

Diagnóstico microscópico versus prueba de hidróxido de potasio (KOH) para el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*

Sánchez Hernández, José Antonio*
 Rivera, Antonio**
 Cortés Domínguez, Oscar*
 Muñoz Zurita, Guillermo***
 Huerta Romano, José Fernando*
 Galindo Paz, Dulce****

Microscopic diagnosis versus potassium hydroxide test (KOH) for *Gardnerella vaginalis* diagnosis

Fecha de aceptación: marzo 2017

Resumen

INTRODUCCIÓN. La vaginosis bacteriana es una enfermedad polibacteriana, con una prevalencia que oscila entre 10% - 40%, considerándose la infección vaginal más frecuente. La toma de muestras de moco vaginal y células del cérvix es por mucho la herramienta diagnóstica más utilizada en diversos países y la más útil a la hora de diferenciar una microbiota normal de la anormal, aunque el uso de pruebas de pH y de hidróxido de potasio KOH (Whiff) a la par conllevan a un diagnóstico más certero.

OBJETIVO. Comparar la positividad de la detección de células claves contra la positividad de la prueba de Whiff en mujeres con vaginosis bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se incluyeron 456 pacientes que acudieron a realizarse citología exfoliativa cérvico-vaginal (Papanicolaou) donde se buscaron células clave, a todas las pacientes se les realizó la prueba de Whiff.

RESULTADOS. De las 456 pacientes incluidas en el estudio, 12.5% fueron diagnosticadas con vaginosis bacteriana siendo positivos 3 ó más criterios. En la población con diagnóstico de vaginosis bacteriana, se corroboró que la prueba de hidróxido de potasio (KOH) fue positiva en 100%. En un 73% se encontró descarga vaginal anormal (leucorrea); solo en el 20% de las muestras fueron observadas las células "clave" (clue). El pH vaginal se mantuvo por arriba de 4.5 en un 98.5% de los casos, 73% de los casos diagnosticados de vaginosis bacteriana dieron cifras de pH de 5, mientras que 24% tuvieron un pH de 6 y sólo en un caso se midió un pH normal. Los casos de vaginosis bacteriana fueron más frecuentes en mujeres con más de 3 embarazos.

CONCLUSIÓN. Se encontró una proporción de 5:1 de la prueba de KOH positiva vs el hallazgo microscópico de células clave en casos de infección por *Gardnerella vaginalis*. La vaginosis bacteriana fue más frecuente en pacientes con más de 3 gestaciones.

Palabras clave: *Gardnerella vaginalis*, hidróxido de potasio, células clave

Abstract

INTRODUCTION. Bacterial vaginosis is a polybacterial disease, with a prevalence ranging from 10% - 40%; is considered the most frequent vaginal infection. Sampling of vaginal mucus and cervical cells is the most widely used diagnostic tool in several countries and the most useful for differentiating a normal microbiota from an abnormal one. The use of pH and potassium hydroxide KOH (Whiff) tests together allow a more accurate diagnosis.

OBJECTIVE. To compare the positivity of the detection of key cells against the positivity of the Whiff test in women with bacterial vaginosis.

MATERIAL AND METHODS. We included 456 patients who underwent cervico-vaginal exfoliative cytology (Papanicolaou) where key cells were searched, all patients underwent the Whiff test.

RESULTS. Of the 456 patients included in the study, 12.5% were diagnosed with bacterial vaginosis because they had 3 or more criteria. In the population diagnosed with bacterial vaginosis, it was corroborated that the potassium hydroxide (KOH) test was 100% positive. Abnormal vaginal discharge (leucorrhoea) was found in 73%; only the "clue" cells were observed in 20% of the samples. The vaginal pH remained above 4.5 in 98.5% of the cases, 73% of the diagnosed cases of bacterial vaginosis gave pH values of 5, while 24% had a pH of 6 and only one case was measured Normal pH. The cases of bacterial vaginosis were more frequent in women with more than 3 pregnancies.

CONCLUSIÓN. A 5: 1 ratio of the positive KOH test was found versus the microscopic finding of clue cells in cases of *Gardnerella vaginalis* infection. Bacterial vaginosis was more frequent in patients with more than 3 gestations.

Key words: *Gardnerella vaginalis*, potassium hydroxide, key cells

* Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

** Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

*** Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

**** Escuela de Fisioterapia, Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Correspondencia: Dr. José Antonio Sánchez Hernández Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 13 sur 2702, Col. Volcanes, C.P. 72410. Puebla, México.

Dirección electrónica: jart70@yahoo.com

Introducción

La vaginosis bacteriana es una patología que involucra a una variedad de microorganismos, considerándose como poli-bacteriana, que se identifica como la infección vaginal más frecuente en pacientes inmunocompetentes. En caso de pacientes VIH seropositivos provenientes de India, la principal afección asintomática es una infección mixta, vaginosis bacteriana y candidiasis, mientras que en los casos sintomáticos muestra una mayor presencia de candidiasis. Mientras que otro estudio realizado en mujeres estadounidenses con VIH presentan una mayor prevalencia de vaginosis bacteriana.^{1,2}

La mayoría de casos se observan en países subdesarrollados y en poblaciones con factores de riesgo como la promiscuidad. Siendo necesario aclarar que ciertas fuentes consideran a la vaginosis bacteriana como un complejo desequilibrio microbiano, no como una infección.³

Gracias a los trabajos de Johann Christoph Döderlein se afirmó que cierta entidad bacteriana se mantenía en la microbiota sin causar sintomatología, y se denominaron "bacilos de Döderlein", pertenecientes al género *Lactobacillus* encargados de mantener el pH vaginal entre 4 y 4.5 aproximadamente. También se hallan dentro de la microbiota natural especies de *Bacteroides*, *Staphylococcus epidermis*, *Corynebacterium*, *Mycoplasma*, entre otras. Las causas de la vaginosis bacteriana no son aún esclarecidas, sin embargo, se han identificado una gran diversidad de factores de riesgo y hábitos predisponentes como la promiscuidad.⁴ Etiológicamente se asocia a una disminución importante en la concentración de especies de *Lactobacillus* y un aumento importante en la concentración de bacterias anaerobias como: *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Ureaplasma urealiticum* y *Mycoplasma hominis*. En la mayoría de los casos, la bacteria predominante es *Gardnerella vaginalis*.⁵

En una población latina (colombiana) con síntomas asociados a vaginosis bacteriana, fue relacionada en un 32% de pacientes por *Gardnerella*, seguido por *Differoides* en un 30%, un 10% por cocobacilos gram negativos, bacilos gram negativos con un 6.6%, 3.3% por cocobacilos grampositivos y 2% por *Mobiluncus*. Mediante un análisis más estricto con PCR, y con población europea (holandesa) se constató una diferencia en la microbiota, con cifras aproximadas de la microbiota vaginal en pacientes con diagnóstico de vaginosis bacteriana. Los organismos con mayor presencia fueron *Gardnerella vaginalis* (96%), *A. vaginae* (87%) y *Megasphaera* (60%). Aunque en pacientes asintomáticos estos mismos microorganismos fueron observados en un 27%, 6% y 2% respectivamente.^{4,6}

El signo más frecuente en pacientes con vaginosis bacteriana es leucorrea (descarga vaginal anormal), las demás manifestaciones relacionadas con esta denominada infección son variables, siendo las más comunes: un olor fétido, referido por los pacientes como "olor a pescado", sensación de picazón, quemadura, dolor, que pueden confundir el diagnóstico con vaginitis. Aunque se estima que alrededor de un 40% - 50% de las mujeres con vaginosis bacteriana cursan asintomáticas.^{5,7}

El diagnóstico de vaginosis bacteriana se categoriza en un criterio clínico o método de Amsel, y un criterio basado en laboratorio o de Nugent. Siendo el primero un conjunto

de características a presentar, de las cuales al menos tres deben estar presentes para el diagnóstico: 1) descarga vaginal de color grisáceo o amarillento; 2) pH vaginal mayor a 4.5; 3) prueba de hidróxido de potasio KOH (Whiff o aminas) positiva; y 4) presencia de grupos de células de descamación llamadas células clave o "clue cells". Cuantificando la presencia de los criterios obtenemos que la manifestación más frecuente prueba de Whiff positiva, seguido por pH mayor a 4.5 y descarga vaginal normal con los números más bajos. Reportes muestran que los criterios de Amsel pueden ser simplificados a la combinación de pH vaginal mayor a 4.5 y observación de células clave cuando no se dispone de tinción de Gram o cuando se carece de tiempo.^{8,9}

El criterio por laboratorio clasifica la microbiota vaginal en normal, intermedia y vaginosis bacteriana, para lo que se necesita la cuantificación de los lactobacilos y cocobacilos Gram variable, característicos de *Gardnerella vaginalis*. El método de Nugent ofrece una clasificación más amplia (incluye aparte de microbiota normal y anormal, una intermedia) y al evaluar la presencia de bacterias dictamina un diagnóstico independiente de las manifestaciones clínicas, para fines prácticos, centraremos nuestra atención al primer método, primordialmente a los criterios 3 y 4.¹⁰

El olor fétido es causado por la volatilización de las aminas (trimetilamina, putrescina, cadaverina) producidas por bacterias anaerobias, proceso ocasionado por el aumento del valor del pH, y que es evaluado clínicamente por la prueba de hidróxido de potasio (KOH) o Whiff (aminas) que consiste en la recolección de una muestra de secreción vaginal para posteriormente mezclar con algunas gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 10%; con esto se alcaliniza el medio, resultando en la liberación de aminas y ácidos grasos, potenciando la reacción fétida, valorado como prueba positiva. A pesar de que puede hallarse de igual forma en mujeres con trichomoniasis. Similitudes epidemiológicas y clínicas entre vaginosis bacteriana y trichomoniasis sugieren un proceso patogénico similar.¹¹

Por su parte, el hallazgo de células clave, también diagnóstico de vaginosis bacteriana, es observado por células epiteliales escamosas con una cantidad considerable de bacterias adheridas a su superficie, tornándose oscuro, perdiendo los bordes característicos de las células vaginales normales. Este procedimiento involucra la dilución de la secreción en 1 ml de solución salina y observación a microscopio. Sin embargo, pacientes con afección crónica no presentan regularmente este criterio por el bloqueo de la lesión de las bacterias a la célula por la producción de inmunoglobulinas locales. La presencia de células clave no es constante en todos los casos, sin embargo algunos estudios constatan la presencia de células clave como mejor parámetro del método.^{8,10}

La toma de muestras de moco vaginal y células del cérvix es por mucho la herramienta diagnóstica más utilizada en diversos países y la más útil a la hora de diferenciar una microbiota normal de la anormal, aunque el uso de pruebas de pH y de hidróxido de potasio KOH (Whiff) a la par conllevan a un diagnóstico más certero.¹²

El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de ambos criterios en pacientes valorados en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Materiales y métodos

Fueron valoradas 456 pacientes que acudieron al Laboratorio del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, del periodo de Mayo de 2013 a Octubre del 2015. A cada paciente se le realizó citología exfoliativa cérvico-vaginal (Papanicolaou), así como valoración de pH vaginal y prueba de hidróxido de potasio (KOH). La prueba de hidróxido de potasio (KOH) o Whiff (aminas) consiste en la recolección de una muestra de secreción vaginal que posteriormente se mezcla con algunas gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 10%; con esto se alcaliniza el medio, lo que produce la liberación de aminas y ácidos grasos, potenciando la reacción fétida (prueba positiva). La búsqueda de células clave, se realizó diluyendo la secreción en 1 ml de solución salina, las muestras fueron teñidas utilizando el tren de tinción de Papanicolaou modificado y posteriormente montadas para la observación al microscopio de las células epiteliales escamosas, considerándose positiva cuando tenían bacterias adheridas a su superficie, tornándose oscuro, perdiendo los bordes característicos de las células vaginales normales.

En todas las pacientes se analizaron los datos clínicos, utilizando los criterios clínicos de Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis*.

Resultados

Se analizaron las fichas clínicas de 456 pacientes para discriminar aquellas que no hayan sido diagnosticadas por vaginosis bacteriana, de acuerdo a los criterios de Amsel el 12.5% fueron diagnosticadas con vaginosis bacteriana teniendo positivos 3 ó más criterios. El porcentaje del total

de las pacientes que mostraron por separado algún criterio de Amsel se ejemplifica en el cuadro 1.

Cabe señalar, que gran porcentaje de la población valorada se presentó como asintomática (ninguna molestia en el momento de la prueba). Así también es prudente mencionar que a pesar de que los criterios son establecidos, un cierto sector de las pacientes podría variar en pruebas relativas como lo son la medición del pH por el rango que ocupa un pH "normal" fisiológico y por los materiales de medición usados, también la observación de presencia de células clave (clue cells) donde intervendrían factores como calidad de la muestra y el equipo utilizado.

En la población con diagnóstico de vaginosis bacteriana, la prueba de hidróxido de potasio (KOH) fue positiva en 100%. En un 73% se encontró descarga vaginal anormal (leucorrea); sin embargo solo en el 20% de las muestras fueron observadas las células "clave" (clue) características (cuadro 2).

El pH vaginal se mantuvo en cifras por arriba de 4.5 en un 98.5% de los casos, 73% de los casos diagnosticados de vaginosis bacteriana dieron cifras de pH de 5, mientras que 24% mostró pH de 6 y en sólo un caso (1.75%) se midió un pH normal (cuadro 3). Dando así por hecho que la gran mayoría de pacientes que se diagnostiquen con vaginosis bacteriana tendrán un pH más alcalino que lo fisiológico; algo correspondiente a la proliferación bacteriana y a la disminución de lactobacilos.

De las 57 pacientes con vaginosis bacteriana, sólo en 11 se pudieron apreciar las células con agregados bacterianos patognomónicos (figura 1), mientras que en todas ellas la reacción de Whiff fue positiva (cuadro 4). Siendo la reacción con KOH algo por mucho esperado al momento de sospecha de vaginosis bacteriana y el hallazgo de células clue poco confiable para basar el diagnóstico.

Cuadro 1
Criterios de Amsel para vaginosis bacteriana en comparación con el total de pacientes

Criterio Clínico de Amsel	% del total que resultó positivo
Leucorrea	49.4
pH vaginal > 4.5	67.9
Prueba de hidróxido de potasio (KOH)	43.8
Células clue	2.41

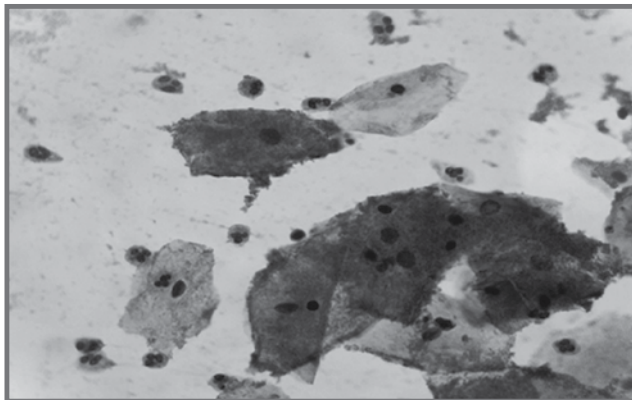
Cuadro 2
Criterios de Amsel en comparación con los pacientes con diagnóstico de vaginosis bacteriana

Criterio	Núm. de pacientes	% de pacientes
Prueba de hidróxido de potasio (+)	57	100
pH vaginal > 4.5	57	98.5
Descarga vaginal anormal (leucorrea)	42	73
Células clave (clue)	11	20

Cuadro 3
Variaciones de pH vaginal en pacientes con vaginosis bacteriana

pH vaginal	Número de pacientes	% de pacientes
4 - 5	1	1.75
5 - 6	42	73
> 6	14	24

Figura 1
Células intermedias y superficiales con los agregados bacterianos clásicos (células clue), tinción de Papanicplau modificada (40X)



Cuadro 4
Comparativo de positividad de criterios en pacientes con vaginosis bacteriana

Pacientes con reacción de KOH +	Pacientes con células clave al microscopio
100%	20%

Cuadro 5
Relación de factores posiblemente implicados en alteraciones de la microbiota vaginal

Padecimiento	DM	Tabaquismo	ETS
Número de pacientes	3	11	1
% de Pacientes	5	20	1.5
Relacionable	NO	NO	NO

Es claro que se esperaría hallar con más frecuencia y en relación de 5:1 a pacientes con reacción de KOH positiva y otros dos criterios de Amsel más para el diagnóstico, que el hallazgo microscópico.

Se consideraron ciertos factores que probablemente tendrían influencia en la sintomatología de las pacientes, tales como: edad, hábito tabáquico, diabetes mellitus, número de embarazos y antecedente de enfermedades de transmisión sexual. En el cuadro 5 se resumen los resultados encontrados basándose únicamente en la muestra que registra el 12.5% de pacientes con diagnóstico de vaginosis bacteriana.

Discusión

De las 456 pacientes valoradas, 57 (12.%) presentaron diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana. De estas, sólo en 11 se apreciaron las células con agregados bacterianos patognomónicos, mientras que en todas ellas la reacción de Whiff fue positiva. Varios factores pueden influir en estos resultados. Como posibles debilidades de este estudio y que no fueron adecuadamente controladas fueron, el error humano con una mala toma de la muestra así como error en la fijación de las mismas en los portaobjetos, lo anterior puede condicionar que las bacterias circundantes a las células epiteliales no puedan ser detectados mediante la tinción y observación. No se realizó una valoración de concordancia interobservador al valorar las muestras al microscopio.

Otros posibles factores que pueden influir en la desproporción entre la prueba de Whiff y células clave pudieran ser la diabetes mellitus, tabaquismo y antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, algunos autores han mencionado la inmunodepresión, ya que estos factores pueden alterar la microbiota de la vagina y predisponer a los desequilibrios característicos de la vaginosis bacteriana. Sin embargo, por la población estudiada esto no fue posible relacionarlo. Aparentemente un mayor número de embarazos puede condicionar mayor alteración en la microbiota vaginal y facilitar la presencia de vaginosis bacteriana.

Es prudente considerar, que todas las muestras presentaron una reacción positiva a la prueba de KOH a pesar de no encontrar las células "clave" a la observación, esto quiere decir que a pesar de no visualizar las bacterias productoras de aminas se evidenció su presencia en la muestra en fresco por la reacción bacteriana con el reactivo (KOH), lo que apoya el que la prueba con KOH se considere de alta utilidad al momento de sospecha de vaginosis bacteriana, y el hallazgo de células "clave" deberá considerarse de baja frecuencia para el diagnóstico.¹³⁻¹⁶

Referencias

1. Goel V, Bhalla P, Sharma A, Mala YM. Lower genital tract infections in HIV-seropositive women in India. *Indian J Sex Transm Dis.* 2011; 32: 103-107.
2. Cu-Uvin S, W. Hogan J, Warren D, S. Klein R, Peipert J, Schuman P, Holmberg S, Anderson J, Schoenbaum E, Vlahov D, H. Mayer K. Prevalence of Lower genital tract infections among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 1145-1150.
3. Gergova RT, Strateva TV, Mitov IG. *Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17: 313-318.
4. Kusters JG, Reuland EA, Bouter S, Koenig P, Dorigo ZJW. A multiplex real-time assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 7: 1-7.
5. Martínez MW. Actualización sobre vaginosis bacteriana. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2013; 39: 427-441.
6. Salas N, Ramírez JF, Ruiz B, Torres E, Jaramillo LN, Gómez-Marín JE. Prevalencia de microorganismos asociados a infecciones vaginales en 230 mujeres gestantes y no gestantes sintomáticas del Centro de Salud La Milagrosa en el municipio de Armenia (Colombia). *Rev Colombiana Obstet Ginecol.* 2009; 60: 135-142.
7. Bohbot JM, Vicaut E, Fagnen D, Brauman M. Treatment of bacterial vaginosis: a multicenter, double-blind, double-dummy, randomised phase III study comparing secnidazole and metronidazole. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010; 1: 1-6.
8. Khandelwal BF, Sharma A, Das C, Kumar HN, Halim HJ. Role of *Gardnerella vaginalis* as an etiological agent of bacterial vaginosis. *Iran J Microbiol.* 2014; 6: 409-414.
9. Mengistie Z, Woldeamanuel Y, Asrat D, Yigeremu M. Comparison of clinical and gram stain diagnosis methods of bacterial vaginosis among pregnant woman in Ethiopia. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7: 2701-2703.
10. Lillo E, Lizama S, Medel J, Martínez MA. Diagnóstico de vaginosis bacteriana en un consultorio de planificación familiar de la Región Metropolitana, Chile. *Rev Chilena Infect.* 2010; 27: 199-203.
11. Zaki MES ZM, Raafat D, Emshtay WE, Azab MS, Goda H. Correlation of *Trichomonas vaginalis* to bacterial vaginosis: a laboratory based study. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4: 156-163.
12. Nenadic D, Pavlovic MD. Value of bacterial culture of vaginal swabs in diagnosis of vaginal infections. *Vojnosanit Pregl.* 2015; 72: 523-528.
13. López AAM, Delgado DI, Iglesias PE, Romero CM, Espinosa CI, Fernández MJR. Evaluación de un método de aglutinación en partículas látex sensibilizadas para el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*. *Rev Cubana Med Trop.* 2008; 60: 118-123.
14. Candido MEF, Hazarabedian de Souza MA, Araujo JE, Adad SJ. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp and human papilloma virus in cytological smears. *Sao Paulo Med J / Rev Paul Med.* 2000; 118: 105-108.
15. Gergova RT, Strateva TV, Mitov IG. *Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Braz J Infet Dis.* 2013; 17: 313-318.
16. Bazan-Ruiz S, Valladares-Garrido D, Benites-Cóndor Y, Bendezú-Quispe G, Ruiz-Leud M, Mejía CR. Severidad de la inflamación en los reportes de Papanicolaou según agente etiológico encontrado en un hospital público del norte de Perú. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2016; 81: 32-37.