
4. Al-Hairthi L, Roedbeck KA, Olinger GG, Landary A, Haeshemi B, Spear T. Bacterial vaginosis associated microflora isolated from the female genital tract activities HIV-1 expression. J Acquir Immune Defic Syndr 1999;21:194-202.
5. Faro S, Martens M, Maccato M, Haemmil M, Pearlman M. Vaginal flora and pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol 1993;169:470-3.
6. Meis PJ, Golberg RL, Mercer B, Moawad A, Das A, Menellis D et al. The preterm prediction study :significance of vaginal infections. Am J Obstet Gynecol 1995;176(49):1231-5.
7. Jarosik PG, Land CB, Duhon P, Mercer T. Acquisition of iron by *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun 1998;66(10):5041-7.
8. Jarosik PG, Land CB. Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun 2000;68(6):3443-7.
9. Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, Nardon E, Amirante GA, Patriarca P. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 1990;58(11):3751-8.

10. Cauci, S. Specific immune response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin in patients with Bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(6):601-5.
11. Pazos Álvarez Rivera V, Rojas N, Viera J. *Temas de Bacteriología*. 1985:290-3.
12. Greenwood JR, Pickett MJ. Genus *Gardnerella*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 1. 1980:587-90.
13. Debrvers J, Sedallion A. Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis*. *Pathol Biol(Paris)* 1985;33(6):672-92.
14. Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations and controversies. *Clin Microbiol Reviews* 1992;5(3):213-7.
15. Totten PA, Amsel R, Hale J. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1982;15:141-7.
16. Piott P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten P, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1984;20(4):677-9.
17. Benito R, Vázquez JA, Berrón S, Fenoll A, Nilo S. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. *J Med Microbiol* 1996;21:357-9.
18. Ingianni-A, Petruzzelli S, Morandotti G, Pompei-R. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS - Immunol - Med - Microbiol* 1997;18(1):61.
19. Dabo SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet Microbiol* 1997;54:167-83.
20. Siegel S, Castellan NJ. *Estadística no paramétrica*, 4ta edición. Análisis de varianza unifactorial por rango. *Kruskal Wallis*. 1995:223-57.
21. Laemli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
22. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Laboratory. Second Edition. 1989.
23. Keliher LB, Nickerson ACh, Morrow BJ, Curtis R. Cell-specific proteins synthesized by *S. typhimurium*. *Inf Immunity* 1988;66(2):856-61.
24. Rodwell AW. *Cultivation and nutrition*. *Methods in Mycoplasmaology*. Razin S, Tully J.G. (eds). 1983.
25. Boskey ER, Teish KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Inf Immunity* 1999;67(10):5170-5.
26. Jansen AM. *Bacterial vaginosis*. Masters thesis. Johns Hopkins school of Hygiene and Public health, Baltimore, md. 1998.
27. Boris S, Pérez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Inf Immunity* 1998;65(5):1985-9.
28. Miles RJ, Tayloe RR, Varsono H. Oxygen up-taken and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by fermentative *Mycoplasma* spp. *J Med Microbiol* 1991;34:219-23.

Recibido: 22 de julio de 2002. Aprobado: 9 de abril de 2003.  
 Lic. *Ivette Espinosa*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.  
 Apartado 10 Carretera Tapaste. Autopista Nacional San José de las Lajas. CP 32700. Correo electrónico: espinosa@censa.edu.cu