Trabajos Originales

BIOTIPOS Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *GARDNERELLA VAGINALIS*

M. Angélica Martínez T.¹, Alfredo Ovalle S.², Iván Reid S.³, Pablo Céspedes P.⁴, M. Cristina Martínez T.¹, Germán Gaete C.¹

¹Programa de Microbiología y Micología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Servicio y Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital San Borja Arriarán, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Centro Médico General Science. ⁴Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital San Juan de Dios

RESUMEN

Se determinaron los biotipos y susceptibilidad a ampicilina, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina de 63 cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana. Las cepas se distribuyeron en los 8 biotipos del esquema de clasificación de Piot, siendo los biotipos 1 y 2 los más frecuentes (44,4%). Todas las cepas fueron susceptibles a ampicilina y resistentes a ciprofloxacina. Cuatro cepas (6,4%) presentaron resistencia a clindamicina y dos (3,2%) a eritromicina. Treinta y una cepas (49,2%) fueron resistentes a tetraciclina. Se estudió la base genética de la resistencia a tetraciclina en ocho cepas resistentes, demostrándose la presencia del determinante *tet* (M) en todas ellas.

PALABRAS CLAVE: *Gardnerella vaginalis*, biotipos, susceptibilidad

SUMMARY

We determined the biotypes and susceptibility to ampicillin, clindamycin, erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline of 63 strains of *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis. All biotypes of the classification scheme of Piot were found, being biotypes 1 and 2 the most frequent (44.4% of the strains). All isolates were susceptible to ampicillin and resistant to ciprofloxacin. Four strains (6.4%) were resistant to clindamycin and two were resistant to erythromycin. Thirty one strains (49.2%) were resistant to tetracycline. The genetic basis of the tetracycline resistance was investigated in 8 strains, and in all of them DNA sequences related to the *tet* (M) resistance determinant were identified.

KEY WORDS: *Gardnerella vaginalis*, biotypes, susceptibility

INTRODUCCIÓN

Gardnerella vaginalis forma parte de la microbiota vaginal comensal de 16-48% de mujeres en edad fértil (1). También participa en la patogenia de la vaginosis bacteriana (VB) en sinergia microbiana junto a algunas especies de bacterias anaerobias y a *Mycoplasma hominis* (1). En esta condición clínica, *G. vaginalis* está generalmente

presente en concentraciones 100 a 1.000 veces mayores a su recuento normal (1). La VB es un factor de riesgo de corioamnionitis, rotura prematura de membranas y parto prematuro, como asimismo de infecciones postquirúrgicas (1-3).

El tratamiento de *G. vaginalis* en pacientes con VB se efectúa habitualmente con metronidazol o clindamicina, antimicrobianos también activos contra los bacilos gramnegativos anaerobios (3).

El metronidazol tiene la ventaja de que no afecta la flora lactobacilar, facilitando un repoblamiento vaginal más rápido luego del tratamiento (3). Ocasionalmente, *G. vaginalis* puede dar origen a infecciones extragenitales; bacteremias (4), meningitis (5), abscesos (6), infección urinaria (7), o a infecciones genitales no relacionadas con VB, como uretritis (8), patologías en las que podría ser útil contar con otros antimicrobianos alternativos (9). Existe escasa información de los biotipos más frecuentes de este microorganismo en pacientes con VB (10-12), desconociéndose si existe alguna relación entre ciertos biotipos y una mayor resistencia antimicrobiana.

Los objetivos de nuestro estudio fueron determinar los biotipos y la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODO

Origen de las cepas. Se estudiaron 63 cepas de *G. vaginalis* aisladas consecutivamente de secreción vaginal de pacientes con VB entre agosto de 2000 y agosto de 2001. Veintisiete cepas fueron aisladas en los Hospitales San Borja Arriarán y San Juan de Dios y 36 cepas en el Centro Ginecológico General Science.

Microbiología. El diagnóstico de VB fue efectuado por el recuento de los morfotipos bacterianos en el gram vaginal, de acuerdo al procedimiento recomendado por Nugent y cols (13). *G. vaginalis* fue aislada en agar CNA (Agar Columbia, DIFCO, USA, suplementado con 5% de sangre humana y 15 µg/ml de ácido nalidíxico (Laboratorio Chile). Las bacterias fueron identificadas por sus características microscópicas; bacilos gramnegativos o gram variable cortos y pleomórficos, características bioquímicas: β hemólisis difusa en agar CNA y reacción de catalasa negativa y pruebas de inhibición con discos: sensibilidad a bacitracina y nitrofurantoína y resistencia a optoquina (14-15). Las cepas fueron asignadas a alguno de los 8 biotipos por la determinación de la actividad de tres enzimas: β-galactosidasa, lipasa e hipuricasa (hidrólisis del hipurato) (10).

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de dilución en agar Columbia (Difco) suplementado con 5% de sangre de cordero de los siguientes antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina y tetraciclina. Drogas de potencia conocida fueron donadas por el Laboratorio Chile (ampicilina y ciprofloxacina) y Laboratorio Upjohn (clindamicina).

Eritromicina y tetraciclina fueron adquiridas de Sigma (Sigma Co, St Louis, USA). Como inóculo se utilizó 10⁵ UFC, dispensado por el inoculador múltiple de Steers. Las placas fueron incubadas por 48 h a 36°C en 3% CO₂. Como cepa control se utilizó la cepa ATCC 14018 de *G. vaginalis*. La interpretación de los resultados se basó en el criterio del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS (16).

Se investigó la presencia de secuencias del gen de resistencia *tet* (M) y del gen de la integrasa *Int-Tn* del transposón *Tn* 916 en 8 cepas mediante PCR. Los procedimientos de PCR fueron efectuados de acuerdo a lo señalado anteriormente (17).

RESULTADOS

En la Tabla I se aprecia la distribución de serotipos de las 63 cepas de *G. vaginalis* estudiadas. Todas las cepas pudieron ser asignadas a un biotipo. Los biotipos 1 y 2 fueron los biotipos más frecuentemente aislados, correspondiendo a 44,4% de las cepas.

En la Tabla II se muestra la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas. Todas las cepas fueron sensibles a ampicilina, con CIM ≤0,25 µg/ml. Cuatro cepas (6,4%) presentaron resistencia a clindamicina y dos (3,2%) a eritromicina. Treinta y una cepas (49,2%) fueron resistentes a tetraciclina. En las ocho cepas en las que se investigó la presencia de los determinantes genéticos de resistencia a tetraciclina se observó el gen *tet* (M) presente en el transposón conjugativo *Tn* 916. La totalidad de las cepas presentó resistencia a ciprofloxacina con CIM ≥16 µg/ml.

Tabla I
DISTRIBUCIÓN DE BIOTIPOS DE GARDNERELLA VAGINALIS AISLADOS DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA

Biotipo	Cepas del biotipo n (%)
1	13 (20,6)
2	15 (23,8)
3	6 (9,5)
4	5 (7,9)
5	6 (9,5)
6	2 (3,2)
7	9 (14,3)
8	7 (11,1)
Total	63(99,9)

Tabla II
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE 63 CEPAS DE *GARDNERELLA VAGINALIS*

Antimicrobiano	Rango	CIM 50% (µg/ml)	CIM 90% (µg/ml)	% de resistencia
Ampicilina	0,03 - 0,12	0,06	0,12	0
Ciprofloxacina	≥16	≥16	≥16	100
Clindamicina	0,06 - ≥16	0,12	0,25	6,4
Eritromicina	0,06 - ≥16	0,12	0,12	3,2
Tetraciclina	0,5 - ≥16	≥0	≥16	49,2

DISCUSIÓN

Se han desarrollado dos esquemas de caracterización fenotípica de *G. vaginalis*. El esquema de biotipificación propuesto por Piot y cols permite asignar a las cepas a 8 biotipos, mientras que el esquema de Pedraza-Aviles y cols, que incorpora al sistema anterior la fermentación de azúcares, tiene un mayor poder de discriminación (10, 12). Con este esquema, los investigadores distinguieron 33 biotipos en 140 cepas de *Gardnerella* caracterizadas (18). No existe una asociación clara entre ciertos biotipos y VB, como tampoco hay un franco predominio de algunos serotipos en la microbiota vaginal comensal. Briselden y Hillier utilizando el mismo esquema que Piot encontraron una mayor frecuencia de los biotipos lipasa positiva (biotipos 1-4) en VB, mientras que Benito y cols observaron una mayor frecuencia de los biotipos 2, 4, 5 y 7 (11, 12). Por su parte, Piot y cols no observaron diferencias en la distribución de biotipos en pacientes con flora normal y VB (10). En nuestro estudio observamos representados los 8 biotipos de *Gardnerella*, aunque los biotipos 1 y 2 agruparon al 54,4% de las cepas. La información disponible sugiere que los biotipos 1 y 2, seguidos por el biotipo 5 constituirían los biotipos de mayor distribución en el mundo (12, 19).

Existe escasa información en la literatura acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de *G. vaginalis*, lo que se complica aún más debido a que no hay una buena correlación entre los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* y su eficacia clínica. Esto podría deberse a las complejas interrelaciones microbianas que se establecen en el ecosistema vaginal de pacientes con VB. Los antibióticos β-lactámicos muestran una buena actividad *in vitro*, similar hallazgo en este estudio, pero la alta concentración de bacilos gramnegativos productores de β-lactamasa en pacientes con VB, como *Bacteroides* spp y *Prevotella* spp, hacen que su eficacia *in vivo* sea limitada (19, 20). Con

relación a macrólidos, 62/63 cepas de *Gardnerella* fueron susceptibles a eritromicina, hallazgo similar al de otros estudios (19). Se ha señalado, no obstante, una mala actividad de la eritromicina en el tratamiento de la VB debido a la inactivación de la droga con el pH vaginal (19, 20). Con relación a la clindamicina, observamos 4 (6,4%) cepas resistentes, con CIM ≥16 µg/ml. Esto contrasta con los hallazgos de Goldstein y cols., quienes encontraron 100% de susceptibilidad a clindamicina en 108 cepas de *G. vaginalis* estudiadas (20). Cepas de *Gardnerella* con valores de CIM altos para clindamicina han sido mencionadas anteriormente (19). Con respecto a quinolonas, *G. vaginalis* es naturalmente resistente a ácido nalidixico y pareciera ocurrir el mismo fenómeno con respecto a ciprofloxacina ya que todas las cepas de nuestro estudio fueron resistentes a este antibiótico con CIM ≥16 µg/ml. Goldstein y cols y Kato y cols han demostrado buena actividad de nuevas quinolonas contra *G. vaginalis* (20, 21). Goldstein y cols estudiaron la actividad de levofloxacino en 108 cepas de esta bacteria, demostrando susceptibilidad en 102 (94,4%) cepas, mientras que Kato y cols encontraron 100% de susceptibilidad a este antibiótico en las 25 cepas analizadas (20, 21). Goldstein y cols evaluaron también garenoxacina, encontrando 97% de susceptibilidad, con CIM ≤2 µg/ml mientras que Kato y cols encontraron que la sitofloxacina inhibió las 25 cepas estudiadas con concentraciones de 0,1 µg/ml (20, 21). Ambas quinolonas han demostrado ser activas contra las bacterias anaerobias aisladas en VB, por lo que podrían tener una futura aplicación en el tratamiento de esta alteración del ecosistema vaginal (20, 21).

Aunque la tetraciclina no es un antibiótico usado en VB, la incluimos, porque es un indicador de resistencia bacteriana. Es interesante mencionar que *G. vaginalis* presenta menos resistencia a este antibiótico que *Streptococcus agalactiae*, que ocupa el mismo nicho ecológico, 49% versus 75%

(22). El mecanismo de resistencia en ambos microorganismos es la presencia del determinante *tetM* en un transposón conjugativo (17).

No incluimos en este estudio la evaluación de metronidazol por varias razones. Los estudios de actividad *in vitro* no reflejan su buena efectividad terapéutica en VB, el metabolito resultante de la oxidación hepática del antimicrobiano es al menos 2-4 veces más activo que la droga parental y se requiere una urgente estandarización de la técnica de estudio *in vitro*, ya que sus resultados son extraordinariamente dependientes de la técnica empleada (3, 19). Este problema queda en evidencia en los resultados de dos estudios microbiológicos recientes; Goldstein y cols observaron 29% de resistencia a esta droga, mientras que Aroutcheva y cols encontraron 59,9% de resistencia (20). Sin embargo, Goldstein y cols emplearon *test* de dilución en agar que permite determinar la CIM, mientras que Aroutcheva y cols., utilizaron la técnica de difusión con discos (20, 23).

No se dispone de una técnica de susceptibilidad recomendada por el NCCLS para el estudio de *G. vaginalis*. Por este motivo, en ausencia de una técnica estandarizada sería preferible la determinación de la CIM. Nosotros iniciamos este estudio aplicando la técnica de difusión con discos, pero demostramos muy baja reproducibilidad, debiendo cambiar la técnica de estudio.

En conclusión, en pacientes con VB se encuentran representados todos los biotipos de *G. vaginalis*, siendo los biotipos 1 y 2 los más frecuentes. Todas las cepas fueron susceptibles a ampicilina y resistentes a ciprofloxacina. La base genética de la resistencia a tetraciclina sería el determinante de resistencia *tet* (M), prevalente en bacterias genitales.

BIBLIOGRAFÍA

- Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 450-54.
- Ovalle A, Martínez MA, Gómez R, Saez J, Menares I, Aspillaga C y Schwarze JE. Parto prematuro con membranas intactas: microbiología del líquido amniótico y tracto genital inferior y su relación con los resultados materno neonatales. Rev Med Chile 2000; 128: 985-95.
- Hay PE. Therapy of bacterial vaginosis. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 6-9.
- Reimer LG, Reller LB. *Gardnerella vaginalis* bacteremia: a review of thirty cases. Obstet Gynecol 1984; 64: 170-72.
- Berardi-Grassias L, Roy O, Berardi JC. Neonatal meningitis due to *Gardnerella vaginalis*. Eur J Clin Microbiol & Infect Dis 1988; 7: 406-7.
- Ezzell JH, Many WJ. *Gardnerella vaginalis*: an unusual case of pyogenic liver abscess. Am J Gastroenterol 1988; 83: 1409-11.
- Josephson S, Thomason J, Sturino K, Zabransky R, Williams J. *Gardnerella vaginalis* in the urinary tract: incidence and significance in a hospital population. Obstet Gynecol 1988; 71: 245-50.
- Keane FE, Thomas BJ, Whitaker L, Renton A, Taylor-Robinson D. An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners. Genitourin Med 1997; 73:373-7.
- Pedraza-Aviles AG, Ortiz-Zaragoza MC, Mota-Vásquez R, Hernández-Soto C, Ramírez-Santana M, Terrazas-Maldonado ML. Treatment of urinary tract infection by *Gardnerella vaginalis*: a comparison of oral metronidazole versus ampicillin. Rev Latinoam Microbiol 2001; 43: 65-69.
- Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol 1984; 20: 677-79.
- Briselden AM, Hillier SL. Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2761-64.
- Benito R, Vásquez JA, Berrón S, Fenoll A, Nilo S. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. J Med Microbiol 1996; 21:357-9.
- Nugent R, Krohn M, Hillier SH. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301.
- Martínez MA, Pinto ME, Vidal A, Campos E, Jaña E. Diagnóstico microbiológico de *Gardnerella vaginalis*. Bol Hosp S J de Dios 1985; 31: 151-55.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed). 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing: M100-SB. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1998; 18(1).
- Martínez MA, Ovalle A, Santa-Cruz A, Barrera B, Vidal R, Aguirre R. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 2) from patients with adverse pregnancy outcomes and normal pregnant women. Scand J Infect Dis 2001; 33 (8): 604-10.
- Pedraza-Aviles AG, Inzunza-Montiel AE, Ortiz-Zaragoza MC, Morales-Espinosa MR, Ponce-Rosas ER. *Gardnerella vaginalis* biotypes: modification of a proposed system. Rev Latinoam Microbiol 1995; 37:19-26.
- Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations and controversies. Clin Microb Rev 1992; 5: 213-37.
- Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren YA,

-
- Tyrrell KL, Fernandez HT. In vitro activities of garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3995-96.
21. Kato N, Kato H, Tanaka-Bando K, Watanabe K, Ueno K. Comparison of in vitro activities of DU-6859a and other fluoroquinolones against Japanese isolates of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 1996; 23 Suppl 1:S31-5.
22. Martínez MA, Ovalle A, Duran C, Reid I, Urriola G, Garay B, Cifuentes M. Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae*. Rev Med Chile 2004; 132: 549-55.
23. Aroutcheva A A, Simones JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. Clin Infect Dis 2001; 33:1022-27.
-