

11201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO 38
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA
DIVISIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL "DR LUIS CASTELAZO AYALA"

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LA
ESPECIALIDAD EN PATOLOGÍA CLÍNICA

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA
DE SONDAS DE ADN EN COMPARACIÓN CON
TINCIÓN DE PAPANICOLAOU EN PACIENTES
CON PATOLOGÍA VAGINAL

TESISTA.

DR JORGE GABRIEL RAMÍREZ RODRÍGUEZ

ASESORES.

DRA ROSA MARÍA GARCÍA ESCAMILLA
PROF TITULAR DEL POSGRADO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

DRA MARÍA DE JESUS BERNAL GUTIERREZ
JEFA DEL LABORATORIO CLÍNICO HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA "LUIS CASTELAZO A

DR ALEJANDRO ANDRADE MANZANO
JEFE DE ANATOMÍA PATOLÓGICA HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DR LUIS CASTELAZO A

MÉXICO, D F

FEBRERO 2001

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Gracias a Dios

*Por haberme dado la oportunidad
de estudiar esta especialidad, para
servir a mis semejantes*

Papá:

*Te dedico este trabajo que es
fruto de lo aprendido
en el curso de Patología Clínica,*

A tu recuerdo

Gracias

Familia y Amigos por su apoyo

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE SONDAS DE ADN

EN COMPARACIÓN CON TINCIÓN DE PAPANICOLAOU EN

PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL



Vo. Bo.

DR. RUBÉN ARGÜERO SÁNCHEZ
DIRECTOR DEL HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



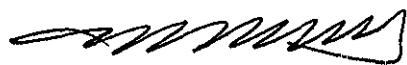
Vo. Bo.

DR. JUAN CARLOS NECOECHEA ALVA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
MÉDICA



Vo. Bo.

DR. ALONSO PEÑA GONZALEZ
SUBJEFE DE DIVISIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
MÉDICA

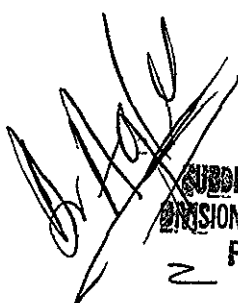


Vo. Bo.

DRA. ROSA MARÍA GARCÍA ESCAMILLA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO EN PATOLOGÍA
CLÍNICA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2001



DIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ÍNDICE:

RESUMEN	4
ANTECEDENTES	5
<i>Trichomona vaginalis</i>	6
<i>Gardnerella vaginalis</i>	7
<i>Candida</i>	10
TINCIÓN DE PAPANICOLAOU	12
EL SISTEMA AFFIRM VPIII	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	24
COMENTARIOS	25
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

Se escogieron 100 pacientes que tenían sintomatología compatible con vaginosis bacteriana/vaginitis con los criterios de Amsel et al (1) y se les realizó exudado vaginal en las condiciones acostumbradas abstinencia de relaciones tratamientos locales y duchas vaginales en las 24 horas previas al estudio introducción del espejo sin lubricante guantes sin talco Se tomó muestra para citología vaginal en portaobjetos y se fijó con cyto-spray para su posterior tinción de papanicolaou con hisopo de dacrón se tomó muestra para sistema Affirm VPiii la cual se introduce en tubo polipropileno y se guarda en refrigeración como máximo 1 a 4 horas para su procesamiento El estudio inició en noviembre del 2000 y concluyó en diciembre del 2000 El 57 % fueron positivas a alguna de las entidades buscadas Tricomona 2 % Candida 14 %, Gardnerella 40 % con el método estándar de oro las sondas de ADN y los resultados con Papanicolaou son muy similares la concordancia de datos es de 3 para las sondas y 2 para la citología con tinción de papanicolaou Obteniendo para las sondas genéticas una sensibilidad 98.24 % con esto se tiene la certeza de la prueba para detectar el trastorno en pacientes que sí tienen la enfermedad con especificidad de 100 % identifica pacientes que no tienen la enfermedad valor predictivo positivo de 100 % es el porcentaje de pacientes positivos que sí tienen el padecimiento y valor predictivo negativo de 97.72 % es la probabilidad de que el paciente no tenga el padecimiento cuando la prueba es negativa para las sondas genéticas

Para la tinción de Papanicolaou la sensibilidad es más baja 94.73 % y el valor predictivo negativo de 93.47 %

En la prueba de X^2 con una $p = 0.00000001$ el AFFIRM tiene un valor de 92.01 y la tinción de Papanicolaou de 84.79

Con esto se demuestra que una prueba altamente sensible y específica la prueba de Chi cuadrada no demuestra una diferencia estadísticamente significativa

ANTECEDENTES

Vaginitis o inflamación de la vagina es un problema común existen aproximadamente 25 causas de exudado vaginal por las cuales consultar al médico. Cada año se registran 10 millones de consultas en E.U.A. por tricomoniasis, vaginosis bacteriana e infecciones por candida que son las tres principales causas de vaginitis (1). Los síntomas y signos sugestivos de vaginitis incluyen comezón, exudado purulento, irritación, ardor con disuria con olor vaginal inusual, acompañado de rash, el pH y el desconocimiento de la flora vaginal (2).

BACTERIAS COMUNES QUE COLONIZAN EL TRACTO GENITAL

- Corynebacterium
- Diphtheroids
- Enterococcus
- Escherichia
- Eubacterium
- Fusobacterium
- Klebsiella
- Lactobacillus
- Morganella bacteroides
- Peptostreptococcus
- Prevotella
- Proteus enterobacteria
- Staphylococcus
- Streptococcus

Varias condiciones asociadas con anomalías en la flora vaginal producen exudados blancos, grises o verde-amarillentos.

El pH puede medirse de las porciones laterales de la vagina con papel indicador con rango de 3.6 a 6.1, el pH habitual es de 3.8 a 4.4 (2,3,7).

Los Lactobacilos producen ácido láctico para mantener el pH que protege contra los patógenos. Las duchas y la menstruación alteran el pH. Las infecciones por levaduras mantienen el pH en límites normales, las tricomonas y la vaginosis bacteriana tiende a alcalinizar (2,3,4,5).

Las pacientes con exudado con olor fétido (pescado) al mezclar con Hidróxido de Potasio al 10% indican crecimiento bacteriano con predominio de anaerobios facultativos y obligados, para lo cual es conveniente examinar alícuotas microscópicamente en seco fuerte 40x, con búsqueda intencionada de levaduras, tricomonas, células clave sugestivas de vaginosis bacteriana, respuesta inflamatoria y efecto estrogénico (2,10,13).

TRICOMONIASIS

Trichomonas vaginalis infecta a 180 millones de personas en el mundo y de 2 a 3 millones de mujeres americanas anualmente (8 9 10 11) afecta al tracto urogenital y es responsable del 20 al 30% de las vulvovaginitis (4) en México se notifican 7311 casos anuales para 1999 Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE)

Es un protozoo anaerobio flagelado ovoide móvil de 10 a 20 micras La motilidad es proporcionada por cuatro flagelos anteriores y uno adicional unido a la membrana ondulante (2,3 6,9 10 11) La forma vegetativa tiene aspecto piriforme y no existe forma quística

Epidemiología. La fuente de contagio es exclusivamente humana de tipo venéreo aunque no puede excluirse el contagio por objetos húmedos El período de incubación es corto de 3 a 6 días (hasta 28) aunque el 20% de los casos persiste de forma asintomática la cual es la principal fuente de contagio (7 9 11 12)

Cuadro Clínico Las mujeres presentan. escozor, quemazón y prurito vulvovaginal con xantorrea líquida en el 75%, discretamente maloliente y espumosa en el 60% Cursa con dispareunia y/o disuria con dolor abdominal bajo (9 10) siendo motivo de consulta de urgencia En el hombre a menudo es asintomática, con ligera disuria y en ocasiones con secreción uretral purulenta (uretritis no gonocócica)

Existe un punteado microhemorrágico cervical en el 25% de los casos con apariencia de "frambuesa" causado por dilatación capilar y hemorragias puntiformes observables en el 2% a simple vista y 90% por colposcopia Las pacientes sienten incomodidad con dolor ardor o dispareunia sin embargo pueden ser asintomáticas hasta en el 50% en los primeros seis meses (2,3,9,10) Se asocia a bajo peso al nacimiento en un 40% Además de gonorrea, chlamidia y vaginosis bacteriana aunque puede ser independiente de estos microorganismos (2 3 23)

Diagnóstico, El pH vaginal es de 4.5 en el 90% de los casos (2 3 22,24 25) Con olor fétido después de aplicar KOH al 10% en el 50% de las pacientes El exudado en fresco es rápido y eficaz, con una sensibilidad de 60 a 70% (8 9 10 13) El movimiento es característico y se sitúa entre leucocitos y establece el diagnóstico en el 75-80% (6)

Para casos difíciles existen medios de cultivo como el Diamont con suero hidrolizado de caseína y antibióticos con una sensibilidad del 95% (27,8 9 11 12) otros medios como InPouch TV y medio Trichosel incubándose de forma anaerobia y con crecimiento a las 48 horas con sensibilidad del 95%

Métodos de aglutinación en látex y análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA) con sensibilidad de 90% y especificidad del 99,8% (2)

La *Trichomonas vaginalis* puede ser observada en frotis de papanicolaou con 60 a 70% de sensibilidad observando polimorfonucleares células epiteliales con un halo perinuclear y gránulos las tricomonas se describen como células fantasma tenues con un punto (núcleo) y citoplasma vacío y hasta vacuolado (20, 21, 25)

El diagnóstico diferencial se debe realizar con vulvovaginitis micótica el flujo es más blanco espeso y grumoso y la reacción inflamatoria se extiende más por la vulva y hacia el ano con la vaginosis

Es conveniente que la pareja reciba tratamiento simultáneo (22)

VAGINOSIS BACTERIANA POR *Gardnerella vaginalis*

Es considerada una enfermedad de transmisión sexual con una frecuencia de 32 a 64% y del 12 al 25% en el contexto de medicina familiar y del 10 al 26% en obstetricia (14). Se le han designado diferentes agentes

HISTORIA DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

1894	vaginitis no específica
1955	vaginitis por <i>Haemophilus</i>
1963	vaginitis por <i>Corynebacterium</i>
1980	vaginitis por <i>Gardnerella vaginalis</i>
1982	vaginosis por anaerobios
1983	vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana es un complejo cambio en la flora vaginal caracterizado por la reducción prevalencia y concentración de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno y concentración de *Gardnerella vaginalis*, encontrada en un 40% (20 al 70% según las distintas series) de mujeres sanas a 95% de mujeres con vaginosis bacteriana encontrando además *Mobiluncus sp*, *Mycoplasma hominis*, anaerobios gram negativos del género *Prevotella bacteroides* y *Peptostreptococcus sp*

Según Amies (2) es un síndrome caracterizado por al menos tres de los siguientes criterios.

- Flujo tenue homogéneo blanco mal oliente no inflamatorio con apariencia de leche cremosa, a menudo adherida a las paredes vaginales y ausencia de *Lactobacillus spp*
- Presencia de células clave en el examen microscópico (más de 20% de células epiteliales) células epiteliales recubiertas de bacterias que pierden los bordes
- El pH del flujo vaginal mayor de 4.5
- Prueba de aminas positiva Olor a pescado con la prueba de KOH al 40% con una gota de exudado vaginal

El género *Gardnerella* consta de una sola especie conocida *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*). Por estudios de ADN se ha comprobado que no está relacionada con ningún otro género conocido debido a las peculiares características de su pared celular no se ha incluido en ninguna familia de microorganismos, aunque suele agruparse con las bacterias gramnegativas. Con el microscopio electrónico se ha descrito la pared celular de este microorganismo como semejante tanto a grampositivos como a los gramnegativos (22, 23). Más recientemente se describe como una bacteria con pared celular laminar no típica de gram positivos ni gram negativos. *G. vaginalis* es por tanto un bacilo gram variable anaerobio facultativo catalasa y oxidasa negativas (12, 14, 22).

Se relaciona con infecciones fuera del tracto vaginal con bacteremias, fiebre, infecciones de herida quirúrgica, complicaciones durante el embarazo y su resolución corioamniotitis, ruptura prematura de membranas, parto de pretérmino, bajo peso al nacimiento en un 40% y endometritis posparto/poscesárea-postaborto, enfermedad inflamatoria pélvica y sangrado uterino anormal (7, 14). Se asocia a sepsis y meningitis neonatal, peritonitis, infección urinaria y absceso hepático.

La etiología del olor en la vaginosis bacteriana es un sinergismo donde los lactobacilos son reemplazados por *Gardnerella vaginalis* y esta relacionado con las bacterias anaerobias especies de Bacteroides sp Especies de *Mobiluncus sp* y *Mycoplasma genital* (8,15 16) que incrementan de 100 a 1000X en pacientes con vaginosis El incremento del metabolismo anaerobio produce aminas (cadaverina putrescina trietilamina) y la alcalinización su volatilización agudizando el olor

DIAGNÓSTICO Los criterios clínicos y la tinción de gram con sensibilidad de 93% y especificidad de 70%, son aceptados para el diagnóstico de vaginosis bacteriana donde se confirma con claridad el tipo de flora (cocobacilos gram negativos y gram variables, pleomórficos y ausencia de bacilos grampositivos tipo *Lactobacillus* (16,17,18)

En la tinción de Papanicolaou se identifican las células clave (clue cells) con fondo sucio con predominio de color cianofilo (20,21) La vaginosis bacteriana puede ser diagnosticada con el uso de pruebas de DNA

Es un microorganismo de crecimiento delicado y relativamente lento (48-72 horas de incubación), cuyo crecimiento puede pasar desapercibido si no se sospecha o si no se utilizan medios de cultivo semiselectivos para su aislamiento, además *G vaginalis* produce con frecuencia infecciones en las que participan otros microorganismos aerobios y anaerobios

El medio semiselectivo es el agar sangre humana de doble capa medios de casman o columbia donde *G vaginalis* presenta una hemólisis característica Pueden utilizarse también otros medios con sangre humana como CNA (agar sangre humana con colistina y ácido nalidixico) Los cultivos son positivos en un 40% a 60% de las pacientes asintomáticas y no implica necesariamente del diagnóstico de vaginosis bacteriana (2 3 24)

CANDIDIASIS

La incidencia de vulvovaginitis micótica se ha incrementado dramáticamente (23 25) El 75% de todas las mujeres tienen al menos un episodio de vulvovaginitis candidiásica y el 50% más de un episodio y aproximadamente un 5% la padecen por años Se atribuye que la Candida albicans, ha emergido responsable del 80 al 92% de la candidosis vulvovaginal (3,4,6) los antifúngicos son inefectivos y crea resistencia como la Torulopsis glabrata (2,3,4)

El INDRE refiere 12 448 casos de candidiasis urogenital para 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 médica durante el período de 1989 a 1994 se atendieron 3075 casos de 13636 consultas (5)

Candida es un hongo levaduriforme imperfecto ovoide gram positivo de 4-6 micras de longitud, provisto de pared fina y que se reproduce por gemación (carece de reproducción sexual) Crece en los frascos de hemocultivo habituales y placas de agar

Las colonias de Candida son lisas, blanquecinas y brillantes semejantes a las de estafilococos

La formación de clamidosporas (esporas de paredes gruesas) es el método sistemático para la identificación

Son hongos dimorfos y las blastosporas es la forma de la transmisión y esta vinculada a la colonización vaginal Las levaduras germinadas producen micelios invadiendo tisularmente y causan enfermedades sistémicas sintomáticas (4)

Factores predisponentes promueven la candidiasis como la diabetes incontrolada los esteroides abuso de antibioticos uso de dispositivos frecuencia en coitos alteraciones del sistema inmune sida enfermedades crónicas sistemicas lupus hipotiroidismo terapia inmunosupresora anticonceptivos orales (2)

Epidemiología Candida es un saprófito normal de mucosas oral digestiva y genital del hombre y animales, la mayoría de las infecciones son de origen endógeno

Patogenia, Candida invade a partir de la zona perianal hacia la vagina (4) y es favorecida por factores predisponentes como estrógenos que aumentan la ávidez de la célula epitelial vaginal para adherirse y se ha demostrado un receptor o sistema de unión en el citosol de las levaduras para las hormonas humanas que aumentan la formación de micelios (anticonceptivos ingeribles, antibioticos sistemicos y factores diversos)(4,6)

Afecta principalmente a diabéticas, embarazadas o tratadas con antibióticos el síntoma más frecuente es el prurito vulvar intenso con leucorrea espesa parecida a "queso cottage" compuesta de hifas pseudohifas y células epiteliales La vagina y labios aparecen eritematosos, edematosos y con lesiones sátelites pudiendo extenderse a vulva uretra con disuria, perineo y se ha descrito endometritis (2 4 6 7 6)

El diagnóstico es por aumento en la ávidez vaginal con rango de pH 4 a 4.7 con media de 4.5 Una preparación muestra levaduras de *C. albicans* son fuertemente positivas en la tinción de gram con pseudohifas filamentos gram positivos con gránulos gram positivos con pocos leucocitos las esporas de *C. glabrata* son de menor tamaño de 8 a 2 micras esféricas u ovoides agrupadas o aisladas (2)

La solución de KOH al 10-20% se usa para visualizar levaduras no visibles con solución salina ya que se disuelven los leucocitos y eritrocitos la ramificación gemación y las hifas de la pared celular se observan más fácilmente cuando es *Candida albicans* (1 23)

Los medios de cultivo son Agar dextrosa Sabouraud micobiotico de Sabouraud modificado Difco o el medio de Nickerson incubando a temperatura ambiente La diferenciación se da por reacción de fermentación de azúcares (2)

El diagnóstico requiere una correlación entre datos clínicos estudio microscópico y cultivo (1 5 9) En la tinción de Papanicolaou se identifican las hifas y esporas, esféricas-ovoides eosinófilas dentro y fuera de las células (20,21,25)

TINCIÓN DE PAPANICOLAOU.

Es esencial que se sumerja la extensión inmediatamente a una sustancia fijadora, ya sea etanol al 95% (v/v) o éter etanol al 50% (v/v) permaneciendo unos 20 minutos y secar o el uso de cito-spray El espejo vaginal debe estar limpio, sin lubricantes Los guantes sin residuos de talco Es conveniente que la paciente se abstenga de relaciones sexuales, tratamientos locales y duchas vaginales en las 24 horas previas al estudio En casos de vaginas muy secas, se pueden humedecer las paredes con solución salina isotónica La presencia de sangrado, no contraindica el estudio siempre y cuando este sangrado no sea correspondiente a la menstruación La tinción empleada en la mayoría de los laboratorios de citología es la de Papanicolaou – que es una variación de la hematoxilina Harris y eosina (H & E) se utiliza la modificación de 1960, empleando alcohol amoniacal como diferenciador en vez de ácido clorhídrico y el carbonato de litio y los tiempos de Hematoxilina de Harris, OG-6 y EA 50 están acortados notablemente Los colorantes son

ácidos por lo cual las células tienen esa apetencia y por tanto deben emplearse los términos de EOSINOFILIA (rojo) y CIANOFILIA (azul) para connotar las coloraciones

TECNICA Para la aspiración vaginal usar pipeta de vidrio de 6 pulgadas de largo y ¼ de pulgada de diametro redondeada en la punta con curvatura de 2 pulgadas al final y equipada con vulvo de aspiración en el extremo proximal

- 1 Después de la fijación transferir los frotis directamente sin secar en alcohol al 80% y pasar a soluciones de alcohol al 70% y 50% con agua destilada
- 2 Teñir con solución de Harris hematoxilina por 3 a 4 minutos
- 3 Lavar en tres ocasiones usando contenedor separado de forma gentil
- 4 Introducir en solución de alcohol al 50%
- 5 Sumergir en una solución de hidróxido de amonio al 15 % y 70% de alcohol por un min
- 6 Enjuague en alcohol al 70% y posteriormente en alcohol al 80% y 95%
- 7 Teñir en OG-6 por 1minuto 15 segundos
- 8 Lavar en tres jarras de alcohol al 95%
- 9 Teñir con EA-65 por 3 minutos
10. Lavar tres veces en alcohol 95% en contenedores separados
11. Deshidratar y limpiar con alcohol absoluto 50% y xilol 50%
- 12 Montar con Permout u otro medio de montaje conveniente

EL SISTEMA AFFIRM VP III

El sistema para identificación Affirm VP III es una tecnología de diagnóstico basada en sondas de DNA las cuales tienen secuencias de aminoácidos específicos para una especie determinada (18) Este sistema emplea el rRNA buscando y capturando 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 streptavidin (19) Esta proteína enlazada a una enzima se emplea como un indicador de coloración del sustrato incoloro La enzima que genera el color unicamente se 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 (19)

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 en 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 identificación de los tres principales agentes causales de vaginitis y vaginosis bacteriana

El sistema affirm VPIII identifica y detecta:

Candida spp 1×10^4 UFC en fase logarítmica del ensayo

Gardnerella vaginalis 2×10^5 UFC

Trichomonas vaginalis 5×10^3 por ensayo

La exactitud y 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, entre otros)(19)

La prevalencia de infección de las pacientes del Hospital de Gineco-obstetricia N°4 en los exudados cervico-vaginales es de 20 26% distribuidos Tricomona 0 62% Candida 9 09 % y Gardnerella 10 53% Obtenido de los registros del laboratorio del hospital

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La alta incidencia de vaginitis o vaginosis bacteriana sintomática o asintomática nos obliga a realizar diagnósticos de laboratorio prácticos y fáciles con un bajo costo

Es importante detectar el microorganismo causante de las vaginitis y ser específico en el tratamiento de *Trichomona vaginalis*, *Gardenella vaginalis* o una *Candida albicans*, pues los tratamientos múltiples originan el abuso de antibióticos y resistencia. Las metodologías para confirmar estos microorganismos pueden ir desde los más simples como examen en fresco, tinción de gram, tinción de Papanicolaou y cultivos, hasta el uso de sondas genéticas.

Se investigará la eficacia diagnóstica de las sondas de ADN (Affirm VPIII) en comparación con la tinción de Papanicolaou en pacientes con patología vaginal, para determinar la presencia de *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida*, para definir que método diagnóstico es más útil, sus indicaciones, cual utilizar y en que momento, las ventajas de cada uno y sus desventajas para optimizar los recursos del laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la eficacia diagnóstica de Affirm VPIII para detectar *Trichomona vaginalis* *Candida spp* y *Gardnerella vaginalis* comparada con tinción de papanicolaou en pacientes con diagnóstico clínico de vaginitis o vaginosis

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

-Determinar la presencia de *Candida spp* en pacientes con candidiasis vaginal sintomática, obteniendo la frecuencia en pacientes con sospecha clínica

-Determinar la presencia de *Trichomona vaginalis* en pacientes con tricomoniasis vaginal sintomática y su frecuencia en pacientes

-Determinar la presencia de *Gardnerella vaginalis* en pacientes con vaginosis bacteriana sintomática y su frecuencia en pacientes del HGO N°4 del Instituto Mexicano del Seguro social (IMSS)

HIPÓTESIS GENERAL:

El método de Affirm VPIII es mejor método diagnóstico para vaginitis causada por *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida spp.* que la tinción de Papanicolaou.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Hi La detección de *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* o *Candida spp.* por el método de Affirm VPIII hace el diagnóstico de vaginitis con mejor sensibilidad y especificidad que la tinción de Papanicolaou

Ho La detección de *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* o *Candida spp.* por el método de Affirm VPIII no hace mejor el diagnóstico de vaginosis que la tinción de Papanicolaou

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron 100 pacientes del sexo femenino con sintomatología de infección cervicovaginal que acudieron al laboratorio clínico del Hospital de Gineco-obstetricia N°4 del Instituto Mexicano del Seguro Social con edades de 15 a 50 años con vida sexual activa sin tratamientos previos y con infección vaginal sintomática flujo transvaginal grumoso acompañado de prurito ardor vulvar dispareunia o sequedad vaginal con signos de eritema y edema vulvar

Los criterios de no inclusión embarazadas multitratadas o con tratamientos recientes hasta 15 días previos al estudio Se les realizó historia clínica exploración ginecológica con espejo vaginal esterilizado sin lubricante y se colectaron especímenes de la secreción del fondo de sacos laterales y canal endocervical, por medio de hisopos con el primer hisopo se procesó para examen en fresco, observando en seco débil y fuerte con búsqueda intencionada de *Trichomona vaginalis* característica por su morfología y movimiento flagelar y membrana ondulante, candidiasis por la presencia de levaduras/micelios y en vaginosis Bacteriana la presencia de células epiteliales tapizadas de bacterias cocobacilares ('células clave") se hizo una extensión en portaobjetos para tinción de Papanicolaou fijandolá con cito-spray y posteriormente teñir con la técnica descrita el mismo hisopo se usó para sembrar en medio de cultivo agar Nickerson por 24 horas a 37°C para candida en caso de ser positivos se les realizó la prueba de filamentación en suero humano por 2 horas a 37°C y observar al microscopio la formación de tubo germinal siendo positiva a *Candida albicans* cuando hubo más de 50% (16), en agar Casman con incubación a 37°C por 24 horas en atmósfera de CO₂ específico para *Gardnerella vaginalis*, con hisopo de dacrón estéril se tomó muestra para prueba de Affirm VP III introduciendo en tubo de polipropileno debidamente identificado, se sometió a procesamiento de incubación con solución de lisis por 20 min a 85°C No transcurriendo más de una hora entre la toma y el procesamiento Posteriormente se proceso de forma automatizada

Donde ocurre la liberación del RNA por la solución de lisis y después poniendo a reaccionar con la tarjeta para hibridación en el primer pozo del cassette y continuar con el proceso de lavado conjugación de la enzima marcadora y desarrollando color con el sustrato siendo positivo cualquier intensidad de azul y se compara con los controles positivo y negativo de cada tarjeta validando la prueba

El diagnóstico de *Trichomona vaginalis* se utilizó como estándar de oro el examen en fresco, para *candida* el desarrollo en medio de Nickerson y para *Gardnerella vaginalis* el medio de Casman

Se comparó el cultivo contra los métodos de tinción de Papanicolaou, y con el sistema Affirm VP III

Se sometió a procedimiento estadístico teorema de Bayes y prueba de Chi cuadrada

RESULTADOS:

Se estudiaron 100 pacientes del sexo femenino con patología vaginal de acuerdo a los criterios de Amsel et al (1), realizando exploración ginecológica con espejo vaginal sin lubricante y se colectó especímenes de fondo de sacos laterales y endocervix, para examen en fresco cultivo, tinción de Papanicolaou y sistema Affirm VP III, procesando las muestras de acuerdo a los tiempos para cada espécimen, realizando el trabajo en los meses de Noviembre y diciembre del 2000, en un estudio de tipo transversal y analítico

Se encontró el 57% con positividad, *Trichomona vaginalis* 2%, *Candida* 14% y *Gardnerella vaginalis* en 40%. La no concordancia de los datos es de 3 para las sondas genéticas y 2 para la citología con tinción de Papanicolaou

En las sondas genéticas se obtuvo una sensibilidad de 98.24%, esto es la certeza de pacientes que si padecen la enfermedad y especificidad de 100% identificando pacientes que no padecen la enfermedad, con valores predictivos positivos de 100% esto pacientes que si tienen la enfermedad, y valor predictivo negativo de 97.72% que es la probabilidad de que el paciente no tenga el padecimiento

En la tinción de Papanicolaou la sensibilidad es menor de 94.73% la especificidad de 100% el valor predictivo positivo de 100% y el valor predictivo negativo de 93.47%. Al no encontrar una diferencia estadística significativa se aplicó otro análisis estadístico para confirmar los resultados

En la prueba de Chi cuadrada (X^2) con una $p= 0.0000001$ el Affirm VP III tiene un valor de 92.01 contra 84.79 del Papanicolaou, siendo no significativa la diferencia cuadros 1 y 2

RESULTADOS GLOBALES DE LAS MUESTRAS ENTRE CULTIVO, SISTEMA DE SONDAS GENÉTICAS AFFIRM VP III Y TINCIÓN DE PAPANICOLAOU EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL:

CULTIVO	AFFIRM	PAPANICOLAOU
1 <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>
3 <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>
5 <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>
7		
8		
9		
10 <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>
12		
13 <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>
15 <i>Trichomona vaginalis</i>	<i>Trichomona vaginalis</i>	<i>Trichomona vaginalis</i>
16 <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>
18 <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>
20 <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>
22 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	*****
23 <i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
24		
25 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
26		
27 <i>Candida spp</i>	*****	*****
28 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	*****
29		
30 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
31 *****	*****	<i>Gardnerella vaginalis</i>
32 <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>
34 <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>
36		
37 <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
38		
39 <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>
41		
42		
43		

44	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
45			
46			
47			
48	<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>
50	" " " "	" " " "	<i>Gardnerella vaginalis</i>
51			
52			
53	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
62			
63			
64	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	*****
65	<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>
67			
68	<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>
70	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
71			
72			
73			
74	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>
75	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
76			
77	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
78			
79			
80	<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>
82	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
83			
84			
85			
86			
87			
88	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
89			
90	<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>
92	<i>Trichomona vaginalis</i>	<i>Trichomona vaginalis</i>	<i>Trichomona vaginalis</i>
93	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>

94	<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>
96	<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>
98			
99			
100	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>

***** NO COINCIDENCIA DE DATOS
 LOS ESPACIOS EN BLANCO SIGNIFICA NEGATIVO

CUADRO 1

RESULTADOS DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA ENTRE STANDARD DE ORO, SISTEMA AFFIRM Y PAPANICOLAOU EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VAGINAL

	STANDARD	AFFIRM	PAPANICOLAOU
TRICOMONA	2	2	2
CANDIDA	15	14	14
GARDNERELLA	40	40	38
POSITIVOS	57	56	54
NEGATIVOS	43	44	46

Ramírez R y col Patología Clínica, HC CMN SXXI

CUADRO 2

RESULTADOS DEL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA POR PRUEBAS DE TEOREMA DE BAYES Y PRUEBA DE CHI CUADRADA EN LA EFICACIA DE SONDAS GENÉTICAS SISTEMA AFFIRM VPIII Y PAPANICOLAOU

	AFFIRM VPIII	PAPANICOLAOU
SENSIBILIDAD	98.24 %	94.73 %
ESPECÍFICIDAD	100 %	100 %
V P POSITIVO	100 %	100 %
V P NEGATIVO	97.72 %	93.47 %
X² p = 0 000 000 01	92.01	84.79

Ramírez R y col Patología Clínica HC CMN SXXI

DISCUSIÓN

El sistema Affirm VP III demostró ser altamente sensible y específico con valores de 98.24% y 100%, al comparar con la literatura donde se refieren sensibilidades de 81 a 89% y especificidad de 98.2 a 99% (1,19) Y comparado con el sistema de cultivo se tiene la ventaja de un resultado confiable el mismo día

La tinción de Papanicolaou mostró sensibilidad de 94.73 y especificidad del 100% en nuestro estudio y se refiere en la literatura parámetros que van sensibilidad 60 al 70% (1,15,21), la diferencia en el resultado es influida por la experiencia del observador en este caso fueron evaluadas por un citotecnólogo y el tesista, no siendo posible comparar los resultados sino hasta el final del estudio, con esto se demuestra que se requiere personal altamente entrenado en observación de tinciones

CONCLUSIONES

1. El sistema Affirma VP III demostró ser altamente sensible y específico con 98.24 % y 100 % respectivamente comparado con la literatura de los insertos que refieren sensibilidades que van de 81% a 89% y especificidades de 98.2 a 99%
2. De las pacientes con síntomas se corroboró por ambos métodos un 57% de infección por cualquiera de las tres entidades con positividad para tricomona de 2 % candida del 15 % y gardnerella de 40 % aplicando los métodos más aceptados para su diagnóstico
3. Se comprobó la eficacia diagnóstica del sistema de sondas genéticas para la detección de *Trichomona vaginalis*, *Candida spp* y *Gardnerella vaginalis*. No hay una diferencia estadística entre la tinción de papanicolaou y las sondas genéticas, ni por el teorema de Bayes, ni por chi cuadrada
4. Por lo tanto es válido usar el sistema de papanicolaou como prueba de tamizaje, las sondas genéticas para confirmar diagnósticos de ser necesario y los cultivos para determinar otras entidades causantes del padecimiento

COMENTARIOS

A) El sistema Affirm VP III demostró ser altamente sensible y específico para la determinación de las entidades señaladas pero no todo son bondades en las determinaciones por sondas genéticas

VENTAJAS

- Permite entregar resultados confiables y oportunos ya que la prueba en sí tarda aproximadamente una hora
- Requiere poco equipo y material
- Fácil manejo por el personal y adiestramiento mínimo del personal
- Hay seguridad en el procedimiento no permite contaminación

DESVENTAJAS

Las pruebas son caras con un costo de aproximadamente 156 pesos cada una, además de la toma , el personal y los gastos indirectos

En cuanto a la metodología sería mejor un sistema de flujo continuo y no como se maneja como discontinuo ya que solo se pueden procesar 6 pruebas a la vez y en los hospitales se toman aproximadamente 30 a 40 exudados, lo cual implicaría 5 horas en su procesamiento y eso traslapando los estudios, esto es mantener en incubación mientras se esta corriendo la prueba, acorta mínimamente los tiempos, siendo que la casa comercial recomienda mantener en refrigeración por un lapso de 1 a 4 hrs, como máximo para la determinación y al parecer no alcanzaría para correr las pruebas

Para ser un método tan actual no es conveniente usar el sistema de gotas por que contradice tanta tecnología con algo tan artesanal como el dispensar 12 gotas de la solución de lisis y posteriormente 12 gotas de buffer, rematando al adicionar 4 gotas de sustrato Es más conveniente en sistemas que aunque no requieren tanta precisión en estos pasos adicionar con un sistema automatizado

Para abrir el cassette y levantar el blister siempre hay riesgo de derramamiento es un sistema poco práctico además en un equipo de prueba donde estaba caducado que se uso para aprender y desarrollar la técnica, estaban vacías algunas cubetas del cassette lo cual indica que el blister no es suficientemente seguro para contener los líquidos Demeritando en la calidad del producto

El método de vaciamiento de los tubos con filtro es poco adecuado, sería conveniente diseñar un método de filtración más fácil

Respecto a la lectura si estamos usando tecnología de punta al manejar sondas genéticas sería conveniente usar un sistema más preciso que no diera lugar a duda, ya que en algunas muestras tuvimos que hacer consenso para determinar si era positiva o negativa, pero también puede ser por la iluminación del laboratorio

B) Para concluir sugiero que el método de Papanicolaou es menos sensible, pero confiable y sirve para realizar pruebas de tamizaje y dar un diagnóstico donde no se requiere tanta precisión

El sistema de sondas genéticas Affirm VP III es bueno para casos donde las infecciones son recurrentes y han fallado otros métodos diagnósticos más simples, como son los montajes directos (fresco en solución salina), tinción de gram, tinción de papanicolaou, donde se requiere más adiestramiento del personal y experiencia, los cultivos son buenos pero tardan hasta 3 días perdiendo oportunidad en la entrega del resultado además que el laboratorio requiere más equipo y personal mucho más capacitado

BIBLIOGRAFÍA

- 1 AmselR Totten PA Spiegel CA et al Nonspecific vaginitis Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic asociactions Am J Med 1983, 74 14-22
- 2 Hope K Haefner, MD Current evaluation and Manegement of vulvovaginitis Obstet Gynecol Clin North Am 1999,42 184-95
- 3 Mc Rivera R L y cols Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana asociación con manifestaciones clínicas de laboratorio y tratamiento Ginecol Obstet Mex 1996,66 26-35
- 4 Jack D Sobel, MD et al Vulvovaginitis candidiásica Obstet Gynecol Clin North Am 1993:153-163
- 5 Flores Rivera E , Casanova Roman G 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
- 6 Andrea Ries Smitpink et al Treatment of vaginal infectons candidiasis, bacterial vaginosis and trichomoniasis J Am Pharmicol Assoc 1997, 37 563-9
- 7 Carr PL Felsenstein D Friedman RH.. Evaluation and management of vaginitis J General Int Med 1997,13 335-46
- 8 Jack D Sobel, MD Vaginitis New Engl J Med 1997, 25 1896-1903
- 9 Allison Graves , BS y William A Gardner, M.D Patogenicidad de Trichomonas vaginalis Obstet Ginecol Clin North Am 1993 145-151
- 10 Phillip Herne, MD y James A Mc Gregor *Trichomona vaginalis* microorganismo patógeno que resurge Obstet Ginecol Clin North Am 1993 135-143
- 11 Petrn D Delgaty K Bhatt R Garber G Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis* Clin Microbiol Rev 1998,1.300-317
- 12 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

- 13 Ohlmeijer 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
- 14 Manoj K, Biswas M, D. Vaginosis bacteriana. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1993: 165-74
- 15 Monterrosa Castro A, Blaquier Anaya L. *Gardnerella vaginalis* en informes de citología cervico-vaginal. *Gac Med Mex* 1997: 132: 119-125
- 16 López M.R, Méndez T.L, J. Hernández H.R, Castañón O.R. Micoaia oportunistas en Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Editorial Panamericana primera edición 1995: 99-129
- 17 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
- 18 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
- 19 Sistema para identificación Microbiana Affirm VPIII de Becton Dickinson S A de C V
- 20 George N, Papanicolaou. ATLAS EXFOLIATIVE CYTOLOGY. Published for The Commonwealth Fund by Harvard University Press, Cambridge, Mass 1963
- 21 Yi-Jing Shu, Etienne Gloor. COMPREHENSIVE CANCER CYTOPATHOLOGY OF THE CERVIX UTERI. Correlation with histopathology. COLOR ATLAS OF CYTOPATHOLOGY VOLUME 4. editor O A N Husain MD
- 22 Sobel JD. Vaginal infections in adult women. *Med Clin North Am* 1990, 74: 1573-1602
- 23 Cotch MF, Pastorek JG 2nd, Nugent RP et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis* 1997;24: 353-360
- 24 Horowitz BJ. Mycotic vulvovaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 165: 1188-1192
- 25 Mayoshi Takahashi. ATLAS DE CITOLOGIA DEL CANCER. Editorial Panamericana 2ª Edición 1982 Reimpresión 1985