

ACTIVIDAD SIALIDASA EN MUJERES CON VAGINOSIS BACTERIANA

ADRIANA M. OMBRELLA¹, ADRIANA BELMONTE¹, MONICA G. NOGUERAS¹, ISABEL RUIZ ABAD²,
EMMA G. SUTICH³, DIANA G. DLUGOVITZKY¹

¹Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología; ²Cátedra de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas;

³Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas,
Universidad Nacional de Rosario

Resumen La vaginosis bacteriana (VB) es un síndrome caracterizado por el sobrecrecimiento bacteriano de flora endógena Gram negativa, que desplaza a la flora lactobacilar normal. Dentro de las enzimas bacterianas, las sialidasas han sido consideradas factores de virulencia de muchos microorganismos patógenos que colonizan las distintas mucosas. Su presencia en fluidos vaginales puede estar correlacionada con VB. El propósito de este estudio fue comprobar la actividad de dicha enzima en mujeres con este síndrome y sin evidencia clínica de infección genital. Se estudiaron 112 mujeres (51 fueron pacientes con VB y 61 mujeres con flora colonizante habitual). Para la cuantificación de la actividad sialidasa se empleó la técnica basada en la hidrólisis enzimática de un derivado ácido del ácido metoxifenil acetil murámico. En la población estudiada se encontró que ambos grupos mostraron valores comprendidos entre 0.5 a 5.1 nmoles de metoxifenol, mientras que 11 de 52 pacientes con VB (21.17%), registraron valores superiores a 5.1 nmoles. La presencia de actividad sialidasa solamente no es índice de VB, excepto para valores mayores de 5.5 nmoles de metoxifenol, producidos en la reacción enzimática.

Palabras clave: sialidasa, vaginosis bacteriana, *Gardnerella vaginalis*

Abstract *Sialidase activity in women with bacterial vaginosis.* Bacterial vaginosis (VB) is a syndrome characterized by overgrowth of endogenous Gram negative bacterial flora and the lack of the normal flora. Within bacterial enzymes, sialidasas have been considered a virulence factor of many pathogenic microorganisms colonizing the different mucous membranes. Their presence in vaginal discharges can be correlated with VB. The aim of this study was to detect the activity of this enzyme in women with this syndrome and without clinical evidence of genital infection. Out of a total 112 women studied, 51 were patients with VB and the other 61 women presented normal vaginal flora. For the quantification of enzyme activity, the technique based on the enzymatic hydrolysis of a derivative acid of the acetyl metoxifenil muramic acid was used. In the studied population both groups shared values from 0.5 to 5.1 nmoles of metoxifenol, whereas only 11 out of 52 patients with VB (21.17%), registered more than 5.1 nmoles. The presence of sialidase activity is not enough to confirm VB, except for values greater than 5.5 nmoles of the metoxifenol produced in the enzymatic reaction.

Key words: sialidase, bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*

La vaginosis bacteriana (VB) es un síndrome caracterizado por el sobrecrecimiento bacteriano de flora endógena Gram negativa, tanto de anaerobios estrictos como facultativos, que desplaza a la flora lactobacilar.

El mecanismo por el cual esta infección, desde la vía genital baja puede comprometer al tracto genital superior, no está aún totalmente esclarecido.

Actualmente se reconoce a la VB como un factor de riesgo para distintas enfermedades, tanto en ginecología

como en obstetricia, pero poco se sabe sobre la patogenia, persistencia o recidivas de este síndrome.

Entre las enzimas bacterianas, las sialidasas han sido consideradas factores de virulencia de muchos microorganismos patógenos que colonizan las distintas mucosas, tales como: *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. agalactiae*; por lo tanto, están asociadas con la patogénesis de distintas enfermedades, entre las que podemos citar peritonitis, septicemia, gastritis, enfermedad periodontal y enfermedad respiratoria¹.

En un estudio realizado por Briselden y col.², se detectaron altos niveles de actividad sialidasa en mujeres con VB y ausencia de ella en mujeres sin esta entidad clínica. Varios autores hallaron correlación entre la presencia de sialidasa en el flujo vaginal y la VB. Se ha

Recibido: 17-V-2005

Aceptado: 16-I-2006

Dirección postal: Dra. Diana G. Dlugovitzky, Maipú 1340, 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina
Fax: (54-341)4804569 e-mail: dianad@fmedic.unr.edu.ar

sugerido que especies de los géneros *Prevotella* y *Bacteroides*, recuperadas en este síndrome, serían las principales productoras de esta enzima^{2, 3}.

En otros trabajos se menciona el hallazgo de residuos siálicos en mucinas presentes en el mucus⁴. Se piensa que la degradación de éstas por enzimas de agentes microbianos, es un factor importante en la patogenia de la colonización bacteriana de las mucosas, por generarse un compromiso local de las defensas del huésped y una provisión de nutrientes a la flora invasora^{1, 5, 6}.

Por lo tanto, puede decirse que las sialidasas mejoran la capacidad de los microorganismos para colonizar y destruir tejidos, jugando un rol importante en la nutrición bacteriana, interacción celular y evasión de la respuesta inmune⁵.

El propósito de este estudio fue investigar en nuestra población, la presencia de actividad sialidasa en fluido vaginal de pacientes con VB y de mujeres asintomáticas sin evidencias de infección genital, para luego comparar los niveles en ambas.

Materiales y métodos

Población

Se estudiaron 112 mujeres en edad fértil y no grávidas, sin tratamiento antibiótico local ni sistémico en el mes previo a su estudio, atendidas en el consultorio externo de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario (Cátedra de Ginecología de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario, Santa Fe, Argentina). Del total, 51 fueron pacientes con VB y 61 mujeres con flora colonizante habitual.

Las pacientes fueron informadas e invitadas a participar del estudio, brindando su consentimiento en forma escrita. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario).

Diagnóstico

El diagnóstico de VB fue establecido por la presencia de tres de los cuatro criterios clínicos de Amsel y col⁷: presencia de flujo vaginal homogéneo, adherente, blanco grisáceo; pH > 4.5; olor a aminas tras el agregado a la muestra de KOH al 10% p/v; presencia de células del epitelio escamoso de la vagina, con gran cantidad de bacilos adheridos a su superficie (denominadas células guías).

Los tres primeros criterios fueron evaluados en el consultorio médico y posteriormente en el laboratorio se realizó la coloración de Gram-Nicollé de los extendidos de cada muestra, empleándose para su interpretación la clasificación de Nugent⁸, la cual asigna un valor de 0 a 10 basándose en la cuantificación de morfotipos bacterianos presentes: lactobacilos, *Gardnerella vaginalis* o bacteroides (bacilos pequeños gram variables o gram negativos) y bacilos curvos Gram negativos. Se consideraron compatibles con VB aquellos valores ≥ 7 ; en estas pacientes la recuperación por cultivo fue predominantemente de *G. vaginalis*, incluyéndose también aquellas que tuvieron *Mycoplasma hominis* y/o *Ureaplasma urealyticum* como flora acompañante, pero fueron excluidas aquellas donde se recuperaron otros patógenos ya sea de fondo de saco o de endocervix.

Se eligieron aquellas pacientes que tuvieran 100% de aislamiento de *G. vaginalis* (n: 51), en esa población hubo 7.84%

(n: 4) de recuperación de *M. hominis*, 22.08% (n: 11) de *U. urealyticum* y 24,80% (n: 13) de formas curvas gram negativas compatibles morfológicamente con género *Mobiluncus*.

Las pacientes correspondientes al grupo control (n: 61) no presentaban ninguno de los signos clínicos mencionados para el otro grupo; la clasificación de Nugent debía ser de cero para su inclusión y el cultivo microbiológico demostraba a *Lactobacillus* spp como flora única. En este grupo hubo crecimiento de *U. urealyticum* en un 9,89% (n: 6) y ausencia de *M. hominis* así como formas compatibles con *Mobiluncus*.

Muestras

Las muestras vaginales se recolectaron previa abstinencia sexual de 72 horas con espéculo sin lubricar y se efectuó una toma de fondo de saco (para estudio de: *Candida* spp., *G. vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *S. agalactiae*; etc.) y otra toma del endocervix previa higiene del exocervix (para investigación de: *Chlamydia trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*).

Posteriormente se realizó un lavado vaginal con 5 ml de solución fisiológica estéril, recogiéndose con pipeta Pasteur descartable y colocándolo en dos tubos estériles, los cuales se conservaron a -70° C hasta el momento de su procesamiento.

Detección de actividad sialidasa

Para la cuantificación de la actividad de esta enzima se empleó la técnica descrita por Cauci y col⁹, basada en la hidrólisis enzimática de un derivado ácido del ácido metoxifenil acetil murámico¹⁰. Esta reacción da lugar a la formación de metoxifenol, que al reaccionar con aminoantipirina forma una quinona, y en presencia de ferricianuro de potasio ésta desarrolla un producto coloreado cuya densidad óptica se lee a 492 nm.

Se realizó una curva estándar de metoxifenol puro con un rango de concentraciones entre 0.175 y 40 nmoles. Este espectro abarca la concentración de metoxifenol formado a partir de lavados vaginales provenientes de pacientes con VB⁹.

Las reacciones se efectuaron en microplacas, colocando en cada pocillo 100 μ l de metoxifenol puro en concentraciones decrecientes (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25, 0.175 nanomoles respectivamente), realizándose la dilución con buffer de acetato de sodio 0.1M, pH 5.

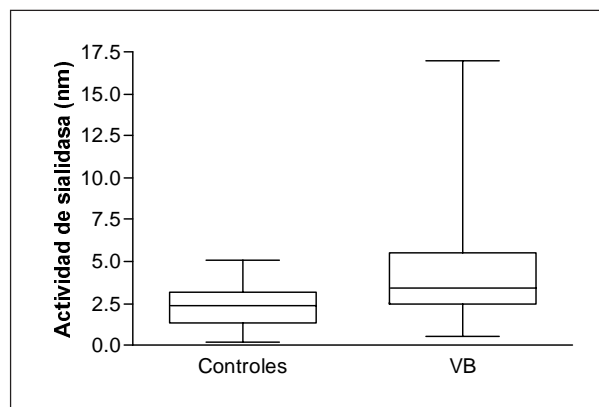
La curva estándar se graficó con los datos obtenidos por la lectura realizada a 492 nm.

La detección de actividad sialidasa en las muestras de lavados vaginales se realizó en micro placas, incubando 100 μ l de los mismos con 100 μ l de sustrato (ácido 2-(3'-metoxifenil)-N-acetil-D-neuramínico). El metoxifenol formado se reveló de manera similar a la utilizada para realizar la curva estándar. Las determinaciones fueron hechas por duplicado y las lecturas contra blanco de solución fisiológica, dentro de los 15 minutos de terminada la reacción.

La actividad de sialidasa de cada muestra se estableció por extrapolación de los valores de densidad óptica obtenida en la curva de metoxifenol puro y se expresó como nanomoles de metoxifenol formado en la reacción enzimática.

Resultados

Los valores de actividad sialidasa detectados en la totalidad de la población estudiada (n: 112), constituida por 61 controles y 51 VB, se presentan en la Fig. 1, que muestra la gran dispersión de los valores detectados en el grupo con VB.



VB: vaginosis bacteriana

Fig. 1.— Valores de actividad sialidasa en muestras de lavados vaginales (n: 112) de mujeres con vaginosis bacteriana (n: 51) y controles sanas (n: 61), expresada en nmoles de metoxifenol formado por la hidrólisis enzimática de un derivado ácido del ácido metoxifenol acetil murámico, cuantificado por método colorimétrico

Mientras que en el grupo control (mujeres con contenido vaginal lactobacilar exclusivamente), los valores estuvieron en el rango de 0.2 a 5.1 nmoles, en el grupo de mujeres con VB (contenido vaginal constituido por *G. vaginalis*, con presencia o no de micoplasmas y bacilos curvos compatibles con *Mobiluncus* spp), el rango obtenido fue de 0.5 a 17 nmoles.

La comparación entre los datos de ambos grupos fue hecha por análisis estadístico mediante el test no paramétrico de U Mann-Whitney.

Discusión

Durante la evolución, los microorganismos aprendieron a reconocer receptores en las células eucariotas que corresponden a distintas familias de proteínas y compuestos (glicopéptidos, glicoproteínas, proteinglicanos), que facilitan la colonización y los procesos de invasión.

Las proteínas bacterianas denominadas *adhesinas* se encuentran en la superficie de los microorganismos e interactúan con carbohidratos y glicoconjugados que llevan a la colonización de las mucosas.

Las sialidasas son enzimas que rompen la unión entre los residuos glicosídicos (glucoproteínas y glucolípidos) y el ácido siálico⁴, confiriéndole a las bacterias que la producen mayor poder injurioso, aumentando la capacidad de adhesión de las mismas.

Debido a esto, nos propusimos detectar el nivel de actividad de enzima sialidasa en lavados vaginales de mujeres con contenido microbiano habitual y mujeres con VB para poder asociar la presencia de la enzima con el síndrome.

A diferencia de lo publicado por Cauci y col.⁹, quienes informaron que 5 de cada 100 mujeres sanas tenían actividad sialidasa (con una especificidad del 95%), en nuestra población puede verse que ambos grupos compartieron valores comprendidos en el rango de 0.5 a 5.1 nmoles de metoxifenol, mientras que sólo 11 de 52 pacientes con VB (21.17%), registraron valores superiores a 5.1 (mediana: 3.4; rango: 0.5-17).

En función de lo expuesto, proponemos un punto de corte ≥ 5.1 nmoles de metoxifenol para el diagnóstico de VB, diez veces mayor al propuesto por Cauci, que tendría una especificidad del 100% para una población global de mujeres, sin discriminar si poseen o no Ig A anti *G. vaginalis*. Si propusiéramos un límite menor la determinación ofrecería mayor sensibilidad pero menor especificidad y lo que se requiere es confirmar con certeza el diagnóstico de esta etiología, que generalmente aparece confusa.

Smayevsky y col³ también realizaron un estudio de detección de sialidasa, pero por método en papel (*spot*) que es cualitativo y por consiguiente no es comparable con el método utilizado por nuestro grupo. Estos autores informan una sensibilidad del 92% y una especificidad del 94%, pero el límite de detección no es informado. Además, se evidencia que las poblaciones elegidas difieren, ya que estos autores reportaron en el grupo sin VB la presencia de 13% de *G. vaginalis*, 13% de *M. hominis*, 26% de *U. urealyticum* y un 3% de formas compatibles con género *Mobiluncus*, mientras que la población con VB fue semejante a la estudiada por nuestro grupo.

El análisis estadístico de los datos de actividad de sialidasa de la población estudiada evidenció una diferencia altamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.0001$). No obstante, se puede afirmar que la presencia de actividad sialidasa no sería índice exclusivo de VB, excepto para valores mayores de 5.5 nmoles de metoxifenol producidos en la reacción enzimática.

Restaría estudiar la presencia de IgA específica anti hemolisina de *G. vaginalis*, para investigar si la existencia de la misma está relacionada con los bajos niveles de actividad sialidasa detectados en el grupo de pacientes con VB (80%), de acuerdo a lo sugerido por Cauci y colaboradores⁹.

Bibliografía

1. Taylor G. Sialidasas: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr Opin Struct Bio* 1996; 6: 830-7.
2. Briselden AN, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SI. Sialidasas (neuraminidasas) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 663-6.
3. Smayevsky J, Fernández Canigia L, Lanza AY, Bianchini H. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001; 9: 17-22.

4. Odin A. Sialic acid in human cervical mucus, in hog seminal gel, and in ovomucin. *Act Chem Scand* 1955; 9: 1235-6.
5. Corfield AP. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiol* 1992; 2: 509-21.
6. Gahmberg CG, Tolvanen M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 308-11.
7. Amsel R., Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis; diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
8. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297-301.
9. Cauci S, Driussi S, Monte R, Lanzafame P, Pitzus E, Quadrioglio F. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 511-5.
10. Santer UV, Yee-Foon J, Glick MC. A rapid assay for neuraminidase: the detection of two differences in activity associated with virus transformation. *Biochim Biophys Act* 1978; 523: 435-42.

Sobre la memoria

Sabía las formas de las nubes australes del amanecer del treinta de abril de mil ochocientos ochenta y dos y podía compararlas en el recuerdo con las vetas de un libro en pasta española que sólo había mirado una sola vez y con las líneas de la espuma que un remo levantó en el Río Negro [. . .] Me dijo: *Más recuerdos tengo yo solo que los que habrán tenido todos los hombres desde que el mundo es mundo.* [. . .] Sospecho, sin embargo, que no era muy capaz de pensar. Pensar es olvidar diferencias, es generalizar, abstraer.

Jorge Luis Borges

Funes el memorioso. En: Ficciones. Buenos Aires: Emecé, 1987, p 111

Sin memoria no hay historia. Pero también sin historia no hay memoria. Sin memoria —o sea, el ejercicio del recuerdo— no es posible registrar lo pasado, y por lo tanto no es posible recordar lo sucedido. Y un pueblo se construye en base a su historia. Un pueblo sin memoria es un pueblo autista. Y en consecuencia, al servicio de intereses ajenos. Es por eso que la memoria es un campo de batalla. [. . .] Superar lo ocurrido es posible. [. . .] Enfrentarse con el pasado para hacerlo justamente pasado. De lo contrario es un presente inmóvil. Pero hacer del pasado un pasado no es olvidar. No es olvidando que se logra, sino recordando. Cuando el recuerdo se convierte en conciencia se puede decir que lo pasado es pasado.

Luis Felipe Noé

Por algo será, por algo fue. En: Ñ, Revista de cultura, *Clarín*, 18-3-2006, p 29