



ARTÍCULO ORIGINAL

PROYECCIÓN CLÍNICA DE LOS SISTEMAS DE CATEGORIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MICROBIOTA VAGINAL.

CLINICAL PROJECTION OF THE VAGINAL MICROBIOTA MICROSCOPIC CATEGORIZATION METHODS.

Gabriela Verdugo¹, Valerie Petit-breuilh¹.

¹Interna de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

RESUMEN

Introducción: El ecosistema vaginal de la mujer en edad fértil alberga una abundante microbiota comensal, que estando alterada es causa de resultados obstétricos y perinatales adversos. Existen tres métodos de categorización microscópica: Nugent, Ison-Hay y Donders. Nugent es actualmente el método de referencia, pero no ha sido comparado con otros.

Objetivos: Comparar la eficacia diagnóstica de los sistemas de categorización microscópica de la microbiota vaginal.

Materiales y Métodos: Entre 2010 y 2011, se obtuvieron 258 muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas atendidas en el Hospital San Borja Arriarán, que luego fueron categorizadas según los métodos mencionados. Se evaluaron 247 muestras en base a los criterios de exclusión. Se calcularon: Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) para cada uno de los métodos.

Resultados: 157 (63.56%) gestantes presentaron microbiota normal, 58 (23.48%), microbiota intermedia y 32 (12.96%) vaginosis bacteriana (VB). Se observó una correlación de 83.7% entre los tres métodos. De las 41 muestras (16.3%) con resultados discrepantes, 36 discreparon en un método y 5 en 3 métodos, siendo eliminados del análisis. Los sistemas de Ison-Hay y de Donders mostraron S, E, VPP y VPN superiores a 95%. El sistema de Nugent, alcanzó una eficiencia diagnóstica de 90%; la S y E del método alcanzó a 86.5% y 91%, respectivamente. Del total de muestras analizadas, el método de Nugent clasificó incorrectamente al 8.5%, Ison-Hay al 0.81% y Donders al 1.2%.

Discusión: El método de categorización microscópica de microbiota vaginal de Nugent presenta limitaciones respecto a los métodos de Ison-Hay y Donders.

PALABRAS CLAVE: tinción de gram; vaginosis bacteriana; vagina, infección.

ABSTRACT

Introduction: The vaginal ecosystem of a fertile woman houses an abundant commensal microbiota which, being altered, causes adverse obstetric and perinatal outcomes. There are three microscopic categorization methods: Nugent, Ison-Hay and Donders. Nugent is currently the reference method, but it has not been compared with others.

Objectives: To compare the diagnostic effectiveness of the vaginal microbiota microscopic categorization methods.

Materials and Methods: Between 2010 and 2011, a total of 258 samples of vaginal discharge from pregnant women attending Hospital San Borja Arriarán were obtained. They were then categorized according to the mentioned methods. Finally, 247 samples were evaluated based on the exclusion criteria. Sensitivity (S), Specificity (E), Positive Predictive Value (VPP) and Negative Predictive Value (VPN) were calculated for each method.





Results: 157 (63.56%) pregnant women had normal microbiota, 58 (23.48%) intermediate microbiota and 32 (12.96%) bacterial vaginosis (VB). An 83.7% of correlation between the three methods was observed. Of the 41 samples (16.3%) with discrepant results, 36 did in one method and 5 in all three methods, being eliminated from the analysis. The Ison-Hay and Donders systems showed S, E, VPP and VPN above 95%. Nugent's system reached a diagnostic effectiveness of 90%; the S and E of the method reached 86.5% and 91% respectively. Of the samples analysed, Nugent's method classified incorrectly 8.5% of them, Ison-Hay's 0.81% and Donders' 1.2%.

Discussion: Nugent's vaginal microbiota microscopic categorization method is limited in comparison with Ison-Hay's and Donders' methods.

KEYWORDS: gram's stain; bacterial vaginosis; vagina; infection.

INTRODUCCIÓN

El ecosistema vaginal de la mujer en edad fértil alberga una abundante microbiota comensal, cuya composición está influenciada por factores internos o externos al ecosistema. Esta homeostasis es particularmente importante durante la gestación, porque alteraciones microbianas en este ecosistema son una de las causas más importantes de parto prematuro y complicaciones perinatales⁽¹⁻⁶⁾. Existe consenso en considerar a especies de lactobacilos como los morfotipos predominantes en mujeres sanas en edad fértil, definidas por la ausencia de signos y síntomas de enfermedad. Se estima que la mucosa vaginal contiene aproximadamente 108-109 lactobacilos⁽¹⁻⁵⁾. Los lactobacilos cumplen un rol importante en la creación y mantención de la homeostasis vaginal; se ha visto que su alteración pudiese predisponer al contagio y desarrollo de enfermedades de transmisión sexual, infecciones urinarias recurrentes, entre otros⁽⁷⁻⁹⁾.

El diagnóstico microbiológico de alteraciones de la microbiota vaginal permite un tratamiento apropiado disminuyendo los costos y efectos secundarios de la automedicación o las complicaciones de una enfermedad inadecuadamente tratada. Con tal propósito se han desarrollado métodos de evaluación rápidos basados en la observación microscópica de las muestras clínicas, los que han desplazado al diagnóstico clínico por su mayor facilidad de ejecución, especificidad y sensibilidad⁽¹⁰⁻¹²⁾.

El sistema de evaluación microscópica definido por Nugent *et al* es el método más utilizado en el mundo y actualmente

de referencia⁽¹⁰⁾ (**Tabla 1**) y, junto con el método de Spiegel, fueron los primeros en ser estandarizados⁽¹¹⁾. Nugent clasifica la microbiota vaginal en normal, intermedia y VB, para lo cual considera y cuantifica 3 morfotipos bacterianos comunes en el hábitat: morfotipo lactobacilar constituido por bacilos grampositivos largos, morfotipo cocobacilar (*Gardnerella vaginalis* y *Prevotella spp.*) y bacilos curvos Gram variable que corresponden al morfotipo de *Mobiluncus spp.* El sistema de categorización microscópica creado por Ison-Hay⁽¹²⁾ añade dos nuevas categorías a la clasificación de Nugent: a) Presencia única de cocáceas grampositivas y b) ausencia de bacterias en una muestra (**Tabla 2**). Las ventajas de este sistema de categorización sobre el de Nugent son la inclusión de otros morfotipos que forman parte de la microbiota vaginal y el considerar la proporción entre los componentes de la microbiota. Finalmente Donders compuso un sistema de categorización, denominado Grado lactobacilar (GL) basado en la proporción relativa del morfotipo lactobacilar sobre otros morfotipos vaginales⁽¹³⁾, creando las categorías de "microbiota normal" (GL I y IIa), microbiota intermedia (GL IIb) y microbiota alterada (GL III) (**Tabla 3**). Al igual que el procedimiento de Ison-Hay, Donders considera el balance de los lactobacilos respecto a otras bacterias del ecosistema, generando un buen indicador de homeostasis vaginal.

Por las características de los métodos previamente descritos podemos inferir que el método de Nugent presenta mayores limitaciones que los métodos de Ison-Hay y Donders para la categorización microscópica de la microbiota vaginal.





El objetivo de este estudio es comparar los métodos de categorización microscópica de la microbiota vaginal previamente descritos entre sí, con el fin de determinar la mejor opción para ser usada como complemento a la clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre abril y octubre del 2010 y abril y octubre de 2011, mediante difusión verbal del estudio durante la consulta médica, se invitó a participar a 258 embarazadas de 8 a 36 semanas de gestación, atendidas en el Consultorio de Alto Riesgo Obstétrico (ARO), Hospital San Borja Arriarán, quienes fueron seleccionadas al azar. Por conveniencia las embarazadas fueron enroladas en forma consecutiva, siendo citadas un día a la semana, 5 pacientes por sesión. Como criterio de inclusión se consideró a todas las embarazadas consultantes en ARO con o sin signos o síntomas de infección genital (prurito vulvar, descarga vaginal de mal olor, dispareunia). Se excluyeron del estudio a aquellas pacientes que usaron antimicrobianos locales o sistémicos en los 30 días previos a la admisión. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y las pacientes dieron previamente su consentimiento informado.

Se obtuvieron dos muestras de pared vaginal lateral alta por paciente, con tómulas estériles y visión mediante espéculo. Con una de las muestras se efectuó un extendido sobre un portaobjetos, depositándose posteriormente la tórula en medio de transporte 2SP. La segunda muestra fue inoculada en medio de transporte anaeróbico Stuart (Copán). Las muestras fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente antes de las 2 horas de obtención e inmediatamente analizadas.

Evaluación microscópica de las muestras. Los frotis de secreción vaginal fueron teñidos con el método de Gram y luego observados al microscopio óptico con aumento de 1.000x. Se contaron todos los morfotipos bacterianos presentes en 20 campos de inmersión, obteniéndose luego un promedio de cada morfotipo. Se consignó también la presencia y cantidad de levaduras, pseudohifas, *clue cells* y células parabasales. La microbiota vaginal fue luego

asignada en distintas categorías de acuerdo a los procedimientos de Nugent, Ison-Hay y GL. Para el análisis de los datos se utilizó un estándar expandido, considerando como resultados verdaderos al menos dos procedimientos concordantes. Para el recuento de leucocitos se observó una gota de la muestra vaginal en *buffer* 2SP al microscopio óptico con aumento de 400 veces. Se consideró respuesta inflamatoria a la presencia de >10 neutrófilos/campo.

Análisis estadístico. Los estimadores calculados fueron: prevalencia, sensibilidad, especificidad y valores predictivo positivo y negativo, de acuerdo a procedimientos convencionales detallados a continuación:

$$S = [(verdaderos positivos) / (verdaderos positivos + falsos negativos)] \times 100;$$

$$E = [(verdaderos negativos) / (verdaderos negativos + falsos positivos)] \times 100;$$

$$VPP = [(verdaderos positivos) / (verdaderos positivos + falsos positivos)] \times 100;$$

$$VPN = [(verdaderos negativos) / (verdaderos negativos + falsos negativos)] \times 100.$$

RESULTADOS

Se evaluaron microscópicamente 258 muestras de secreción vaginal, de las cuales 6 fueron excluidas (3 por el uso de antibióticos y 3 por la calidad del frotis), quedando un total de 252 muestras a analizar. Se observó una correlación de 83.7% (211 casos) entre los tres procedimientos de evaluación. De las 41 muestras (16.3%) con resultados discrepantes, 36 discreparon en un procedimiento y 5 (1.98%) presentaron resultados diferentes por los 3 procedimientos, siendo eliminados estos últimos del análisis. Finalmente se analizaron 247 muestras.

En la **Tabla 4** se muestra la prevalencia de las distintas categorías de microbiota vaginal de acuerdo al estándar expandido, para las 247 muestras finalmente caracterizadas. La mayoría de las gestantes, 157 (63.56%), presentó microbiota normal; 58 (23.48%), presentó microbiota intermedia; 32 (12.96%), presentó VB.



En la **Tabla 5** se muestran los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la eficiencia global de los procedimientos de categorización microscópica para la categorización de microbiota vaginal. El análisis global de los sistemas de evaluación microscópica mostró una muy buena capacidad de categorización de la microbiota vaginal de los procedimientos de Ison-Hay y de Donders, con valores de S, E, VPP y VPN superiores a 95%. Esto se vio corroborado con su alta eficiencia diagnóstica, con valores superiores a 98.5%. El sistema de Nugent, alcanzó una eficiencia diagnóstica de 90%, mientras que la S y E del método alcanzó a 86.5% y 91%, respectivamente. Del total de muestras analizadas, el procedimiento de Nugent clasificó incorrectamente 21 (8.5%) de ellas, el método de Ison-Hay clasificó incorrectamente a 2 (0.81%) muestras y el GL 3 (1.2%).

La mayor eficiencia diagnóstica para el diagnóstico de microbiota normal e intermedia la obtuvo el método de Donders (100% y 99.19% respectivamente), mientras que para el diagnóstico de VB, los sistemas de categorización de Nugent y Ison-Hay fueron levemente superiores al sistema de Donders (**Tablas 6, 7 y 8**).

DISCUSIÓN

El muestreo al azar de embarazadas atendidas en el Hospital San Borja Arriarán, independiente de la sintomatología que las misma refieren, es un elemento que minimiza el error sistemático de nuestro estudio, logrando recolectar muestras representativas del universo estudiado y, aportando validez externa a nuestro estudio. También la exclusión de paciente que hayan usado antimicrobianos locales o sistémicos 30 días previo a su admisión disminuye el error aleatorio; sin embargo, cabe mencionar la posible presencia de éste último en el proceso de análisis de las muestras, ya sea mediante fallas en la técnica de tinción como en el conteo de morfotipos bacterianos en los campos microscópicos. Ambos factores mencionados previamente limitan la validez interna de nuestro estudio.

Los resultados indican que los sistemas de categorización microscópica presentan fundamentalmente diferencias en el

diagnóstico de microbiota intermedia. Este hecho es importante considerarlo en vista de las evidencias actuales, que señalan que la microbiota intermedia se relaciona con mayores complicaciones obstétricas que incluso la VB⁽³⁻⁴⁾.

Aún no se determinan con exactitud las implicancias en la homeostasis del ecosistema vaginal de la microbiota vaginal categorizada como intermedia, según el método de Nugent. Existen evidencias que demuestran que es parte de un continuo entre microbiota normal y VB, y que la microbiota intermedia sería de transición e inestable^(14,15).

El método de Nugent es un procedimiento muy simple de efectuar; no obstante, tiene varias limitaciones. En primer lugar, considera solamente 3 morfotipos bacterianos en la secreción vaginal, no efectúa un balance de los lactobacilos con respecto a los otros morfotipos presentes, ni tampoco considera la respuesta inflamatoria de la paciente. El sistema de categorización de Ison-Hay constituye un avance con respecto al de Nugent, ya que incluye todos los morfotipos presentes en la secreción vaginal y comienza a considerar la proporción de los microorganismos en el ecosistema vaginal. Por ende incluye varias especies que forman parte tanto de la microbiota normal como patológica. Producto de lo anterior la sola composición de la microbiota pasa a ser insuficiente como método de diagnóstico de microbiota normal o patológica y, comienza a ser necesario incluir el recuento de leucocitos⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, reflejo de la respuesta inmune de la paciente. Por ende, creemos que la categoría de cocáceas grampositivas no es necesaria ni obligadamente patológica y debe interpretarse correctamente a la luz de la respuesta inflamatoria vaginal. Entonces, la categoría de microbiota intermedia definida por Nugent puede corresponder efectivamente a una microbiota de transición (como el autor originalmente postula), o a una vaginitis aeróbica (si se acompaña de respuesta inflamatoria), categoría incluida por Donders⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. El método de Donders, con su categorización de GL, incorpora una visión más amplia de la homeostasis de la microbiota vaginal siendo su definición más ecológica y amplia. Se sabe que la respuesta inmune de cada persona estaría determinada por factores genéticos y epigenéticos⁽²⁰⁾. De lo anterior deriva que ante antígenos microbianos, algunas personas montarán una reacción



inflamatoria, mientras que otras no producirán tal respuesta⁽²⁰⁻²³⁾.

Finalmente, consideramos necesario distinguir entre microbiota intermedia y vaginitis aeróbica, basándose en la respuesta inflamatoria de la paciente, con el fin de evitar el posible sobreuso de antimicrobianos. Para lo anterior, pensamos que un sistema de categorización microscópica de microbiota vaginal idóneo requiere también explicitar mejor los parámetros microbiológicos a evaluar, cosa que permitan al laboratorio informar la microbiota alterada haciendo distinción entre VA y VB, por cuanto las bacterias involucradas y las opciones de tratamiento son distintas.

En conclusión, los resultados obtenidos nos permiten avalar que el método de categorización microscópica de microbiota vaginal de Nugent presenta limitaciones respecto a los métodos de Ison-Hay y Donders. Por otra parte, también podemos inferir a partir de los resultados de este estudio que el método de Donders es el mejor para ser usado como complemento a la clínica por ser el único método que incluye la respuesta inflamatoria de la paciente en su análisis.

Tabla 1. Método microscópico de evaluación de la microbiota vaginal de Nugent (Nugent et al, 1991)

Puntaje	Morfotipo bacteriano*		
	<i>Lactobacillus</i> (Bacilos grampositivos largos)	<i>Gardnerella-Prevotella</i> (Cocobacilos grampositivos, gramnegativos ó Gram variable)	<i>Mobiluncus</i> (Bacilos Gram variable curvos)
0	>30	0	0
1	5-30	<1	1-4
2	1-4	1-4	>5
3	<1	5-30	
4	0	>30	

* Promedio del número de bacterias por campo de inmersión

Puntaje:

- 1: < 1 morfotipo/campo
- 2: 1-4 morfotipos/campo
- 3: 5-30 morfotipos/campo
- 4: ≥ 30 morfotipos/campo

Interpretación del puntaje final: 0-3 puntos: Microbiota normal
4-6 puntos: Microbiota intermedia
7-10 puntos: Vaginitis bacteriana





Tabla 2. Método microscópico de evaluación de la microbiota vaginal de Ison-Hay (Ison y Hay, 2002).

Categoría microbiota	Interpretación	Elementos microscópicos presentes
Grado 0	Uso de antimicrobianos	Células epiteliales, ausencia bacterias
Grado I	Microbiota normal	Morfotipo lactobacilar solo
Grado II	Microbiota intermedia	Reducción N° morfotipo lactobacilar con microbiota mixta
Grado III	Vaginosis bacteriana	Predominio microbiota mixta, escasa cantidad ó ausencia de lactobacilos
Grado IV	Sobrecrecimiento de <i>S. agalactiae</i>	Predominio cocáceas grampositivas

Tabla 3. Método microscópico de evaluación de la microbiota vaginal de Donders (Donders et al, 2009).

Categoría microbiota Interpretación	Proporción del morfotipo lactobacilar respecto a otros morfotipos bacterianos
Grado I Microbiota normal	Presencia única de lactobacilos ó con escasa cantidad de otros morfotipos
Grado IIa Microbiota normal	Predominio del morfotipo lactobacilar sobre otros morfotipos bacterianos
Grado IIb Microbiota intermedia	Predominio de otros morfotipos bacterianos sobre el morfotipo lactobacilar
Grado III Microbiota alterada	Disminución sustancial ó ausencia del morfotipo lactobacilar y su reemplazo por otros morfotipos bacterianos. Presencia de neutrófilos en N°≥10/campo de 400X





Tabla 4. Distribución de las categorías de microbiota vaginal en 247 muestras analizadas empleando como referencia un estándar expandido. Hospital San Borja Arriarán, 2010-2011.

Microbiota vaginal	N° de muestras de la categoría	% de muestras en la categoría
Normal	157	63,56
Intermedia	58	23,48
Vaginosis bacteriana	32	12,96
TOTAL	247	100

Tabla 5. Comparación de los procedimientos de evaluación microscópica con respecto al estándar expandido para la categorización de microbiota vaginal (n= 247).

Parámetro estadístico	Resultado (%)		
	<i>Nugent</i>	<i>Ison-Hay</i>	<i>GLB</i>
<i>Sensibilidad</i>	86,5	99,51	98,1
<i>Especificidad</i>	91	99,6	99,5
<i>VPP</i>	95,6	98,8	96,6
<i>VPN</i>	96,2	99,2	98,8
<i>Eficiencia diagnóstica</i>	90,2	99,1	98,6

Tabla 6. Utilidad de los procedimientos de evaluación microscópica con respecto al estándar expandido para la categorización de microbiota normal (n=157)

Parámetro estadístico	Procedimiento (%)		
	<i>Nugent</i>	<i>Ison-Hay</i>	<i>Donders</i>
<i>Sensibilidad</i>	100	95,54	100
<i>Especificidad</i>	71,1	100	100
<i>VPP</i>	85,8	100	100
<i>VPN</i>	100	92,8	100
<i>Eficiencia diagnóstica</i>	89,47	97,16	100
<i>Prevalencia</i>	63,56	63,56	63,56





Tabla 7. Utilidad de los procedimientos de evaluación microscópica con respecto al estándar expandido para la categorización de microbiota intermedia (n=58)

Parámetro estadístico	Procedimiento (%)		
	<i>Nugent</i>	<i>Ison-Hay</i>	<i>Donders</i>
<i>Sensibilidad</i>	55	98,27	96,55
<i>Especificidad</i>	100	96,3	100
<i>VPP</i>	100	89	100
<i>VPN</i>	87,9	99,45	98,95
<i>Eficiencia diagnóstica</i>	89,47	96,76	99,19
<i>Prevalencia</i>	23,48	23,48	23,48

Tabla 8. Utilidad de los procedimientos de evaluación microscópica con respecto al estándar expandido para la categorización de vaginosis bacteriana (n=32)

Parámetro estadístico	Procedimiento (%)		
	<i>Nugent</i>	<i>Ison-Hay</i>	<i>Donders</i>
<i>Sensibilidad</i>	100	100	100
<i>Especificidad</i>	100	100	99,07
<i>VPP</i>	100	100	94,11
<i>VPN</i>	100	100	100
<i>Eficiencia diagnóstica</i>	100	100	99,19
<i>Prevalencia</i>	12,96	12,96	12,96





Agradecimientos

Dra. María Angélica Martínez Tagle.

Información sobre el artículo

Recibido el 5 de septiembre de 2016.

Aceptado el 11 de noviembre de 2016.

Publicado el 29 de noviembre de 2016.

Autor corresponsal: Gabriela Teresita Verdugo Ulloa, gaby.verdugo.u@hotmail.com

Los autores declaran no haber recibido financiamiento para la realización de este trabajo.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación a este trabajo

Citar de la siguiente forma en formato de la National Library of Medicine (Vancouver):

Verdugo G, Petit-breuilh V. Proyección clínica de los sistemas de categorización microscópica de la microbiota vaginal.. Rev Chil Estud Med. 2016 Nov;9(3):415-424.

Referencias

1. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Fidesser M, Krondorfer I, et al. Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery. Sci Rep. 2014;4:5136.
2. Villaseca R, Ovalle A, Amaya F, Labra B, Escalona N, Lizana P et al . Infecciones vaginales en un Centro de Salud Familiar de la Región Metropolitana, Chile. Rev chil infectol. 2015 Feb; 32(1):30-36.
3. Donders G, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2009; 116(10): 1315-24.
4. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21:355-73
5. Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A, Bracaglia M, Ianiello F, Caruso A, Paradisi G. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch Gynecol Obstet 2010; 281:589-600.
6. Kindinger LM, MacIntyre DA, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, McDonald JAK, et al. Relationship between vaginal microbial dysbiosis, inflammation, and pregnancy outcomes in cervical cerclage. Sci Transl Med. 2016 Aug;8(350):350ra102 LP-350ra102.
7. Van der Veer C, Bruisten S, van der Helm J, de Vries H, van Houdt R. The cervico-vaginal microbiota in women notified for Chlamydia trachomatis infection: A case-control study at the STI outpatient clinic in Amsterdam, the Netherlands. Clin Infect Dis. 2016;ciw586.
8. Hütt P, Lapp e, Stsepetova J., et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. Microb Ecol Health Dis. 2016 Aug;27:30484
9. Steven B Smith and Jacques Ravel. The vaginal microbiota, host defense and reproductive physiology. J Physiol. 2016;0(3):1-13.
10. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991; 29: 297-301.
11. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J Clin Microbiol. 1983;18:170-7.





12. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002;78:413-15.
13. Donders G. Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7:177-79.
14. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, Gibbs RS. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;00:938-44.
15. Desseauve D, Chantrel J, Fruchart A, Khoshnood B, Brabant G, Ancel PY, et al. Prevalence and risk factors of bacterial vaginosis during the first trimester of pregnancy in a large French population-based study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;163(1):30-4.
16. Ovalle A, Martínez MA, Giglio MS, Fuentes A, Villablanca E. Microbiología aislada en la rotura prematura de membranas de pretérmino. Relación con morbilidad infecciosa materna neonatal e intervalo rotura de membranas parto. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 1995;60:252-62.
17. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BIOG.* 2002;109:34-43.
18. Donders GG, Van-Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van-den-Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BIOG.* 2009;116:1315-24.
19. Donders G G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG.* 2011;118:1163-70.
20. Osborne N G, Grubin L, Pratson L. Vaginitis in sexually active women: relationship to nine sexually transmitted organisms. *Am J Obstet Gynecol.* 1982; 962-7.
21. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome.* 2014;2(1):4.
22. Buve A, Jespers V, Crucitti T, Fichorova RN. The vaginal microbiota and susceptibility to HIV. *AIDS.* 2014;28(16):2333-44.
23. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):271.

