

112-361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA

EVALUACION DE LA EFICACIA DIAGNOSTICA DE
SONDAS DE ADN VS EXAMEN EN FRESCO,
CRITERIOS DE NUGENT EN PACIENTES CON
PATOLOGIA VAGINAL

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN PATOLOGIA CLINICA

P R E S E N T A :

DRA. ELISA MONTES DE OCA ACOSTA



IMSS

DR. CELSO PEREZ ROSTRO
ASESORES: DRA. ROSA MARIA GARCIA ESCAMILLA
DRA. MARIA DE JESUS BERNAL GUTIERREZ

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



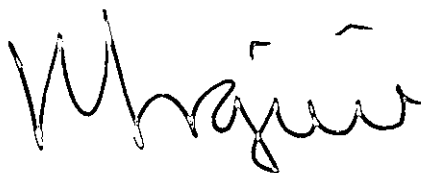
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

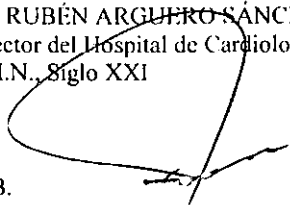
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

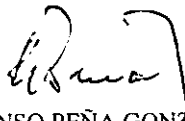
EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE SONDAS DE ADN VS
EXAMEN EN FRESCO, CRITERIOS DE NUGENT EN PACIENTES CON
PATOLOGÍA VAGINAL



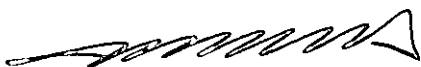
V.B.
DR. RUBÉN ARGÜERO SÁNCHEZ
Director del Hospital de Cardiología
C.M.N., Siglo XXI



V. B.
DR. JUAN CARLOS NECOECHEA ALVA
Jefe de la División de Educación e
Investigación Médica



V.B.
DR. ALONSO PEÑA GONZÁLEZ
Subjefe de la División de Educación
e Investigación Médica



V.B.
DRA. ROSA MARÍA GARCÍA ESCAMILLA
Profesora titular del Curso de Patología Clínica

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
Antecedentes	6-12
Planteamiento del problema	13
Objetivos	14
Hipótesis	15
Material y Método	16-18
Resultados	19-20
Discusión	21
Conclusiones	22
Agradecimientos	23
Bibliografía	24-25
Cuadros	26-29

RESUMEN

Evaluación de la eficacia diagnóstica de sondas de ADN vs examen en fresco, criterios de Nugent en pacientes con patología vaginal

Montes de Oca A. E., Pérez R. C., García Escamilla R.M., Bernal Gutiérrez Ma. De J.

Se realizó un estudio transversal para conocer la eficacia diagnóstica de sondas de ADN vs examen en fresco, criterios de Nugent en pacientes con cuadro clínico de infección vaginal. Se realizó en 100 mujeres adultas, se les aplicó un cuestionario y se colectó muestra de secreción vaginal, fondo de saco posterior y laterales con espejo vaginal, sin lubricante por medio de hisopos de algodón y dacrón estériles, para la identificación microscópica por técnicas de preparación en fresco y tinción de Gram y Método de sondas genéticas Affirm VPIII. El objetivo fue evaluar la eficacia diagnóstica de Affirm VPIII para la detección de *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.* y *Gardnerella vaginalis*.

Las muestras se sembraron en Agar Casman y Nickerson, se realizó filamentación en suero de las colonias que crecieron en este cultivo. Resultados: El análisis estadístico se realizó por comparación en tablas de 2 X 2 utilizando como estándar de oro el cultivo el cual se empleó también para conocer el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo a través del teorema de Bayes. Se realizó también la prueba de X^2 De un total de 100 mujeres estudiadas 57% (57/100) presentó positividad a alguno de los microorganismos buscados. Con el examen en fresco, levaduras sugestivas de *Candida* 15.84% (15/100), *Trichomonas vaginalis* 2% (2/100), células clave sugestivas de *Gardnerella vaginalis* 40% (40/100). La utilización del examen en fresco y tinción de Gram se deben utilizar como prueba de tamizaje y el método de sondas genéticas en casos de infecciones recurrentes.

Key words: sondas de ADN, *Candida*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, patología vaginal

INTRODUCCIÓN

La vaginitis o inflamación vaginal es un problema común que representa más de 10 Millones de visitas anuales al médico. La tricomoniasis, vaginosis bacteriana y la infección por levaduras son las tres causas más frecuentes de infección vaginal. (1) *Candida albicans* es responsable del 80 a 92% de los episodios de candidosis vulvovaginal (2,3,4) las levaduras en gemación que producen micelios, constituyen más a menudo la forma invasora tisular y suelen identificarse en relación con la enfermedad sintomática. (3,5,6) La tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente. En todo el mundo hay alrededor de 180 millones de casos y en Estados Unidos se presentan de 2.5 a 3 millones por año (7,8,9,10) Los síntomas y signos de la tricomoniasis no son suficientemente sensibles ni específicos para eliminar las pruebas diagnósticas (6,8,9) El diagnóstico se hace directamente al observar el parásito móvil, este procedimiento tiene una sensibilidad de 60 a 70% de los casos (6,7,8,9,10,11,12). La vaginosis bacteriana es una situación sinérgica caracterizada microbiológicamente por el reemplazo de la flora vaginal normal de lactobacilos o por *Gardnerella vaginalis*, especies de *Bacteroides sp.* especies de *Mobiluncus sp.* y *Mycoplasma genital* (7,14,15). Tanto los criterios clínicos como los de la tinción de gram son aceptados para el diagnóstico de vaginosis bacteriana (15,16,17). El Sistema Affirm VPIII realiza el diagnóstico de las muestras por hibridación de DNA a través del uso de sondas específicas para la identificación de los principales agentes causales de vaginitis y vaginosis bacteriana, *Candida spp.*, *Trichomona vaginalis* y *Gardnerella vaginalis* (18) El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia diagnóstica de Affirm VPIII para detectar *Trichomona vaginalis*, *Candida spp.* y *Gardnerella vaginalis* en tricomoniasis, candidosis y vaginosis bacteriana respectivamente.

ANTECEDENTES

La vaginitis o inflamación vaginal es un problema común que representa más de 10 Millones de visitas anuales al médico. La vaginosis bacteriana, tricomoniasis y la infección por levaduras son las tres causas más frecuentes de infección vaginal. (1)

CANDIDOSIS VULVOVAGINAL

Existen aproximadamente 80 especies de *Candida*, sin embargo, *Candida albicans* es responsable del 80 a 92% de los episodios de candidosis vulvovaginal.(2,3).

El Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), informó un total de 12448 casos de candidosis urogenital para el año de 1999 en México. En los estudios realizados en la clínica de enfermedades de transmisión sexual del Instituto Nacional de Perinatología de la Secretaría de Salud, la candidosis vulvovaginal fue una de las primeras causas de atención medica durante el periodo de 1989 a 1994, se atendieron 3075 casos de 13636 consultas. (4)

Los microorganismos del género *Candida* son hongos dimorfos. En general, las blastosporas son la causa de la transmisión o diseminación y esta vinculada con la colonización vaginal asintomática. Por el contrario, las levaduras gemantes que producen micelios, constituyen más a menudo la forma invasora tisular y suelen identificarse en relación con la enfermedad sintomática. (3)

Los hongos del género *Candida* son levaduras redondas u ovaladas gram positivas, de 3 a 7 micras de diámetro, que se reproducen por gemación. En agar Sabouraud incubado a temperatura ambiente se desarrollan colonias blandas, lisas, color cremoso, la producción de clamidoconidios (esporas de pared gruesa) es diagnóstica de *Candida albicans* En relación a la patogenia, los microorganismos del género *Candida* llegan a la luz y secreciones vaginales predominantemente a partir de la zona perianal adyacente. (3)

De los factores predisponentes del huésped, se conoce que los estrógenos aumentan la avidéz de la célula epitelial vaginal para adherirse y se ha demostrado un receptor o sistema de unión en el citosol de la levadura para las hormonas reproductivas humanas, que también aumentan la formación de micelios(Anticonceptivos ingeribles, antibióticos sistémicos, factores diversos)(3)

Manifestaciones clínicas: El síntoma más frecuente es prurito vulvar que se presenta virtualmente en todas las pacientes sintomáticas. No hay secreción vaginal invariablemente y a menudo es mínima, descrita típicamente como "queso cottage", la secreción puede variar de acuosa a espesa y homogénea. Suele ocurrir hipersensibilidad vaginal, irritación, ardor vulvar, dispareunia y disuria. El olor cuando se percibe es mínimo, no fétido. A la exploración suele observarse edema de los labios, de vulva y eritema a menudo con lesiones periféricas pustulopapilares. El cuello uterino es normal y el eritema de la mucosa vaginal se aúna a secreción blanquecina adherente. (3,5,6)

Diagnóstico. Debe hacerse de manera sistemática un frotis en fresco o con solución salina, no sólo para identificar la presencia de levaduras y micelios sino también para excluir la presencia de "células clave" y tricomonas. Invariablemente no se encuentran cifras importantes de leucocitos y en su caso sugieren infección mixta. El pH vaginal es "normal" (4.0 a 4.5) en la vaginitis por *Candida*, por lo que el encontrar una cifra mayor de 4.7 indica vaginosis bacteriana, tricomoniasis o infección mixta. (3). El frotis de secreción vaginal revela típicamente esporas de *Candida albicans*, si se presentan esporas de *Candida glabrata* son de tamaño variable (2-8 micras) esféricas u ovals y más pequeñas que los eritrocitos, a menudo se encuentran agrupados aunque pueden permanecer solas o asociadas a hifas. La solución de Hidróxido de Potasio (KOH) (10-20%) se usa para visualizar levaduras que no son visibles con solución salina ya que disuelve leucocitos y eritrocitos (la ramificación, gemación y las hifas de la pared celular sé observan más fácilmente cuando

es *Candida albicans*). (1)

En la tinción de Gram para diagnóstico de candidosis, las esporas de candida son fuertemente gram positivas igualmente los filamentos o tienen grumos rojos gram positivos. (1). El frotis con solución salina tiene una sensibilidad de 50 a 75%. Los medios de cultivo utilizados son: Agar Sabouraud o Nickerson. El diagnóstico requiere una correlación entre datos clínicos, estudio microscópico y finalmente cultivo vaginal. (1,3,7)

TRICOMONIASIS VAGINAL

Epidemiología: La tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente. En todo el mundo hay alrededor de 180 millones de casos y en Estados Unidos se presentan de 2.5 a 3 millones por año. La prevalencia de la enfermedad varía ampliamente en grupos diversos. (7,8,9,10).

El INDRE informó un total de 7311 casos de tricomoniasis para 1999 en toda la República Mexicana.

Trichomonas vaginalis es un protozoo anaerobio flagelado, ovoide, móvil de 10 a 20 micrómetros. La motilidad es proporcionada por cuatro flagelos anteriores y uno adicional unido a una membrana ondulante responsable de la movilidad. *Trichomonas vaginalis* sólo existe como trofozoito y se encuentra en la uretra y vagina de las mujeres y en la uretra y próstata de los varones afectados. (8,9,10)

Cuadro clínico: Los síntomas y signos de la tricomoniasis no son suficientemente sensibles ni específicos para eliminar las pruebas diagnósticas. Las infecciones por tricomonas son asintomáticas hasta en un 50% de los pacientes y sus compañeros. El periodo de incubación de la infección sintomática por tricomona varía de tres a 28 días. (6,8,9). Las manifestaciones más frecuentes de la tricomoniasis son secreción vaginal verde amarillenta y espumosa e irritación vulvovaginal en mujeres y secreción uretral en varones. Hay

secreción anormal en 50 a 75% de las mujeres infectadas que se describe como maloliente ("mohoso"). La infección se describe como prurítica o irritante en una de cuatro o cinco pacientes. Otros síntomas vinculados incluyen dispareunia, disuria y en un pequeño número de pacientes, algún grado de dolor abdominal bajo. (8,9). La secreción vaginal es excesiva en 50 a 70% de las pacientes. El "cuello uterino en fresa" producto de dilatación capilar y hemorragias puntiformes, se aprecian a simple vista en 2% de los casos, pero por colposcopia en 90%. (8,9)

Diagnóstico: El pH vaginal es de 4.5 hasta en 90% de los casos. La presencia de olor fétido (pescado) después de aplicar hidróxido de potasio al 10% se encuentra en 50% de las pacientes, pero es inespecífica. Las células del epitelio vaginal presentan aspecto normal en la tricomoniasis. El diagnóstico se hace por estudio en fresco al observar el parásito móvil, este procedimiento tiene una sensibilidad de 60 a 70% de los casos. (7,8,9,12). El medio de cultivo de Diamont con suero hidrolizado de caseína y antibióticos sigue siendo el estándar para el diagnóstico de infecciones por tricomonas, tiene una sensibilidad de 95% de los casos con este medio. Métodos de aglutinación en látex y ensayo inmunoenzimático (ELISA) con anticuerpos monoclonales refieren sensibilidad e 90% (6,7,8,10,11)

VAGINOSIS BACTERIANA

La frecuencia de vaginosis bacteriana de las clínicas de enfermedades de transmisión sexual es de 32 a 64% y de 12 a 25% en el contexto de medicina familiar, de 10 a 26% en la práctica obstétrica (13)

La vaginosis bacteriana es una situación sinérgica caracterizada microbiológicamente por el reemplazo de la flora vaginal normal de lactobacilos o por *Gardnerella vaginalis*, especies de *Bacteroides sp.*, especies de *Mobiluncus sp.* y *Mycoplasma genital*.(7,14,15) En la vaginosis bacteriana la tinción de gram tiene una sensibilidad de 93% y especificidad de 70% (6,13)

Algunos de los criterios más importantes para diagnosticar esta etiología son: el fluido transvaginal fétido, homogéneo amarillo verdoso, el pH de la secreción vaginal es mayor a 4.5 debido a la disminución o pérdida de especies de lactobacilos que intervienen en la degradación de glucógeno, ácido láctico, y en la producción de peróxido de hidrógeno, el olor "aminado" de la secreción vaginal, con técnicas de laboratorio se ha podido identificar: putrescina, cadaverina, trimetilamina y niveles relativos de succinato y lactato así como polina aminopéptidasa, la presencia de células "clave" que son células epiteliales cubiertas por abundantes bacterias adheridas a sus bordes de las que la especie de *Gardnerella vaginalis* presente de 70% a 92% en mujeres con vaginosis bacteriana.

Los criterios de Nuget proponen la escala de 0 a 10 basándose en las características de los morfotipos: Bacilos largos gram positivos (morfotipo de *Lactobacillus*)

Bacilos pequeños gram variables (morfotipo de *Gardnerella vaginalis*)

Bacilos pequeños gram negativos(morfotipos *bacteroides sp*)

Bacilos curvos gram variables(morfotipos *Mobiluncus spp*)

Estos morfotipos bacterianos se utilizan para desarrollar un sistema para la vaginosis bacteriana que va de 0 a 10 puntos

Cada morfotipo se cuantifica de 1 a 4 cruces considerando el número de morfotipos por campo en aceite de inmersión:

Morfotipo	No. De cruces	interpretación
Menos de 1	+1	0-3+ Flora normal
1 a 4	+2	4 a 6+ Flora intermedia
5 a 30	+3	7 a 10+ Vaginosis bacteriana
30 o más	+4	

Tanto los criterios clínicos como los de la tinción de Gram son aceptados para el diagnóstico de vaginosis bacteriana(15,16,17). En la actualidad se ha relacionado a la

vaginitis con serias complicaciones en el embarazo ya que se incrementa el riesgo de parto prematuro, ruptura prematura de membranas, corioamnioitis bajo peso al nacer y endometritis poscesárea (6,13) Los tratamientos para vaginitis son eficaces cuando se diagnostica correctamente por lo que se requiere de métodos sensibles y confiables.(18). El sistema para identificación Affirm VPIII es una nueva tecnología de diagnóstico basada en sondas de DNA, su aplicación diagnóstica con base en la habilidad para desarrollar sondas con los aminoácidos que tiene la secuencia específica para la especie de un organismo determinado. (17). En este sistema el rRNA buscado es capturado por la sonda de DNA que esta atrapada en una cama de Nylon. Una segunda sonda de DNA específico tiene una asa para el acoplamiento del sistema hibridizado. En este caso el asa empleada es Biotina, que tiene una afinidad natural para enlazarse con la proteína strepavidin.(17). Esta proteína enlazada a una enzima se emplea como un indicador de coloración del sustrato incoloro. La enzima que genera el color únicamente precipitará sobre la cama de nylon desarrollando color si el anillo buscado es capturado. La intensidad de color producido, así como la sensibilidad del ensayo son directamente proporcionales a la cantidad de analito buscado en la muestra. (18). Los beneficios del diagnóstico con sondas en comparación con los inmunoensayos radican en la especificidad, sensibilidad, velocidad de la reacción y ausencia de arrastre antigénico, así como la cantidad de rRNA presente en las células. El sistema Affirm VPIII realiza el diagnóstico de las muestras por hibridación de DNA a través del uso de sondas específicas para la identificación de los tres principales agentes causales de vaginitis y vaginosis bacteriana. *Gadnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Candida spp*.

El sistema Affirm VPIII identifica y detecta:

Candida spp 1X10 UFC en fase logarítmica del ensayo,

Gadnerella vaginalis 2X10UFC

Trichomonas vaginalis de 5X10 por ensayo

La exactitud y la precisión analítica son al 100% para microorganismos puros ya que la prueba está basada en la detección de DNA celular de cada microorganismo. Del 85 al 95% en organismos que presentan mutación celular por efectos exógenos y endógenos (medicamentos, condiciones ambientales, humedad etc.)(17)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las infecciones por complicación vaginal son significativas sobre todo cuando la mitad de las mujeres que la padecen son asintomáticas. En las mujeres que se embarazan se incrementa el riesgo de ruptura prematura de membranas, endometritis posparto, poscesárea, parto prematuro, recién nacidos de bajo peso al nacer en el 40% de las embarazadas. La causa de estas patologías no puede ser adecuadamente diagnosticada basándose únicamente en los síntomas o el examen físico. El diagnóstico requiere de una correlación entre datos clínicos y estudios de laboratorio, para la detección del microorganismo causante de la patología vaginal como *Candida spp*, *Trichomona vaginalis* y *Gardnerella vaginalis* es importante correlacionar los datos clínicos y estudios de laboratorio orientando a un tratamiento específico, dado que los tratamientos múltiples originan resistencia a los antibióticos por abuso de los mismos. De ahí la necesidad de realizar una técnica de laboratorio con tecnología de punta que permita la detección específica del patógeno relacionado con el diagnóstico temprano de las patologías vaginales infecciosas más frecuentes

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la eficacia diagnóstica de Afirm VPHI para detectar *Trichomona vaginalis*, *Candida spp.* y *Gardnerella vaginalis* en tricomoniasis, candidosis y vaginosis respectivamente

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar la presencia de *Candida spp.* en pacientes con candidiasis vaginal sintomática.

- Determinar la presencia de *Trichomonas vaginalis* en pacientes con tricomoniasis vaginal sintomática.

- Determinar la presencia de *Gardnerella vaginalis* en pacientes con vaginosis bacteriana sintomática.

HIPÓTESIS GENERAL:

La detección por el método de Affirm VPIII de *Candida spp.*, *Trichomonas vaginalis* y *Gadnerella vaginalis* confirman la enfermedad vaginal infecciosa.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Hi La detección de *Candida spp.* por el método de Affirm VPIII si hace el diagnóstico de candidosis vaginal sintomática.

Ho La detección de *Candida spp.* por el método de Affirm VPIII no hace el diagnóstico de candidosis vaginal sintomática.

Hi La detección de *Trichomonas vaginalis* por el método de Affirm VPIII si hace el diagnóstico de tricomoniasis vaginal sintomática

Ho La detección de *Trichomonas vaginalis* por el método de Affirm VPIII no hace el diagnóstico de tricomoniasis vaginal sintomática

Hi La detección de *Gadnerella vaginalis* por el método de Affirm VPIII si hace el diagnóstico de vaginosis bacteriana sintomática.

Ho La detección de *Gadnerella vaginalis* por el método de Affirm VPIII no hace el diagnóstico de vaginosis bacteriana..

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 100 pacientes que acudieron al laboratorio clínico referidos de la consulta externa de ginecología del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 del Instituto Mexicano del Seguro Social de la ciudad de México D.F.. Se corroboró a la paciente sintomática bajo lo siguiente: Criterios de inclusión: Mujeres Mayores de 15 y menores de 50 años con vida sexual activa, con leucorrea, con integridad anatómico funcional de órganos primarios. Criterios de No inclusión: Embarazadas, con enfermedad de transmisión sexual diagnosticada, con terapia antimicrobiana local o sistémica en los últimos 15 días previos a la fecha de toma de muestra. A las pacientes con infección vaginal sintomática se les realizó exploración ginecológica con espejo vaginal esterilizado sin lubricante y se colectó espécimen de la secreción de fondo de saco por medio de hisopos de algodón y dacrón estériles. Un primer hisopo se colocó en un tubo de ensayo con solución salina isotónica a temperatura ambiente y en un portaobjetos se colocó la muestra y se observó al microscopio de luz en objetivos seco débil (10X) y seco fuerte (40X). Se considero para el diagnóstico de Candidosis la presencia de levaduras y micelios, para el diagnóstico de Tricomoniasis la presencia de *Trichomonas vaginalis* (caracterizándose por su movilidad en tirabuzón), para Vaginosis bacteriana la identificación de “células clave” con gran cantidad de bacterias cocobacilares adheridas a su superficie lo cual impide observar con claridad los bordes. Se realizó otro extendido en un portaobjetos para fijarlo y teñirlo con tinción de Gram y se observaron al microscopio de luz en objetivo seco fuerte (40X) y de inmersión (100X) lo que permitió ratificar o descartar la observación de levaduras y micelios, células clave y la disminución de la flora lactobacilar normal.(17)

Cultivo; la muestra se sembró en los siguientes medios de cultivo: Agar Nickerson y se incubaron durante 24 horas a 37C para identificar el desarrollo de colonias. Agar Casman

se incubaron 24 a 48 horas a 37C en atmósfera de CO₂ para identificar el desarrollo de colonias.

Se realizo prueba de filamentación en suero para las colonias que desarrollaron en Nickerson. De las colonias desarrolladas se tomo una muestra, se inoculo en suero humano y se incubo a 37C durante 2 horas. Se coloco una gota de esta suspensión y se observó al microscopio de luz con objetivo seco fuerte(40X) para identificar la formación de tubo germinal, cuando la filamentación se presento en más del 50% de las levaduras se considero como *Candida albicans*. (18).

En la preparación de la muestra, a esta se le adiciono el reactivo de lisis y al someterse a calentamiento de 85C ocasiono la ruptura de la célula y la liberación del rRNA y ácidos nucleicos. Posteriormente se le adicionó una solución buffer de tiocianato de guanidinio para estabilizar los ácidos nucleicos y para controlar las condiciones para la hibridización. Esta solución buffer también contiene un polímero que permite la amplificación de la señal asegurando la sensibilidad del sistema.

La muestra se adiciono al primer pozo del cassette o charola de reactivos prellenada y se coloco en el microprocesador. El procesador mueve el cassette de un pozo a otro. La hibridización ocurre en el primero y segundo pozos con reactivos del cassette.

Si el rRNA se encuentra presente en la muestra de hibridización se llevará a cabo y este rRNA quedará capturado por la sonda de DNA de la tarjeta, todas las sustancias sobrantes son lavadas con el pozo 3.

La enzima conjugada captura los analitos buscados en el pozo 4 y el material sobrante en lavado en los pozos 5 y 6.

En el pozo 7 el sustrato indicador reacciona con la enzima conjugada si hay enlace con el rRNA marcado produciendo coloración azul.

El paso final es la lectura del resultado a través del desarrollo de color en la tarjeta. tanto

en el control positivo como en uno o más de los organismos señalados.

El sistema Affirm VPIII realiza el diagnóstico de las muestras por de la hibridación de DNA a través del uso de sondas específicas para cada microorganismo para la identificación de los tres principales agentes causales de vaginitis y vaginosis bacteriana.

Gadnerella vaginalis, *Trichomona vaginalis* y *Candida spp.*

El sistema Affirm VPIII identifica y detecta:

Candida spp 1X10 UFC en fase logarítmica del ensayo,

Gadnerella vaginalis 2X10 UFC

Trichomonas vaginalis de 5X10 por ensayo

La exactitud y la precisión son al 100% para microorganismos puros ya que la prueba está basada en la detección de DNA celular de cada microorganismo, del 85 al 95% en organismos que presentan mutación celular por efectos exógenos y endógenos (medicamentos, condiciones ambientales y humedad etc.)(17)

En la prueba de Affirm VPIII el círculo de cualquier tono de azul en el control y posición de cada uno de los microorganismos determinará la positividad de la muestra. Si no se desarrolla color en el control positivo o posiciones de organismos la muestra deberá considerarse como negativa.

Los resultados de la prueba serán validos si el control positivo aparece de color azul y el negativo sin color. En caso de no ser así se descartarán los resultados y se volverá a procesarla muestra.

RESULTADOS

Se muestrearon 100 pacientes a quienes se realizó exploración ginecológica con espejo vaginal esterilizado sin lubricante y se colecto espécimen de la secreción de fondo de saco por medio de hisopos de algodón y dacrón estériles para su observación en fresco y con tinción de Gram, con el hisopo de dacrón para el sistema Affirm el cual se conservo el un tubo especial y permaneció en refrigeración máximo 4 horas previo a su procesamiento. El estudio se realizo en noviembre del 2000, fue transversal, analítico.

De un total de 100 mujeres estudiadas 57% (57/100) presentó positividad a alguno de los microorganismos buscados. se considero como estandar de oro el cultivo para *Candida sp* y *Gardnerella vaginalis*, no así para *Trichomona vaginalis* donde se considero el examen en fresco. *Candida* 15% (15/100), *Trichomona vaginalis* 2% (2/100), *Gardnerella vaginalis* 40.% (40/100). El examen en fresco presento una sensibilidad de 42.9% y una especificidad de 100%, el valor predictivo positivo de 100% y el valor predictivo negativo de 91.4% . El examen con tinción de gram presentó una sensibilidad de 96.4%, especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 95.5%. En el sistema de sondas de ADN se obtuvo una sensibilidad de 98.2%, especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 97.7%. Dado que la especificidad es más alta en el método de las sondas de ADN 98.2% en comparación con la tinción de gram de 96% la tasa de falsos negativos es baja para el método de sondas de ADN . No así la especificidad de los métodos empleados que fue de 100%. Valor predictivo positivo de 100% para ambas pruebas y valor predictivo negativo de 91.4% para el examen en fresco, 95.5% para la tinción de Gram y 97.7 % para la prueba de sondas genéticas. El análisis estadístico se realizo por comparación en tablas de 2 X 2 a través del teorema de Bayes. Se realizo también la prueba de X^2

Para la prueba de χ^2 con una p de 0.000 000 0 la prueba de sondas genéticas tuvo un valor de 92.07, la tinción de Gram 88.35 y el examen en fresco 81.38.

DISCUSIÓN

La eficacia diagnóstica del sistema de sondas genéticas se comprobó en este estudio, este sistema permite obtener resultados confiables y oportunos dado que su proceso se realiza en 45 minutos sin embargo, solo se pueden procesar 6 pruebas a la vez y dado que el sistema es de flujo discontinuo no es de utilidad en un centro hospitalario donde diariamente se analizan de 20 a 40 exudados vaginales lo que implica 6 horas de trabajo continuo, por lo que sería conveniente procesar mayor cantidad de pruebas a la vez y en un sistema de flujo discontinuo automatizado.

El sistema de sondas genéticas tiene alta sensibilidad y especificidad para la identificación de las tres entidades que maneja y que están correlacionadas con la patología vaginal correspondiente. Sin embargo, dado el costo elevado de la prueba (\$150.00 por prueba) es conveniente usar los métodos convencionales de examen en fresco, tinción de Gram y cultivo para la identificación de estas patologías y usar el sistema de sondas genéticas en casos donde los métodos diagnósticos convencionales son confusos.

CONCLUSIONES

De 100 pacientes estudiadas por sintomatología vaginal, se corroboró infección por *Candida spp.*, *Trichomona vaginalis* y *Gardnerella vaginalis* en 48% de los tres métodos utilizados con positividad para *Candida spp* en 29.1%, *Trichomona vaginalis* en 25% y *Gardnerella vaginalis* 66.6%.

El sistema de sondas de ADN mostró alta sensibilidad 98.2% y especificidad de 100% en este estudio comparado con los informes referidos en los insertos que presentan de 81% a 89% de sensibilidad y 98.2% a 99% de especificidad.

La eficacia diagnóstica del método de sondas genéticas para la detección de *Candida spp*, *Trichomona vaginalis* y *Gardnerella vaginalis* se comprobó. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la tinción de Gram y la prueba de sondas genéticas por el teorema de Bayes ni por la prueba de X^2

La utilización del examen en fresco y la tinción de Gram deben utilizarse como prueba de tamizaje y el método de sondas genéticas en los casos de infecciones recurrentes.

La prevalencia de exudados cervico-vaginales del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 del IMSS para el año 2000 fue de 20.2% de los cuales para *Candida albicans* fue de 09.09%, *Trichomona vaginalis* de 0.62% y *Gardnerella vaginalis* de 10.53%. Este dato se obtuvo del registro de laboratorio clínico del hospital donde se realizó el estudio

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa María García Escamilla por todos sus conocimientos y paciencia transmitidos día tras día

Al Dr. Celso Pérez Rostro por compartir sus conocimientos y experiencia para la realización de esta tesis.

A la Dra. Bernal por su apoyo para la realización de la tesis

Al personal de la sección de Microbiología del laboratorio clínico del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A todas las personas que de una forma u otra colaboraron con la realización de esta tesis

BIBLIOGRAFÍA

1. Hope K. Haefner, M.D.: Current evaluation and Management of vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;42:184-95.
2. MC. Leonor Rivera R., Biol. Manuel Q. y cols.: Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana: asociación con manifestaciones clínicas, de laboratorio y tratamiento. *Ginecol Obstet Mex* 1996;66:26-35.
3. Jack D. Sobel, MD et al.: Vulvovaginitis candidiásica. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1993:153-163.
4. Biol Ernestina Flores Rivera., Gerardo Casanova Roman y col.: Vaginosis bacteriana. Relación de flora vaginal con las células epiteliales de vagina, con diferente tratamiento. Estudio ultraestructural. *Ginecol Obstet Mex* 1997; 65:182-190.
5. Andrea: Ries: Smitpink.et al.: Treatment of vaginal infectons: candidiasis, bacterial vaginosis and trichomoniasis. *J Am Pharmacol Assoc.* 1997; 37:563-9
6. Carr PL. Felsenstein D. Friedman RH.: Evaluation and management of vaginitis. *J General Int Med.* 1997;13:335-46
7. Jack D. Sobel, MD.:Vaginitis. *New Engl J Med* 1997; 25:1896-1903.
8. Allison Graves , BS y William A. Gardner, Jr. M.D. Patogenicidad de *Trichomonas vaginalis*. *Obstet Ginecol Clin North Am* 1993:145-151.
9. Phillip Herne, MD y James A Mc Gregor. *Trichomona vaginalis*: microorganismo patógeno que resurge. *Obstet Ginecol Clin North Am* 1993:135-143
10. Petrin D. Delgaty K. Bhatt R. Garber G. : Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998;1:300-317.
11. Waghorn DT. Tucker PK. Et al.: Collaborative approach, to improve the detection and management of microbiologically confirmed. *Int J STD AIDS.* 1998;9:164-167

12. Ohlemey C, Hornberg LL: et al.: Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in adolescent females: In Pouch TV culture versus wet-mount microscopy. J Adol Health. 1998; 22:205-208.
13. Manoj. K. Biswas, M.D.: Vaginosis bacteriana. . Obstet Ginecol Clin North Am 1993:165-74
14. Alvaro Monteriosa Castro Liliana Blaquicet Anoya.: *Gardnerella vaginalis* en informes de citología cervico-vaginal. Gac Med Mex 1997;132:119-125.
15. John D. Davis, MD; Erin E. Connor,MD.et al.: Correlation between cervical cytologic results and Gram stain as diagnostic test for bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1997;177:532-535.
16. Jane R. Schwebke, MD, Sharon L. Hillier Ph D, et al.: Validity of the vaginal Gram Stain for Diagnosis of Bacterial Vaginosis Obstet Gynecol 1996;88:573-576.
- 17.- Sistema para identificación Microbiana Affirm VPIII de Becton Dickinson
- 18.-López MR, Méndez TLJ, Hernández H R, Castañon O R. Micosis oportunistas en Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio 1995:99-129

CUADRO I

RESULTADOS GLOBALES DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE SONDAS DE ADN vs EXAMEN EN FRESCO CRITERIOS DE NUGENT EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL

EXAMEN EN FRESCO	RESULTADOS TINCIÓN DE GRAM	CULTIVO (ESTÁNDAR)	AFFIRM
1 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
2 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
3 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp.</i>
4 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
5 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
6 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
7 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8 <i>Gardnerella vaginalis</i>	Negativo	Negativo	Negativo
9 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
11 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
12 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
14 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
15 <i>Trichomonas vaginalis</i>	Negativo	Negativo	<i>Trichomonas vaginalis</i>
16 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
17 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
18 Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
19 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
20 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
21 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
22 Negativo	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
23 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
24 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	Negativo	Negativo
25 Negativo	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
26 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	Negativo	Negativo
27 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	Negativo
28 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
29 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	Negativo	Negativo
30 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
31 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
33 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
34 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
35 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
36 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
38 Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>

40	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
49	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
53	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
54	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
61	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
62	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
65	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
66	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
67	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	Negativo	Negativo
68	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
69	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
70	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
71	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
74	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
75	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
76	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
77	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
78	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
79	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
80	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
81	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
82	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
83	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
84	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
85	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
86	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
87	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
88	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
89	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
91	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
92	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Negativo	Negativo	<i>Trichomonas vaginalis</i>

93	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
94	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
95	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
96	Negativo	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
97	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
98	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
100	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>

Cuadro 2
RESULTADOS DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE
SONDAS DE ADN vs EXAMEN EN FRESCO, CRITERIOS DE
NUGENT EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL

Prueba en estudio

Agente Etiológico VPiII	Examen en fresco	Tinción de Gram	Cultivo (estándar)	Affirm
<i>Candida spp</i>	19	16	15	14
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	0	2	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	32	39	40	40
Positivos	53	55	57	56
Negativos	47	45	43	44
Total De pruebas	100	100	100	100

Montes de Oca A.E. y cols Patología Clínica, Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI

Cuadro 3
**RESULTADOS DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE
 SONDAS DE ADN vs EXAMEN EN FRESCO, CRITERIOS DE
 NUGENT EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL.**

Validación de la prueba en estudio

Prueba en Estudio	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
Examen En fresco	42.9%	100%	100%	91.4%
Tinción de Gram	96.4%	100%	100%	95.5%
Affirm VPIII	98.2%	100%	100%	97.7%

Montes de Oca A.E. y cols Patología Clínica, Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI

Resultados de prueba de X^2 : Método de sondas genéticas 92.07,

Tinción de Gram: 88.35, Examen en fresco: 81.38

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA