



Diagnóstico de vaginitis-vaginosis mediante hibridación con sondas de ADN

Lidia García-Agudo,¹ Iría Jesús de la Calle,^{1,2} Manuela Román Enry,¹ Pilar Aznar Marín,¹ Manuel Rodríguez-Iglesias^{1,3}

RESUMEN

Antecedentes: las infecciones vaginales son un motivo frecuente de consulta médica. Por orden de frecuencia: vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal y la tricomoniasis son responsables de 90% de las vaginitis-vaginosis.

Objetivo: evaluar una técnica de hibridación de ADN para la detección simultánea de *Gardnerella vaginalis*, especies de *Candida* y *Trichomonas vaginalis*, como alternativa a los métodos microbiológicos convencionales.

Material y métodos: estudio prospectivo, transversal y comparativo efectuado con base en el análisis de 1,003 exudados vaginales de mujeres sintomáticas atendidas en el Hospital Universitario de Puerto Real, Cádiz, España. Se obtuvieron dos muestras de cada mujer, una para diagnóstico microbiológico rutinario (examen en fresco, tinción de Gram y cultivo micológico) y otra para hibridación con sondas de ADN (Affirm VPIII, Becton Dickinson). Esta técnica molecular detecta concentraciones clínicamente significativas de *G. vaginalis* (2×10^5 UFC/mL), *Candida spp* (1×10^4 células) y *T. vaginalis* (5×10^3 parásitos).

Resultados: de los 1003 exudados estudiados, se diagnosticó vaginosis bacteriana en 30.6% de los casos, candidiasis vulvovaginal en 23.3% y tricomoniasis en 0.5%. Mediante el método Affirm VPIII 27.5%, 27.4% y 0.5%, respectivamente, de las muestras fueron positivas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la técnica molecular y los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico ($p < 0.05$).

Conclusiones: la técnica Affirm VPIII tuvo buena concordancia con el examen en fresco, la tinción de Gram y el cultivo micológico. Aunque su costo es relativamente elevado, resulta rápida, reproducible, sencilla y puede efectuarse en el laboratorio clínico y en los consultorios de Ginecología, lo que permite prescribir un tratamiento específico temprano.

Palabras clave: hibridación de ácidos nucleicos, vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal, vaginitis por tricomonas.

ABSTRACT

Background: Vaginal infections lie among the most common causes women ask for medical advice. In order of frequency bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, and trichomoniasis are responsible for 90% of vaginitis/vaginosis.

Objective: To evaluate a DNA hybridization test for simultaneous molecular detection of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* species and *Trichomonas vaginalis*, as an alternative to conventional microbiological methods.

Material and methods: Cohort, cross-sectional, and comparative study of 1,003 vaginal samples from symptomatic women from our health-care area. Two swabs were obtained from each woman, one for routine microbiological diagnosis of vaginal infection (wet mount, Gram stain, and mycological culture) and the other for the DNA hybridization test (Affirm VPIII, Becton Dickinson). This method detects clinically significant levels of *G. vaginalis* (2×10^5 CFU/ml), *Candida spp.* (1×10^4 cells) and *T. vaginalis* (5×10^3 trichomonads).

Results: Out of the 1,003 women studied, 30.6% tested positive for bacterial vaginosis, 23.3% for vulvovaginal candidiasis, and 0.5% for trichomoniasis. The Affirm VPIII method turned out positive in 27.5%, 27.4% and 0.5% of cases, respectively. No statistically significant differences were found between the molecular technique and conventional methods for microbiological diagnosis of vaginitis/vaginosis ($p < 0.05$).

Conclusion: The Affirm VPIII test correlated well with wet mount, Gram stain and mycological culture. Although its cost is relatively high, it is fast, reproducible, easy, and can be done in either clinical laboratories or Gynecology offices, which permits prescribing a specific early treatment.

Keywords: Nucleic acid hybridization, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, trichomonas vaginitis.

RÉSUMÉ

Antécédents: Les infections vaginales sont un motif fréquent de consultation médicale. Par ordre de fréquence: la vaginose bactérienne, candidose vulvo-vaginale et la trichomonase sont responsables de 90% des vaginites, des vaginoses.

Objectif: évaluer une technique d'hybridation d'ADN pour la détection simultanée de *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* et *Trichomonas vaginalis*, comme une alternative aux méthodes microbiologiques conventionnelles.

Méthodes: Etude prospective, transversale et comparative basée sur l'analyse de 1003 prélèvements vaginaux de femmes symptomatiques traités à l'Hôpital Universitaire de Puerto Real, Cadix, Espagne. Deux échantillons ont été obtenus à partir de chaque femme, l'un pour le diagnostic microbiologique de routine (frottis, coloration de Gram et la culture mycologique) et l'autre pour l'hybridation avec des sondes d'ADN (Affirm VPIII, Becton Dickinson). Cette technique moléculaire détecte des concentrations cliniquement significatives de *G. vaginalis* (2×10^5 CFU / ml), *Candida spp* (1×10^4 cellules) et *T vaginalis* (5×10^3 parasites).

Résultats: Des 1003 exsudats étudiés, la vaginose bactérienne a été diagnostiquée dans 30,6% des cas, candidose vulvo-vaginale et la trichomonase chez 23,3% à 0,5%. Par la méthode Affirm VPIII

27,5%, 27,4% et 0,5% des échantillons étaient positifs, respectivement. Il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre les méthodes de l'art classique et moléculaires de diagnostic microbiologique ($p < 0,05$).

Conclusions: Affirmer technique VPIII eu un bon accord avec le frottis, coloration de Gram et la culture mycologique. Même si son coût est relativement élevé, il est rapide, reproductible, simple et peut être effectuée dans les laboratoires cliniques et cliniques de gynécologie, permettant prescrire un traitement spécifique précoce.

Mots-clés: hybridation d'acides nucléiques, la vaginose bactérienne, candidose vulvo-vaginale, vaginite à trichomonas.

RESUMO

Antecedentes: infecções vaginais são uma razão comum para consulta médica. Em ordem de frequência: vaginose bacteriana, a candidíase vulvovaginal e tricomoníase são responsáveis por 90% da vaginite, vaginose.

Objetivo: Avaliar a técnica de hibridação de ADN para a detecção simultânea de *Gardnerella vaginalis*, as espécies de *Candida* e *Trichomonas vaginalis*, como uma alternativa aos métodos convencionais de microbiologia.

Métodos: Estudo prospectivo, transversal e comparativo com base na análise de 1.003 secreção vaginal de mulheres sintomáticas atendidos no Hospital Universitário de Puerto Real, Cádiz, Espanha. Duas amostras foram obtidas de cada mulher, uma para o diagnóstico de rotina microbiológica (esfregaço, cultura de Gram e micológica) e um para a hibridação com as sondas de ADN (Afirmary VPIII, Becton Dickinson). Esta técnica detecta molecular concentrações clinicamente significativos de *G. vaginalis* (2x10⁵ CFU / mL), *Candida* spp (1x10⁴ células) e *T vaginalis* (5x10³ parasitas).

Resultados: dos 1003 exsudatos estudados, vaginose bacteriana foi diagnosticada em 30,6% dos casos, a candidíase vulvovaginal e tricomoníase em 23,3% para 0,5%. Pelo método Afirmary VPIII 27,5%, 27,4% e 0,5% de amostras positivas, respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os métodos da arte moleculares e convencionais de diagnóstico microbiológico ($p < 0,05$).

Conclusões: afirmar técnica VPIII teve boa concordância com o exame direto, a cultura de Gram e micológica. Embora o seu custo é relativamente elevado, é rápido, reprodutível, simples e pode ser realizado em laboratórios clínicos e ginecologia, permitindo prescrever o tratamento precoce e específico.

Palavras-chave: hibridação de ácido nucléico, a vaginose bacteriana, a candidíase vulvovaginal, vaginite trichomonas.

Las infecciones vaginales son un motivo frecuente de consulta médica y tienen una gran trascendencia social por su alta incidencia. Por orden de frecuencia¹⁻³ la vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal y la tricomoniasis son responsables de 90% de las vaginitis-vaginososis.^{4,5} Otras causas menos comunes afectan, sobre todo, a las niñas prepúberes: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, enterobacterias, *Enterobius vermicularis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.^{6,7}

La vaginosis bacteriana se debe a un desequilibrio en el ecosistema vaginal, con proliferación de *Gardnerella vaginalis* junto con otras bacterias anaerobias, como: *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Mobiluncus*, quizá también *Atopobium vaginae* y, ocasionalmente, *Mycoplasma hominis*.^{1,8,9} La candidiasis vulvovaginal o vulvovaginitis candidiásica^{5,10} la ocasionan levaduras del género *Candida*, sobre todo *Candida albicans* (70-80% de los casos) y, en menor proporción, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. famata* y *Saccharomyces cerevisiae*.^{11,12} Es una infección que suele ser recurrente.^{13,14} La vaginitis parasitaria o tricomoniasis, causada por el protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis*, es la única infección vaginal considerada totalmente de transmisión sexual; a menudo se asocia con otras infecciones transmitidas sexualmente y, en menor medida, con complicaciones ginecológicas.^{15,16}

Las manifestaciones clínicas de estas infecciones son, con frecuencia, inespecíficas e insuficientes para establecer el diagnóstico, lo que hace necesario disponer de la confirmación microbiológica.^{2,17,18} El diagnóstico microbiológico se fundamenta, principalmente, en el examen microscópico del exudado vaginal, mediante observación en fresco y por tinción, y el cultivo microbiológico en medios selectivos: agar *Gardnerella* para la vaginosis, agar de Sabouraud para

¹ Especialista en Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Puerto Real. Cádiz, España.
² Profesora Asociada. Universidad de Cádiz, España.
³ Profesor titular. Universidad de Cádiz, España.

Correspondencia: Dra. Lidia García-Agudo. Hospital de Tomelloso, Vereda de Socuéllamos s/n, Tomelloso 13700 Ciudad Real, España. Correo electrónico: lidiagarciaagudo@gmail.com
 Recibido: octubre 2012. Aceptado: marzo 2013.

Este artículo debe citarse como: García-Agudo L, Jesús de la Calle I, Román-Enry M, Aznar-Marín P, Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico de vaginitis-vaginososis mediante hibridación con sondas de ADN. Ginecol Obstet Mex 2013;81:195-200.

la candidiasis vulvovaginal y caldo de Roiron o Diamond para la tricomoniasis. Otros procedimientos diagnósticos incluyen técnicas colorimétricas, serológicas, cromatografía gas-líquido y técnicas de biología molecular, con una alta sensibilidad y especificidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación mediada por transcripción (TMA).¹⁹⁻²²

Recientemente apareció en el mercado una nueva técnica de biología molecular denominada Affirm VPIII (Becton Dickinson, EUA), basada en la hibridación de ácidos nucleicos que permite la detección simultánea de *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp y *Trichomonas vaginalis* en muestras de exudado vaginal de mujeres con síntomas y signos de vaginitis-vaginosis. Esta técnica ofrece resultados en menos de una hora, es sencilla de realizar y constituye una buena alternativa a los métodos microbiológicos habituales de diagnóstico.^{4,9,20,23,24,26,27} El objetivo de este ensayo es evaluar la técnica Affirm VPIII en exudados vaginales de mujeres con sospecha de infección vaginal frente a la tinción de Gram para vaginosis, el cultivo micológico para candidiasis y el examen en fresco para tricomoniasis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, transversal y comparativo de vaginitis-vaginosis efectuado en 1,003 mujeres sintomáticas del Área Sanitaria atendida por médicos del Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz, España). De cada mujer se obtuvieron dos muestras vaginales, una de ellas se reservó para la prueba de hibridación de ADN y la otra se utilizó para el diagnóstico microbiológico rutinario de infección vaginal. Este procedimiento comprendió: inoculación de una placa de agar de Sabouraud con cloranfenicol para cultivo de levaduras, tinción de Gram para diagnóstico de vaginosis bacteriana y, finalmente, suspensión en solución salina para observación en fresco de *Trichomonas vaginalis*.

Criterios diagnósticos

El diagnóstico de vaginosis bacteriana se estableció en los casos en que la tinción de Gram mostró células clave, de acuerdo con los criterios de Nugent y su grupo.²⁸ El cultivo micológico se consideró positivo cuando se apreció un crecimiento $\geq 10^4$ UFC/mL de exudado. El diagnóstico de tricomoniasis se confirmó en los casos en los que se visualizaron parásitos móviles en el examen en fresco.

Prueba de hibridación de ADN (Affirm VPIII)

El análisis de las muestras con la prueba Affirm VPIII se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta técnica detecta concentraciones clínicamente significativas de *Gardnerella vaginalis* (2×10^5 UFC/mL), *Candida* spp (1×10^4 células) y *Trichomonas vaginalis* (5×10^3 parásitos) utilizando, para cada microorganismo, una sonda de captura y una sonda biotinilada para desarrollo de color, ambas monocatenarias y complementarias a secuencias genéticas únicas de estos microorganismos. Cada sonda de captura está inmovilizada en una perla incrustada en una tarjeta de análisis que, además, incluye un control positivo y un control negativo. Tras una lisis para que las células liberen el ADN, la muestra se deposita en una *cassette* que contiene la sonda de desarrollo de color, y ésta se coloca en el microprocesador automático BD MicroProbe, donde se lleva a cabo la hibridación en unos 30 minutos. La reacción se revela con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa unido a un sustrato indicador que cambia la perla de incolora a azul en caso de producirse la hibridación (Figura 1).

Análisis estadístico

Mediante tablas de contingencia de 2x2 se calcularon: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica Affirm VPIII, utilizando la tinción de Gram, el cultivo micológico y el examen en fresco como estándares para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal y tricomoniasis. Para establecer las diferencias estadísticamente significativas



Figura 1.

entre el test evaluado y los métodos convencionales de diagnóstico, se utilizó la prueba de la χ^2 con un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

De los 1,003 exudados vaginales estudiados con los métodos habituales, se diagnosticó infección vaginal en 546 (54.4%) casos: vaginosis bacteriana en 307 (30.6%), candidiasis vulvovaginal en 234 (23.3%) y tricomoniasis en 5 (0.5%). Las mujeres en las que no se detectó ninguna de estas afecciones vaginales se consideraron grupo control.

Mediante la técnica Affirm VPIII se comprobó la hibridación de alguna de las sondas de ADN en 556 muestras de exudado vaginal (55.4%): vaginosis bacteriana en 276 (27.5%), candidiasis vulvovaginal en 275 (27.4%) y tricomoniasis en 5 (0.5%). En 87 (15.6%) de estas muestras se comprobó positividad simultánea para *Gardnerella vaginalis* y *Candida* spp. En 514 muestras (94.1%) existió acuerdo entre el test de hibridación y la tinción de Gram, el cultivo micológico y el examen en fresco. En el Cuadro 1 se refleja esta concordancia para cada una de las tres infecciones vaginales diagnosticadas.

La prueba Affirm VPIII fue positiva en una paciente que, conforme a los criterios clínicos y la tinción de Gram, no fue diagnosticada de vaginosis bacteriana. En cuanto a candidiasis vulvovaginal, la técnica de hibridación mostró positividad en 41 pacientes en las que el cultivo fue negativo. Todas las pacientes en quienes se observó *Trichomonas vaginalis* en el exudado resultaron positivas mediante el método molecular ensayado.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la prueba de hibridación de ADN y los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La vaginosis bacteriana es la infección vaginal más frecuente en las mujeres atendidas en nuestra área sanitaria, al igual que sucede en otras poblaciones que han sido sujeto de estudio.^{4,26,27} La candidiasis vulvovaginal se ha referido con gran incidencia en mujeres embarazadas y sexualmente activas,^{5,29} pero en nuestro estudio la incidencia fue moderada porque englobaba a todo tipo de mujeres. No es infrecuente la coinfección vaginal por *Gardnerella vaginalis* y *Candida* spp que en nuestra serie supone 15.6%, porcentaje superior al descrito en otras áreas geográficas, aunque existen pocos estudios al respecto.^{27,30,31} Este hecho indica que la recuperación de un microorganismo no descarta que haya otros. Sin embargo, la tricomoniasis tiene una baja incidencia en la mayor parte de las series publicadas,^{4,25-27} aunque superior a la observada en nuestro estudio, que ha sido muy baja. De cualquier manera, la prevalencia real de la tricomoniasis está subestimada porque los métodos rutinarios de diagnóstico tienen baja sensibilidad.

En general, las técnicas habituales utilizadas para el diagnóstico de infecciones vaginales presentan ciertos problemas que dificultan o retrasan el diagnóstico. El examen microscópico requiere personal adiestrado, es subjetivo y de baja sensibilidad;³² el cultivo, a su vez, exige tiempo para la detección del crecimiento de los patógenos vaginales, lo que supone una demora en el diagnóstico o, bien, no es recomendable en la vaginosis bacteriana, debido al gran número de mujeres colonizadas por *Gardnerella vaginalis*. Las técnicas moleculares no están disponibles en la mayor parte de los laboratorios, son complejas y, en algunos casos, de rendimiento inferior a las técnicas microscópicas.^{5,22}

En términos generales, la técnica de hibridación de sondas de ADN Affirm VPIII tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de las infecciones

Cuadro 1. Resultados de la técnica Affirm VPIII frente a la tinción de Gram, el cultivo micológico y el examen en fresco

Patrón de referencia	Verdaderos positivos	Falsos positivos	Falsos negativos	Técnica Affirm VPIII				
				Verdaderos negativos	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Tinción de Gram	275	1	32	695	89.6	99.9	99.6	95.6
Cultivo micológico	234	41	0	728	100	94.7	85.1	100
Examen en fresco	5	0	0	998	100	100	100	100

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

vaginales más frecuentes en clínica,³² y su rendimiento es comparable con los métodos habituales de diagnóstico microbiológico. No obstante, los mejora al permitir realizar el diagnóstico diferencial de las mismas con una sola prueba.

En el caso de la vaginosis bacteriana, nuestros resultados fueron similares a los hallados por otros autores,^{23,24,27} pero inferiores a los de otras publicaciones.^{4,25,26} La técnica parece muy rentable porque la tinción de Gram es de dudosa interpretación en ciertos casos y está sujeta a la calidad de la muestra, de la tinción y la disponibilidad de personal experto en la interpretación del resultado. Aunque el cultivo es rentable para el diagnóstico, el crecimiento es muy lento y su sensibilidad es sólo ligeramente superior a la de la tinción de Gram,^{23,25} razón por la que no se eligió como método diagnóstico en nuestro estudio. La hibridación de ADN, al no detectar concentraciones menores a 2×10^5 UFC/mL de *Gardnerella vaginalis*, garantizaría la detección correcta de infecciones clínicamente relevantes.^{24,27} El resultado falso positivo observado con esta técnica podría deberse a la subjetividad de la interpretación de la tinción de Gram.

Con respecto al rendimiento de la técnica Affirm VPIII en el diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal, observamos un excelente comportamiento. Se muestra superior al cultivo cuando se valora un crecimiento $\geq 10^4$ UFC/mL, ya que esta concentración ha demostrado estar relacionada con vulvovaginitis. Además, parte de las muestras positivas por Affirm VPIII también lo fueron para *Gardnerella vaginalis*. Existen muy pocos estudios que evalúen este test de hibridación en el diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal, y las escasas referencias comparan el test con la observación en fresco²⁶ o la tinción de Gram²⁷ y comunican resultados similares a los nuestros. El test de hibridación no diferencia entre las distintas especies de *Candida* y no detecta otros géneros de levaduras implicados en la vulvovaginitis, como es el caso de *Saccharomyces*.^{12,33} Este hecho es fundamental para establecer el tratamiento específico, por lo que el cultivo sigue siendo necesario para el aislamiento de la levadura y su posterior identificación,⁹ lo que no excluye la utilización del test de hibridación como técnica de cribado.

En el caso de la tricomoniasis, los resultados de nuestro ensayo son excelentes, iguales a los comunicados por Briselden²⁵ y DeMeo³⁴ utilizando la observación en fresco como método de referencia. Estos mismos autores emplean también el cultivo, con sensibilidad de 98 y 80%,

respectivamente. Aunque el cultivo se ha considerado clásicamente mejor que la observación en fresco,³⁵ tiene relativa utilidad clínica por necesitar una incubación de 3-5 días. Por eso no se incluyó como método diagnóstico en nuestro estudio.

El sistema de transporte para la recolección de muestras, que incluye la técnica, permite la viabilidad de los microorganismos durante 72 horas a temperatura ambiente, sin disminución de su sensibilidad,³⁶ lo que permite diferir la realización del ensayo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio puede concluirse que la técnica Affirm VPIII tiene alta concordancia con los métodos diagnósticos convencionales, es rápida, reproducible, de ejecución sencilla, no necesita personal altamente especializado y puede realizarse en el laboratorio clínico y en los consultorios de atención ginecológica, lo que permite prescribir un tratamiento específico oportuno. Además, es una herramienta complementaria a los métodos habituales cuando los resultados microbiológicos no confirman el diagnóstico clínico, y permite la detección de infecciones mixtas. Aunque su costo es relativamente elevado, lo que limita su disponibilidad, su valor como técnica de tamizaje reduciría la utilización de recursos de salud.²⁴

Agradecimientos

A Juan Ramón León Cámara, Natalia Soledad Erquínigo Agurto y María Jesús Castro Martínez su contribución en la implantación, desarrollo y mejora continua de este proyecto. Sin ellos, no habría sido posible.

REFERENCIAS

1. De la Calle I J, De la Calle MAJ. Vaginosis bacteriana. Med Clin (Barc) 2009;133:789-797.
2. Buitrón García R, Bonifaz A, Amancio Chassin O, Basurto Kuba E, Araiza J, y col. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. Ginecol Obstet Mex 2007;75:68-72.
3. Kamara P, Hylton-Kong T, Brathwaite A, Del Rosario GR, Kristensen S, et al. Vaginal infections in pregnant women in Jamaica: prevalence and risk factors. Int J STD AIDS 2000;11:516-520.
4. Brown HL, Fuller DD, Jasper LT, Davis TE, Wright JD. Clinical evaluation of Affirm VPIII in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. Infect Dis Obstet Gynecol 2004;12:17-21.
5. Sobel JD. Vaginal infections in adult women. Sexually transmitted diseases. Med Clin North Am 1990;74:1573-1602.

6. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmae A, Salembier G, et al. Definition of a type of vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginosis. *Brit J Obstet Gynaecol* 2002;109:34-43.
7. Cuadros J, Mazon A, Martínez R, González P, Gil-Setas A, et al. The aetiology of paediatric inflammatory vulvovaginitis. *Eur J Pediatric* 2004;162:105-107.
8. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, van Simaey L, de Ganck C, de Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol* 2005;5:61. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/61>
9. Schwiertz A, Tara D, Kerstin R, Rusch V. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? *Annl Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:4. Disponible en: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/5/1/4>
10. Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis. *Lancet* 2007;369:1961-1971.
11. Montesano L, García-Martos P, Fernández M, Revuelta JA, Agudo E. Candidiasis vulvovaginal: análisis de 502 episodios. *Rev Esp Microbiol Clin* 1992;7:394-397.
12. García-Martos P, Hernández JM, Mira J, Galán F, Marín P. *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:453-454.
13. Ventolini G, Baggish MS. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Newslett* 2006;12:93-95.
14. Buitrón García R, Romero Cabello R, Cruz Talonia F, Bonifaz A, Zarama Márquez F. Estudio de especies de *Candida* no albicans y su relación con candidiasis vulvovaginal recurrente. *Ginecol Obstet Mex* 2002;70:431-6.
15. Lossick JG, Kent HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1217-1222.
16. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:300-317.
17. Karaca M, Bayram A, Kocoglu ME, Gocmen A, Eksi F. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2005;32:172-174.
18. Anderson MR, Klink K, Cohnssen A. Evaluation of vaginal complaints. *JAMA* 2004;291:1368-1379.
19. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005;353:899-911.
20. Andrea SB, Chapin KC. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD Affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: Performance parameters and epidemiologic implications. *J Clin Microbiol* 2011;49:866-9.
21. Schoonmaker JN, Lunt BD, Lawellin DW, French JL, Hillier SL et al. A new proline aminopeptidase assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:737-742.
22. Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1266-1271.
23. Flores-Paz R, Rivera-Sánchez R, Ruix-Pérez NJ, Arriaga-Alba M. Utilidad del sistema Affirm VPIII y de la prueba L-Pap para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:338-342.
24. Witt A, Petricevic L, Kaufmann U, Gregor H, Kiss H. DNA hybridization test: Rapid diagnostic tool for excluding bacterial vaginosis in pregnant women with symptoms suggestive of infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:3057-3059.
25. Briselden AM, Hillier SL. Evaluation of Affirm VP Microbial Identification Test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:148-152.
26. Ferris DG, Hendrich J, Payne PM, Getts A, Rassekh R et al. Office laboratory diagnosis of vaginitis. Clinician-performed tests compared with a rapid nucleic acid hybridization test. *J Fam Pract* 1995;41:575-581.
27. Gazi H, Degerli K, Kurt O, Tekler A, Uyar Y et al. Use of DNA hybridization test for diagnosing bacterial vaginosis in women with symptoms suggestive of infection. *APMIS* 2006;114:784-787.
28. 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.
29. Balu RB, Savitz DA, Ananth CV, Hartmann KE, Miller WC et al. Bacterial vaginosis and vaginal fluid defensins during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1267-1271.
30. Mendoza-González A, Sánchez-Vega JT, Sánchez-Peón I, Ruiz-Sánchez D, Tay-Zavala J. Frecuencia de vaginosis producida por *Gardnerella vaginalis* y su asociación con otros patógenos causantes de infección genital en la mujer. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:272-6.
31. Belmonte A, Noguera MG, Ombrella AM, Ruiz Abad I, Nistal MA y col. Estudio microbiológico de vaginitis y vaginosis en mujeres sexualmente activas. *Medicina (B Aires)* 2002;62:103-104.
32. Levi AW, Harigopal M, Hui P, Schofield K, Chheng DC. Comparison of Affirm VPIII and Papanicolaou tests in the detection of infectious vaginitis. *Am J Clin Pathol* 2011;135:442-7.
33. Echeverría-Irigoyen MJ, Eraso E, Cano J, Gomáriz M, Guarro J, Quindós G. *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: Microbiology and in vitro antifungal susceptibility. *Mycopathologia* 2011;172:201-5.
34. DeMeo LR, Draper DL, McGregor JA, Moore DF, Peter CR, Kapernick PS, McCormack WM. Evaluation of a deoxyribonucleic acid probe for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal secretions. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1339-42.
35. Kreiger JN, Tam MR, Stevens CE, Nielsen IO, Hale J et al. Diagnosis of trichomoniasis: Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA* 1988;259:1223-1227.
36. Brown HL, Fuller DA, Davis TE, Schwabke JR, Hillier SL. Evaluation of the Affirm Ambient Temperature Transport System for the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species from vaginal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:3197-3199.