

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA



TESIS DOCTORAL

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA VAGINITIS: Desarrollo y validación de un test de PCR a tiempo real para la identificación de los principales agentes causantes de vaginitis infecciosa.

María Isabel Amor Mateo

Directores:

Alfonso Ruiz-Bravo López

Pablo Mendoza López

2025

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Isabel Amor Mateo
ISBN: 978-84-1195-857-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/106777>

Parte de los contenidos y resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados y publicados en:

- Amor, I., Alberola, A., De Salazar, A., Viñuela, L., Úbeda-Portugués, S., Galán, M. I., Mendoza, P., & García, F. (2024). **Evaluation of the Vaginal Panel Realtime PCR kit (Vircell, SL) for diagnosing vaginitis: A comparative study with routinely used diagnostics.** *PloS one*, 19(11), e0313414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313414>
- 33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). April 2023, Copenhagen (Denmark). Scientific poster: **Validation of a molecular test for the diagnosis of vaginitis.** Number 3246/P1662.
- 1º Congreso de la Sociedad Andaluza de Microbiología clínica y enfermedades infecciosas (SAMICEI). Noviembre 2022, Málaga. Póster científico: **Validación del test Vaginal Panel Realtime PCR (Vircell S.L) para el diagnóstico molecular de la Vaginosiis Bacteriana, la Vulvovaginitis Candidiásica y la Vulvovaginitis por Trichomonas.** Número P2-40.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en colaboración con la empresa Vircell S.L. (Granada, España) en el departamento de Diagnóstico Molecular bajo la dirección del Dr. Pablo Mendoza López.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, quienes me brindaron la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. Su guía, apoyo y confianza han sido fundamentales para que este trabajo se hiciera realidad. Asimismo, extendiendo mi agradecimiento a la empresa Vircell por darme la oportunidad de formar parte de esta experiencia.

Este proyecto no solo me ha permitido crecer profesionalmente, sino también a nivel personal, y ha sido una puerta de entrada al fascinante universo de la ciencia y la investigación. Gracias a ello, he podido colaborar con otros centros y aprender de grandes profesionales del ámbito, algo que considero un verdadero privilegio.

A mis compis de laboratorio, gracias por vuestras "donaciones a la ciencia" y por vuestros ánimos constantes, que han sido esenciales para superar los retos de esta etapa. Vuestra compañía y vuestro apoyo han hecho que este camino sea mucho más llevadero. Como solemos decir: si no fuera por estos ratitos...

A mi familia, muchísimas gracias por creer en mí, por animarme siempre a seguir adelante y por ser mi refugio en los momentos más complicados. Y a mis amigos, gracias por preocuparos (¡a veces en exceso!) y por estar ahí animándome en cada paso del proceso. Por fin ya no tendréis que preguntarme más cómo voy ni cuánto me queda, ¡porque aquí está el resultado!

Por último, pero no menos importante, a mi pareja: gracias por apoyarme en todas mis decisiones, por animarme a seguir adelante incluso en los momentos en que pensé en rendirme, por tu paciencia infinita y por estar siempre a mi lado de forma incondicional. Sin tu apoyo, este trabajo no habría sido posible.

Después de muchos años soñando con embarcarme en esta aventura, puedo decir con orgullo que lo he conseguido, aportando mi granito de arena al apasionante mundo de la investigación.

A todos los que me habéis acompañado en este camino, gracias de corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Generalidades.....	7
1.1.1. Composición de la microbiota vaginal	9
1.1.2. Vaginosis bacteriana	11
1.1.3. Vulvovaginitis candidiásica.....	13
1.1.4. Trichomoniasis	15
1.2. Epidemiología	15
1.3. Diagnóstico clínico	18
1.4. Diagnóstico microbiológico	19
1.4.1. Vaginosis bacteriana	19
1.4.2. <i>Candida</i>	22
1.4.3. <i>Trichomonas vaginalis</i>	24
1.5. Tipo de muestra, condiciones de recogida, conservación y transporte	25
1.6. Tratamiento y prevención	26
1.6.1. Vaginosis bacteriana	26
1.6.2. Candidiasis.....	28
1.6.3. Trichomoniasis	29
1.7. Embarazo y menopausia.....	30
1.7.1. Etapas de la vida y microbiota vaginal	30
1.7.2. Prevalencia	31
1.7.3. Tratamiento durante el embarazo	31
1.8. Otras causas de Vaginitis	31
1.8.1. Vaginitis Aerobia	31
1.8.2. Vaginosis citolítica	33

1.8.3.	Vulvovaginitis no infecciosas.....	34
1.8.4.	Vaginitis por otros microorganismos	34
1.8.5.	Enfermedades sistémicas.....	35
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	39
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.	Selección de dianas genéticas y estudio del genoma	43
3.2.	Secuencias de referencia	43
3.3.	Diseño de oligonucleótidos y sondas.....	44
3.3.1.	Oligonucleótidos para la detección de las especies de <i>Lactobacillus</i>	45
3.3.2.	Oligonucleótidos y sondas del test.....	45
3.3.3.	Oligonucleótidos y sondas para la detección de <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Megasphaera</i> tipo 1 y BVAB-2.....	47
3.4.	Cepas bacterianas, controles y plásmidos	48
3.5.	Extracción de ácidos nucleicos	50
3.5.1.	QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen)	51
3.5.2.	GXT NA Extraction Kit (Hain Lifescience).....	51
3.5.3.	PCR BIO Rapid Extract Lysis Kit (PCR BIO)	51
3.5.4.	Optipure viral Nucleic Acid Extraction Kit (TANBead).....	52
3.5.5.	MagXtract® 3200 system.....	52
3.6.	Técnicas de biología molecular.....	53
3.6.1.	PCR	53
3.6.2.	Cuantificación de los cultivos	55
3.6.3.	Secuenciación por Sanger	56
3.7.	Otras técnicas	58
3.7.1.	Cultivo en agar sangre.....	58
3.7.2.	Cultivo en agar Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar	58
3.7.3.	Cultivo RPMI	59
3.7.4.	Tinción de Gram	59

3.7.5.	Cultivo en medio Roiron.....	60
3.8.	<i>Mastex mix</i>	60
3.9.	Liofilización de la mezcla de qPCR y el control positivo	61
3.10.	Medios de recogida	62
3.10.1.	Medios sólidos.....	62
3.10.2.	Medios líquidos	62
3.11.	Test NAATs comerciales.....	63
3.12.	Muestras clínicas	64
3.12.1.	Hospital Universitario Vall d’Hebrón.....	65
3.12.2.	Hospital Universitario Lozano Blesa	66
3.12.3.	Hospital Universitario Virgen de las Nieves	66
3.13.	Conservación de las muestras y del ADN purificado	67
3.14.	Evaluación funcional interna	67
3.14.1.	Límite de detección	68
3.14.2.	Precisión	68
3.14.3.	Reactividad cruzada, especificidad analítica	69
3.14.4.	Inclusividad.....	72
3.14.5.	Sensibilidad y especificidad analítica	73
3.14.6.	Estabilidades.....	75
3.14.7.	Compatibilidad con otro termociclador	77
3.15.	Evaluación funcional externa.....	78
3.15.1.	Hospital Universitario San Cecilio	78
3.15.2.	Hospital Universitario Virgen de las Nieves	81
3.16.	Análisis de datos	82
4.	RESULTADOS	87
4.1.	Diseño del test	87
4.1.1.	Prototipo 1	87
4.1.2.	Prototipo 2	88

4.1.3.	Diseño final.....	88
4.2.	Selección de las dianas genéticas para el diagnóstico molecular.....	89
4.2.1.	Caracterización de especies del género <i>Lactobacillus</i>	90
4.3.	Cuantificación de cultivos	92
4.4.	Algoritmo para detección de VB	93
4.4.1.	Detección de <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Megasphaera</i> spp. y BVAB-2.....	96
4.5.	PCR a tiempo real.....	97
4.5.1.	Optimización detección del género <i>Candida</i>	98
4.5.2.	<i>Master mix</i> para la qPCR	102
4.5.3.	Control interno del kit	110
4.5.4.	Condición final.....	110
4.6.	Métodos de extracción	113
4.6.1.	Comparación Hain Lifescience, PCRBIO y TANBead.....	113
4.6.2.	Optimización protocolo extracción	115
4.7.	VAGINAL PANEL REALTIME PCR KIT.....	115
4.7.1.	Evaluación interna.....	120
4.7.2.	Automatización	128
4.7.3.	Compatibilidad con otro termociclador.....	129
4.7.4.	Evaluación externa	132
4.7.5.	Comparación del rendimiento del Vaginal Panel Realtime PCR kit con otros test comerciales.....	146
5.	DISCUSIÓN	151
6.	CONCLUSIONES	169
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	173
	ANEXOS.....	191
	Anexo I. Aprobación del comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio.....	191

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

AUC: Área bajo la curva (Area Under the ROC Curve).

BVAB: Bacterias asociadas a vaginosis bacteriana (Bacterial Vaginosis Associated Bacteria).

BSL-3: laboratorio de bioseguridad nivel 3.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

CE: Certificación Europea

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

Ct: Umbral de ciclo de amplificación.

CV: Coeficiente de variación.

DIU: Dispositivo intrauterino.

DQC: Cloruro de decualinio (Dequalinium chloride).

ECHA: Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (European Chemicals Agency).

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration).

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

IC: Intervalo de confianza.

ITS: Infecciones de transmisión sexual.

ITSR: Región del espaciador transcrito interno (Internal Transcribed Spacer Region).

IVD: Diagnóstico in vitro.

KOH: Hidróxido potásico.

LIS: Sistema de Información de Laboratorio (Laboratory Information System).

LNA: Sondas TaqMan LNA (Locked Nucleic Acid TaqMan).

LoD: Límite de detección.

MALDI-TOF MS: Espectrometría de masas asistida por matriz y desorción/ionización láser (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).

NAAT: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (Nucleic Acid Amplification Test).

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).

NGS: Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

Pb: Pares de bases.

PCR/qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Polymerase Chain Reaction)

pH: Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o solución.

POCT: Pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia (Point Of Care Testing).

RFU: Unidades relativas de fluorescencia (Relative Fluorescence Units)

ROC: Curva de característica operativa del receptor (Receiver Operating characteristic Curve).

TMA: Amplificación mediada por transcripción (Transcription-mediated amplification).

UMA: unidad mínima amplificable.

VA: Vaginitis aerobia.

VB: Vaginosis bacteriana.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPH: Virus del papiloma humano.

VPN: Valor predictivo negativo.

VPP: Valor predictivo positivo.

VVC: Vulvovaginitis candidiásica.

RESUMEN

La microbiota vaginal desempeña un papel fundamental en la salud ginecológica al actuar como barrera protectora frente a infecciones. Las alteraciones en este ecosistema pueden derivar en afecciones como la vaginosis bacteriana (VB), la vulvovaginitis candidiásica (VVC) y la tricomoniasis, que representan las principales causas de vaginitis infecciosa. Estas condiciones no solo impactan significativamente la calidad de vida de las pacientes, sino que también se asocian con complicaciones obstétricas y un mayor riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual (ITS).

Este trabajo presenta el diseño, desarrollo y validación de un test molecular basado en la técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de las principales causas de vaginitis. El test diseñado permite la detección simultánea, mediante un formato de PCR *multiplex*, de los microorganismos que forman parte de la microbiota, *Lactobacillus* spp. (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners* y *L. gasseri*), y los patógenos clave involucrados en estas infecciones: *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei*, *Candida* spp. (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*) y *Trichomonas vaginalis*.

Para el diseño del test, en base a bibliografía y alineamientos de genomas, se identificaron los microorganismos clínicamente relevantes y se seleccionaron dianas genéticas altamente conservadas para el diagnóstico. Se diseñaron oligonucleótidos y sondas TaqMan específicas para cada diana, optimizando las condiciones de reacción hasta alcanzar una sensibilidad y especificidad óptimas inicialmente en formato *singleplex* para posterior aplicación en formato *multiplex*. Durante el desarrollo del test, se evaluaron diversos reactivos de PCR y métodos de extracción. Se seleccionó el *master mix*, kit de extracción y protocolo de amplificación que generó el mejor rendimiento.

Se desarrolló un algoritmo propio para el diagnóstico de VB, que pretende establecer una clasificación de la microbiota vaginal similar a la que proporciona el método de Nugent (*gold standard*) en base a la cantidad de *Lactobacillus* frente a la cantidad de *G. vaginalis* y *F. vaginae* presente en la muestra. Este algoritmo alcanzó un AUC de 0,950, con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 90,4%.

Para demostrar la validez científica y el desempeño analítico y clínico del método, se realizó una validación interna conforme a los criterios establecidos en el Reglamento (UE) 2017/746 para la comercialización de productos sanitarios de diagnóstico *in vitro* (IVD) en la Unión Europea (marcado CE). Esta validación incluyó el análisis del límite de detección, precisión,

sensibilidad y especificidad diagnóstica, reactividad cruzada, inclusividad y estabilidad del método para su uso con muestras de exudado vaginal de origen humano. Además, se evaluó la integración del test con sistemas automatizados, como el MagXtract® 3200 System, y su compatibilidad con equipos de amplificación, como el CFX96™ Real-Time PCR Detection System y el Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System. Los resultados obtenidos del análisis de estos parámetros confirmaron el adecuado funcionamiento analítico y clínico del test.

Una vez obtenida la certificación CE, se llevó a cabo una evaluación externa que incluyó la comparación con métodos de diagnóstico tradicionales y otros basados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). El análisis del desempeño del test Vaginal Panel Realtime PCR kit frente a estos métodos demostró que ofrece un rendimiento clínico equiparable para el diagnóstico de VB, VVC y tricomoniasis.

En conclusión, este trabajo describe el diseño, desarrollo y validación del test **Vaginal Panel Realtime PCR Kit** que representa un avance significativo en el diagnóstico de vaginitis, proporcionando una herramienta rápida, precisa y confiable para el manejo clínico. Su implementación en la práctica clínica permite mejorar la atención a las pacientes, reducir complicaciones y optimizar las estrategias terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La microbiota vaginal es el conjunto de microorganismos que habitan de manera natural en el ambiente vaginal. Constituye un ecosistema complejo, equilibrado y dinámico que actúa como barrera protectora fundamental para la salud urogenital. Su función principal es prevenir la invasión y colonización de microorganismos oportunistas y patógenos, desempeñando un papel crucial en la defensa frente a infecciones, incluidas las de transmisión sexual (ITS) [1–3]. La composición de la microbiota vaginal experimenta cambios durante toda la vida reproductora de la mujer, causados principalmente por fluctuaciones hormonales [1]. Además, esta composición puede verse afectada por factores como la edad, enfermedades inmunodepresoras, ingesta de antibióticos, duchas vaginales y diabetes mellitus, entre otros. Estas variaciones pueden derivar en un estado conocido como disbiosis. La disbiosis de microbiota vaginal se define como un desequilibrio en la composición de los microorganismos que habitan naturalmente en la vagina. Este desequilibrio se caracteriza por una disminución de bacterias beneficiosas (*Lactobacilos*) y un crecimiento excesivo de microorganismos oportunistas o patógenos [4,5].

Las infecciones vaginales son una causa muy frecuente de consulta en Atención Primaria, Especializada y Urgencias [5]. Las 3 causas más comunes causantes de vaginitis son vaginosis bacteriana (VB) en un 40-50% de los casos, vulvovaginitis candidiásica (VVC) en un 20-25% y trichomoniasis en un 15-20%. El 5-10% restante se debe a causas no infecciosas como alergias, irritantes o inflamaciones [6]. Estas infecciones ocasionan inflamación tanto de la mucosa vaginal como de la piel vulvar, manifestándose con signos como enrojecimiento (eritema), hinchazón inflamatoria (edema), aumento de la secreción vaginal y, en algunos casos, mal olor. Los síntomas más comunes incluyen picazón intensa (prurito), sensación de ardor (escozor) o dolor, que pueden variar en intensidad según la causa específica de la infección [5]. Cuando las manifestaciones clínicas de inflamación vulvovaginal ocurren en ausencia de patógenos, se sugiere que los signos están asociados a factores mecánicos, químicos, alérgicos u otras causas de origen no infeccioso [7]. Las infecciones vaginales aumentan significativamente el riesgo de desarrollar complicaciones graves, entre las que se encuentra la amnionitis (una inflamación e infección de las membranas fetales y del líquido amniótico), parto prematuro, infecciones postaborto y una mayor susceptibilidad a contraer otras ITS, entre las que destacan las debidas al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del papiloma humano (VPH) [5,7]. En las

Tablas 1 y 2 se describen la etiología, los signos, síntomas y factores de riesgo asociados a las diferentes causas de vaginitis.

Tabla 1. Etiología y principales signos y síntomas de la vaginitis. Adaptada de Paladine et al. (2018) [6].

Diagnóstico	Etiología	Síntomas	Signos	Otros Riesgos
VB	Bacterias anaerobias (<i>Prevotella</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Mycoplasma</i>)	Olor a pescado; flujo delgado y homogéneo que puede empeorar después del coito; puede haber molestias pélvicas.	Sin inflamación	Mayor riesgo de infección por VIH, gonorrea, clamidia y herpes.
VVC	<i>Candida albicans</i> u otras especies de <i>Candida</i>	Flujo blanco, espeso, tipo queso o cuajado; picazón o ardor vulvar; sin mal olor.	Eritema y edema vulvar	—
Tricomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Flujo amarillo o verde, espumoso; mal olor; dolor vaginal o sensibilidad.	Inflamación; cuello uterino en fresa	Mayor riesgo de infección por VIH. Incremento del riesgo de parto prematuro. Debe investigarse por otras ITS.
Vaginitis atrófica	Deficiencia de estrógenos	Flujo fino, claro; sequedad vaginal; dispareunia; picazón.	Inflamación; mucosa vaginal friable	—
Vaginitis irritativa/alérgica	Irritación por contacto o reacción alérgica	Ardor, sensibilidad.	Eritema vulvar	—
Vaginitis inflamatoria	Posiblemente autoinmune	Flujo vaginal purulento, ardor, dispareunia.	Atrofia vaginal e inflamación	Asociada a niveles bajos de estrógeno.

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; VVC, vulvovaginitis candidiásica; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; ITS, infecciones de transmisión sexual.

Tabla 2. Factores de riesgo que contribuyen a la vaginitis. Adaptada de Paladine et al. (2018) [6].

Tipo de vaginitis	Factores de riesgo
VB	Bajo nivel socioeconómico, duchas vaginales, tabaquismo, nuevas o múltiples parejas sexuales, relaciones sexuales sin protección, mujeres que tienen sexo con mujeres.
VVC	Uso reciente de antibióticos, embarazo, diabetes mellitus no controlada, VIH, uso de corticosteroides, otras inmunosupresiones.
Tricomoniasis	Bajo nivel socioeconómico, múltiples parejas sexuales, otras infecciones de transmisión sexual, relaciones sexuales sin protección, consumo de drogas, tabaquismo.
Vaginitis atrófica o inflamatoria	Menopausia, lactancia, ooforectomía, radioterapia, quimioterapia, trastornos inmunológicos, insuficiencia ovárica prematura, trastornos endocrinos, medicamentos antiestrogénicos.
Vaginitis irritativa	Jabones, tampones, dispositivos anticonceptivos como condones o diafragmas, juguetes sexuales, pesarios, productos tópicos, duchas vaginales, limpieza excesiva, medicamentos, ropa.
Vaginitis alérgica	Espermatozoides, duchas vaginales, condones o diafragmas de látex, tampones, productos tópicos, medicamentos, ropa, historial atópico.

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; VVC, vulvovaginitis candidiásica; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; ITS, infecciones de transmisión sexual.

1.1.1. Composición de la microbiota vaginal

La microbiota vaginal está compuesta mayoritariamente por bacilos Gram-positivos del género *Lactobacillus*, perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, orden Lactobacillales. Los lactobacilos fueron aislados por primera vez por Albert Döderlein en 1892 [8]. Estos microorganismos son los principales responsables del mantenimiento del ecosistema vaginal, y su presencia tiene un efecto protector, manteniendo el pH ácido de la vagina (entre 3.5-4.5) gracias a la producción de sustancias como ácido láctico, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y bacteriocinas [2,4]. Además, su adhesión a receptores glicolipídicos en la superficie de las células epiteliales actúan inhibiendo la colonización de bacterias patógenas [2]. Históricamente, debido a la producción de ácido láctico, se ha considerado que las especies de *Lactobacillus* presentes en la microbiota eran principalmente *L. acidophilus*. Sin embargo, los análisis genómicos han permitido estudiar la taxonomía de este género y caracterizar diferentes especies [9]. Hasta marzo de 2020, se han descrito 261 especies de *Lactobacillus* con gran diversidad fenotípica, ecológica y genotípica [10]. Las especies más comunes en la microbiota vaginal son *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenni* [9,11–13]. Otras especies descritas con menor frecuencia son *L. acidophilus*, *L. vaginalis*, *L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* [9,13,14]. La prevalencia de estas especies varía según factores como la etnia, la raza y la región geográfica (Figura 1), además de aspectos individuales tales como el estado hormonal, la edad, el uso de productos de higiene personal y antibióticos. Estos factores pueden influir en la diversidad y composición bacteriana del microbioma vaginal, alterando el equilibrio entre las especies de *Lactobacillus* y otros microorganismos [13,15]. La disminución de especies del género *Lactobacillus*, junto con un aumento en la concentración de bacterias anaerobias facultativas y estrictas, constituye una causa frecuente de desequilibrio o disbiosis de la microbiota vaginal, lo que puede dar lugar a infecciones vaginales o vaginitis [1,11,13]. De las cuatro especies más comunes de *Lactobacillus*, *L. inners* se ha identificado con más frecuencia en casos de disbiosis. Aunque su función de defensa no está del todo clara, estudios recientes han demostrado su capacidad para sobrevivir en presencia de patógenos y activar la respuesta inmune [14,16].

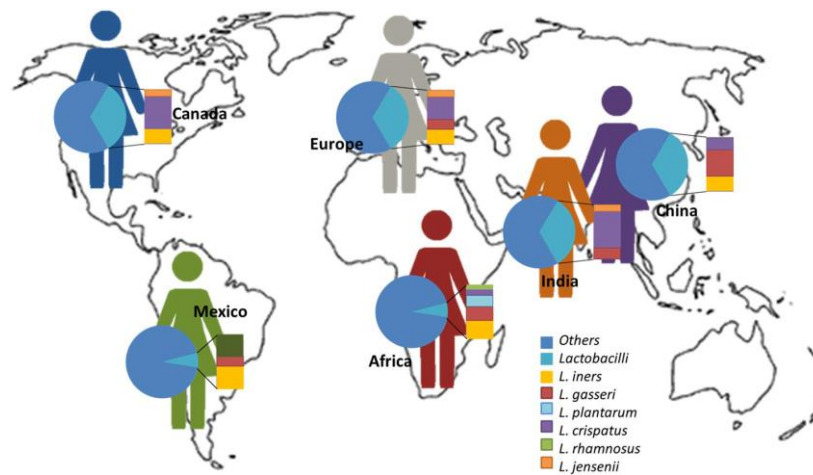


Figura 1. Diversidad y abundancia de especies de *Lactobacillus* en mujeres sanas en edad reproductiva a nivel mundial. En la imagen se muestra la abundancia relativa de cada especie por colores en función de la longitud de la barra, permitiendo una comparación visual entre las distintas poblaciones. Tomada de Saraf et al. (2021) [13].

El estrógeno desempeña un papel importante en el ecosistema vaginal. En la pubertad, los niveles de estrógeno se elevan lo que promueve la maduración y proliferación de las células epiteliales, así como la acumulación de glicógeno. El glicógeno es catabolizado por la α -amilasa a maltosa, maltotriosa y α -destrinas, las cuales son posteriormente metabolizadas a ácido láctico por las especies de *Lactobacillus*, propiciando un ambiente ácido (pH 3.5-4.5) que favorece el crecimiento de estos microorganismos. Los niveles de estrógeno aumentan durante el embarazo y disminuyen con la menopausia (Figura 2) [12,17,18]. En mujeres postmenopáusicas, el incremento de infecciones urogenitales se asocia con una reducción de los niveles de estrógeno y, por tanto, de *Lactobacillus* [19].

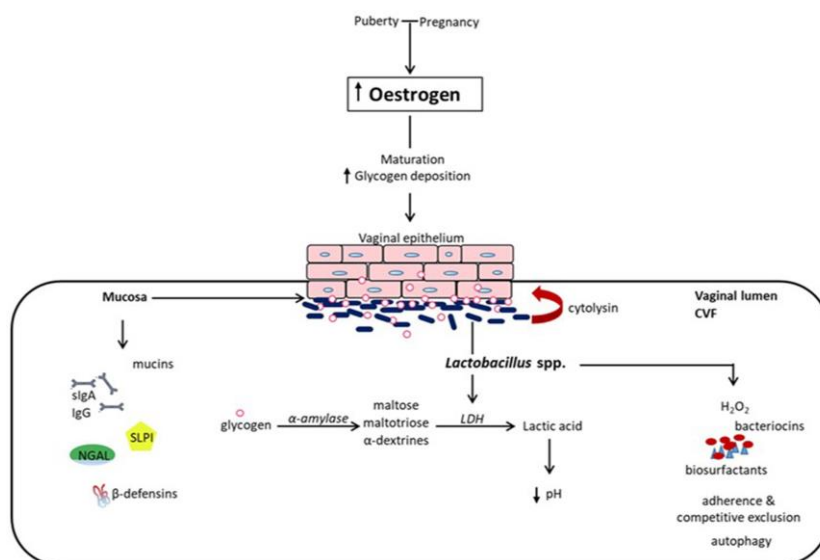


Figura 2. Función del estrógeno y de *Lactobacillus* en la microbiota vaginal. Tomada de Amabebe et al. (2018) [1].

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de las subunidades ribosomales 16S y 23S del ARN ribosomal (ARNr) han permitido la detección y cuantificación de todos los microorganismos presentes en el ecosistema vaginal [3]. Asimismo, estudios de pirosecuenciación han establecido una clasificación del microbioma vaginal en estado asintomático en cinco grupos. El grupo I está dominado por *L. crispatus*, el grupo II por *L. gasseri*, el grupo III por *L. iners* y el grupo V por *L. jensenii*. El grupo IV es el más diverso, ya que incluye microbiomas en los que coexisten *Lactobacillus* junto con bacterias asociadas a VB (BVAB, *BV Associated Bacteria*) [3,17,20].

En la microbiota vaginal normal, las distintas especies de *Lactobacillus* suelen ser dominantes; sin embargo, también pueden encontrarse otras bacterias potencialmente patógenas. Entre las más frecuentes, dependiendo de la población estudiada, se encuentran especies de los géneros *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* y del orden *Clostridiales*. En la población europea, la microbiota vaginal presenta una baja diversidad bacteriana, con predominancia de *Lactobacillus*, mientras que en la población africana la microbiota es más diversa y está dominada por bacterias como *Gardnerella vaginalis* y la bacteria no cultivada asociada a vaginosis bacteriana-1 (BVAB-1). En mujeres embarazadas se observa una predominancia de *Lactobacillus*, *Clostridiales* y *Bacteroides*. Además, algunos hongos, como *Candida albicans*, pueden existir como comensales en la mucosa vaginal. Esta diversidad refleja la variación en la composición de la microbiota vaginal a lo largo de la vida, dependiendo de múltiples factores como la raza, la edad, el estado hormonal y la actividad sexual, entre otros [4,12,21].

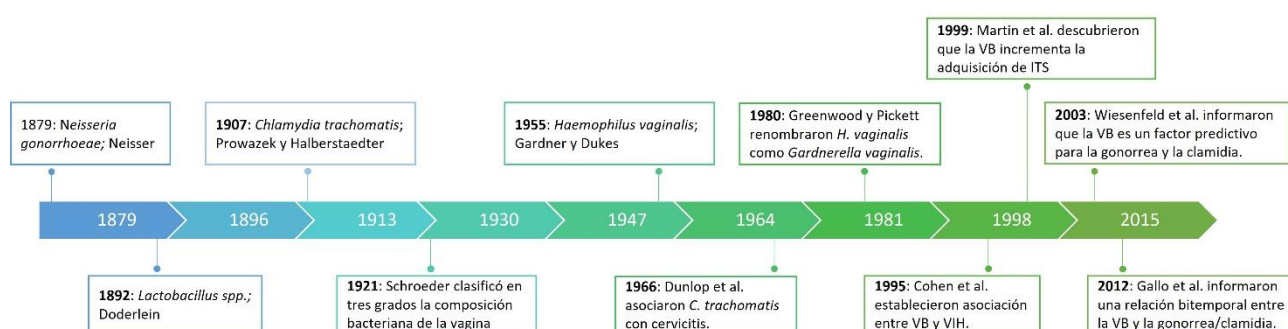
1.1.2. Vaginosis bacteriana

La VB es la disbiosis vaginal más común entre mujeres en edad reproductiva. El término “vaginosis” fue descrito por primera vez en 1964, aunque no se adoptó el término específico de “vaginosis bacteriana” hasta 1981. Actualmente, se ha propuesto un cambio en la terminología hacia “vaginosis polimicrobiana”, dado que este término reflejaría mejor la composición compleja y diversa de los microorganismos asociados a esta condición [2].

La VB se produce por una disminución o ausencia de *Lactobacillus* en la microbiota vaginal y un aumento de las bacterias patógenas. A diferencia de otras especies de *Lactobacillus*, como *L. crispatus* que está asociada con un ambiente vaginal normal, *L. iners* ha sido detectada tanto en microbiotas normales como en casos de VB. *L. iners* tiene la capacidad de persistir y adaptarse a entornos alterados, lo que ha generado controversia respecto a su papel en la microbiota vaginal. Su presencia en situaciones de disbiosis, combinada con su menor producción de ácido

láctico, plantea dudas sobre si contribuye activamente al desarrollo de la VB o si simplemente actúa como un marcador de transición entre una microbiota saludable y un estado disbiótico [14]. En los últimos años, se ha descrito la VB como un síndrome polimicrobiano, siendo *G. vaginalis* y *Fannyhessea vaginalis*, los principales agentes causantes de este síndrome [2]. Además, otras bacterias también pueden estar presentes, incluyendo micoplasmas y especies de los géneros *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Megasphaera* y BVAB [5,21,22]. En la Figura 3 se presenta la cronología de los principales hitos de la VB y su asociación con las ITS.

Figura 3. Cronología de los principales hitos de la VB e ITS desde 1879 hasta la actualidad. Adaptada de Bautista et al. (2016) [23].



Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; ITS, infecciones de transmisión sexual; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

La especie *G. vaginalis*, originalmente denominada como *Haemophilus vaginalis*, género *Gardnerella*, familia *Bifidobacteriaceae* y orden Bifidobacteriales, es un bacilo anaerobio facultativo cuya pared tiene estructura de bacteria Gram-positiva, aunque se decolora con facilidad por lo que suele calificarse como Gram-variable. Se caracteriza por su adherencia a las células epiteliales y su capacidad para formar biofilms [24,25]. La especie *F. vaginalis*, anteriormente denominada *Atopobium vaginalis*, del género *Fannyhessea*, familia *Atopobiaceae* y orden Coriobacteriales, es un cocobacilo anaeróbico facultativo, Gram-positivo, de forma bacilar o elíptica. También asociado a la formación de biofilms, lo que reduce la eficacia de los tratamientos y favorece las infecciones recurrentes [26]. Aunque estos patógenos han sido descritos como causantes de VB en un 50-96% de los casos, *G. vaginalis* también se encuentra en mujeres que no han tenido relaciones sexuales y en mujeres sexualmente activas con microbiotas vaginales normales [26,27]. En los últimos años, el análisis mediante secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) ha revelado la existencia de 13 especies dentro del género *Gardnerella*. Como resultado, estudios genómicos combinados con caracterizaciones fenotípicas están estudiando las diferencias significativas en el potencial

patogénico entre distintas cepas de *G. vaginalis*. Este análisis ha permitido la identificación de cuatro clados o subgrupos genéticamente distintos. Entre las especies y genomoespecies reconocidas hasta ahora se encuentran: *G. swidsinskii* y *G. leopoldii* (subgrupo A/clado 4), *G. piovii* (subgrupo B/clado 2) y *G. vaginalis*. Asimismo, los subgrupos C/clado 1 y D/clado 3 incluyen varias genomoespecies adicionales, consolidando una taxonomía más compleja y específica dentro del género. Las especies de *Gardnerella* producen varias enzimas hidrolíticas, como las sialidasas, que parecen desempeñar un papel significativo en la patogénesis de la VB [28,29].

El síntoma más característico de la VB es el aumento de la secreción vaginal, que se vuelve más acuosa y presenta un olor desagradable (similar al olor a pescado); sin embargo, también existe un alto número de mujeres asintomáticas [5]. Otros síntomas comunes incluyen exudado homogéneo, picor e irritación, mientras que en menor frecuencia pueden presentarse disuria, dispareunia y dolor abdominal [2].

Los factores de riesgo asociados con la VB incluyen múltiples parejas sexuales, relaciones sexuales sin uso de métodos anticonceptivos, duchas vaginales, estrés y uso de antibióticos, entre otros [22,27]. Se ha reportado una mayor prevalencia de infección en mujeres que utilizan un dispositivo intrauterino (DIU), mientras que el uso de anticonceptivos orales no ha demostrado incrementar el riesgo de VB [30]. Además, la VB se asocia con un mayor riesgo de adquirir una ITS y problemas asociados al embarazo como aborto espontáneo, rotura prematura de membranas, endometriosis y problemas de fertilidad [2].

1.1.3. Vulvovaginitis candidiásica

La VVC es una infección que causa inflamación de la vagina y la vulva, provocada por diversas especies de hongos, principalmente del género *Candida* (familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*), siendo *C. albicans* la especie más común. Otras especies menos frecuentes, denominadas *Candida no albicans*, como *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*, están incrementando su prevalencia y se caracterizan por su resistencia a los tratamientos actuales [5,31,32].

La colonización de la vagina ocurre mediante la adhesión del hongo a las células epiteliales. *C. albicans* muestra una mayor adhesión a estas células en comparación con las especies *Candida no albicans*, debido a su capacidad de germinación y su cambio morfológico de levadura (células redondas u ovoides) a hifas filamentosas (Figura 4), lo que a veces da lugar a la formación de biofilms [32,33]. En aproximadamente un 1-2% de los cultivos vaginales se detecta *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo comensal de la vagina que no provoca síntomas [34].

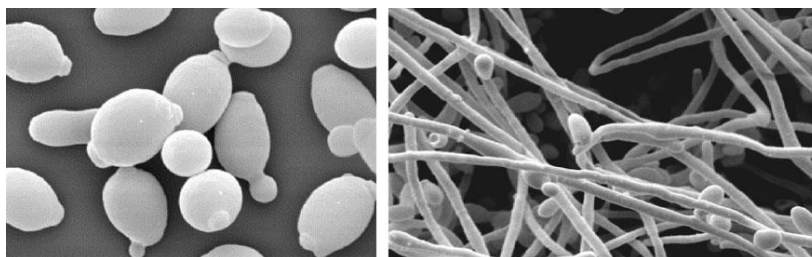


Figura 4. Imagen al microscopio electrónico de las dos formas del hongo *C. albicans*: forma de levadura (izquierda) e hifa (derecha). Imágenes tomadas de Cassone (2015) [33].

La VVC se clasifica en no complicada y complicada. Se considera no complicada cuando es causada por la especie *C. albicans*, con menos de cuatro episodios al año de gravedad leve o moderada. La VVC complicada incluye episodios debidos a especies *Candida* no *albicans* o casos graves causados por cualquier especie de *Candida*. Se considera VVC complicada recurrente cuando ocurren cuatro o más episodios al año, en presencia de factores de riesgo reconocidos como embarazo, diabetes e inmunosupresión [35,36]. También se observa colonización del tracto genital en un 20% de los casos [5,37]. En la Tabla 3 se presenta la distribución de casos de las especies de *Candida* en Europa en mujeres con VVC aguda.

Tabla 3. Distribución de las especies de *Candida* de Europa en casos de VVC aguda. Tabla tomada de la revisión bibliográfica Farr et al. (2021) [34].

<i>Candida</i> species	n	%
<i>C albicans</i>	450	94.8
<i>C glabrata</i>	10	2.1
<i>C krusei</i>	4	0.8
Others (<i>C tropicalis</i> , <i>C kefyr</i> , <i>C africana</i> , <i>S cerevisiae</i>)	11	2.3
Total	475	100

Los factores de riesgo asociados con un aumento de la prevalencia de VVC incluyen embarazo, uso de anticonceptivos orales con alto contenido de estrógeno, diabetes mellitus no controlada, inmunosupresión y uso de antibióticos [35,37]. En presencia de estos factores de riesgo, suelen predominar las especies *Candida* no *albicans* [34].

Los síntomas más característicos de esta infección incluyen el aumento de la secreción vaginal (de aspecto blanquecino y con grumos), prurito, disuria, escozor, lesiones cutáneas en la vulva y el periné, así como eritema en la mucosa vaginal [32,35,37].

1.1.4. Trichomoniasis

T. vaginalis es un protozoo patógeno unicelular flagelado, anaerobio, causante de la ITS no viral más prevalente a nivel mundial, solo superada en prevalencia por el VPH [38,39]. Perteneció al género *Trichomonas*, familia *Trichomonadidae* y orden Trichomonadida. Provoca lesiones del epitelio ectocervical que pueden atribuirse a factores citotóxicos elaborados por el propio protozoo, como la síntesis de proteinasas capaces de degradar algunos factores endógenos que protegen la integridad del epitelio cervicovaginal, lo que favorece su adhesión a las células (Figura 5) [40–42].

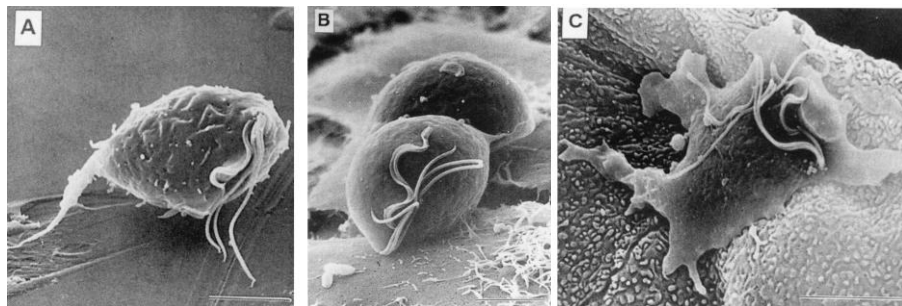


Figura 5. Cultivo de *T. vaginalis* al microscopio electrónico. En las imágenes se pueden observar el axostilo, la membrana ondulante y los flagelos (A); el protozoo en la superficie de una célula epitelial vaginal antes de la transformación ameboide (B); y la morfología ameboide en cultivo celular, donde se muestra la adhesión a la célula epitelial vaginal. Imágenes tomadas de Petrin et al. (1998) [42].

Este protozoo se caracteriza por causar secreción vaginal de color amarillo-verdoso e irritación con prurito intenso [5]. Produce síntomas como vaginitis, uretritis, inflamación pélvica, cervicitis, cáncer cervical e infertilidad. Aunque los hombres son generalmente asintomáticos, también se han descrito casos de uretritis, epididimitis y prostatitis. Al igual que la VB y VVC, la trichomoniasis está asociada a problemas en el embarazado, como parto prematuro, mayor susceptibilidad a VIH, y cáncer de próstata y cervical [38,43,44]. Además, se ha identificado un mayor riesgo de infección por *T. vaginalis* en casos de VB [22,45].

1.2. Epidemiología

Las molestias vaginales son la razón más común por la que las mujeres buscan atención médica, con una prevalencia global que varía entre el 23% y el 29% en mujeres en edad reproductiva [46,47]. Se estima que el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de vulvovaginitis sintomática a lo largo de su vida, siendo la VVC la más prevalente en Europa y

la VB en EE.UU. [5,27,48]. Además, entre el 40% y el 45% de las mujeres experimentan dos o más episodios, lo que resalta la importancia de un diagnóstico y tratamiento adecuados [22].

La VB es la infección más común, con una incidencia que varía entre el 8 y el 30% en mujeres sexualmente activas en los países desarrollados [5,49]. La prevalencia varía de un país a otro (Figura 6) e incluso dentro de un mismo país, dependiendo de la raza, la etnia y las prácticas sexuales. En los últimos años, estudios han reportado un aumento en el número de casos entre mujeres que tienen relaciones sexuales con otras mujeres [23]. Esta infección es más frecuente en mujeres de entre 15 y 44 años y menos común en mujeres posmenopáusicas [27,50].

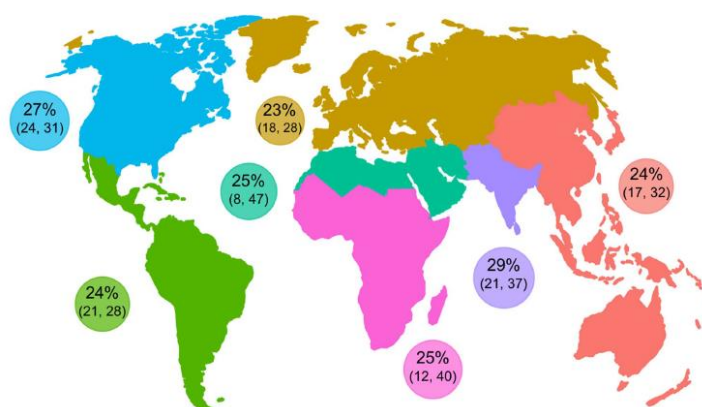


Figura 6. Prevalencia global de la VB expresada en porcentaje por región, según un estudio publicado por Peebles et al. (2019) [49]. Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

La VVC es la segunda causa más común de vaginitis en mujeres en edad fértil, con una tasa de infección que supera el 75% [33,50]. Se estima que el 8% de los casos corresponden a infecciones recurrentes (definidas como al menos cuatro episodios en un año). Las estadísticas globales muestran que 138 millones de mujeres en todo el mundo experimentan VVC recurrente cada año, con una prevalencia anual de 3,871 por cada 100,000 [36,51].

Esta infección es más frecuente en mujeres que reciben terapia hormonal y en aquellas que están embarazadas, especialmente después de un tratamiento con antibióticos [51]. *C. albicans* es responsable del 80-92% de los casos de VVC, mientras que el 8-20% restante se atribuye a otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Tabla 4) [5,48]. Además de su papel patogénico, *C. albicans* puede estar presente en el microbioma de individuos sanos, pudiendo pasar de un estado comensal a uno patogénico bajo condiciones adversas impulsadas por diversos factores predisponentes. Entre estos factores se incluyen la diabetes mellitus, niveles elevados de estrógenos endógenos (por embarazo u obesidad), inmunosupresión (como

en pacientes trasplantados, tratados con medicamentos antimetabolitos, quimioterapia o con infección por VIH), uso de antibióticos de amplio espectro y otros factores ambientales [36].

Tabla 4. Datos de estudios epidemiológicos publicados entre 2003 y 2014 que muestran la distribución de especies de *Candida* en mujeres con VVC. Estos estudios evidencian la prevalencia de diferentes especies, destacando la proporción de *C. albicans* en comparación con las especies no-*albicans* en diversas poblaciones de mujeres afectadas por esta infección. Tomada de Gonçalves et al. [35].

Country	Year(s) of study	No. of subjects	<i>C. albicans</i> (%)	<i>C. glabrata</i> (%)	<i>C. tropicalis</i> (%)	<i>C. parapsilosis</i> (%)	<i>C. krusei</i> (%)	References
USA	1998–2001	429	75.7	15.6	1.1	3.8	3.8	(Richter et al., 2005)
Jamaica	–	125	83.2	4.8	11.2	–	–	(Jackson et al., 2005)
Brazil	2001–2003	40	70.0	20.0	7.5	–	–	(Boatto et al., 2007)
Italy	1999–2001	909	77.1	14.6	2.3	0.6	4.0	(Corsello et al., 2003)
Slovakia	2000–2001	227	87.7	6.2	0.9	0.9	2.2	(Sojakova et al., 2004)
Austria	2000–2004	3243	87.9	3.4	0.2	0.5	0.3	(Paulitsch et al., 2006)
Greece	2002–2004	576	80.2	7.3	1.6	2.1	1.0	(Grigoriou et al., 2006)
Turkey	2004–2005	240	44.2	29.6	–	–	5.8	(Cetin et al., 2007)
India	2003–2004	111	35.1	50.4	10.8	0.9	2.7	(Mohanty et al., 2007)
India	–	215	46.9	36.7	2.8	10.2	1.4	(Ahmad & Khan, 2009)
China	2003–2006	1070	90.4	7.9	0.9	0.6	0.1	(Fan et al., 2008b)
Iran	2006–2008	175	65.1	13.1	6.2	0.6	4.0	(Mahmoudi et al., 2011)
Tunisia	2006–2008	295	76.3	19.3	1.4	–	–	(Amouri et al., 2011)
Nigeria	–	517	20.3	33.8	17.9	4.3	–	(Okunbowa et al., 2003)
Australia	2000	1221	89.0	7.3	0.7	1.0	1.0	(Holland et al., 2003)

La tricomoniasis no es una infección de declaración obligatoria, lo que dificulta la recopilación de datos epidemiológicos fiables. Por esta razón, su incidencia se estima a partir de estudios localizados [22,44]. En Estados Unidos, esta infección es responsable de aproximadamente 3.7 millones de casos. La prevalencia en la población estadounidense es del 2.1% entre las mujeres y del 0.5% entre los hombres, con las tasas más altas entre mujeres negras (9.6%) y hombres negros (3.6%), en comparación con mujeres blancas no hispanas (0.8%) y mujeres hispanas (1.4%) [22,52,53].

En 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó datos basados en los casos reportados en 2008, estimando 276.4 millones de nuevos casos anuales. Este número supera la suma de las dos ITS más prevalentes, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, que en el mismo período registraron 105.7 millones y 106.1 millones de nuevos casos, respectivamente [45,54]. La infección por *T. vaginalis* muestra marcadas disparidades según la edad y la etnicidad. Los continentes africano y americano están significativamente más afectados que Europa, con 42.8 millones y 57.8 millones de adultos infectados en África y América, respectivamente. En contraste, Europa presenta cifras mucho menores, con solo 14.3 millones de adultos infectados, donde la prevalencia de la infección se estima entre el 0.6% y el 5.8% (Tabla 5) [38,52,55].

En 2020, se registraron aproximadamente 156 millones de nuevos casos de infección por *T. vaginalis* entre personas de 15 a 49 años. La prevalencia fue del 5.3% en mujeres y del 0.6% en

hombres, lo que representa 73.7 millones de casos en mujeres y 82.6 millones en hombres [39,56].

Tabla 5. Incidencia y prevalencia estimada de *T. vaginalis* por región en adultos de 15 a 49 años según la OMS [55].

<i>Región de la OMS</i>	Incidencia Anual Estimada (millones)	Prevalencia Estimada (millones)
<i>África</i>	59.7	42.8
<i>Américas</i>	85.4	57.8
<i>Asia Sudoriental</i>	42.9	28.7
<i>Europa</i>	22.6	14.3
<i>Mediterráneo Oriental</i>	20.2	13.2
<i>Pacífico Occidental</i>	45.7	30.1
<i>Total Mundial</i>	276.4	187

Abreviaturas: OMS, organización mundial de la salud.

La infección por *T. vaginalis* presenta una prevalencia que varía del 6,1% al 52,6% en mujeres infectadas por el VIH [57]. Además, se estima que aproximadamente un 25% de las mujeres y entre el 40 y el 75% de los hombres infectados son asintomáticos [54].

1.3. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de infecciones vaginales se basa en la evaluación detallada de los signos, los síntomas, los hallazgos durante el examen físico y el uso de herramientas simples como la medición del pH vaginal y pruebas rápidas disponibles en el consultorio.

La VB se caracteriza por un flujo vaginal fino, homogéneo y de color blanco-grisáceo, acompañado de un olor fuerte a pescado, especialmente después del coito o durante la menstruación. En general, no hay signos de inflamación vulvar o vaginal. El pH vaginal suele ser mayor de 4.5, y la prueba de aminas, añadiendo hidróxido de potasio (KOH) al flujo vaginal, puede desencadenar el característico olor a pescado [2,58].

En la VVC, los síntomas incluyen prurito intenso, enrojecimiento y flujo vaginal espeso, blanco y grumoso. A menudo hay inflamación de la mucosa vulvar y vaginal, acompañada de sensación de ardor o dolor durante la micción o el coito. El pH vaginal es normal (≤ 4.5), lo que ayuda a diferenciarla de otras infecciones. En el examen clínico, los hallazgos de flujo característico y eritema son suficientes para sospechar candidiasis [32].

La tricomoniasis se presenta con un flujo vaginal espumoso, amarillo-verdoso y de mal olor. En algunos casos, se observa eritema. Otros síntomas incluyen ardor, disuria y dolor durante el coito. El pH vaginal suele ser mayor de 4.5 [59,60].

En la tabla 6 se muestran las principales características clínicas de estas infecciones.

Tabla 6. Características clínicas para el diagnóstico de la VB, VVC y tricomoniasis.

Criterio	VB	VVC	Tricomoniasis
Leucorrea	moderada	Leve/moderada	alta
pH	≥4.5	≤4.5	≥5
Olor	Olor a pescado	-	Maloliente
Aspecto	Creoso (adherente y homogéneo)	Grumoso	Espumoso
Color	Grisáceo	Blanco-amarillo	Amarillo-verdoso
Cuadro clínico	Escozor	Prurito, escozor, disuria, dispareunia	Prurito, escozor, disuria, dispareunia
Microscopio, solución salina	Abundante microbiota mixta (<i>Gardnerella</i> y anaerobios) con pocos leucocitos y lactobacilos	Esporas, micelios o pseudomicelios	Tricomonas móviles

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; VVC, vulvovaginitis candidiásica.

1.4. Diagnóstico microbiológico

La anamnesis desempeña un papel importante en el diagnóstico de este tipo de infecciones, ya que cualquier factor desencadenante de un cambio en la microbiota puede ser indicativo. No obstante, la detección de los agentes causantes es crucial para un diagnóstico específico y un tratamiento adecuado.

1.4.1. Vaginosis bacteriana

En un primer examen, se puede realizar un test de pH, un test de KOH y un examen en fresco al microscopio de una muestra vaginal diluida en 0.9% de solución salina o en una solución de KOH al 10%. Un pH mayor de 4.5 es un posible indicador de VB o tricomoniasis, aunque *T. vaginalis* puede no alterar el pH. En la solución salina, es posible visualizar el parásito *T. vaginalis* y las células "guía" o "clue cells", características de la VB. Las células "guía" son células epiteliales escamosas cubiertas por cocobacilos en ausencia de microorganismos baciliformes (*Lactobacillus*) [54,61]. La solución KOH se utiliza para identificar hifas o blastoporos característicos de las especies de *Candida*. A pesar de su uso común, la sensibilidad de estas técnicas es del 50% en comparación con pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, *Nucleic Acid Amplification Test*) o los cultivos [22]. El cultivo vaginal y test de Papanicolaou no

son útiles para el diagnóstico debido al carácter polimicrobiano de la infección [6]. Los métodos habitualmente empleados para la detección de la VB son los criterios de Amsel y la puntuación de Nugent mediante la tinción de Gram. En la Figura 7, se muestran imágenes representativas de colposcopia y examen microscópico de secreciones vaginales características de VB y de una microbiota vaginal normal.

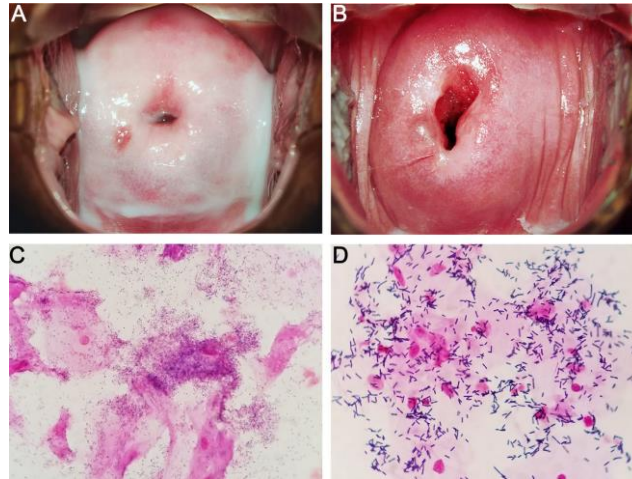


Figura 7. Colposcopia y examen microscópico de una secreción vaginal característica de VB (A, C) y de microbiota vaginal normal (B, D). En las imágenes (A, C) se observan secreciones homogéneas de aspecto lechoso, microorganismos similares a *Gardnerella* y células clave. Las imágenes (B, D) muestran la colposcopia y el examen microscópico de secreciones vaginales normales, respectivamente, con secreciones homogéneas y claras, presencia de microorganismos similares a *Lactobacillus* y ausencia de células clave. Figura tomada de Chen et al. (2021) [4].

La VB se ha diagnosticado tradicionalmente utilizando los criterios de Amsel (1983) [6]. Según este método, una muestra es clasificada como VB si cumple con 3 de los 4 siguientes criterios: secreción vaginal homogénea, pH mayor 4.5, presencia de células clave y prueba de aminas positiva (realizada con KOH al 10%) [62,63]. Este método presenta una sensibilidad que varía entre el 70% y el 97%, y una especificidad del 90% al 94% en comparación con la tinción de Gram [6].

El método de Nugent (1991) es considerado el estándar de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico de la VB. Se trata de una técnica rápida y económica de microscopia que permite detectar la presencia de especies de *Lactobacillus*, *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp. y bacilos Gram-negativos curvados [3]. Una puntuación de 0 a 3 indica la predominancia de *Lactobacillus* en la muestra, lo que es equivalente a una microbiota normal; una puntuación de 4 a 6 se clasifica como microbiota intermedia, donde se observa el aumento de *G. vaginalis*; y una puntuación de 7 a 10 indica VB (Tabla 7) [64]. Al comparar ambos métodos, la sensibilidad y especificidad de

los criterios de Amsel frente al método de Nugent son del 37% al 70% y del 94% al 99%, respectivamente [61].

Tabla 7. Sistema de puntuación de Nugent. Tomado y adaptado de Nugent et al. 1991 [64]. Una puntuación de 0 indica que no hay morfotipos presentes, solo *Lactobacillus*; una puntuación de 1 se asigna cuando hay menos de un morfotipo presente; 2 cuando hay de 1 a 4 morfotipos presentes; 3 cuando hay de 5 a 30; y 4 cuando hay 30 o más morfotipos.

Puntuación	Morfotipos de <i>Lactobacillus</i>	Morfotipos de <i>Gardnerella</i> y <i>Bacteroides</i> spp.	Bacilos curvos Gram-variables
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ o 2+
2	2+	2+	3+ o 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Un método más simple fue descrito posteriormente por Ison y Hay (2002). Este método se basa en la inspección de las tinciones de Gram para estimar la proporción de los morfotipos observados, en lugar de determinar el número de bacterias presentes. Las observaciones se dividen en tres grados: grado 1 (normal: muchos morfotipos de *Lactobacillus* y pocos morfotipos de *Gardnerella*); grado 2 (intermedio: igual número de morfotipos de *Lactobacillus* y *Gardnerella*); y grado 3 (BV: pocos *Lactobacillus* y muchos morfotipos de *Gardnerella*) [65,66]. En la Figura 8 se presentan varios ejemplos de tinciones en las que se pueden observar varias categorías de la microbiota vaginal.

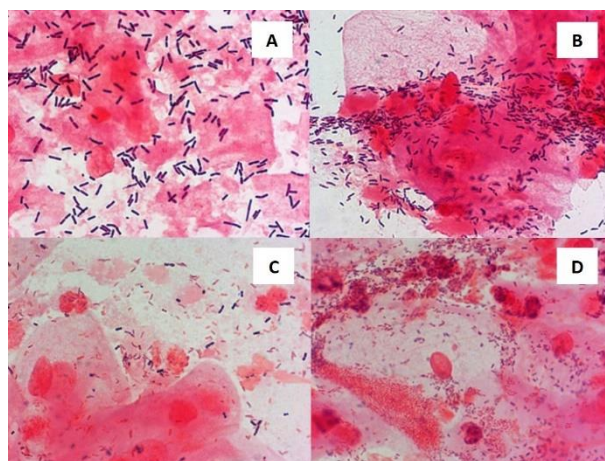


Figura 8. Imágenes de microscopia óptica (100×) de tinciones de Gram de frotis vaginales que ilustran diferentes categorías de la microbiota vaginal. Adaptada de Verhelst et al. 2005 [67]. A: muestra caracterizada por la presencia de *Lactobacillus*; B: presencia de bacilos Gram-positivos de forma irregular; C: mezcla de *Lactobacillus* y bacterias asociadas a VB (*Gardnerella*, *Bacteroides-Prevotella* y *Mobiluncus*); D: VB, donde no se observan *Lactobacillus* y predominan las bacterias asociadas a VB.

Otras pruebas disponibles de laboratorio en el lugar de asistencia (Point of Care Test, POCT) incluyen aquellas que miden los niveles de sialidasa en el fluido vaginal como, por ejemplo, el OSOM® BVBlue® (Sekisui Diagnostics, Massachusetts, Estados Unidos). Esta prueba se realiza en 10 minutos y presenta una sensibilidad y especificidad varían en el rango de 88% a 94% en comparación con el método de Nugent, y entre el 91% y el 98% con el método de Amsel [47,61]. El problema de estas pruebas rápidas radica en que se ha documentado que algunas especies de *Gardnerella* no producen esta enzima, lo que puede afectar su precisión diagnóstica [28].

Debido a las limitaciones de la microscopia y de los POCT, en los últimos años se han desarrollado métodos moleculares con el objetivo de proporcionar un diagnóstico más rápido y objetivo. Entre los más utilizados se encuentra el Affirm VPIII (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos), que es una prueba que utiliza una sonda de ADN para la detección e identificación de los ácidos nucleicos de *Candida*, *G. vaginalis* y *T. vaginalis* en muestras de fluido vaginal de pacientes con síntomas de vaginitis [68,69]. También está el BD Max vaginal panel de la misma compañía, que consiste en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) para la detección de vaginitis en mujeres sintomáticas. Este panel detecta el grupo *Candida* (incluyendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*), así como *C. glabrata* o *C. krusei* y *T. vaginalis*. Además, incluye un algoritmo para el diagnóstico de VB a través de la cuantificación de *Lactobacillus* (*L. crispatus* y *L. jensenii*), *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Megasphaera* tipo 1 y BVAB2. En comparación con los métodos de referencia Nugent y Amsel, este test presenta una sensibilidad del 90.5% y una especificidad del 85.8% para el diagnóstico de VB [46,61,70].

1.4.2. *Candida*

Debido a la alta tasa de infección (75%), de colonización asintomática (10-15%) y de recurrencias (10-20%), el diagnóstico de VVC debe considerar tanto el diagnóstico microbiológico como la clínica de la paciente [22,32,71].

Para el diagnóstico de *Candida*, además de una anamnesis adecuada y un examen ginecológico, es recomendable realizar un examen microscópico del flujo vaginal con solución salina o KOH al 10% utilizando un microscopio óptico o de contraste de fases con un aumento de 400×, esto que permiten la visualización de esporas e hifas [34,35]. La microscopia presenta una sensibilidad entre el 40% y el 70% y presenta menor capacidad para identificar ciertas especies, como *C. glabrata*, porque no forman hifas ni pseudohifas, por lo que estas técnicas deben complementarse con un cultivo vaginal como prueba confirmatoria [72].

El cultivo de levaduras es el método de referencia con una sensibilidad alta 85-95% y especificidad del 90% puesto que permite identificar un amplio grupo de especies. Para el cultivo de *Candida* spp. se usa en rutina el medio agar Sabouraud con 2% de glucosa y requiere un mínimo de 48 a 72 horas [5,22,34].

Para el diagnóstico de las distintas especies de *Candida*, se utilizan medios cromogénicos como CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar, Francia) y ChromID *Candida* agar (bioMérieux, Francia) (Figura 9), así como la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight Mass Spectrometry*). Los medios de cultivo cromogénicos permiten, dependiendo de la composición, la diferenciación e identificación rápida de dos o más especies (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*). Por otro lado, la técnica de MALDI-TOF MS permite la identificación de múltiples microorganismos a través del análisis de su perfil proteico o nucleotídico. Sin embargo, esta técnica se aplica principalmente al análisis de cultivos, ya que requiere una concentración mínima superior a 10^5 células [73–75].

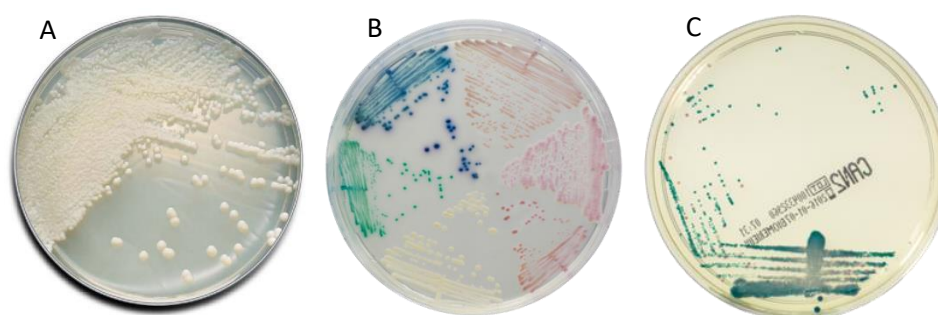


Figura 9. Identificación de especies de *Candida* mediante cultivo en diferentes medios cromogénicos. (A) Cultivo en agar Sabouraud Dextrose con cloranfenicol: *C. albicans* forma colonias blancas y cremosas. (B) Cultivo en CHROMagar™ *Candida*: *C. albicans* se identifica por colonias de color verde, mientras que *C. glabrata* y *C. kefyr* presentan colonias de color malva a marrón, *C. tropicalis* se caracteriza por colonias azul metálico, y *C. krusei* forma colonias de color rosa con bordes rizados. Otras especies muestran colonias que varían entre blanco y malva. (C) Cultivo en ChromID™ *Candida* agar: se observa una clara diferenciación entre especies, con *C. tropicalis* formando colonias rosas y *C. albicans* colonias azules.

Dadas las limitaciones de los métodos tradicionales para el diagnóstico de la VVC, el uso de pruebas moleculares ha experimentado un notable incremento. En los últimos años, diversos estudios han evaluado estas pruebas, destacando su alta precisión clínica, con sensibilidades y especificidades que alcanzan entre el 90% y el 95% y permiten obtener un resultado en 2-6 horas [72,76]. Además, las candidiasis complicadas o recurrentes suelen ser causadas por especies *Candida* no *albicans*, por lo que siempre es necesario realizar un cultivo o PCR para identificar la especie [22].

No se recomienda el uso de métodos serológicos para el diagnóstico de VVC, ya que es posible medir niveles de anticuerpos en pacientes con y sin infección [34].

1.4.3. *Trichomonas vaginalis*

Este parásito en mujeres es tradicionalmente diagnosticado por microscopia mediante el examen de un frotis en fresco que permite observar el movimiento del protozoo. Este método es altamente utilizado debido a su bajo coste y simplicidad, aunque presenta baja sensibilidad (40-70%) en comparación con otros métodos como PCR. La baja sensibilidad del examen en fresco se debe a una reducción de la motilidad del parásito, requiriendo un análisis inmediato lo que complica su identificación [39,57].

Hasta hace unos años, el cultivo de muestras clínicas ha sido el método de referencia para el diagnóstico del *T. vaginalis*. En un periodo de 48-72h es posible observar crecimiento, pero los cultivos deben mantenerse entre 5 y 7 días para detectar pequeñas concentraciones o considerarlos negativos, especialmente en hombres. Los medios más comunes son variantes del medio Diamond y Roiron con una sensibilidad entre el 80 y el 90% y una especificidad muy alta. El medio de cultivo InPouch® TV (BioMed Diagnostics, Moldavia) ha sido ampliamente utilizado para la detección de *T. vaginalis*, ofreciendo una sensibilidad que varía entre el 44% y el 81% y una especificidad del 100%. Sin embargo, su uso ha disminuido con el desarrollo de métodos moleculares, que ofrecen una mayor precisión diagnóstica [3,22,39,54].

Existen métodos serológicos, aunque su uso en la práctica clínica es poco frecuente. En los hombres, el diagnóstico rara vez se realiza debido a que la mayoría son asintomáticos, y la baja carga parasitaria dificulta su detección mediante microscopía o cultivo [5,38]. En mujeres, el test de Papanicolaou también puede detectar *T. vaginalis*, sin embargo, presenta una sensibilidad y especificidad muy bajas, lo que hace imprescindible una prueba confirmatoria [77]. También se dispone de pruebas rápidas, como el test OSOM Trichomonas Rapid Test (Sekisui Diagnostics), que proporciona resultados en 30 minutos con una sensibilidad del 80-94% y una especificidad superior al 95% [71].

El desarrollo de métodos NAATs, ha reemplazado el uso de los métodos tradicionales debido a su mayor sensibilidad y precisión. Estos métodos han facilitado, además, el diagnóstico en pacientes asintomáticos, quienes a menudo presentan una carga parasitaria baja que puede ser indetectable con métodos menos sensibles. El Centro para Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) recomienda el uso de NAATs para el diagnóstico de *T. vaginalis* en mujeres sintomáticas y en aquellas que presentan factores de riesgo. Estos métodos permiten detectar el parásito tanto en muestras endocervicales como

en orina, con una sensibilidad que varía entre el 88% y el 97%, y una especificidad que oscila entre el 98% y el 99% [6,38,71]. El test Aptima T. vaginalis Assay (Becton Dickinson) fue el primer test aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) y que cuenta con Certificación Europea (CE) para el diagnóstico del parásito en mujeres sintomáticas y asintomáticas, con una sensibilidad del 95.3% al 100% y una especificidad del 95.2% al 100% en comparación con la microscopia y el cultivo [22,54,78].

1.5. Tipo de muestra, condiciones de recogida, conservación y transporte

La elección del tipo de muestra para el diagnóstico depende de diversos factores, como la edad y sexo del paciente, el contexto clínico, las instalaciones de laboratorio disponibles, los costos, el tipo de prueba diagnóstica, el microorganismo que se busca identificar y el método de análisis utilizado.

Para el diagnóstico de vaginitis, se emplean torundas y contenedores específicos adaptados a cada técnica. En muchos casos, se recogen varias muestras según las pruebas que se vayan a aplicar. Es fundamental que la recolección de muestras se realice en condiciones asépticas y, siempre que sea posible, antes de iniciar cualquier tratamiento. Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre del paciente y el número de historia clínica correspondiente para garantizar la trazabilidad y la precisión en el manejo de los datos clínicos [79].

Se recomienda la recolección de exudados vaginales y/o endocervicales. Una muestra cervical adecuada debe contener células metaplásicas o endocervicales viables, por lo que es fundamental preservar su integridad. Los dispositivos de recolección, como hisopos o cepillos, deben colocarse en un medio de transporte adecuado o transportarse en seco dentro de un tubo sellado [50,80]. En el mercado existen hisopos de diversos materiales como dacrón, nailon y rayón, aunque estos presentan el inconveniente de retener parte de la muestra en las fibras. Los hisopos flocados representan un avance al mejorar tanto la absorción como la liberación de la muestra [79]. Normalmente se utiliza el espéculo para la toma de muestras; sin embargo, varios estudios han demostrado que la auto-recolección por parte del paciente puede ser igualmente viable y confiable. Esta modalidad ofrece una alternativa cómoda y aceptable en ciertos entornos clínicos [61,81,82].

La correcta conservación y transporte de las muestras es fundamental para garantizar la viabilidad de los microorganismos y obtener resultados diagnósticos confiables. Las muestras deben colocarse en medios adecuados, seleccionados en función del microorganismo de interés y las pruebas diagnósticas previstas. Entre los medios más utilizados para el transporte se

encuentran los medios de Stuart o Amies, que son ideales para preservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos durante el transporte. Estos ofrecen una conservación adecuada durante períodos cortos, generalmente hasta 24 horas, ya sea a temperatura ambiente o refrigerados [22,50].

Tradicionalmente, las muestras se han recolectado en medios en forma de agar semisólido, como el medio Transystem™ Amies Agar Gel (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, USA) y el medio DeltalabSwab Amies Gel (Deltalab, Barcelona, España). Sin embargo, con el avance de las técnicas moleculares, los medios líquidos se han convertido en una opción más común, debido a su compatibilidad con las nuevas tecnologías diagnósticas. Los medios líquidos cada vez son más utilizados, especialmente en técnicas moleculares, debido a su capacidad para recuperar de manera eficiente el ADN o ARN microbiano. Además, estos medios son compatibles con sistemas automatizados y de alto rendimiento, lo que los hace ideales para muestras vaginales, endocervicales o de orina. Entre los medios más comúnmente utilizados se encuentran el UTM-RT® (Universal Transport Medium) y el eSwab® (Copan Diagnostics Inc.) [47,50].

El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse en el menor tiempo posible para evitar la degradación microbiana o el crecimiento de contaminantes. Idealmente, las muestras deben llegar al laboratorio en menos de 2 horas. Si esto no es posible, es fundamental almacenarlas refrigeradas a 4°C para mantener su viabilidad. En casos donde el procesamiento de la muestra pueda retrasarse más de 24 horas, como ocurre en análisis moleculares, se recomienda la congelación a -20°C o -80°C para preservar la calidad de los ácidos nucleicos [50,79].

1.6. Tratamiento y prevención

1.6.1. Vaginosis bacteriana

El tratamiento actual de la VB se centra en detener la proliferación de microorganismos responsables de la infección y en restaurar la microbiota vaginal. Las principales opciones terapéuticas incluyen el uso de antibióticos con amplia actividad contra microbios anaerobios y protozoos, y/o la administración de probióticos.

El metronidazol es el tratamiento de elección, recomendado en una dosis de 500 mg por vía oral, dos veces al día durante una semana. Sin embargo, debido a los efectos secundarios asociados a este antibiótico, se sugiere como alternativa el uso de clindamicina, administrada por vía oral a una dosis de 300 mg dos veces al día durante una semana. Otros regímenes incluyen el tratamiento tópico con geles o óvulos vaginales, que han demostrado una eficacia

similar, con tasas de curación que varían entre el 58 % y el 92 % [5,22,26]. A pesar de la alta eficacia inicial de estos tratamientos, las tasas de recurrencia siguen siendo elevadas, principalmente debido a la incapacidad de los antibióticos para eliminar los biofilms. Además, se ha documentado resistencia de *F. vaginae* a nitroimidazoles como el metronidazol y el secnidazol, lo que podría contribuir significativamente a los fracasos terapéuticos. Ante esta problemática, se han investigado y siguen desarrollándose nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo el uso de antisépticos, probióticos y combinaciones de diversas terapias. Entre los compuestos estudiados, el timol, el ácido bórico y los tensioactivos anfotéricos han mostrado efectos prometedores en la eliminación de biofilms de *G. vaginalis* [4,26,27].

En los últimos años, se ha prestado especial atención a un grupo de sustancias pertenecientes a los antisépticos y antimicrobianos, destacando el cloruro de decualinio (DQC, *Dequalinium Chloride*). Este compuesto antiséptico, no antibiótico, presenta la ventaja de no asociarse con el desarrollo de resistencias adquiridas. Su uso es tópico, en forma de supositorios vaginales, y está especialmente indicado en pacientes con VB recurrente [22,27,71].

El uso de probióticos, tanto para recuperar la microbiota tras el tratamiento con antibióticos como para prevenir la infección, está ganando cada vez más popularidad. Se ha demostrado que microorganismos como *L. rhamnosus* GR-1, *L. rhamnosus* Lcr 35, *L. reuteri* RC-14 y *L. crispatus* CTV-05 poseen propiedades probióticas sin asociarse a efectos secundarios. El efecto beneficioso observado sobre la microbiota vaginal y el equilibrio del pH parece estar relacionado con un menor riesgo de recurrencias [4,25,83].

Actualmente, no existen recomendaciones específicas para el manejo de infecciones recurrentes o fracasos terapéuticos en el tratamiento de la VB. En estos casos, se sugiere extender la duración del tratamiento o combinar diferentes enfoques terapéuticos [83]. Se recomienda realizar controles médicos regulares para abordar posibles factores predisponentes.

La prevención de la VB se basa en mantener un equilibrio saludable de la microbiota vaginal y en evitar los factores de riesgo asociados con esta infección. Para ello, es fundamental mantener una higiene adecuada, evitando el uso de duchas vaginales y productos irritantes, así como optar por ropa interior de algodón que ayude a prevenir la humedad excesiva. Además, el uso de preservativos, la reducción del número de parejas sexuales y el consumo de probióticos han demostrado tener un efecto positivo en el mantenimiento de una microbiota equilibrada [14,84].

1.6.2. Candidiasis

El tratamiento para la VVC no complicada incluye una variedad de agentes antimicóticos, como los derivados imidazólicos, poliénicos y piridinonas. Los azoles son el grupo de antifúngicos más utilizado debido a su amplio espectro de acción y la disponibilidad de formulaciones orales. Se recomienda un tratamiento de corta duración, generalmente de 1 a 3 días, o una dosis única de fluconazol oral (150 mg), que ha demostrado una eficacia del 80-90 % en los casos. El clotrimazol es el fármaco más recomendado, administrado por vía vaginal en forma de crema (5 g/día durante 7 días) o comprimidos vaginales (100 mg cada 12-24 horas durante 3-7 días) [5,22,85].

En casos de infecciones recurrentes o persistentes, los tratamientos orales suelen ser preferidos. En estas situaciones, se recomienda prolongar el tratamiento de 7 a 14 días y administrar 3 dosis de fluconazol oral. Además, para prevenir reinfecciones, se puede indicar fluconazol oral en dosis semanal durante 6 meses [21,72].

Desde 1993, el uso extendido de fluconazol ha llevado al surgimiento de aislados de *C. albicans* y especies *Candida* no *albicans* resistentes, lo que ha complicado el manejo de estas infecciones. De estas especies, *C. glabrata* es la que exhibe una susceptibilidad intrínsecamente reducida a esta clase de antifúngicos [85,86]. Aunque no se ha definido un tratamiento óptimo para las infecciones causadas por *Candida* no *albicans*, se ha observado que prolongar el tratamiento de 7 a 14 días puede ser efectivo. Alternativamente, se ha demostrado la eficacia de la anfotericina B vaginal y del ácido bórico, con tasas de éxito del 70 %. Sin embargo, el uso de ácido bórico está restringido debido a las advertencias de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, *European Chemicals Agency*), que lo asocia con infertilidad y toxicidad embrionaria. Por esta razón, su empleo se limita a casos excepcionales de resistencia a otros fármacos [34,72,87].

Al igual que en el tratamiento de la VB, en los últimos años se ha investigado la efectividad de nuevas terapias basadas en probióticos para prevenir la adhesión y colonización de especies de *Candida* en la mucosa. Aunque los resultados preliminares son prometedores, su uso en la práctica clínica aún está siendo evaluado para determinar su seguridad y eficacia [36,88]. Asimismo, se ha observado que las mujeres con VB tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones posteriores por *Candida*. Este aumento en la susceptibilidad se atribuye a la disbiosis vaginal asociada a este síndrome. En este estado, la disminución de *Lactobacillus*, que protegen y evitan el sobrecrecimiento de bacterias anaerobias, facilita un ambiente que favorece la proliferación de *Candida*. Este vínculo resalta la importancia de abordar la disbiosis vaginal no

solo como un factor en el desarrollo de VB, sino también como un componente clave en la prevención de infecciones recurrentes por VVC. Por ello, las estrategias que combinan tratamientos convencionales con probióticos para restaurar la microbiota vaginal podrían tener un impacto significativo en la reducción de estas infecciones recurrentes [89].

1.6.3. Trichomoniasis

En cuanto al tratamiento de la infección por *T. vaginalis*, los nitroimidazoles son los únicos medicamentos que han demostrado eficacia clínica frente al parásito. Dado que se trata de una ITS, se recomienda tratar tanto a hombres como a mujeres para prevenir la reinfección y el mantenimiento del ciclo de transmisión [22].

En mujeres, el tratamiento recomendado consiste en una dosis oral de 500 mg de metronidazol dos veces al día durante 7 días. Aunque anteriormente se indicaba una dosis única de 2 g de metronidazol oral, estudios recientes han mostrado que esta pauta es menos efectiva en comparación con el esquema de tratamiento prolongado, especialmente en pacientes con síntomas persistentes o reinfección. En hombres, la pauta de tratamiento tradicional con una dosis única de 2 g de metronidazol sigue siendo recomendada. Sin embargo, para casos más complejos o recurrentes, puede ser necesaria la adaptación a pautas prolongadas, similares a las utilizadas en mujeres [39,45]. No se recomienda el uso de estos fármacos en formato de gel debido a su baja eficacia para erradicar el parásito [22].

Como alternativa al metronidazol, se recomienda el uso de tinidazol, que ha demostrado una eficacia comparable. Además, este medicamento presenta ventajas como menor toxicidad y niveles séricos y genitourinarios más elevados, lo que podría beneficiar a pacientes con intolerancia al metronidazol. Sin embargo, el mayor costo del tinidazol limita su aplicación en algunos contextos, particularmente en países con recursos limitados y no se ha evaluado en embarazo [44,45].

Aunque la exposición prolongada a los nitroimidazoles ha demostrado ser efectiva debido a la baja tasa de resistencia del parásito, el aumento en la incidencia de la infección ha llevado a una mayor frecuencia de fracasos terapéuticos, posiblemente relacionados con factores como adherencia inadecuada al tratamiento o reexposición por parejas no tratadas [5,21,38].

La prevención de la tricomoniasis se basa en fomentar prácticas sexuales seguras, incluyendo el uso correcto y constante de preservativos y la reducción del número de parejas sexuales. Es fundamental tratar a todas las parejas sexuales para evitar reinfecciones y realizar reevaluaciones diagnósticas entre dos y tres meses después del tratamiento inicial, especialmente en mujeres debido a las altas tasas de reinfección [6,22,71].

1.7. Embarazo y menopausia

El equilibrio del pH vaginal y la composición de la microbiota vaginal dependen de factores como los niveles de estrógenos, glucógeno y la presencia de *Lactobacillus*. Estos elementos varían significativamente en diferentes etapas de la vida de la mujer, como la prepubertad, el embarazo y la menopausia, impactando en la salud vaginal y general.

Durante el embarazo, se recomienda realizar controles regulares para identificar y tratar oportunamente infecciones vaginales, como VB, candidiasis VVC y tricomoniasis.

1.7.1. Etapas de la vida y microbiota vaginal

En la prepubertad, la microbiota vaginal está dominada por bacterias anaerobias, *Escherichia coli* y estafilococos, debido a los bajos niveles de estrógeno y glucógeno. Durante la pubertad, el aumento en los niveles de estrógeno provoca la acumulación de glucógeno en las células epiteliales, que es metabolizado a ácido láctico por especies de *Lactobacillus*. Esto genera un ambiente ácido protector contra infecciones [14].

Durante el embarazo, los niveles de estrógeno aumentan significativamente debido a la producción placentaria, lo que incrementa la acumulación de glucógeno y favorece la proliferación de *Lactobacillus*, especialmente *L. crispatus*. Este entorno disminuye la diversidad bacteriana y protege contra infecciones. Sin embargo, tras el parto, los niveles de estrógeno caen drásticamente, lo que provoca disbiosis de la microbiota vaginal. Este desequilibrio se asocia patologías postparto, como endometritis, y complicaciones neonatales, entre las que se incluyen bajo peso al nacer, inmadurez pulmonar y problemas en el desarrollo. Además, puede influir en la formación de la microbiota intestinal del recién nacido. Microorganismos como *Gardnerella* y *Ureaplasma* están implicados en el parto prematuro, destacando su importancia en el seguimiento y tratamiento durante el embarazo [27,90,91]. Se estima que las mujeres con una microbiota vaginal rica en *Lactobacillus* durante el primer trimestre del embarazo tienen un 75 % menos de riesgo de dar a luz de forma prematura en comparación con aquellas con microbiota anormal caracterizada por la colonización de bacterias causantes de VB [13].

Con la llegada de la menopausia, los niveles de estrógeno disminuyen, lo que reduce el glucógeno disponible y, a su vez, la producción de ácido láctico. Esto eleva el pH vaginal, disminuye la presencia de *Lactobacillus* y aumenta la susceptibilidad a infecciones. Este cambio está asociado con síntomas del síndrome genitourinario, como sequedad, quemazón, irritación y atrofia vulvovaginal. Se ha demostrado que la terapia hormonal y el uso de probióticos pueden reforzar la microbiota vaginal en esta etapa, reduciendo los síntomas y el riesgo de infecciones [90,92].

1.7.2. Prevalencia

La prevalencia de VB en mujeres embarazadas varía ampliamente según la población y el país, con estimaciones que oscilan entre el 10% y el 30%. Se estima que entre el 20% y el 30% de las mujeres embarazadas experimentan VVC en algún momento de la gestación, con mayor tasa de frecuencia en el segundo y tercer trimestre. La prevalencia de *T. vaginalis* en mujeres embarazadas es menor en comparación con VB y VVC, situándose entre el 3% y el 5% [4,39,93].

1.7.3. Tratamiento durante el embarazo

En caso de VB, se recomienda tratar a todas las mujeres embarazadas con síntomas. Para la tricomoniasis, el tratamiento es recomendado en todos los casos. El tratamiento estándar para ambas infecciones es metronidazol oral, administrado en dosis ajustadas según el trimestre de gestación [22]. Aunque este fármaco atraviesa la placenta, numerosos estudios han confirmado su seguridad, sin evidencias de teratogenicidad ni anomalías congénitas [6,94]. Sin embargo, un metaanálisis reciente asoció su uso con un mayor riesgo de aborto espontáneo [95]. Durante la lactancia, se recomienda una dosis baja de metronidazol o pausar la lactancia por 12 a 24 horas tras completar el tratamiento [44,71].

En el caso de VVC, el tratamiento recomendado es el uso de clotrimazol por vía vaginal, ya que los tratamientos orales no son aconsejados durante el embarazo [5]. Estudios han demostrado que el clotrimazol puede reducir el riesgo de parto prematuro cuando se administra en el primer trimestre. Aunque el fluconazol oral (≤ 150 mg) se considera seguro en relación al riesgo embriopático, no está aprobado para su uso rutinario en mujeres embarazadas. Como alternativa en evaluación, el DQC ha mostrado efectividad y no presenta toxicidad aparente [34].

1.8. Otras causas de Vaginitis

Aunque este trabajo se centra en el estudio de las principales causas de vaginitis descritas anteriormente, esta condición también puede, aunque con menor frecuencia, originarse por otros factores. Entre ellos se incluyen cambios hormonales, reacciones alérgicas, exposición a irritantes, presencia de cuerpos extraños o infecciones menos comunes. Por esta razón, es fundamental adoptar un enfoque diagnóstico integral que permita identificar con precisión la causa subyacente y, de esta manera, ofrecer el tratamiento más adecuado para cada caso.

1.8.1. Vaginitis Aerobia

La vaginitis aerobia (VA), también conocida como vaginitis inflamatoria descamativa, se define como la alteración de la microbiota con inflamación y deficiente maduración epitelial.

Esta condición se caracteriza por una disminución significativa de *Lactobacillus* y aumento del pH vaginal. Su causa principal son microorganismos comensales aerobios de origen intestinal, entre los que destacan *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* grupo B y *Enterococcus faecalis* [71,96,97].

Los principales síntomas incluyen un exudado purulento de color amarillo-verdoso, inflamación vaginal significativa y alteración epitelial [2]. Además, esta condición está asociada con complicaciones obstétricas, como el parto prematuro, y otras anomalías durante el embarazo [96].

El diagnóstico de referencia es el examen en fresco con microscopio de contraste de fases, aplicando una puntuación similar a los criterios de Nugent. Se establece no AV cuando se obtiene una puntuación de 0 a 2, AV leve de 3 a 4, moderada de 5-6 y severa de 7 a 10 [71,96]. Aunque también se han descrito el uso de PCR y cultivos microbiológicos, estos métodos no han mostrado resultados consistentes. De hecho, no se recomienda el cultivo como método diagnóstico, ya que un resultado positivo para los patógenos asociados a VA no confirma la presencia de infección [71,98,99]. Métodos complementarios incluyen la medición de estrógenos en sangre, el pH vaginal y NGS [2].

El tratamiento de la VA no está completamente definido. Dado que se trata de una infección inflamatoria, se recomienda el uso de corticoides (como hidrocortisona), antisépticos como el DQC, antiinflamatorios no esteroideos y probióticos. Cuando hay un crecimiento bacteriano significativo, se indican antibióticos como clindamicina. Cabe destacar que el metronidazol está contraindicado en estos casos [2,71,96]. Durante el embarazo, se recomienda la clindamicina debido a su amplio espectro de acción y eficacia tanto contra VA como contra VB [96].

En la Tabla 8 se presentan las principales características comparativas entre VA y VB.

Tabla 8. Comparación entre VA y VB [2].

Características	VA	VB
Principales microorganismos implicados	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus</i> .	<i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> , BVAV, <i>Mobiluncus</i> , <i>Megasphaera</i> .
<i>Lactobacillus</i>	Disminuidos o ausentes	Disminuidos o ausentes
pH	Aumentado (más que en VB)	Aumentado
Prevalencia	No clara: 7-12%	Clara: 8-30%
Inflamación	Vagina roja, edematosa con pequeñas erosiones o ulceraciones	No
Exudado	Aumentado con olor maloliente de color amarillento-verdoso, espeso y mucoide	Aumentado con olor a pescado, blanuzco o gris, delgado y homogéneo

Características	VA	VB
Dispareunia	Si	No
Asociado a otros cuadros clínicos	VB, VVC, otras ITS	VA, VB, VVC, otras ITS
Diagnóstico	Examen en fresco con contraste de fases (x400), clasificación en 4 grados (I, IIa, IIb, III)	Criterios de Amsel, Nugent y Hay-Ison
Tratamiento	Recomendaciones no claras. Se indica el uso de corticoides, antisépticos, antiinflamatorios y/o antibióticos.	Establecido. Se indica metronidazol o clindamicina oral.

Abreviaturas: VA, vaginosis aerobia; VB, vaginosis bacteriana; VVC, vulvovaginitis candidiásica, ITS, infecciones de transmisión sexual.

1.8.2. Vaginosis citolítica

La vaginosis citolítica es una condición ginecológica poco conocida que a menudo se confunde con infecciones vaginales comunes como la candidiasis o la VB debido a la similitud de los síntomas, aunque su origen y tratamiento son completamente diferentes. Esta afección se caracteriza por un desequilibrio en la microbiota vaginal, causado específicamente por una proliferación excesiva de *Lactobacillus*, provocando una acidificación excesiva del pH vaginal (menor de 4.5). Este ambiente extremadamente ácido causa la citólisis, un proceso de destrucción de las células epiteliales vaginales, que libera glucógeno, alimentando aún más a los *Lactobacillus* y perpetuando el desequilibrio [100,101].

Los principales síntomas de esta condición incluyen flujo vaginal blanco o amarillento de consistencia espesa similar al de la candidiasis, prurito o ardor vaginal, y sensación de irritación o quemazón, especialmente después de las relaciones sexuales o la micción. Una característica distintiva es la ausencia de mal olor en el flujo, lo que la diferencia de la VB. En algunos casos, las pacientes también pueden experimentar dispareunia o dolor durante las relaciones sexuales [101].

El diagnóstico de la vaginosis citolítica se basa en criterios clínicos y de laboratorio. El examen microscópico del flujo vaginal revela una abundancia de *Lactobacillus*, la presencia de células epiteliales destruidas o citolizadas, y una disminución o ausencia de leucocitos, lo que permite descartar infecciones inflamatorias como la candidiasis o la tricomoniasis. El pH vaginal es típicamente más ácido de lo normal, menor a 4.5, lo que respalda el diagnóstico [100,102].

El tratamiento de la vaginosis citolítica se enfoca en restaurar el equilibrio de la microbiota vaginal y aliviar los síntomas asociados con la acidez excesiva. Las principales medidas incluyen el uso de bicarbonato de sodio para neutralizar el pH ácido y equilibrar el ambiente vaginal. Es importante evitar los tratamientos antifúngicos, ya que el uso de antimicóticos, frecuentemente

recetados para la candidiasis, puede agravar la condición al alterar aún más el equilibrio de la microbiota vaginal [102].

1.8.3. Vulvovaginitis no infecciosas

La vulvovaginitis no infecciosa engloba diversas afecciones que, aunque menos conocidas, son comunes y pueden ser causadas por factores no relacionados con infecciones.

Una de las causas más frecuentes es la **vaginitis atrófica**, que se presenta principalmente en mujeres posmenopáusicas debido a la disminución de los niveles de estrógeno. Esta condición provoca sequedad vaginal, adelgazamiento de las paredes vaginales y dolor durante las relaciones sexuales, lo que afecta significativamente la calidad de vida de las pacientes [6,22].

Otra variante frecuente es la **vaginitis inflamatoria inespecífica**, causada por irritación sin una infección identificable. Factores como el uso de productos químicos en jabones, duchas vaginales o ropa ajustada pueden desencadenar esta afección, cuyos síntomas incluyen ardor, picazón y, en algunos casos, flujo vaginal anormal [103].

También puede presentarse la **vaginitis alérgica**, resultado de una reacción alérgica a sustancias como preservativos de látex, lubricantes o productos perfumados. De manera similar, la **vaginitis irritativa** ocurre debido a la exposición a agentes irritantes, como jabones fuertes o duchas vaginales frecuentes. Ambas condiciones comparten síntomas característicos, como enrojecimiento, picazón y molestias vaginales [5].

El diagnóstico de estas condiciones requiere una anamnesis detallada para identificar posibles desencadenantes. Aunque los síntomas suelen ser similares para las distintas etiologías, los más comunes incluyen escozor, dolor perineal, disuria por contacto y, en raros casos, un aumento de la secreción vaginal. A menudo, las pacientes presentan una mayor afectación de la región vulvar que de la vaginal [6,22].

El tratamiento se basa en evitar los agentes irritantes responsables y adoptar medidas para aliviar los síntomas. En casos de inflamación significativa, se puede recurrir al uso de corticoides tópicos para reducir el malestar y facilitar la recuperación de los tejidos afectados [104].

1.8.4. Vaginitis por otros microorganismos

Existen casos de vaginitis infecciosa causados por microorganismos poco comunes. Aunque estas infecciones son raras, es fundamental considerarlas, especialmente en pacientes con síntomas persistentes que no responden al tratamiento convencional o en aquellos con factores de riesgo específicos.

Entre los más comunes se encuentran el *Mycoplasma genitalium*, un patógeno que puede afectar tanto la vagina como el tracto urinario; y, el virus herpes simple, que puede provocar lesiones dolorosas y ulceraciones vaginales que resultan en inflamación significativa. Por otro lado, infecciones bacterianas raras, como la actinomicosis, han sido asociadas con el uso prolongado de DIU, generando un cuadro inflamatorio crónico [105].

En algunos casos, la vaginitis puede ser causada por parásitos diferentes a *T. vaginalis*, como *Enterobius vermicularis* (lombriz intestinal), más frecuente en niñas, que puede migrar hacia la zona vaginal y causar irritación significativa [106].

1.8.5. Enfermedades sistémicas

Las enfermedades sistémicas también pueden contribuir al desarrollo de vaginitis. Por ejemplo, el síndrome de Sjögren, una enfermedad autoinmune que afecta las glándulas mucosas, puede provocar sequedad vaginal severa, mientras que la diabetes mellitus incrementa el riesgo de infecciones recurrentes, especialmente por hongos, y genera alteraciones en la microbiota vaginal que predisponen a otras infecciones [34].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La vaginitis afecta a un alto porcentaje de la población femenina, constituyéndose como una de las causas más frecuentes de consulta en Atención Primaria, Especializada y en los servicios de Urgencias hospitalarias, lo que la posiciona como un importante problema de salud pública a nivel mundial.

Las principales causas de vaginitis requieren una evaluación clínica preliminar de la paciente, complementada con diversas técnicas de laboratorio para alcanzar un diagnóstico preciso.

Ante la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial de los patógenos responsables de estas infecciones, las frecuentes recidivas, y las complicaciones ginecológicas y obstétricas asociadas, los métodos moleculares como la PCR están cobrando un mayor interés. Estas técnicas permiten la detección simultánea de múltiples microorganismos y su cuantificación, además de ofrecer una alta sensibilidad y especificidad. Estas ventajas representan un avance significativo en el diagnóstico microbiológico, así como en el tratamiento y control de estas infecciones.

Vircell S.L. (Granada, España) es una empresa biotecnológica especializada en el desarrollo y producción de reactivos y pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas humanas. Sus métodos abarcan desde el cultivo celular tradicional hasta las tecnologías más innovadoras en biología molecular. Una de sus líneas de trabajo incluye el desarrollo de tests de diagnóstico basados en PCR en tiempo real (qPCR).

En este contexto, se planteó el diseño, desarrollo y validación de un test molecular basado en la técnica de qPCR como alternativa a los métodos tradicionales. Este test pretende la detección simultánea de los principales agentes causantes de VB, VVC y tricomoniasis, con el propósito de ofrecer un diagnóstico rápido, preciso y eficaz para estas infecciones.

Para llevar a cabo este trabajo se plantearon los siguientes objetivos y subobjetivos específicos:

Punto 1. Revisión bibliográfica, estudio microbiológico y fisiológico de la microbiota vaginal.

- Realizar una búsqueda bibliográfica relacionada con el proyecto de investigación.
- Estudiar y comprender los microorganismos implicados en la vaginitis.

Punto 2. Planteamiento y diseño del test.

- Identificar los principales genes o dianas a detectar en base a su relevancia clínica.

- Analizar bioinformáticamente las secuencias genéticas, realizando alineamientos múltiples para definir las regiones más conservadas y que ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica.
- Diseño del test de PCR: diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis tipo TaqMan para cada diana.

Punto 3. Optimización y validación del test.

- Desarrollar y optimizar las condiciones de PCR: determinar el *master mix*, las concentraciones óptimas de reacción y de amplificación.
- Definir y validar el método de extracción óptimo para el tipo de muestra a estudio.
- Establecer un algoritmo para la detección de VB.

Punto 4. Rendimiento analítico y clínico del test.

- Generar evidencia experimental y documental de que el método desarrollado cumple con las normativas del sistema de calidad para su comercialización y uso clínico.
- Evaluar y demostrar la sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica, repetibilidad y reproducibilidad, inclusividad, especificidad y estabilidad del producto.
- Analizar el rendimiento clínico del test en un entorno hospitalario.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección de dianas genéticas y estudio del genoma

Se procede a la búsqueda, en base a bibliografía y alineamientos de genomas, de las dianas genéticas a utilizar para el diagnóstico molecular de los microorganismos implicados en la vaginitis. Para ello, se consultan guías como las publicadas por Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) y OMS.

Se utilizaron bases de datos y herramientas de libre acceso del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) y del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, *European Bioinformatics Institute*) [107]. Para la búsqueda de referencias se usó PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) que comprende más de 30 millones de citas de literatura biomédica procedentes principalmente de la base de datos MEDLINE. La búsqueda de secuencias FASTA se realizó utilizando la herramienta BLASTn (NCBI), (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [108]. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando los programas ClustalW (EMBL-EBI) [109] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y Jalview (<https://www.jalview.org/>).

3.2. Secuencias de referencia

Se seleccionaron diversas secuencias depositadas en la base de datos NCBI, provenientes de diferentes regiones y periodos de depósito, con el objetivo de realizar un análisis global y representativo. En la Tabla 9 se muestran las secuencias de referencia utilizadas para cada microorganismo depositadas en la base de datos Genoma del NCBI.

Tabla 9. Cepa, número de referencia y secuencia de referencia de cada uno de los microorganismos a estudio.

Microorganismo	Cepa	Nº referencia	Referencia secuencia (RefSeq)
<i>L. gasseri</i>	2016	ASM43991v2	GCF_000439915.2
<i>L. crispatus</i>	DC21.1	ASM976920v1	GCF_009769205.1
<i>L. iners</i>	LI335	ASM955645v1	GCF_009556455.1
<i>L. jensenii</i>	SNUV360	ASM193623v1	GCF_001936235.1
<i>G. vaginalis</i>	UMB0386	ASM286196v1	GCF_002861965.1
<i>A. vaginae</i>	NCTC13935	58174_B01	GCF_900445305.1
<i>T. vaginalis</i>	G3	NYU_TvagG3_2	GCF_026262505.1
<i>C. albicans</i>	SC5314	ASM18296v3	GCF_000182965.3
<i>C. glabrata</i>	CBS 138	ASM254v2	GCF_000002545.3
<i>C. krusei</i>	CBS573	ASM305444v1	GCF_003054445.1

Microorganismo	Cepa	Nº referencia	Referencia secuencia (RefSeq)
<i>C. parapsilosis</i>	CDC317	ASM18276v2	GCF_000182765.1
<i>C. tropicalis</i>	MYA-3404	ASM633v3	GCF_000006335.3
<i>C. dubliniensis</i>	CD36	ASM2694v1	GCF_000026945.1

3.3. Diseño de oligonucleótidos y sondas

Un oligonucleótido es una cadena corta de ácidos nucleicos sintética, diseñada para unirse de forma complementaria a una región específica de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Por su diseño, los oligonucleótidos son esenciales en técnicas de biología molecular como la PCR y la qPCR.

Una sonda de hidrólisis TaqMan es un tipo especializado de oligonucleótido diseñado específicamente para la detección de secuencias diana de ADN durante la qPCR. Estas sondas incorporan un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' y un desactivador de fluorescencia (quencher) en el extremo 3'. La fluorescencia se emite únicamente cuando el fluoróforo y el quencher se separan durante la amplificación.

Además, las sondas TaqMan pueden estar marcadas con diferentes fluoróforos, lo que permite su detección en múltiples longitudes de onda dentro del espectro visible (Figura 10).

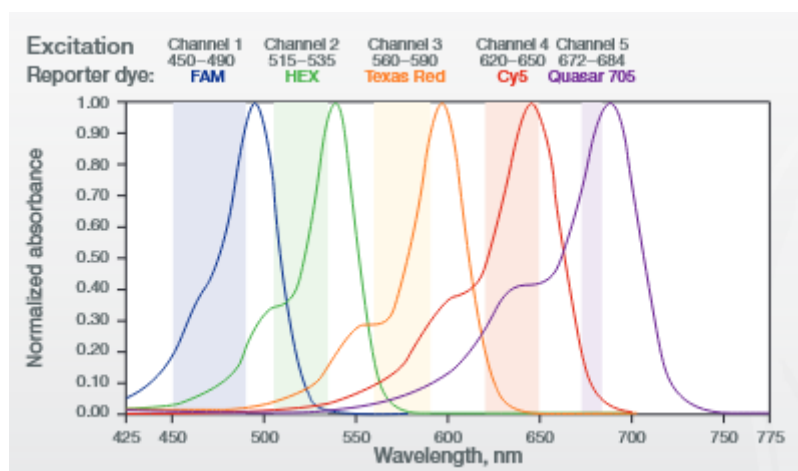


Figura 10. Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente utilizados en qPCR. La figura muestra la longitud de onda de absorción y emisión para cada canal, destacando los fluoróforos más frecuentemente empleados en esta técnica. Imagen adaptada del manual del termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Las sondas TaqMan LNA (LNA, *Locked Nucleic Acid TaqMan*) son una variación de las sondas TaqMan tradicionales, diseñadas para mejorar la especificidad y la sensibilidad en técnicas de qPCR. Estas sondas incorporan nucleótidos modificados con enlaces bloqueados, denominados

LNA, que aumentan la estabilidad del híbrido ADN-ARN y su afinidad por la cadena complementaria.

Para el diseño de oligonucleótidos y sondas se emplearon los programas Clone Manager Profesional Suite (versión 7.10) (Sci-Ed Software) y la aplicación PrimerQuest de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA) (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) [110]. Para asegurar la completa homología y especificidad de todo el diseño se usó la herramienta BLASTn y la herramienta OligoAnalyzer de la web IDT (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Los oligonucleótidos y sondas empleadas en este trabajo han sido adquiridos en las siguientes casas comerciales: IDT, Metabion international AG (Baviera, Alemania) y LGC Standards (Middlesex, Reino unido).

3.3.1. Oligonucleótidos para la detección de las especies de *Lactobacillus*

Se realizó una revisión bibliográfica para identificar las especies de *Lactobacillus* más frecuentes en la microbiota vaginal mediante la técnica de qPCR. Con base en esta revisión, se diseñaron y solicitaron oligonucleótidos específicos en el gen 16S para la identificación de dichas especies (Tabla 10). Se diseñaron una pareja de oligonucleótidos genérica y una pareja para cada una de las siguientes especies: *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gaserri* y *L. iners*.

Tabla 10. Oligonucleótidos para la identificación de las especies más frecuentes de *Lactobacillus*.

Oligonucleótido	Secuencia
Lactobspp_16s_F	5'-ATGGAAGAACACCACTGGCG-3'
Lactobspp_16s_R	5'-CAGCACTGAGAGGCGGAAAC-3'
Lac.cris-16s-F	5'-TCTTGACATCATGTGCCATTTGT-3'
Lac.cris-16s-R	5'-TGCACCACCTGTCTTAGC-3'
Ljens_16s_F	5'-AAGTCGAGCGAGCTTGCTATAGA-3'
Ljens_16s_R	5'-CTTCTTTTCATGCGAAAGTAGC-3'
Liners_16s_F	5'-GTCTGCCTGAAGATCGG-3'
Liners_16s_R	5'-ACAGTTGATAGGCATCATC-3'
Lgass_16s_F	5'-AGCGAGCTTGCTAGATGAATTTG-3'
Lgass_16s_R	5'-TCTTTTAACTCTAGACATGCGTC-3'

3.3.2. Oligonucleótidos y sondas del test

Se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos y sondas TaqMan con el objetivo de seleccionar la que combinación que proporcionara la mejor sensibilidad y especificidad para cada diana. Para el diseño se tuvieron en cuenta las siguientes especificaciones: análisis de

secuencias disponibles de diferentes orígenes, representando los 5 continentes y momentos diferentes de depósito; oligonucleótidos de tamaño entre 18 y 24 pares de bases (pb); tamaño del producto de PCR entre 100 y 500 pb; temperatura de melting para los oligonucleótidos entre 55 y 65°C; y, temperatura de las sondas igual o superior a la de los oligonucleótidos.

Mediante análisis *in silico* y validación experimental por qPCR, se determinaron los oligonucleótidos y sondas óptimos para la ampliación de cada diana. Las sondas TaqMan están marcadas con fluoróforos distintos, lo que permite su identificación individual (Tabla 11). Los mismos criterios se aplicaron para el diseño de la diana correspondiente al control interno.

Para todas las dianas se diseñaron sondas TaqMan, excepto para la diana de *T. vaginalis*, para la cual se utilizó una sonda TaqMan LNA, diseñada específicamente para mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de esta secuencia. En un principio, todas las sondas se pidieron marcadas con el fluoróforo FAM, y una vez validada la funcionalidad de las mismas, se pidieron marcadas con otro fluoróforo para su distinción por qPCR.

Tabla 11. Oligonucleótidos y sondas finales del test. Se detalla la información relevante de los oligonucleótidos y sondas utilizadas en el test, incluyendo el nombre, el marcado de cada sonda, la longitud en pares de bases de cada oligonucleótido/sonda, la temperatura de melting, y el tamaño del fragmento amplificado.

Diana	Nombre	Marcado ¹	Longitud (pb)	Tm (°C) ²	Tamaño fragmento (pb)
<i>G. vaginalis</i>	GVA16S_F	-	18	60	103
	GVA16s-R	-	18	61	
	GVA16s-Pb	FAM-BHQ1	28	68,1	
<i>A. vaginae</i>	Avag_16s_F2	-	20	61,7	121
	Avag_16s_R2	-	22	61,9	
	Avag_16s_Pb2	C610-BHQ2	25	68,3	
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lactspp_rplK_F2	-	20	57-61	185
	Lactspp_rplK_R2	-	23	61-63	
	Lactspp_rplK_pb	HEX-BHQ1	23	62	
<i>T. vaginalis</i>	TVA-G3HP.F2	-	22	60,9	71
	TVA-G3HP.R2	-	20	60,2	
	TVA-G3HP-Pb1	Cy5-BHQ1	24	68,1	
<i>C. albicans</i>/ <i>C. dubliniensis</i>	C.alb-dub_ITS_F	-	21	61,6-62,1	173-178
	ITS_4R	-	20	59,6	
	C.albicans_ITS_Pb4	C610-BHQ2	23	65,8	
	C.dub_ITS_Pb3	HEX-BHQ1	22	66,2	
<i>C. glabrata</i>	Cgla_ITS_F2	-	23	62,1	188
	ITS_4R	-	20	59,6	
	Cgla_ITS_pb	FAM-BHQ1	24	68	

Diana	Nombre	Marcado ¹	Longitud (pb)	Tm (°C) ²	Tamaño fragmento (pb)
<i>C. krusei</i>	Ckru_ITS_F3	-	19	62,5	114
	ITS_4R	-	20	59,6	
	C.krusei_ITS_Pb2	Cy5-BHQ1	24	68,2	
<i>C. parapsilosis</i>	C.para_ITS_F	-	23	60,7	130
	ITS_4R	-	20	59,6	
	C.para_ITS_Pb	HEX-BHQ1	24	64,2	
<i>C. tropicalis</i>	C.trop_ITS_F2	-	23	60,2	125
	ITS_4R	-	20	59,6	
	C.trop_ITS_Pb2	HEX-BHQ1	20	64,4	
ARNsa P humana	H-RNAseP-50-F	-	19	64,4	65
	H-RNAseP-114-R	-	20	66,2	
	HURNASE-Pb	Q705-BHQ2	23	70	

¹El fluoróforo C610 es funcionalmente equivalente a Texas red, puesto que ambos presentan características similares en términos de longitud de onda de emisión y absorción, lo que los hace intercambiables.

²Se define un rango de Tm cuando la secuencia presenta bases degeneradas.
Abreviaturas: pb, pares de bases; Tm, temperatura melting.

3.3.3. Oligonucleótidos y sondas para la detección de *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* tipo 1 y BVAB-2

Además de los mencionados previamente, se diseñaron y adquirieron varias parejas de oligonucleótidos y sondas específicas para la detección de *Mobiluncus* spp. (*M. curtisii* y *M. mulieris*), *Megasphaera* tipo 1 y BVAB-2 (Tabla 12). Estos microorganismos fueron seleccionados debido a su descripción en la literatura científica como asociados a la VB, con el objetivo de evaluar su inclusión en el test. Para probar la funcionalidad de estos oligonucleótidos y sondas, se analizaron muestras clínicas positivas para VB, ya que no se disponía de cepas de referencia.

Tabla 12. Secuencias solicitadas de oligonucleótidos y sondas para la detección de *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* tipo 1 y BVAB-2.

Microorganismo	Oligonucleótido/Sonda	Secuencia
<i>Mobiluncus</i> spp.	Mob_spp_16s_F2	5'-CAGTACAGAGGGTTGCGATAC-3'
	Mob_spp_16s_R2	5'-CGATTACTAGCGACTCCAATT-3'
	Mob_spp_16s_Pb2	5'-FAM-AAAGCTGGTCTCGGTTCCGATTGG- BHQ1-3'
<i>Megasphaera</i> sp tipo 1	Mega1_16s_F	5'-GATGCCAACAGTATCCGTCCG-3'
	Mega1_16s_R ¹	5'-CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA-3'
	Mega1_16s_pb	5'-FAM-ACAGACTTACCGAACC GCCT-BHQ1-3'
	Mega1_16s_F2	5'-GACGGATGCCAACAGTATCCGTCCG-3'
	Mega1_16s_R2	5'-AAGTTCGACAGTTTCCGTCCCTC-3'
	Mega1_16s_pb2 ¹	5'-FAM-CCGTGGCTTTCTCTTACGGTAC- BHQ1-3'
BVAB-2 ¹	BVAB-2_16s_F1	5'-TTAACCTTGGGGTTCATTACAA-3'
	BVAB-2_16s_R1	5'-GAATACTTATTGTGTTAACTGCGC-3'
	BVAB-2_16s_pb1	5'-FAM-TCTCCAGCACTCAAGCTAAACAG- BHQ1-3'

¹Las secuencias utilizadas para BVAB-2 fueron tomadas de Fredricks et al. (2009) [111].

3.4. Cepas bacterianas, controles y plásmidos

Para verificar el diseño y optimizar las condiciones de la qPCR se han utilizado cultivos crecidos *in vitro*, controles de ADN la línea AmpliRun® DNA/RNA Controls (Vircell S.L., Granada, España) y plásmidos sintéticos.

Las cepas crecidas *in vitro* y sus características se muestran en la Tabla 13. Estas cepas fueron adquiridas de la colección “German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH” (DSMZ, Leibniz Institute, Alemania). Todos los cultivos se crecieron en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) de la empresa Vircell S.L. Posteriormente, las cepas se inactivaron mediante tratamiento térmico a 96°C durante 30 minutos, garantizando condiciones seguras para su manipulación.

Tabla 13. Descripción de las cepas y condiciones de cultivo utilizados en este trabajo. Se detallan las características de las cepas empleadas, incluyendo las condiciones específicas de cultivo. Todos los microorganismos están clasificados como de nivel de riesgo II, siguiendo las normativas de bioseguridad correspondientes.

Microorganismo	Nº DSM ¹	Medio de cultivo	Temperatura incubación	Tiempo	Atmósfera de incubación	Efecto citopático
<i>A. vaginae</i>	15829	Agar Triptica/Soja o Agar chocolate	37°C	2-3 días	Anaeróbica	Colonia translúcida, plana y diminuta
<i>G. vaginalis</i>	4944	Agar garnerella	37°C	2 días o cuando el crecimiento sea adecuado	Anaeróbica	Colonias diminutas b-hemolíticas en sangre humana
<i>L. crispatus</i>	20584	Agar lactobacillus MRS	37°C	2-3 días	Anaeróbica	Colonia blanca-beige, cóncava y con brillo
<i>L. jensenii</i>	20557	Agar lactobacillus MRS	37°C	2-3 días	Anaeróbica	Colonia blanca-beige, cóncava y con brillo
<i>T. vaginalis</i> ²	-	Medio LYI	37°C	3 días o cuando el crecimiento este entorno al 100%	Anaeróbica	Se observa el trofozoito
<i>C. albicans</i>	3153 ³	Sabouraud agar	37°C	2 días o cuando el crecimiento de colonias sea adecuado	Aeróbica	Colonia blanca
<i>C. glabrata</i>	11226	Sabouraud agar	30°C, 37°C	2 días o cuando efecto citopático este entorno al 100%	Aeróbica	Colonia lisa no adherente de color blanco o cremosa brillante
<i>C. krusei</i>	6128	Sabouraud agar	30°C, 37°C	2 días o cuando efecto citopático este entorno al 100%	Aeróbica	Colonia lisa no adherente de color blanco

Microorganismo	Nº DSM ¹	Medio de cultivo	Temperatura incubación	Tiempo	Atmósfera de incubación	Efecto citopático
<i>C. dubliniensis</i>	13268	Sabouraud agar	30°C, 37°C	2 días o cuando efecto citopático este entorno al 100%	Aeróbica	Colonia lisa no adherente de color blanco
<i>C. parapsilosis</i>	5784	Sabouraud agar	30°C, 37°C	2 días o cuando efecto citopático este entorno al 100%	Aeróbica	Colonia lisa no adherente de color blanco o cremosa
<i>C. tropicalis</i>	11953	Sabouraud agar	30°C, 37°C	2 días o cuando efecto citopático este entorno al 100%	Aeróbica	Colonia lisa no adherente de color blanco con borde micelar

¹ El número DSM es un número de identificación asignado por la DSMZ único para cada cepa y sirve para identificar de manera precisa microorganismos almacenados en esta colección.

² Cepa clínica procedente del Instituto Valenciano de Microbiología (Valencia, España).

³ Número NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*).

Los controles AmpliRun® contienen el ADN genómico completo, cuantificado (entre 10.000 y 20.000 copias/μl) y purificado del microorganismo especificado. Estos controles han sido diseñados para ser utilizados como controles positivos en técnicas de PCR convencionales o a tiempo real. Los controles disponibles utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Controles de ADN AmpliRun® utilizados en este trabajo.

Organismo	Nombre	Referencia	Cepa	Origen
<i>G. vaginalis</i>	AMPLIRUN® GARDNERELLA DNA CONTROL	MBC108-R	cepa 594 (cepa tipo)	ATCC 14018
<i>T. vaginalis</i>	AMPLIRUN® TRICHOMONAS DNA CONTROL	MBC079	Aislado clínico	N/A
<i>C. albicans</i>	AMPLIRUN® CANDIDA DNA CONTROL	MBC010-R	cepa 207 serotipo A	ATCC 36801

Además, se adquirieron fragmentos de ADN sintéticos (gBlocks™) para cada una de las dianas de la casa comercial IDT y un plásmido sintético para la diana ARNsA P humana de la casa comercial Eurogentec (Bélgica, Europa), Tabla 15. Estos consisten en fragmentos de ADN de doble cadena de hasta 3000 pb de longitud, diseñados para aplicaciones como investigación de anticuerpos y la edición del genoma mediada por CRISPR, controles de qPCR, entre otros.

Tabla 15. Fragmentos de ADN (gBlocks™) y plásmidos sintéticos utilizados en este trabajo.

Nombre gblock/plásmido	Proveedor
gblockGVA-gC	IDT
gblockAVA-gC	IDT
gblockLACT-gC	IDT
gblockTV2-G3HP2	IDT
gblockCGLA-gC	IDT
gblockCALB-gC	IDT
gblockCKRU-gC	IDT
gblockCPARA-gC	IDT
RNAseP_pUC57	Eurogentec

3.5. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de los ácidos nucleicos tanto de los cultivos como las muestras utilizadas en este proyecto, se utilizaron diferentes test comerciales en conjunto con sus respectivos equipos especializados (Figura 11). El proceso de extracción, independientemente del método, se basa en tres fases fundamentales: unión, lavado y elución.

1. **Unión:** Durante esta fase, los ácidos nucleicos presentes en la muestra se adhieren a una matriz de sílice, membrana o partículas magnéticas, facilitando su separación del resto de componentes celulares.
2. **Lavado:** Posteriormente, se realizan lavados sucesivos para eliminar impurezas y contaminantes, como proteínas, lípidos y otros residuos que podrían interferir en análisis posteriores.
3. **Elución:** Finalmente, los ácidos nucleicos purificados se recuperan mediante elución en un tampón adecuado, obteniendo así un ADN/ARN de alta pureza, listo para su uso en aplicaciones posteriores.

Una vez obtenido el ADN purificado, los eluidos se conservaron a 2-8°C para un almacenamiento temporal durante las primeras 48 horas. Para una conservación a largo plazo, las muestras se almacenaron a -20°C, garantizando su estabilidad y evitando la degradación del material genético.

3.5.1. QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen)

Al inicio de este trabajo, se utilizó el kit QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Alemania, referencia 56304) para la extracción de ADN a partir de cultivos (Figura 11-A). Este kit permite la purificación de ácidos nucleicos mediante membranas de sílice, a partir de diversos tipos de muestras, como tejidos, hisopos, líquido cefalorraquídeo, sangre, fluidos corporales y células. Una ventaja clave es que no se requiere homogeneización mecánica, ya que los tejidos se lisan enzimáticamente, simplificando el proceso. El protocolo de extracción manual tiene una duración aproximada de 30 a 40 minutos, resultando en un volumen de eluido de 100 µl.

3.5.2. GXT NA Extraction Kit (Hain Lifescience)

Uno de los métodos de extracción más utilizados durante el diseño y optimización del test fue el kit de extracción GXT NA Extraction Kit (Hain Lifescience GmbH, Alemania, referencia 12.08.02) en el equipo GenoXtract® (Hain Lifescience GmbH, Alemania) (Figura 11-B). Este equipo permite la extracción automática de 12 muestras simultáneamente. El protocolo de extracción se demora unos 45 minutos y requiere de 250 o 500µl de muestra. Se obtiene un volumen de eluido de 100µl. Este kit permite la extracción de ácidos nucleicos de varios tipos de muestra y se basa en la tecnología de "partículas magnéticas", la cual asegura una preparación de muestras de alta calidad y precisión. Esta tecnología facilita la separación eficiente de los ácidos nucleicos gracias a la afinidad de las partículas magnéticas por el material genético, lo que resulta en una mayor pureza y rendimiento de los eluidos obtenidos.

3.5.3. PCR BIO Rapid Extract Lysis Kit (PCR BIO)

El kit de extracción PCR BIO Rapid Extract Lysis Kit (PCR Biosystems Inc., Reino Unido, referencia PB15.11) se utilizó como un método manual alternativo que permite una extracción rápida y sin columna, obteniendo un ADN listo para PCR (Figura 11-C). Este kit contiene un sistema de tampones de lisis y proteasa diseñado para la extracción eficiente de ADN. La extracción se lleva a cabo en un único tubo, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación y pérdida de muestra.

Para la extracción, se utilizó un volumen de muestra de 70 µl de exudado vaginal, mezclada con 20 µl de 5x PCR BIO Rapid Extract Buffer A (tampón de lisis) y 10 µl de 10x PCR BIO Rapid Extract Buffer B (tampón con proteasa). El protocolo de extracción tiene una duración de aproximadamente 20 minutos, obteniéndose un volumen final de elución de 1 ml (Tabla 16).

Tabla 16. Etapas y proceso para la extracción de ADN con el kit PCR BIO Rapid Extract Lysis Kit.

Etapas	Proceso
1	Mezcla de la muestra con los tampones de extracción 70 µl muestra 20 µl 5x PCR BIO Rapid Extract Buffer A 10 µl 10x PCR BIO Rapid Extract Buffer B
2	Incubación 5 minutos a 75°C, vorteadando la muestra al menos 2 veces durante la incubación
3	Incubar durante 10 minutos a 95°C para inactivar la proteinasa
4	Añadir 900µl de agua desionizada grado molecular. Para muestras mucosas, se recomienda centrifugar durante 2 minutos a 12.000 rpm al final del proceso. Descartar el pellet y utilizar el sobrenadante para la PCR.

3.5.4. Optipure viral Nucleic Acid Extraction Kit (TANBead)

El kit OptiPure Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Taiwan Advanced Nanotech Inc., TANBead, Taiwán), con referencias M665A46 y M665S46, se utilizó en el equipo Maelstrom™ 4800 (Taiwan Advanced Nanotech Inc., TANBead, Taiwán) (Figura 11-D) para la evaluación funcional del test interna y externa. Este kit de extracción, basado en nano-partículas magnéticas, permite aislar y purificar automáticamente ácidos nucleicos de diversas muestras, como hisopos, fluidos corporales, suero, plasma, esputo, entre otras. No se requiere procesamiento previo, ya que las muestras pueden añadirse directamente al tampón de lisis. El equipo Maelstrom™ 4800 automatiza las fases de lisis, lavado y elución, optimizando la extracción.

El protocolo tiene una duración aproximada de 40 minutos y requiere 300 µl de muestra, obteniéndose un volumen final de 80 µl de eluido listo para su uso en análisis posteriores.

En este trabajo se evaluaron dos protocolos de extracción. En primer lugar, se optimizó el procedimiento utilizando el protocolo de extracción recomendado en las instrucciones de uso del producto. Posteriormente, se diseñó y validó un método de extracción simplificado, orientado a mejorar la eficiencia del proceso. Este nuevo protocolo, con una duración aproximada de 20 minutos, mantiene los mismos pasos del protocolo original, pero reduce los tiempos de incubación en cada etapa y aumenta la velocidad de agitación para agilizar el proceso sin comprometer la calidad de los resultados.

3.5.5. MagXtract® 3200 system

El procesador automático MagXtract® 3200 (Chroma ATE Inc., Taiwán) es un sistema completamente automatizado que integra todo el flujo de trabajo desde el procesamiento de la muestra hasta la preparación de mezcla de qPCR (Figura 11-E).

El MagXtract® 3200 tiene la capacidad de procesar hasta 32 muestras en aproximadamente 60 minutos y utiliza los kits de extracción de TANBead. Además, permite la trazabilidad de todo el proceso minimizando los errores humanos.

Una vez puesto a punto el equipo, se validó para la automatización del proceso con muestras de exudado vaginal y el test diseñado.



Figura 11. Kits de extracción y procesadores. A, QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen); B, GXT NA Extraction Kit y equipo GenoXtract® (Hain Lifescience GmbH); C, PCR BIO Rapid Extract Lysis Kit (PCR Biosystems Inc.); D, OptiPure Viral Nucleic Acid Extraction Kit y equipo Maelstrom™ 4800 (TANBead); E, equipo MagXtract® 3200 (Chroma ATE Inc.).

3.6. Técnicas de biología molecular

3.6.1. PCR

La PCR es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) de un segmento específico de ADN. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, los oligonucleótidos, para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará, y luego múltiples repeticiones de síntesis de ADN para amplificar ese segmento. El ADN se desnaturaliza mediante calor permitiendo la unión de los oligonucleótidos a la secuencia complementaria. La reacción requiere de una enzima termoestable (Taq ADN polimerasa) para que tenga lugar la extensión y síntesis del ADN (Figura 12).

Este proceso se realiza en un equipo llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Los reactivos necesarios para realizar la PCR son dNTPs, oligonucleótidos, iones divalentes, iones monovalentes, solución tampón, Taq ADN polimerasa y el ADN molde.

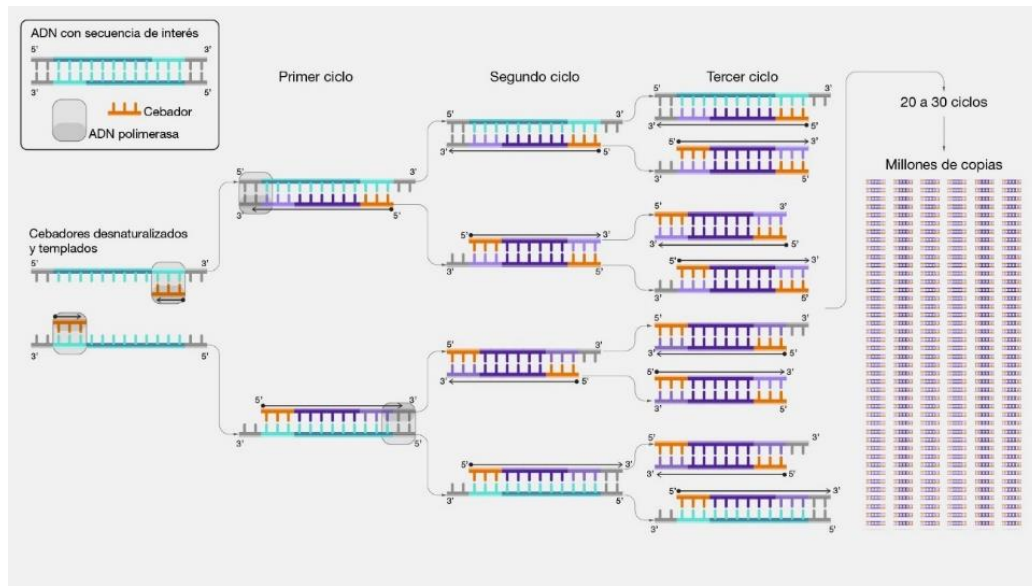


Figura 12. Proceso de la técnica de PCR. Tomada de la web del Instituto nacional de investigación del genoma humano <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reacci%C3%B3n-en-cadena-de-la-polimerasa-PCR>

3.6.1.1. PCR a tiempo real

Una versión avanzada es la qPCR. Además, de los oligonucleótidos y reactivos necesarios para la amplificación, incluye el uso de sondas fluorescentes o sondas TaqMan. Estas sondas hibridan en una zona entre ambos oligonucleótidos y presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET) que permite monitorizar el proceso de amplificación del fragmento seleccionado a través de la medición de la fluorescencia emitida. Esta técnica se puede utilizar para detección cualitativa (ausencia o presencia de amplificación) o cuantitativa (medir cantidad de un producto amplificado).

3.6.1.2. qPCR de colonias

Para la optimización de la detección de *Candida* fue necesario realizar una qPCR a partir de colonias obtenidas por cultivo. Para ello, una vez desarrollado el cultivo, se seleccionaron una o varias colonias de la placa y se inocularon en un tubo eppendorf estéril con 40 µl de agua estéril. Esta suspensión se utilizó directamente para la qPCR.

Para identificar si la colonia inoculada corresponde a una especie de *Candida*, se realizaron PCR individuales con oligonucleótidos diseñados específicamente para la detección de *C. albicans* y las especies *Candida* no *albicans* (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*). Las qPCR se llevaron a cabo utilizando el *master mix* FastGene 2x IC Green qPCR Universal Mix (NIPPON Genetics EUROPE, Alemania), que contiene un agente intercalante para la detección

de ADN. El volumen final de reacción fue de 15 µl, compuesto por 11.4 µl de *master mix*, oligonucleótidos a 0.3 µM y 3.6 µl de muestra.

Tabla 17. Programa de amplificación utilizado para la qPCR de colonias.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 minutos
Amplificación	40	95°C	5 segundos
		60°C	20 segundos (lectura fluorescencia)
Curva de melting	1	55-95°C	Incremento progresivo (0.5 °C/segundo) (lectura fluorescencia)

3.6.1.3. Termocicladores

Todo los ensayos durante el diseño y optimización del test fueron realizados en los termocicladores CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, Estados Unidos) y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, Estados Unidos). Además, una vez finalizado el test, se validó en el termociclador Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR system (Azure biosystems Inc., California, Estados Unidos) (Figura 13). Los termocicladores CFX96™ Real-Time PCR Detection System y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR contienen 5 canales de detección FAM, HEX/VIC, Texas Red/Rox, Cy5 y Quasar 705; el termociclador Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR system incluye un canal adicional, TAMRA.



Figura 13. Termocicladores utilizados para la realización de ensayos de qPCR. De izquierda a derecha: CFX96™ Real-Time PCR Detection System, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR y Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR system.

3.6.2. Cuantificación de los cultivos

Una vez inactivados los cultivos, se procedió a realizar una cuantificación estimada en copias/µl para el ajuste de la sensibilidad del test. Para ello, se utilizaron dos métodos. La concentración de ambas especies de *Lactobacillus* y *F. vaginae* se determinó mediante la amplificación y detección de la unidad mínima amplificable (UMA), es decir, la cantidad mínima

de producto que puede generar un resultado positivo en un 60% de los resultados. Por otro lado, la cuantificación de las distintas especies de *Candida*, *T. vaginalis* y *G. vaginalis* se realizó mediante la generación de una curva estándar utilizando los controles Amplirun® DNA/RNA Controls definidos en la Tabla 14.

En ambos casos se realizaron tres extracciones del cultivo con el kit GXT NA Extraction Kit obteniendo un volumen final de 300µl de eluido purificado. La cuantificación se realizó por qPCR con oligonucleótidos específicos para cada microorganismo, un mix de Meridian Bioscience (Londres, Reino Unido) y EvaGreen® Dye. En el caso de *Candida*, se emplearon oligonucleótidos genéricos para la amplificación de todas las especies. El volumen final de reacción fue de 20 µl, compuesto por *master mix* a una concentración de 1x, oligonucleótidos a 0.3 µM, EvaGreen® Dye a 0.5x y 5 µl de muestra. El programa de amplificación utilizado se define en la Tabla 18.

Se analizaron 10 diluciones seriadas del eluido obtenido. Para el método UMA, se evaluaron seis réplicas de cada dilución. En el caso de la curva estándar, se generó una recta de calibración utilizando cuatro diluciones seriadas de cada control, y se analizaron tres réplicas por cada concentración del control y dilución del cultivo.

Tabla 18. Programa de amplificación utilizado para la qPCR de cuantificación de los cultivos.

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	3 minutos
Amplificación	40	95°C	15 segundos
		58°C	45 segundos (lectura fluorescencia)
Curva de melting	1	55-95°C	Incremento progresivo (0.5 °C/segundo) (lectura fluorescencia)

3.6.3. Secuenciación por Sanger

En 1977, Frederick Sanger desarrolló un método de secuenciación de ADN conocido como el método de Sanger [112]. Este método se basa en la polimerización del ADN y en el uso de dideoxinucleótidos, que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3', lo que provoca la terminación de la síntesis de la cadena de ADN en puntos específicos.

Actualmente, la reacción de secuenciación incorpora dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos, permitiendo la detección automatizada de las secuencias mediante electroforesis capilar. El resultado de esta técnica se representa en un cromatograma, donde cada pico corresponde a una base de la secuencia de ADN.

La técnica de secuenciación por el método de Sanger requiere varias etapas, descritas a continuación.

3.6.3.1. Amplificación por qPCR

El objetivo de esta primera etapa es la obtención de suficiente ADN para la reacción de secuenciación. Con el objetivo de secuenciar muestras de *Candida*, se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar toda la región del espaciador transcrito interno (ITSR, *Internal Transcribed Spacer Region*) (Tabla 19). Con estos oligonucleótidos se obtiene un tamaño entre 330 y 360 pb dependiendo de la especie. Para ello, se realizó qPCR de las muestras a estudio con el *master mix* del proveedor NIPPON Genetics EUROPE con las mismas condiciones descritas en el apartado 3.6.1.2.

Tabla 19. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de *Candida*.

Oligonucleótido	Secuencia
Cand_Fseq	5'-CAAYGGATCTCTTGGTTCTC-3'
Cand_Rseq	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

3.6.3.2. Análisis por electroforesis en gel de agarosa

A continuación, para comprobar la calidad y especificidad del fragmento amplificado, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% (SeaKem® LE Agarose, Lonza Bioscience, Suiza, referencia 50004) en tampón TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio (VWR Chemicals, Pensilvania, Estados Unidos, referencia X328-10ml) a una concentración final de 0.5 µg/ml. Para su visualización en el gel, el producto de PCR se mezcló con tampón de carga a proporción 5:1 (v/v) y se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100pb (100 bp DNA Ladder, Bioron, Dinamarca) para poder estimar el tamaño del fragmento de ADN. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 100V. El resultado se visualizó en un transiluminador UV *SERIE TCP-20.M* (Biogen, Madrid).

3.6.3.3. Purificación del fragmento de PCR

Antes de mandar a secuenciar el producto de PCR, es necesario la eliminación de contaminantes y componentes sobrantes de la reacción, como cebadores y nucleótidos libres, para garantizar la precisión en la secuenciación.

Se empleó el kit de purificación de ácidos nucleicos NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Alemania, referencia 740609.50). Una vez purificado se preparó para enviar al servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (Granada, España) siguiendo las indicaciones del servicio.

3.7. Otras técnicas

3.7.1. Cultivo en agar sangre

El cultivo en agar sangre bajo condiciones de anaerobiosis es una técnica utilizada en microbiología para el aislamiento y la identificación de microorganismos, especialmente aquellos que crecen en ambientes con baja o nula concentración de oxígeno, como algunas levaduras y bacterias anaerobias [113].

Se utiliza un medio de agar sangre que contiene extracto de peptona, sangre (generalmente de cordero al 5%), y otros nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos. La muestra, secreción vaginal, se inocula en la superficie del agar sangre de forma estéril utilizando un asa bacteriológica. El cultivo se coloca en una estufa anaeróbica a temperatura de 35-37 °C durante 48-72 horas para permitir el crecimiento de los microorganismos [113].

En condiciones anaerobias, *C. albicans* y otras levaduras pueden desarrollar colonias blancas o beige, que a menudo presentan un aspecto cremoso en la superficie del agar. El hongo se identifica mediante la observación microscópica de levaduras con forma de huevo y la formación de pseudohifas [113,114].

Para los cultivos realizados en este estudio, se empleó el medio BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Becton Dickinson; referencia 254005). Para la siembra, se inocularon 100 µl de la muestra de exudado vaginal sobre la superficie del agar y se distribuyeron mediante siembra por extensión utilizando un asa de Diralsky de cristal bajo condiciones estrictas de esterilidad.

3.7.2. Cultivo en agar Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar

El Agar Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (BioMérieux, ref. 43596) es un medio de cultivo especializado para el aislamiento de hongos, incluidas levaduras como *C. albicans*. Este medio se enriquece con dextrosa y tiene un pH bajo, lo que favorece el crecimiento de hongos y levaduras al inhibir el desarrollo de bacterias. El cloranfenicol se agrega al medio para suprimir el crecimiento bacteriano, permitiendo así un aislamiento selectivo de hongos patógenos. En este medio, las colonias de *C. albicans* suelen presentar un aspecto característico: blancas, cremosas y lisas [113,114].

En este caso, se llevaron a cabo dos tipos de siembra en función del estudio a realizar. Para los ensayos que incluían una primera siembra en agar sangre, las colonias obtenidas de esta siembra inicial fueron inoculadas mediante siembra por estría, utilizando un asa bacteriológica, con el objetivo de obtener colonias aisladas. Por otro lado, en los ensayos donde se analizó directamente la muestra de exudado vaginal, se inocularon 100 µl de la muestra sobre la

superficie del agar y se distribuyeron mediante siembra por estría, también utilizando un asa bacteriológica para obtener colonias aisladas bajo condiciones estrictas de esterilidad.

En ambos procedimientos, las placas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 48 horas para favorecer el crecimiento bacteriano.

3.7.3. Cultivo RPMI

El medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) es un medio de cultivo ampliamente utilizado en microbiología y biología celular, especialmente para el crecimiento y estudio de microorganismos y células eucariotas. En el caso de *C. albicans*, el medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino es ideal para inducir y observar la formación de estructuras especializadas como microgemas y filamentos (hifas o pseudohifas), que son características de su virulencia y capacidad de adaptación [114].

Se utilizó el medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) como base para el procedimiento. Una colonia obtenida de la siembra fue transferida a 10 mL de medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino. La mezcla fue incubada a 37 °C durante un período de 2-3 horas, proporcionando las condiciones necesarias para el desarrollo y estudio de estructuras características de *C. albicans*.

3.7.4. Tinción de Gram

La tinción de Gram es una de las técnicas de tinción más utilizadas en microbiología para clasificar bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas. Fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884, y se utiliza para diferenciar bacterias en función de las propiedades físicas y químicas de sus paredes celulares, Gram-positivas (púrpuras) y Gram-negativas (rosas). Procedimiento:

1. Preparar un frotis bacteriano y fijarlo con calor.
2. Aplicar violeta cristal (colorante primario).
3. Añadir lugol (mordiente).
4. Decolorar con alcohol-acetona.
5. Teñir con safranina (colorante de contraste).
6. Observar bajo el microscopio utilizando el objetivo de inmersión (100x).

El método más utilizado para evaluar la tinción de Gram en muestras vaginales para el diagnóstico de VB es el índice de Nugent, descrito en el apartado 1.4.1 [64].

Además del diagnóstico de VB, la tinción de Gram también permite la identificación de otros patógenos vaginales en el mismo frotis. Las levaduras (como *C. albicans*) se observan como células ovaladas o esféricas que pueden aparecer en forma de gemación o con presencia de pseudohifas. Los diplococos Gram-negativos pueden ser indicativos de *N. gonorrhoeae*, el agente causante de la gonorrea [22,50].

3.7.5. Cultivo en medio Roiron

El cultivo en medio Roiron es una técnica de diagnóstico utilizada para detectar la presencia del parásito *T. vaginalis*. Este método se basa en la observación al microscopio para identificar parásitos móviles, caracterizados por su movimiento distintivo generado por los flagelos [50,115]. El medio Roiron es altamente selectivo, lo que minimiza la contaminación por bacterias y hongos, y favorece el crecimiento de *T. vaginalis*. Composición del medio Roiron:

1. Extracto de carne y péptidos: Proporcionan los nutrientes esenciales necesarios para el desarrollo del parásito.
2. Suero (como suero bovino): Favorece el crecimiento de los protozoarios.
3. Antibióticos (opcional): Ayudan a inhibir el crecimiento bacteriano, permitiendo que *T. vaginalis* prospere en condiciones óptimas.

En este estudio, se utilizó el medio Roiron de la casa comercial Becton Dickinson. El procedimiento consistió en introducir un hisopo directamente en un tubo que contenía 500 µl de medio Roiron. Las muestras se mantuvieron en condiciones anaeróbicas e incubaron a 37 °C durante 48 horas.

3.8. Mastex mix

Para los ensayos de optimización del test qPCR se han utilizado reactivos comerciales de los siguientes proveedores: Quantabio (Beverly, Estados Unidos), Promega (Wisconsin, Estados Unidos), Apto-Gen (Londres, Reino Unido) y Meridian Bioscience.

En la Tabla 20, se muestran los reactivos utilizados de cada proveedor. Todos contienen Taq polímera “hot start”, minimizando la amplificación inespecífica y la formación de dímeros de cebadores durante el proceso de amplificación.

Tabla 20. Master mixes utilizados para los ensayos de optimización del test.

Proveedor	Master mix
Promega	GoTaq® MDx Hot Start Polymerase
New England Biolabs	Lunascript® RT supermix Kit
Apto-Gen	Lyo PCR Master Mix (MM1)
Meridian Bioscience	Lyo-ready One-step RT-qPCR mix (MM2)
	Lyo-ready qPCR Mix (MM3)
	Lyo-ready dUTP 1-Step RT-qPCR virus mix (MM4)

Para los ensayos realizados en la comparación de *master mixes*, se prepararon tres muestras positivas. Además, se utilizó el control positivo del equipo, ya que contiene todas las dianas necesarias para comprobar la amplificación de las mismas. Las muestras se formularon utilizando cultivos cuantificados a una concentración cercana al límite de detección del equipo, entre 5 y 20 cp/μl, con el objetivo de evaluar el rendimiento en condiciones de dilución límite. La composición de las tres muestras utilizadas se detalla en la Tabla 21.

Tabla 21. Composición y concentración de las muestras utilizadas en los estudios de comparación de *master mixes*.

Muestra	Microorganismo	Composición	Concentración
M1	<i>G. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	5 copias/μl
	<i>A. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/μl
	<i>C. dubliniensis</i>	Cultivo cuantificado	5 copias/μl
	<i>C. krusei</i>	Cultivo cuantificado	20 copias/μl
	ARNsa P humana	RNaseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁵ ng/μl
M2	<i>C. glabrata</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/μl
	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/μl
	<i>C. albicans</i>	Cultivo cuantificado	20 copias/μl
	<i>T. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	5 copias/μl
	ARNsa P humana	RNaseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁵ ng/μl
M3	<i>L. crispatus</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/μl
	<i>C. tropicalis</i>	Cultivo cuantificado	5 copias/μl
	ARNsa P humana	RNaseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁵ ng/μl

3.9. Liofilización de la mezcla de qPCR y el control positivo

Con el objetivo de mejorar la conservación del producto y facilitar su uso, se optimizó la mezcla de qPCR y el control positivo en formato liofilizado.

Para definir las condiciones óptimas de liofilización, se probaron varios protocolos y diferentes volúmenes de reacción hasta alcanzar el resultado deseado. Asimismo, se evaluó la concentración adecuada de adyuvantes para obtener una pastilla compacta y homogénea.

Todos los ensayos de liofilización se llevaron a cabo utilizando el equipo LyoLab+ de la empresa Coolvacuum TECHNOLOGIES, SL (Barcelona, España).

La liofilización de la mezcla de qPCR se optimizó para un volumen final de reacción de 25 μ l, conteniendo un 0,2% de un reactivo adyuvante en tubos de PCR de 0.2 ml. El control positivo se ajustó a un volumen final de 100 μ l en tubos de 0.5 ml, en el que se incorporaron dos reactivos adyuvantes en concentraciones de 9% y 1%, respectivamente (Figura 14).



Figura 14. Viales del control positivo liofilizado (izquierda) y la mezcla de qPCR liofilizada (derecha).

3.10. Medios de recogida

A lo largo del desarrollo de este trabajo, se analizaron muestras de exudado vaginal recolectadas en diferentes medios de transporte que garantizan la recogida, transporte y conservación adecuada de las mismas. Se emplearon medios de transporte especialmente formulados para muestras microbiológicas, capaces de mantener la viabilidad de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas. Estos medios aseguran la integridad de las muestras desde su recolección hasta su procesamiento en el laboratorio, minimizando el riesgo de pérdida de viabilidad de los microorganismos presentes.

3.10.1. Medios sólidos

Se utilizó el medio Transystem™ Amies Agar Gel (Copan Diagnostics Inc.) para recogida y conservación de muestras para posterior análisis por tinción de Gram y cultivo.

3.10.2. Medios líquidos

Para el análisis mediante técnicas moleculares, se emplearon los siguientes medios líquidos:

- a. ESwab® liquid amies medium (Copan Diagnostics Inc.): medio ampliamente utilizado que garantiza la viabilidad de una variedad de microorganismos, ideal para aplicaciones moleculares. Es una modificación del medio de transporte Amies tradicional.

- b. Deltaswab Amies (Deltalab): medio clásico de transporte diseñado para la recogida de muestras microbiológicas, manteniendo la viabilidad de bacterias tanto aerobias como anaerobias facultativas. Es una modificación del medio de transporte Amies tradicional.
- c. DeltaSwab ViCUM® (Deltalab): especialmente indicado para la recogida y transporte de muestras que contienen microorganismos específicos como virus, *Chlamydia*, *Ureaplasma* y/o *Mycoplasma*. Este medio incluye una solución tampón que mantiene el pH óptimo para la preservación de virus y microorganismos intracelulares sensibles, asegurando una conservación adecuada para posteriores análisis moleculares.
- d. Aptima® Specimen Collection Medium (Hologic, Massachusetts, Estados Unidos): medio de transporte especializado y optimizado para técnicas moleculares, utilizado frecuentemente en análisis clínicos avanzados. Contiene agentes antimicrobianos para minimizar la contaminación de la muestra por microorganismos no deseados, asegurando la calidad del análisis molecular.
- e. Vircell Transport Medium (Vircell SL, ref. TM003): medio versátil, válido para diferentes tipos de muestras, microorganismos y métodos de diagnóstico. El medio utilizado contiene Hank's Balanced Salt Solution con HEPES como tampón, gelatina, BSA (albúmina sérica bovina), sacarosa y antibióticos.

3.11. Test NAATs comerciales

En este estudio se emplearon los siguientes test comerciales basados en NAATs para el análisis de muestras clínicas en el sitio de referencia, muestras artificiales generadas *in situ* y la para la resolución de discrepancias.

1. **BIOGX Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Trichomonas vaginalis Open System PCR Reagents** (BioGX, Alabama, Estados Unidos), referencia 450-035-LMP. Este test permite la detección de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *T. vaginalis* en muestras de exudado recogidas en medio de transporte universal (UTM, Universal transport medium) o en medio de citología. Tiene como dianas la ITSr para *Candida* y una región conservada de los genes *T. vaginalis*-specific 2-kb repeated sequence para *T. vaginalis*.
2. **Candidosis Real-TM Quant** (Sacace Biotechnologies, Italia), referencia F5-100FRT. Este test detecta *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en muestras clínicas humanas, como exudados recogidos en medio de transporte y orina.

3. **GeneProof Trichomonas vaginalis PCR Kit** (GeneProof as, República Checa), referencia TV/GP/025. Test para identificar *T. vaginalis* en muestras de exudado en medio de transporte UTM® Viral Transport y eNAT™ (COPAN Diagnostics Inc.) y en orina. Diseñado para la detección del gen *B-tubulina*. Compatible con varios termocicladores.
4. **Allplex™ STI Essential Assay** (Seegene Inc., Seúl, Corea del Sur), referencia SD9801X. Este ensayo de qPCR *multiplex* permite la detección de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y *T. vaginalis*. Validado para muestras de exudado genital, orina y recogidas en medio de citología.
5. **Allplex™ Vaginitis Screening Assay** (Seegene Inc.), referencia SD9750X. Este test de qPCR *multiplex* permite la detección de los principales patógenos relacionadas con la vaginitis y proporciona una clasificación de la microbiota en normal, intermedia, VB y normal* (ausencia de *Lactobacillus* y bacterias anaerobias). Esta clasificación de la microbiota se basa en la detección cuantitativa de *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *Lactobacillus* spp. (*L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*) y cualitativa de *Mobiluncus* spp. (*M. mulieris*, *M. curtisii*). Además, incluye la detección de *C. albicans*, especies *Candida* no *albicans* (donde se incluyen *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dublinensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*) y *T. vaginalis*. Este test ha sido validado para muestras de exudado genital y recogidas en medio de citología.

3.12. Muestras clínicas

Las muestras clínicas, tanto positivas como negativas, utilizadas para la optimización y validación del test para el cumplimiento con los requisitos del reglamento para dispositivos de diagnóstico *in vitro* de la Unión Europea, fueron cedidas por diversos hospitales nacionales: el Hospital Universitario Valle de Hebrón (Barcelona, España), el Hospital Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, España) y el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España).

Las muestras fueron procesadas y analizadas utilizando los métodos de rutina establecidos en cada hospital para el diagnóstico de VB, VVC, tricomoniasis y, en algunos casos, ITS. Posteriormente, el remanente de estas muestras, debidamente anonimizadas para garantizar la confidencialidad, fue cedido a la empresa Vircell S.L. para su utilización para fines de investigación.

3.12.1. Hospital Universitario Vall d'Hebrón

Las muestras recogidas para el diagnóstico de VB y VVC se transportaron en el medio Deltaswab Amies, mientras que aquellas solicitadas específicamente para el diagnóstico de ITS fueron recolectadas en el medio DeltaSwab ViCUM®.

Grupo 1

Se recogieron 200 muestras clasificadas como microbiota normal o VB mediante tinción de Gram, aplicando el criterio de Nugent. Con este método 94 muestras fueron clasificadas como microbiota normal y 100 como VB. Todas las muestras fueron evaluadas para *Candida* mediante cultivo en medio BBL Sabouraud Dextrose Agar (Becton Dickinson). Además, 172 de estas muestras fueron analizadas para *T. vaginalis* mediante cultivo en medio Roiron (Condalab, Madrid, España). En todos los casos se obtuvo un resultado negativo para *Candida* y *T. vaginalis*.

Para los análisis por qPCR, el ADN fue extraído utilizando el kit STARMag 96 x 4 Universal Cartridge Kit (Seegene Inc.).

Grupo 2

Se suministraron 20 muestras recogidas en paralelo en medio Deltaswab Amies y DeltaSwab ViCUM®. Estas muestras fueron caracterizadas como microbiota normal o VB mediante tinción de Gram, aplicando el criterio de Nugent; para *Candida* mediante cultivo en medio BBL Sabouraud Dextrose Agar confirmadas por análisis con MALDI-TOF MS (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos); y, para *T. vaginalis* fueron analizadas con el test Allplex™ STI Essential Assay. La composición para cada muestra se detalla en la Tabla 22.

Tabla 22. Muestras y composición determinada con cada método en el análisis de rutina realizado en el servicio de microbiología del hospital universitario Vall d'Hebron.

Nº muestra	Gram-Nugent y Hay-Ison	Cultivo y MALDI-TOF MS	Allplex™ STI Essential Assay
Muestra 1	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 2	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 3	VB		<i>T. vaginalis</i>
Muestra 4	VB	<i>C. albicans</i>	
Muestra 5	VB	<i>C. albicans</i>	
Muestra 6	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 7	VB	<i>C. albicans</i>	
Muestra 8	VB		<i>T. vaginalis</i>
Muestra 9	VB		<i>T. vaginalis</i>
Muestra 10	VB	<i>C. albicans</i>	
Muestra 11	VB	<i>C. albicans</i>	
Muestra 12	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 13	VB		<i>T. vaginalis</i>

Nº muestra	Gram-Nugent y Hay-Ison	Cultivo y MALDI-TOF MS	Allplex™ STI Essential Assay
Muestra 14	Microbiota normal	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	
Muestra 15	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 16	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 17	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 18	Microbiota normal	<i>C. albicans</i>	
Muestra 19	VB	<i>C. glabrata</i>	
Muestra 20	VB	<i>C. albicans</i>	

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana.

Grupo 3

Se recopilaron 32 muestras positivas, 14 muestras positivas para *T. vaginalis*, 15 para *C. albicans* y 3 para *C. glabrata*, caracterizadas por cultivo e identificada la especie de *Candida* por MALDI-TOF MS.

Grupo 4

Se incluyeron 26 muestras positivas para *C. glabrata*, 6 muestras positivas para *C. krusei* y 7 muestras positivas para *Candida* no *albicans*, todas ellas diagnosticadas mediante cultivo y confirmadas por MALDI-TOF MS.

3.12.2. Hospital Universitario Lozano Blesa

Se recopilaron un total de 28 muestras positivas para *C. albicans*, 18 muestras positivas para *C. glabrata*, 14 muestras positivas para *C. krusei* y 2 muestras positivas para *Candida* no *albicans*, todas detectadas mediante cultivo en BBL Sabouraud Dextrose Agar (Becton Dickinson) y confirmadas por análisis con MALDI-TOF MS (Bruker). Estas muestras fueron recogidas en medio ESwab® liquid amies medium.

Adicionalmente, se identificaron 40 muestras positivas para *T. vaginalis* mediante cultivo en medio Roiron (Condalab).

3.12.3. Hospital Universitario Virgen de las Nieves

Del hospital Universitario Virgen de las Nieves se cedieron los siguientes grupos de muestras recogidas en medio medio ESwab® liquid amies medium:

Grupo 1

Para la optimización del diseño de la diana para la detección de *Candida*, se recopilaron 20 muestras positivas caracterizadas con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay, de las cuales 11 muestras positivas para *C. albicans*, 5 muestras positivas para *Candida* no *albicans* y 4 muestras positivas para *C. albicans* y *Candida* no *albicans*.

Grupo 2

Se recogieron 13 muestras positivas para *T. vaginalis*, 8 muestras positivas para *C. glabrata*, 50 muestras positivas para *C. albicans*, 3 muestras positivas para *C. krusei* y 4 muestras positivas para *Candida* no *albicans*. Todas diagnosticadas con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Grupo 3

Se seleccionaron 72 muestras de exudado vaginal previamente caracterizadas por el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay para la validación de los equipos Maelstrom™ 4800 equipo MagXtract® 3200 system. De estas 72 muestras, 2 se descartaron por volumen insuficiente para ser procesadas por ambos equipos. Se seleccionaron 36 muestras interpretadas como VB, 34 como microbiota normal, 44 positivas para varias especies dentro del género *Candida* y 9 positivas para *T. vaginalis*.

3.13. Conservación de las muestras y del ADN purificado

Para la conservación de muestras y ADN purificado, se siguieron las directrices de la guía elaborada por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods* (CLSI MM13-A) [80].

Según la guía CLSI MM13-A, el ADN obtenido a partir de muestras de exudado vaginal o endocervical es estable hasta 10 días a temperaturas de 2-8 °C. Para la conservación a largo plazo del ADN purificado o de las muestras, se requiere congelación a temperaturas inferiores a -70 °C, y se recomienda evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

En este trabajo, las muestras se almacenaron a 2-8 °C durante un máximo de 4 días. Para la conservación a largo plazo, se congelaron en un ultracongelador a -80 °C. En todos los casos, se prepararon varias alícuotas de trabajo para minimizar el riesgo de congelaciones y descongelaciones repetidas.

3.14. Evaluación funcional interna

Se realizó una evaluación funcional interna del test con el objetivo de demostrar la validez científica y el desempeño analítico y clínico del método, conforme al Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro (IVD), con el objetivo de obtener la certificación CE. Los productos IVD comercializados en la Unión Europea deben contar con el marcado CE, que certifica que el dispositivo cumple con los requisitos de calidad y puede ser comercializado legalmente en la región.

El reglamento establece los parámetros que deben analizarse para verificar el correcto funcionamiento del test, dependiendo del método utilizado. Para definir los ensayos a realizar, se recomienda la aplicación de guías proporcionadas por organismos oficiales como el CLSI o la FDA, entre otros. El centro CLSI desarrolla guías detalladas para la validación de métodos analíticos, incluyendo protocolos exhaustivos que son comúnmente empleados por los fabricantes de reactivos. Además, existen guías de verificación con protocolos accesibles que pueden ser implementados en laboratorios de rutina.

En este test, se definieron los métodos para evaluar los siguientes parámetros: límite de detección del método (LoD), precisión, sensibilidad y especificidad diagnóstica, reactividad cruzada, inclusividad y estabilidad.

Para la definición de los ensayos se utilizaron varias guías CLSI [80,116–123] y otras guías publicadas específicamente para la validación de métodos de qPCR [124,125].

Todas las muestras fueron extraídas utilizando el kit de extracción OptiPure Viral Nucleic Acid Extraction Kit en el equipo Maelstrom™ 4800, y analizadas en el termociclador CFX96™ Real-Time System.

3.14.1. Límite de detección

El objetivo de este parámetro es determinar la concentración menor del analito que puede ser detectada consistentemente con un 95% de confianza.

Para la determinación de este parámetro se utilizaron cultivos cuantificados (apartado 4.33.4) inoculados en una matriz artificial negativa que simula una muestra vaginal.

En primer lugar, se realizó una estimación con 3 diluciones seriadas de la muestra a 3 concentraciones, analizándose 5 réplicas por concentración. Una vez estimada la concentración se testaron 3 diluciones seriadas a 3 concentraciones, 20 réplicas por concentración. El LoD se corresponde con la concentración en la que 19/20 (95%) réplicas son positivas.

3.14.2. Precisión

Este parámetro permite evaluar la repetitividad y reproducibilidad del ensayo. A través de este análisis, se determina la precisión:

- Precisión intra-ensayo: variabilidad entre réplicas dentro del mismo ensayo.
- Precisión inter-ensayo: variabilidad entre ensayos diferentes realizados en las mismas condiciones.
- Precisión entre días: variabilidad en los resultados obtenidos en días diferentes.
- Precisión entre equipos: variabilidad entre ensayos realizados en diferentes equipos.

Para su evaluación, se analizaron dos muestras positivas (Tabla 23) correspondientes a todas las dianas durante un periodo de veinte días, realizando dos réplicas por muestra en dos termocicladores diferentes. En el caso de la diana *Candida* spp., debido a su capacidad para detectar múltiples especies, la precisión fue evaluada únicamente utilizando una de ellas. En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos del test para garantizar la validez de los resultados.

Para garantizar la precisión, se establecieron las siguientes especificaciones. Las muestras positivas y los controles positivos deben amplificar con un coeficiente de variación (CV) igual o inferior al 10% ($CV \leq 10\%$), lo que asegura la consistencia en la amplificación y la confiabilidad de los resultados positivos. Por otro lado, las muestras y controles negativos deben arrojar un resultado negativo de amplificación, validando así la ausencia de señales inespecíficas y garantizando la especificidad.

Tabla 23. Composición y concentración de las muestras utilizadas para el ensayo de precisión.

Muestra	Microorganismo	Composición	Concentración
Muestra 1	<i>G. vaginae</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>A. vaginae</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>C. krusei</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>C. glabrata</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>C. albicans</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>T. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	<i>L. crispatus</i>	Cultivo cuantificado	100 copias/ μ l
	ARNsa P humana	RNAseP_pUC57	5×10^{-6} ng/ μ l
Muestra 2	<i>G. vaginae</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>A. vaginae</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. krusei</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. glabrata</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. albicans</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>T. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>L. crispatus</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	ARNsa P humana	RNAseP_pUC57	5×10^{-6} ng/ μ l

3.14.3. Reactividad cruzada, especificidad analítica

El análisis de este parámetro permite determinar la especificidad analítica o reactividad cruzada del test frente a microorganismos relacionados taxonómica y/o sindrónicamente con el tipo de muestra o infección (Tabla 24). La detección de amplificación positiva en alguna de las dianas del test se interpreta como un indicador de reactividad cruzada.

Cuando no fue posible realizar el análisis *in situ*, la presencia de reactividad cruzada se evaluó mediante un análisis *in silico* (Tabla 25). Este procedimiento calculó el porcentaje de homología de los oligonucleótidos/sondas para cada diana utilizando la herramienta BLAST. Se consideró que podía haber reactividad cruzada cuando el porcentaje de homología era igual o superior al 80%.

En los casos en que no se disponía de controles AmpliRun®, se emplearon cultivos crecidos en el laboratorio de BSL-3 de la empresa Vircell S.L. Estos cultivos fueron evaluados a una concentración superior a 1×10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

Tabla 24. Microorganismos analizados *in situ* relacionados taxonómica y/o sindrónicamente con el tipo de muestra o infección.

Tipo	Organismo	Referencia	Origen
Virus	Adenovirus	MBC001	ATCC VR1
Virus	Cytomegalovirus	MBC016	ATCC VR-538
Virus	Enterovirus 68	MBC125	ATCC VR-1197
Virus	Epstein-barr virus	MBC065	ATCC HTB-62
Virus	Virus herpes simple tipo 1	MBC023	ATCC VR-539
Virus	Virus herpes simple tipo 2	MBC024	ATCC VR-540
Virus	Virus herpes simple tipo 6	MBC025	Aislado clínico
Virus	Virus del papilloma humano subtipo 16	MBC067	ATCC CRL-1550
Virus	Virus del papilloma humano subtipo 18	MBC068	ATCC CCL-2.2
Virus	Virus varicela-zóster	MBC048	ATCC VR-1367
Bacterias	<i>Bacillus cereus</i>	MBC004	ATCC 14579
Bacterias	<i>Campylobacter jejuni</i>	MBC088	ATCC 33291
Bacterias	<i>Chlamydia trachomatis</i>	MBC012	ATCC VR-902B
Bacterias	<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo celular	NCTC 8237
Bacterias	<i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)	MBC115	ATCC 51299
Bacterias	<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	MBC116	DSM 17050
Bacterias	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo celular	DSM 300054
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	MBC121	DSM 10974
Bacterias	<i>Haemophilus ducreyi</i>	MBC021	ATCC 33940
Bacterias	<i>Haemophilus influenzae</i>	MBC020	ATCC 33533
Bacterias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MBC107	ATCC BAA-2146
Bacterias	<i>Legionella pneumophila</i>	MBC031	ATCC 33152
Bacterias	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MBC117	ATCC 25240
Bacterias	<i>Mycoplasma genitalium</i>	MBC085	ATCC 33530
Bacterias	<i>Mycoplasma hominis</i>	MBC084	DSM 19104
Bacterias	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MBC035	ATCC 15531
Bacterias	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MBC075	ATCC 19424
Bacterias	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	MBC036	ATCC 13077
Bacterias	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B	MBC066	NCTC 10026

Tipo	Organismo	Referencia	Origen
Bacterias	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo C	MBC053	NCTC 8554
Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA+)	MBC074	DSM 13661
Bacterias	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo celular	Cultivo celular
Bacterias	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MBC070	ATCC 49619
Bacterias	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cultivo celular	Cultivo celular
Bacterias	<i>Treponema pallidum</i>	MBC109	Cepa Nichols
Bacterias	<i>Ureaplasma parvum</i>	MBC133	ATCC 27815
Bacterias	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	MBC112	ATCC 27618
Bacterias	<i>Vibrio cholerae</i>	MBC118	ATCC 39315
Bacterias	<i>Yersinia enterocolitica</i>	MBC027	ATCC 9610
Hongos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	MBC015	ATCC 208821
Protozoos	<i>Cryptosporidium parvum</i>	MBC126	Aislado clínico cedido por la Universidad de Arizona "Sterling Parasitology Laboratory"
Protozoos	<i>Giardia intestinalis</i>	MBC119	ATCC 50803

Tabla 25. Microorganismos analizados *in silico* relacionados taxonómica y/o sindrónicamente con el tipo de muestra o infección.

Tipo	Organismo	Identificador de taxonomía
Virus	VIH	11676
Bacterias	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	28090
Bacterias	<i>Actinomyces israelii</i>	1659
Bacterias	<i>Alcaligenes faecalis</i>	511
Bacterias	<i>Atopobium minutum</i>	1381
Bacterias	<i>Atopobium parvulum</i>	1382
Bacterias	<i>Atopobium rimae</i>	1383
Bacterias	<i>Bacillus subtilis</i>	1423
Bacterias	<i>Bacteroides fragilis</i>	817
Bacterias	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1680
Bacterias	<i>Bifidobacterium breve</i>	1685
Bacterias	BVAB-1	699240
Bacterias	BVAB-2	884684
Bacterias	<i>Clostridium difficile</i>	1496
Bacterias	<i>Corynebacterium genitalium</i>	38288
Bacterias	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	851
Bacterias	<i>Gemella haemolysans</i>	1379
Bacterias	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1579
Bacterias	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1585
Bacterias	<i>Lactobacillus mucosae</i>	97478
Bacterias	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1633
Bacterias	<i>Leptotrichia buccalis</i>	40542

Tipo	Organismo	Identificador de taxonomía
Bacterias	<i>Megasphaera</i> spp.	31977
Bacterias	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2051
Bacterias	<i>Mobiluncus mulieris</i>	2052
Bacterias	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1260
Bacterias	<i>Prevotella bivia</i>	28125
Bacterias	<i>Proteus vulgaris</i>	585
Bacterias	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1311
Bacterias	<i>Streptococcus mitis</i>	28037
Bacterias	<i>Streptococcus mutans</i>	1309
Bacterias	<i>Streptococcus salivarius</i>	1304
Bacterias	<i>Streptococcus thermophilus</i>	1308
Hongos	<i>Candida guilliermondii</i>	4929
Hongos	<i>Candida inconspicua</i>	52247
Hongos	<i>Candida kefyr</i>	4911
Hongos	<i>Candida lusitanae</i>	36911
Hongos	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5207
Hongos	<i>Pichia fermentans</i>	53655
Hongos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4932
Protozoos	<i>Eggerthella lenta</i>	84112
Protozoos	<i>Trichomonas tenax</i>	43075

Abreviaturas: VIH: virus de inmunodeficiencia humana; BVAB: bacterias asociadas a VB.

3.14.4. Inclusividad

Este parámetro evalúa la capacidad del test para detectar distintas cepas o variantes de los microorganismos objetivo. Para ello, se llevó a cabo un análisis *in silico* utilizando secuencias depositadas en la base de datos GenBank Nucleotide (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se seleccionaron secuencias de distintos tiempos de depósito y procedencias geográficas con el objetivo de realizar un análisis global.

En este ensayo, se calcula el porcentaje de homología entre las secuencias y los oligonucleótidos/sondas para cada diana. Se considera que 1 o 2 discrepancias en un oligonucleótido/sonda no tienen un impacto significativo en el proceso de amplificación.

En la Tabla 26 se presentan las secuencias analizadas para cada microorganismo, especificando los números de referencia del NCBI incluidos en el estudio de inclusividad.

Tabla 26. Números de referencia del NCBI de las secuencias analizadas para cada microorganismo en el estudio de inclusividad.

Microorganismo	Nº referencia NCBI
<i>L. crispatus</i>	CP079206.1, NZ_CP059140.1, CP088015.1, AP025162.1, CP118087.1, CP047142.1, CP046311.1
<i>L. gasseri</i>	CP075596.1, LR698989.1, CP049762.1, NZ_CP158455.1, CP087763.1, CP146880.1, CP021427.1
<i>L. jensenii</i>	CP046310.1, CP018809.1, NZ_CP018809.1, NZ_CP160085.1, CP160083.1
<i>L. iners</i>	CP049223.1, CP049225.1, CP049226.1, CP049228.1, CP049230.1, CP049231.1, NZ_CP049230.1
<i>A. vaginae</i>	KU513752.1, AY269029.1, AY269027.1, JQ511973.1, NR_117757.1, AY269020.1, AY269033.1, AF325325.1, NR_029349.1, KU726641.1, AY269031.1, NR_029349.1, AY269024.1, AY269022.1, AY269021.1
<i>G. vaginalis</i>	CP033836.1, LT629773.1, AP012332.1, AB547907.1, CP002725.1, CP002104.1, L08167.1
<i>C. albicans</i>	MT539318.1, MK793246.1, MH534925.1, MT466073.1, MT131348.1, MK026352.1, MN914087.1, MN747847.1, MN263159.1, MK793270.1, MT131347.1, MH534931.1, MK026361.1, MT539315.1, MK793255.1, MH534916.1
<i>C. glabrata</i>	MT548914.1, MT377829.1, MT300279.1, LR757916.1, LR757909.1, MN962637.1, MN699479.1, MN371898.1, MK343435.1, MN788444.1, MN477933.1, MN473880.1, MN699325.1, MN540214.1, MN521700.1, MN521697.1, MH534929.1, MN062976.1, MK998697.1, MK394140.1, MK793257.1, MK793231.1, MK723993.1, MH534934.1
<i>C. krusei</i>	CP093519.1, OM479428.1, MT102788.1, MT071789.1, MH545928.1, MN944500.1, MK343434.1, MN809256.1, MN710523.1, MN371886.1, MN310532.1, MN244404.1, MN213721.1, XR_003834616.1, MK946698.1, MK394162.1, CP039617.1, MK592834.1, MK267579.1, MK027141.1, MK106346.1, MF685432.1
<i>C. parapsilosis</i>	MT640028.1, MT548911.1, MT482736.1, MT471970.1, MT444920.1, MT443910.1, MT443897.1, MT377826.1, MT321277.1, MT303060.1, LC534407.1, MT154269.1, MT153890.1, MT153873.1, MT153859.1, MT640027.1, MT539196.1
<i>C. tropicalis</i>	CP047875.1, MT490210.1, MT482656.1, MT443945.1, MT422054.1, MT377831.1, MT350641.1, LC534414.1, MT193535.1, MT169782.1, MT159957.1, MT159664.1
<i>C. dubliniensis</i>	MT640025.1, MH545916.1, MK394123.1, LC317493.1, KY514056.1, LT716020.1, LT608369.1, KJ451682.1, KP131697.1, OL604797.1, KJ651885.1, KC905080.1, KF959847.1, MW980770.1, OL604797.1
<i>T. vaginalis</i>	XM_001579000.1, XM_001301063.1, XM_001279254.1, L23861.1

3.14.5. Sensibilidad y especificidad analítica

La sensibilidad y especificidad analítica del test se determinaron mediante el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas por un método de referencia. Se realizó un análisis retrospectivo que incluyó un total de 363 muestras, de las cuales 313 eran positivas para los diferentes microorganismos objetivo y 50 correspondían a muestras negativas.

Para el análisis de VB, se utilizaron 50 muestras caracterizadas como VB y microbiota normal, procedentes del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Grupo 1). En el caso de *T. vaginalis*, se incluyeron 13 muestras del Hospital Universitario Virgen de las nieves (Grupo 2) y 37 del Hospital Universitario Lozano Blesa. Para la detección de *C. albicans* se analizaron 50 muestras provenientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 2). En el caso de *C. glabrata*, 15 muestras fueron obtenidas del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Grupo 4), 8 del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 2) y 16 del Hospital Universitario Lozano Blesa. Para *C. krusei*, se incluyeron 4 muestras del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Grupo 4), 3 del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 2) y 14 del Hospital Universitario Lozano Blesa. En cuanto al resto de las especies de *Candida* no *albicans*, se analizaron 4 muestras del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 2), 2 del Hospital Universitario Lozano Blesa y 6 del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Grupo 4). Este último grupo de muestras fueron caracterizadas como *C. tropicalis*/*C. parapsilosis* mediante el test Candidosis Real-TM Quant.

Para *T. vaginalis* y *Candida*, en los casos en que el método de rutina fue el cultivo, los resultados se confirmaron mediante el test BIOGX Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Trichomonas vaginalis Open System PCR Reagents.

Para las especies de *Candida* no *albicans*, debido a su baja prevalencia, fue necesaria la generación de muestras artificiales. Se fabricaron un total de 91 muestras distribuidas de la siguiente manera:

- 11 muestras para *C. glabrata*
- 29 muestras para *C. krusei*
- 14 muestras para *C. parapsilosis*
- 16 muestras para *C. tropicalis*
- 21 muestras para *C. dubliniensis*

Estas muestras se generaron *in situ* inoculando cultivos a diferentes concentraciones en una matriz artificial diseñada para simular un exudado vaginal negativo. Se prepararon 300 µL de cada muestra, que posteriormente fueron procesadas. Una vez generadas, fueron caracterizadas en paralelo utilizando los test BIOGX Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Trichomonas vaginalis Open System PCR Reagents y Allplex™ STI Essential Assay.

Para determinar la concentración de las muestras a preparar, se consideraron las recomendaciones de la guía de la FDA *Highly Multiplexed Microbiological/Medical Countermeasure In Vitro Nucleic Acid Based Diagnostic Devices* [126]. Se aseguró que el 50% de

las muestras simuladas cubrieran todo el rango de sensibilidad del equipo, mientras que el 50% restante se situara cerca del LoD (Tabla 27).

Tabla 27. Muestras artificiales generadas para las especies de *Candida* no *albicans* para la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica del test. La concentración de las mismas se expresa en copias/ μ L.

Muestra	CK (copias/ μ L)	CG (copias/ μ L)	CT (copias/ μ L)	CPa (copias/ μ L)	CD (copias/ μ L)
1	300	500	6000	10000	100
2	200	200	3000	8000	80
3	200	50	1000	6000	50
4	200	50	500	5000	50
5	200	50	100	3000	40
6	150	30	100	1000	40
7	150	30	80	500	30
8	100	20	50	200	30
9	100	10	50	100	10
10	75	10	30	100	10
11	75	10	30	30	1,5
12	75		10	20	1,5
13	75		10	10	1,5
14	75		10	10	1,5
15	50		10		1
16	50		10		1
17	50				1
18	40				0,7
19	40				0,7
20	40				0,7
21	30				0,7
22	30				
23	30				
24	20				
25	20				
26	10				
27	7,5				
28	7,5				
29	7,5				

Abreviaturas: CG: *C. glabrata*; CK: *C. krusei*; CPa: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*; CD: *C. dubliniensis*.

3.14.6. Estabilidades

Se llevaron a cabo varios estudios de estabilidad con el objetivo de evaluar la vida útil del producto, su estabilidad bajo condiciones de transporte y en uso. Además, se realizaron estudios de estabilidad acelerada, los cuales permiten simular la estabilidad real del producto en un período reducido de tiempo sometiéndolo a condiciones extremas de temperatura.

Para garantizar la estabilidad, se evaluaron los controles positivo y negativo y tres muestras positivas que contenían un pool de diferentes microorganismos, preparadas a concentraciones de 5 a 10 veces el LoD (Tabla 28).

Tabla 28. Composición y concentración de las muestras utilizadas para los estudios de estabilidad.

Muestra	Diana	Composición	Concentración
Muestra 1	<i>G. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	3 copias/ μ l
	<i>A. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	20 copias/ μ l
	<i>C. dubliniensis</i>	Cultivo cuantificado	3 copias/ μ l
	<i>C. krusei</i>	Cultivo cuantificado	30 copias/ μ l
	ARNsa P humana	RNAseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁶ ng/ μ l
Muestra 2	<i>C. glabrata</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo cuantificado	20 copias/ μ l
	<i>C. albicans</i>	Cultivo cuantificado	30 copias/ μ l
	<i>T. vaginalis</i>	Cultivo cuantificado	2 copias/ μ l
	ARNsa P humana	RNAseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁶ ng/ μ l
Muestra 3	<i>L. crispatus</i>	Cultivo cuantificado	10 copias/ μ l
	<i>C. tropicalis</i>	Cultivo cuantificado	5 copias/ μ l
	ARNsa P humana	RNAseP_pUC57	5 x 10 ⁻⁶ ng/ μ l

Los estudios de estabilidad real y acelerada se realizaron en tres lotes, mientras que los estudios de estabilidad en uso se realizaron en un único lote. En cada condición se analizaron tres puntos, tiempo inicial, punto intermedio y punto final.

Se definieron los siguientes ensayos para analizar la estabilidad del equipo:

- **Estabilidad real.** Se evaluó la estabilidad del producto durante su vida útil, establecida en 18 meses a una temperatura de 2-8 °C.
- **Estabilidad acelerada (cerrado).** Se evaluó incubando el producto a 36-38 °C durante 12 días, equivalente a 20 meses a 2-8 °C [120].
- **Estabilidad en condiciones de transporte.** Se evaluó sometiendo el producto a temperaturas extremas para simular posibles condiciones durante su transporte. El protocolo incluyó 1 día a -80 °C seguido de 1 semana a 37 °C.
- **Estabilidad en uso.** Se definieron los siguientes ensayos para garantizar la viabilidad del producto durante su utilización:
 - **Estabilidad de la mezcla de PCR:** Se analizó durante 60 minutos una vez reconstituido y mantenido a 2-8 °C.
 - **Estabilidad del control positivo:** Se evaluó mediante 5 ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Para garantizar la estabilidad del producto, se establecieron criterios específicos que deben cumplirse en todas las evaluaciones realizadas durante los estudios de estabilidad. Las muestras positivas y los controles positivos deben amplificar con un CV igual o inferior al 10% ($CV \leq 10\%$), lo que asegura la consistencia en la amplificación y la confiabilidad de los resultados positivos. Por otro lado, las muestras y controles negativos deben arrojar un resultado negativo de amplificación, validando así la ausencia de señales inespecíficas y garantizando la especificidad.

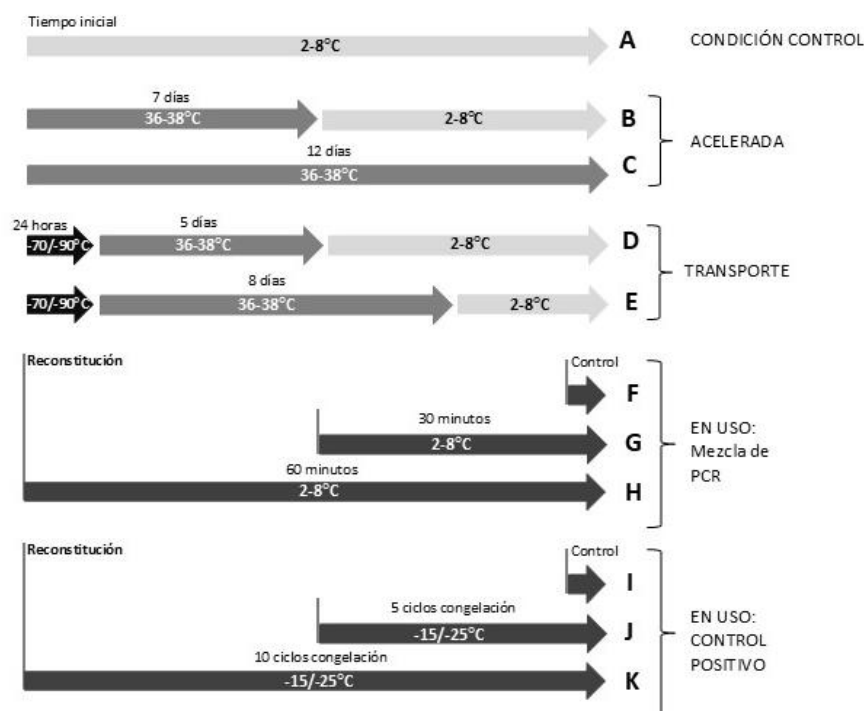


Figura 15. Diagrama de los estudios de estabilidad realizados. Se muestran los tiempos de análisis y las temperaturas de conservación en cada caso.

3.14.7. Compatibilidad con otro termociclador

Con el objetivo de evaluar la compatibilidad del test con el termociclador Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System (versión de software 1.0.8.12), se llevó a cabo un análisis paralelo utilizando este equipo frente al CFX96™ Real-Time PCR Detection System (versión 2.3) como sistema de referencia. Para esta evaluación, se procesó un panel de 14 muestras, incluyendo los controles del test.

Las muestras analizadas, descritas en la Tabla 21, fueron seleccionadas para cubrir un rango representativo de escenarios. Estas se probaron a dos niveles de concentración. Además, se incluyeron seis muestras provenientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 3), seleccionadas por presentar resultados representativos para esta evaluación.

3.15. Evaluación funcional externa

Tras obtener la certificación CE, se procedió a la realización de dos evaluaciones externas en dos hospitales de referencia dentro de la región de Granada. Estas evaluaciones se diseñaron específicamente para analizar un amplio rango de muestras representativas, asegurando la inclusión de diferentes perfiles clínicos y variaciones en las condiciones de las pruebas. El objetivo principal de estas pruebas fue determinar con precisión la sensibilidad y especificidad clínica del método, evaluando su rendimiento en condiciones reales de uso. Además, estos estudios permitirán identificar posibles limitaciones, confirmar la robustez del procedimiento y recopilar datos adicionales que respalden su implementación en un entorno clínico. Los resultados obtenidos son fundamentales para garantizar la confiabilidad del método y proporcionar evidencia adicional de su validez en la práctica médica.

3.15.1. Hospital Universitario San Cecilio

En el Hospital Universitario San Cecilio se planificó un estudio prospectivo, diseñado y llevado a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital, bajo la referencia 1517-N-22.

Durante 3 meses, desde Junio a Septiembre del 2022, se analizaron todas las muestras consecutivas de exudado vaginal recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital. Este hospital tiene centralizado el análisis de muestras provenientes de varios centros médicos de la región. Estas muestras procedían tanto de pacientes sintomáticas como asintomáticas que acudieron a atención primaria y hospitalaria. No se reportaron datos personales ni clínicos de las pacientes, pero si se informó de que 23 muestras procedían de mujeres embarazadas. Para este estudio no se aplicó ningún criterio de exclusión. Los participantes del estudio tenían edades comprendidas entre los 14 y los 98 años.

Se recibió una muestra de exudado vaginal por paciente, recolectada en medio de transporte Transystem™ Amies Agar Gel (Figura 16). Las muestras fueron procesadas inmediatamente después de su recepción y se almacenaron a una temperatura de 2–8 °C hasta su análisis mediante qPCR. Este análisis se realizó en un plazo inferior a 72 horas.



Figura 16. Imagen de las muestras de exudado vaginal en medio Transystem™ Amies Agar Gel. Las muestras para su procesamiento por el servicio de microbiología fueron identificadas con el código de barras y el número de petición.

Todas las muestras se sometieron a examen microscópico como parte de los procedimientos rutinarios de diagnóstico en el laboratorio durante el periodo del estudio. Para el diagnóstico de VB, los exudados vaginales se analizaron mediante tinción de Gram y se evaluaron utilizando el sistema de puntuación de Nugent [64]. En los casos en los que predominaban bacilos Gram-negativos, Gram-variables o células guía, las muestras se sembraron en medio de cultivo *Gardnerella* agar en atmósfera de CO₂ a 37°C durante 48 horas (Becton Dickinson) [127]. Adicionalmente, si durante el análisis microscópico se observaban leucocitos, la muestra se cultivó en medio Roiron (Becton Dickinson) a 37 °C durante un máximo de 48 horas para el diagnóstico de *T. vaginalis* [54,115].

Para el diagnóstico de *Candida*, todas las muestras se inocularon en medio de cultivo CHROMID® Candida agar (bioMérieux) e incubaron a 37 °C durante un máximo de 48 horas [75]. En caso de cultivo positivo, la identificación de especies de *Candida* se llevó a cabo mediante MALDI-TOF MS utilizando el sistema Maldi Biotyper® (Bruker Daltonics).

Después del análisis de rutina, cada hisopo se descargó en 1 ml de medio líquido ESwab® Liquid Amies Medium para el análisis con el test Vaginal Panel Realtime PCR kit. El procesamiento de las muestras, la extracción de ácidos nucleicos y la preparación para la qPCR se llevaron a cabo en el sistema MagXtract® 3200 System, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando 300 µl de muestra. Se empleó el kit TANBead Nucleic Acid Extraction Kit para la purificación y aislamiento de ácidos nucleicos. Se obtuvo un volumen de elución de 80 µl, de los cuales se añadieron 5 µl a cada tubo de reacción de PCR (mezcla A + mezcla B).

Los ensayos de qPCR se realizaron en el termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System. En cada ensayo se analizaron los controles positivos y negativos incluido en el test de qPCR para verificar el proceso de amplificación. El software Vircom PCR LIS Connection (Vircell

SL) se utilizó para la interpretación automática de los resultados. Este software permite la generación de plantillas de trabajo, la interpretación y validación automática de los resultados tras realizar el ensayo de amplificación y la integración con el sistema de información del laboratorio (LIS, *Laboratory Information System*). Para ello, recoge todos los datos obtenidos del ensayo de amplificación y aplica las reglas de interpretación del kit.

Tras la realización de ambos análisis, se procedió a la recopilación de los datos y al análisis de los resultados. El flujo de trabajo se ilustra en la Figura 17, donde se proporciona una visión general del diseño experimental, los procedimientos aplicados y las etapas de análisis de datos llevadas a cabo en este estudio.

Para analizar las discrepancias en los resultados obtenidos para *Candida* spp. y *T. vaginalis*, las muestras se procesaron utilizando el kit Candidiosis Real-TM Quant y el kit GeneProof Trichomonas vaginalis PCR Kit, respectivamente. En cuanto a la VB, cada portaobjetos teñido con el método de Gram fue revisado por dos técnicos independientes, quienes desconocían la interpretación inicial. El resultado final se estableció según el acuerdo entre al menos dos técnicos.

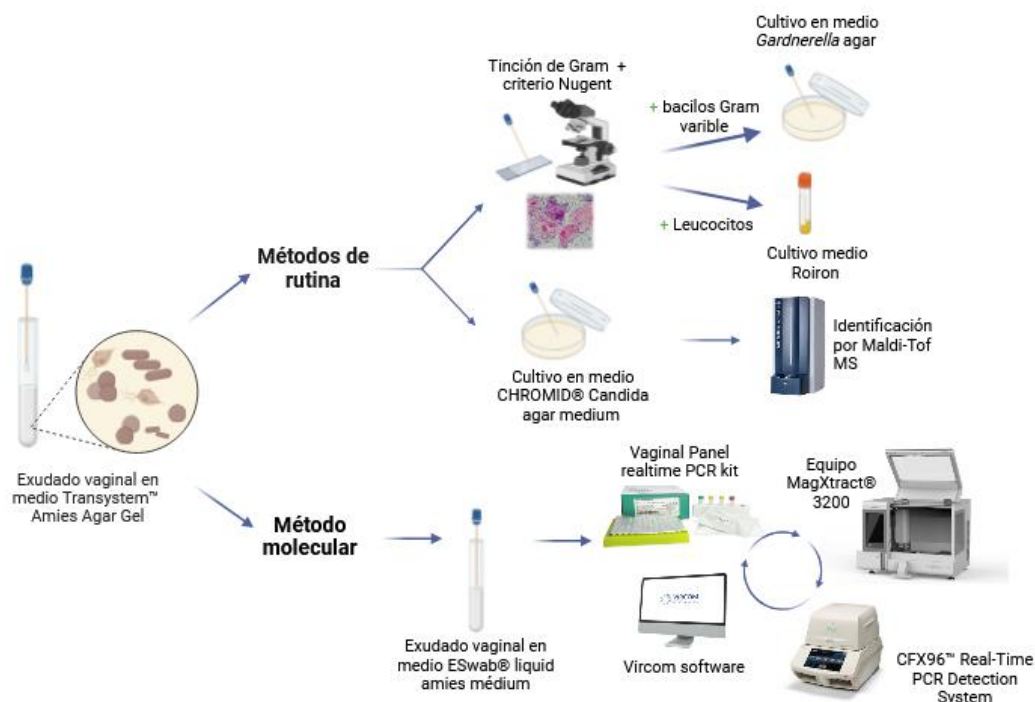


Figura 17. Esquema de métodos, materiales y equipamiento empleados en el análisis de rutina y molecular.

3.15.2. Hospital Universitario Virgen de las Nieves

En colaboración con el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, se llevó a cabo un estudio retrospectivo para comparar el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit con un test molecular de características similares, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Se seleccionó un conjunto de muestras representativas de todas las clasificaciones posibles del test, y los remanentes de estas muestras fueron recogidos y almacenados para su posterior análisis en las instalaciones de Vircell SL. El estudio fue realizado de forma anónima, sin aplicar criterios de exclusión ni recopilar datos clínicos de las pacientes. Los participantes tenían edades comprendidas entre los 13 y los 75 años.

Cada muestra de exudado vaginal fue recolectada en medio ESwab® Liquid Amies Medium para su análisis mediante el método rutinario del hospital. Inicialmente, las muestras se almacenaron a una temperatura de 2-8 °C durante tres días para su procesamiento en el hospital y, posteriormente, fueron congeladas a -20 °C para su conservación a largo plazo.

Como método de rutina del hospital para el diagnóstico de VB, *Candida* spp. y *T. vaginalis*, todas las muestras fueron analizadas con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay. Este análisis fue realizado en el equipo automático STARlet IVD (Seegene Inc.), que integra el flujo completo de trabajo, desde el procesamiento de las muestras hasta la extracción de ácidos nucleicos y la preparación de la qPCR. Posteriormente, la amplificación y detección se llevaron a cabo en el termociclador CFX96™ Dx Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), y los resultados fueron analizados mediante el software Seegene Viewer (Seegene Inc.). La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando el STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit, diseñado para purificar ácidos nucleicos de diversos tipos de muestras, incluyendo exudados vaginales, cervicales y uretrales.

Posteriormente, las mismas muestras fueron analizadas con el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit en las instalaciones de Vircell SL. El procesamiento de las muestras se realizó manualmente, llevando a cabo la purificación de ácidos nucleicos a partir de 300 µl de muestra utilizando el kit OptiPure Viral Nucleic Acid Extraction Kit en el equipo Maelstrom™ 4800. El volumen de elución obtenido fue de 80 µl, de los cuales se añadieron 5 µl a cada tubo de reacción de PCR (mezcla A y mezcla B).

Los ensayos de qPCR se realizaron en el termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System. En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos proporcionados en el kit de qPCR para verificar la validez del proceso de amplificación. El software Vircom PCR LIS

Connection fue utilizado para la generación de plantillas de trabajo, la carga automatizada de estas plantillas en el termociclador y la interpretación de los resultados.

Tras completar ambos análisis, se procedió a la recopilación y comparación de los datos. En total, se seleccionaron 147 muestras para el estudio. La Tabla 29 presenta el desglose de las muestras seleccionadas y su interpretación diagnóstica según el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Tabla 29. Desglose de muestras e interpretaciones diagnósticas según el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Categoría	Nº de muestras
VB	25
Microbiota normal	29
Microbiota normal con <i>C. albicans</i>	27
Microbiota normal con otras especies <i>Candida</i>	15
VB con <i>C. albicans</i>	22
VB con otras especies <i>Candida</i>	2
Microbiota normal con <i>T. vaginalis</i>	6
VB con <i>T. vaginalis</i>	5
Microbiota normal con <i>C. albicans</i> y <i>T. vaginalis</i>	2
Microbiota normal con <i>C. albicans</i> y otras especies <i>Candida</i>	5
VB con <i>C. albicans</i> y <i>T. vaginalis</i>	2
VB con <i>C. albicans</i> y otras especies <i>Candida</i>	7

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana.

3.16. Análisis de datos

Todos los datos utilizados en este estudio han sido recopilados mediante herramientas del paquete Microsoft Office, incluyendo principalmente Word, Excel y Access (Microsoft, Washington, USA). Estas herramientas han facilitado la gestión, organización y análisis inicial de la información. En particular, Microsoft Excel se empleó para la elaboración de tablas y gráficas, proporcionando una representación visual clara y estructurada de los datos.

Para el análisis de los resultados de secuenciación, se utilizó el software Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA), que permitió interpretar y analizar las secuencias FASTA obtenidas tras el proceso de secuenciación, asegurando precisión y fiabilidad en los resultados.

El análisis del grado de concordancia entre los métodos evaluados se realizó a través del cálculo del índice kappa de Cohen (k), un indicador estadístico que mide el nivel de acuerdo más allá del azar, asegurando una evaluación robusta y objetiva.

En cuanto al rendimiento del método desarrollado, se llevaron a cabo cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) utilizando el software MedCalc® v23.0.6, una herramienta que permite la realización de análisis estadísticos biomédicos. Este software también fue empleado para la generación y análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), para establecer el algoritmo desarrollado para la clasificación de la microbiota en normal o VB. La construcción de las curvas ROC siguió la metodología propuesta por DeLong et al. (1988), un enfoque estadístico robusto que facilita la comparación y evaluación de curvas ROC a partir de datos empíricos, proporcionando estimaciones fiables incluso en escenarios con prevalencia desconocida. Estas curvas permitieron identificar los puntos de corte óptimos y calcular el área bajo la curva, un indicador clave para evaluar la capacidad discriminatoria del método.

El test de McNemar se aplicó para evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los métodos. En este análisis, un valor p (p -value) inferior a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo, lo que establece un estándar riguroso para la validación de los resultados.

Para la creación de figuras y esquemas visuales, se utilizó GraphPad Prism 8 (versión 8.0.2) junto con la plataforma Biorender (<https://app.biorender.com/user/signin>), que permitió generar representaciones gráficas claras y de alta calidad, ideales para la comunicación de los hallazgos.

Finalmente, para la interpretación automática de los resultados de qPCR generados con el test desarrollado en este trabajo, se empleó el software Vircom PCR LIS Connection, una herramienta diseñada para facilitar la integración y automatización de los datos en el flujo de trabajo clínico.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Diseño del test

Para definir los microorganismos a incluir en el panel para el diagnóstico de vaginitis, se llevó a cabo un exhaustivo estudio bibliográfico. Esta revisión resulta fundamental para el desarrollo de un nuevo test diagnóstico, ya que permite conocer la demanda clínica actual y las metodologías aplicadas en los laboratorios para el diagnóstico de este tipo de infecciones. El conocimiento de las herramientas disponibles y situación actual es esencial para orientar el desarrollo hacia una prueba que sea competitiva, precisa y adaptada a las necesidades clínicas y regulatorias.

Durante el proceso de diseño y desarrollo del test molecular llevado a cabo en este trabajo, se evaluaron y plantearon varios prototipos de configuración. A continuación, se presentan las principales características de cada propuesta, así como los microorganismos seleccionados para su detección.

4.1.1. Prototipo 1

Inicialmente, y basándonos en la revisión bibliográfica sobre los microorganismos asociados a vaginitis, se propuso un diseño preliminar que contemplaba los principales patógenos implicados en esta condición. Este diseño inicial incluyó la identificación de los siguientes microorganismos:

- **Detección de *G. vaginalis* y *F. vaginae* para el diagnóstico de VB.** Ambos microorganismos han demostrado ser marcadores clave en la identificación de la VB, lo cual hace que su detección sea esencial para un diagnóstico de esta infección.
- **Detección de *Candida* spp., *Ureaplasma* spp., *M. hominis* y *T. vaginalis*.** Este grupo de microorganismos está implicado en diferentes infecciones vaginales, y su inclusión permite un diagnóstico más amplio que abarca la candidiasis, infecciones por micoplasmas y tricomoniasis.

Con el objetivo de controlar el montaje del ensayo y el proceso de amplificación, se propuso la inclusión de un control interno en la mezcla de reacción de qPCR. Como control interno, se planteó la utilización del bacteriófago MS2, que es un agente exógeno a la infección y no afecta la detección de los microorganismos a estudio. La adición del bacteriófago MS2 permite detectar posibles errores en el montaje e inhibiciones en la reacción de PCR, lo que contribuye a mejorar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

4.1.2. Prototipo 2

Después de las primeras pruebas de optimización, y tras una revisión bibliográfica continua y actualizada, se decidió modificar el diseño inicial del test. A continuación, se detallan los cambios principales que se implementaron:

- **Detección de la principal especie de *Lactobacillus* presente en la microbiota vaginal sana.** La detección de *L. crispatus*, permite evaluar el equilibrio de la microbiota vaginal, factor relevante en el diagnóstico diferencial de la vaginosis.
- **Posible inclusión de microorganismos adicionales en el diagnóstico de VB.** Se evaluó la incorporación de especies como *Megasphaera* spp., *Mobiluncus* spp. y BVAB-2 en el algoritmo de diagnóstico de VB. Estos microorganismos han mostrado una asociación significativa con la vaginosis bacteriana y su detección puede mejorar la precisión del diagnóstico.
- **Detección específica de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* para un tratamiento diferencial.** Dada la importancia de un tratamiento diferencial en infecciones por especies de *Candida*, se consideró la detección específica de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*. Estas especies presentan variaciones en su sensibilidad a los tratamientos antifúngicos, lo que hace fundamental su identificación precisa en el diagnóstico.

4.1.3. Diseño final

Tras evaluar los cambios propuestos en las fases anteriores, se definió un diseño final que contempla los microorganismos clave en el diagnóstico de las principales infecciones vaginales, asegurando su utilidad clínica. A continuación, se detallan las principales características del diseño final:

- **Detección semi-cuantitativa de las especies más frecuentes de *Lactobacillus* spp. y de patógenos específicos para el diagnóstico de VB.** Detección de las especies más frecuentes de *Lactobacillus* spp. (*L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. iners*), junto con *G. vaginalis* y *F. vaginae*, mediante amplificación semi-cuantitativa. Esta detección permite evaluar la cantidad relativa de *Lactobacillus* spp. respecto a la de los patógenos, *G. vaginalis* y *F. vaginae*, proporcionando un diagnóstico del estado de la microbiota vaginal y una mejor caracterización de la VB.
- **Detección cualitativa de *Candida* spp. para el diagnóstico de VVC.** Se incluye la detección específica de *C. albicans*, *C. glabrata*, y *C. krusei*, dada su importancia en el tratamiento diferencial para VVC. Además, se detectan otras especies de *Candida* (como

C. parapsilosis, *C. dubliniensis*, y *C. tropicalis*) que también pueden ser causantes de infección, ofreciendo una cobertura amplia y precisa de la infección por este hongo.

- **Detección cualitativa de *T. vaginalis* para el diagnóstico de tricomoniasis.** Este protozoo será detectado cualitativamente, asegurando un diagnóstico fiable de tricomoniasis, la cual requiere tratamiento específico debido a su naturaleza infecciosa y riesgo de transmisión.

Además, para el control de la correcta toma de muestra, transporte, procesamiento y extracción se decidió la inclusión de un control interno endógeno (**gen *ARNsa P humano***) que a su vez controla el proceso de amplificación. Este control permite asegurar que la muestra no ha sufrido degradación durante el transporte y valida que la amplificación se ha realizado correctamente, permitiendo detectar posibles inhibiciones o fallos en la reacción. Este control aporta una capa adicional de seguridad al diagnóstico, minimizando el riesgo de falsos negativos derivados de problemas técnicos o de calidad en la muestra.

Este diseño final proporciona un diagnóstico clínicamente relevante y diferencial de los principales microorganismos causantes de infecciones vaginales.

4.2. Selección de las dianas genéticas para el diagnóstico molecular

Se seleccionaron como dianas genéticas de cada microorganismo aquellas que estuvieran altamente conservadas dentro de la especie, con relevancia clínica y, que, en la medida de lo posible, no presenten mutaciones frecuentes. Para esta selección, se realizó un estudio detallado de las características de los distintos microorganismos para su detección molecular. Asimismo, se realizaron alineamientos con secuencias de cepas de distinta procedencia geográfica y temporal para garantizar la inclusividad del diseño.

Para la amplificación y detección de *G. vaginalis* y *F. vaginae* se seleccionó el gen *ARNr 16S*. Esta región está conservada dentro de la especie, es específica y permite la diferenciación respecto a otras especies afines al género *Gardnerella* y *Fannyhessea*.

Para el género *Lactobacillus* en un principio se escogió el gen *ARNr 16S* por estar altamente estudiado. Sin embargo, este gen presentó el inconveniente de ser multicopia y mostrar variabilidad entre especies, lo que limitaba su utilidad para una detección precisa. Por este motivo, se decidió descartar esta diana y explorar otros genes, como *tuf*, *rplK* y *gyrA*. Finalmente, se seleccionó el gen *rplK* debido a su alto grado de conservación entre las especies más comunes de la microbiota vaginal, tanto en condiciones normales como alteradas. Este gen, además,

permite la detección de las principales especies de *Lactobacillus* presentes en la microbiota, garantizando una alta especificidad en su identificación.

La ITSr es la región más estudiada para el diagnóstico molecular de las especies del género *Candida*. Se analizaron numerosas secuencias de las especies más prevalentes en la VVC para analizar la conservación de esta diana. Se escogió esta región por presentar zonas conservadas en la secuencia génica de cada especie y regiones específicas que permiten la detección y diferenciación de cada especie.

Por último, para la detección de *T. vaginalis* se seleccionó la diana TRIDNATARP. Diana conservada, con repetición en tándem y altamente estudiada que permite la detección específica con gran sensibilidad analítica y diferenciación frente a otras especies del género *Trichomonas*.

Para cada diana genética, se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos y sondas, con el propósito de identificar la combinación que ofreciera los mejores resultados en términos de sensibilidad y especificidad. Esta selección fue optimizada mediante pruebas exhaustivas que incluyeron tanto muestras control como muestras clínicas, lo cual permitió asegurar que el test respondiera de manera confiable y precisa en condiciones reales.

4.2.1. Caracterización de especies del género *Lactobacillus*

Durante las etapas iniciales del diseño del test, se realizó un estudio para caracterizar las especies más frecuentes del género *Lactobacillus* presentes en la microbiota vaginal. Este análisis se llevó a cabo utilizando una serie de muestras clasificadas como microbiota normal y VB mediante el método de Nugent. Para garantizar la correcta calidad y toma de las muestras, se incluyó un control interno mediante la amplificación por PCR de la diana ARNsa P humana.

Se analizaron un total de 40 muestras, distribuidas equitativamente entre microbiota normal (20 muestras) y VB (20 muestras), todas ellas cedidas por el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Grupo 1). Para la interpretación de los resultados, se consideraron positivos aquellos con un valor de Ct inferior a 35, mientras que se consideraron negativos los que presentaban un Ct mayor a 35 o ausencia de amplificación. En todos los casos se obtuvo amplificación positiva de la diana ARNsa P humana asegurando la correcta toma de la muestra y realización del ensayo.

En el análisis global, en 11 muestras se detectó únicamente una especie de *Lactobacillus*, mientras que en 21 muestras se identificó la presencia de dos o más especies. En 6 muestras no se detectó *Lactobacillus*, y en 2 muestras solo se observó amplificación con la pareja genérica de oligonucleótidos, lo que sugiere la posible presencia de otra especie no identificada con los

oligonucleótidos específicos utilizados. En cuanto al análisis detallado de las muestras positivas para cada especie dentro de las categorías evaluadas, se observó que *L. gasseri* y *L. crispatus* predominaron en las muestras clasificadas como microbiota normal, mientras que *L. iners* mostró una mayor prevalencia en las muestras clasificadas como VB. El número de muestras con *L. jensenii* fue similar en ambas categorías (Figura 18).

El análisis en paralelo utilizando la diana genérica de *Lactobacillus* permitió identificar la posible presencia de otras especies en cuatro muestras clasificadas como VB. En dos de estas muestras, se obtuvo un resultado positivo para *L. iners*, evidenciándose una diferencia de sensibilidad entre las dos dianas utilizadas. En las otras dos muestras, no se detectó amplificación positiva para ninguna de las especies evaluadas, lo que sugiere la presencia de otras especies no incluidas en el diseño específico del estudio.

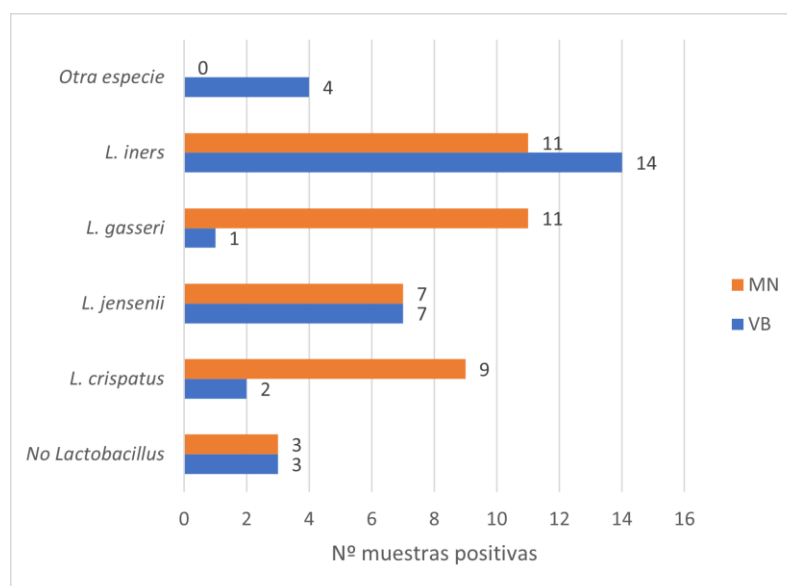


Figura 18. Número de muestras positivas identificadas para cada especie de *Lactobacillus* para cada categoría de Nugent.

Abreviaturas: MN, microbiota normal; VB, vaginosis bacteriana.

Ante la elevada proporción de muestras que contenían dos o más especies de *Lactobacillus*, se realizó un análisis detallado para determinar el número de muestras que presentaban cada especie de forma individual, así como las diferentes combinaciones de dos o más especies (Figura 19). Los resultados mostraron que la especie más frecuente fue *L. iners*, detectada en 8 muestras como única especie presente. Por otro lado, la combinación más común fue la de *L. jensenii* y *L. iners*, identificada en 6 muestras.

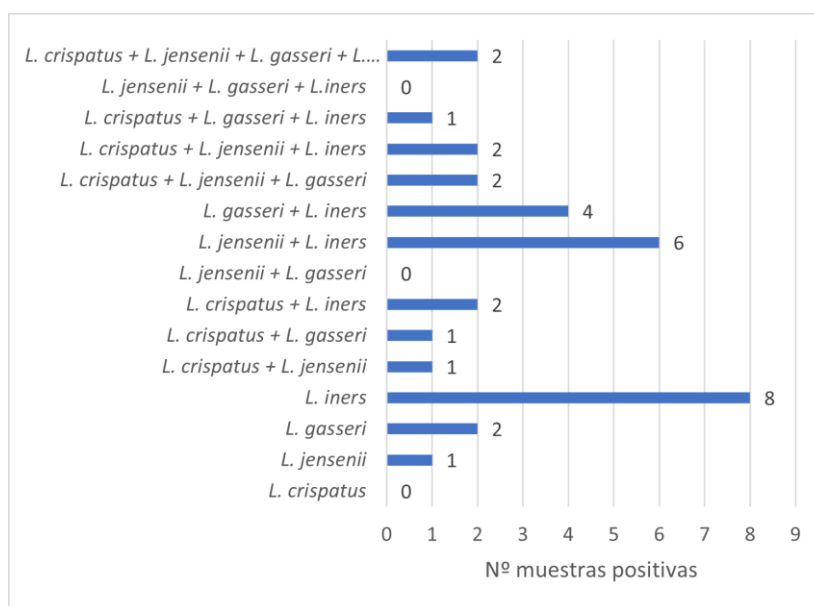


Figura 19. Distribución del número de muestras positivas con especie única de *Lactobacillus* y combinación de varias especies.

4.3. Cuantificación de cultivos

Para determinar y optimizar la sensibilidad y especificidad del test, tanto durante su diseño como en la posterior evaluación funcional, se llevó a cabo la cuantificación de cultivos *in situ* correspondientes a cada uno de los microorganismos objetivo. Esta cuantificación resultó esencial para garantizar la precisión del método y su capacidad para detectar cada especie de manera eficaz. Los resultados obtenidos para la cuantificación de cada microorganismo y especie están detallados en la tabla 30.

Tabla 30. Resultados de cuantificación en copias/μl de los cultivos.

Microorganismo	Concentración copias/μl
<i>L. crispatus</i>	1.5×10^7
<i>L. jensenii</i>	1.0×10^6
<i>G. vaginalis</i>	1.9×10^7
<i>A. vaginae</i>	2.0×10^8
<i>C. albicans</i>	1.0×10^7
<i>C. krusei</i>	2.2×10^7
<i>C. glabrata</i>	4.5×10^7
<i>C. tropicalis</i>	6.0×10^7
<i>C. parapsilosis</i>	2.2×10^7
<i>C. dubliniensis</i>	1.0×10^6
<i>T. vaginalis</i>	2.0×10^5

4.4. Algoritmo para detección de VB

Con este test molecular se pretende establecer una clasificación de la microbiota vaginal similar a la que proporciona el método de Nugent (método de referencia para el diagnóstico de VB) en base a la cantidad de *Lactobacillus* frente a la cantidad de *G. vaginalis* y *F. vaginae* presente en la muestra. El ratio derivado de este algoritmo indica el grado de disbiosis en la microbiota, clasificándola en microbiota normal o VB.

Una vez optimizada la qPCR *multiplex* para la detección de *G. vaginalis*, *F. vaginae* y *Lactobacillus* spp., se llevaron a cabo diluciones seriadas de un cultivo previamente cuantificado para generar una curva de calibración específica para cada microorganismo. Este procedimiento tuvo como objetivo obtener una recta patrón que permitiera la semi-cuantificación de cada especie en una muestra analizada. La recta patrón obtenida establece la relación entre la concentración de cada diana y su valor de Ct (umbral de ciclo), facilitando así la interpretación precisa de los resultados. En el caso de *Lactobacillus* spp., se utilizó como referencia el cultivo de la especie *L. crispatus*, debido a su relevancia en la microbiota vaginal y su representatividad dentro del género.

Una vez calculadas las rectas patrón para cada microorganismo, el siguiente paso fue establecer un punto de corte que diferenciara entre VB y microbiota vaginal normal, utilizando una curva ROC. Para este análisis, se estudiaron un total de 194 muestras de exudado vaginal del Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Grupo 1), previamente caracterizadas mediante tinción de Gram y evaluadas con el método de Nugent. De las 194 muestras, 100 fueron clasificadas como VB y 94 como microbiota normal según el método de rutina.

Utilizando los valores de Ct de cada microorganismo obtenidos por PCR y aplicando la recta patrón establecida, se calculó el logaritmo de las copias/ μ l de *G. vaginalis*, *F. vaginae* y *Lactobacillus* en cada muestra (Figura 20). Posteriormente, se estableció un cociente entre *G. vaginalis*/*F. vaginae* y *Lactobacillus* spp. para evaluar la proporción de estos microorganismos en cada muestra. Este cociente fue analizado mediante curva ROC, obteniéndose un punto de corte de 1.25 (Figura 21). Este punto de corte se determinó con una sensibilidad del 93% con un intervalo de confianza al 95% (IC) de 86.1-97.1 y una especificidad del 90.4% (IC 95%: 82.6-95.5). Por lo tanto, según este método molecular, las muestras con un cociente igual o inferior a 1.25 se clasifican como VB, mientras que aquellas con un cociente superior se clasifican como microbiota normal.

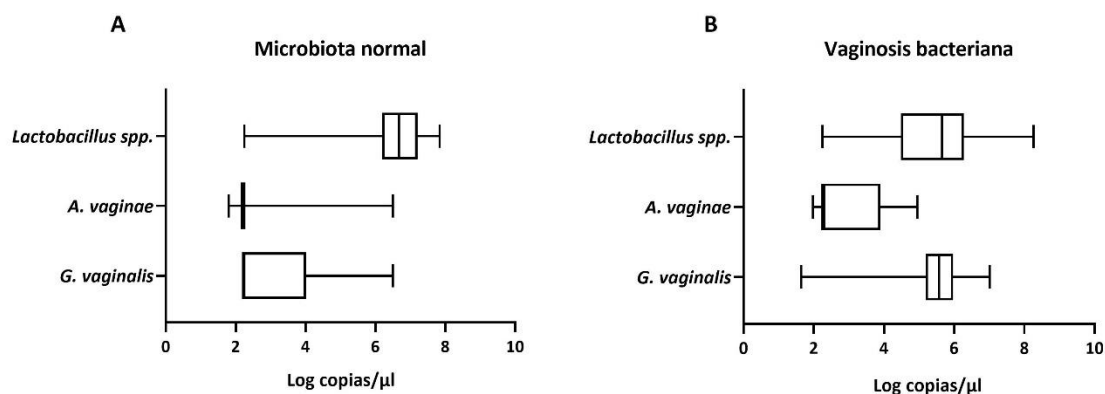


Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la cantidad de cada microorganismo en cada grupo de muestras. A: muestras clasificadas como microbiota normal; B: muestras clasificadas como VB según el método de Nugent. Los valores se expresan en logaritmo copias/μl.

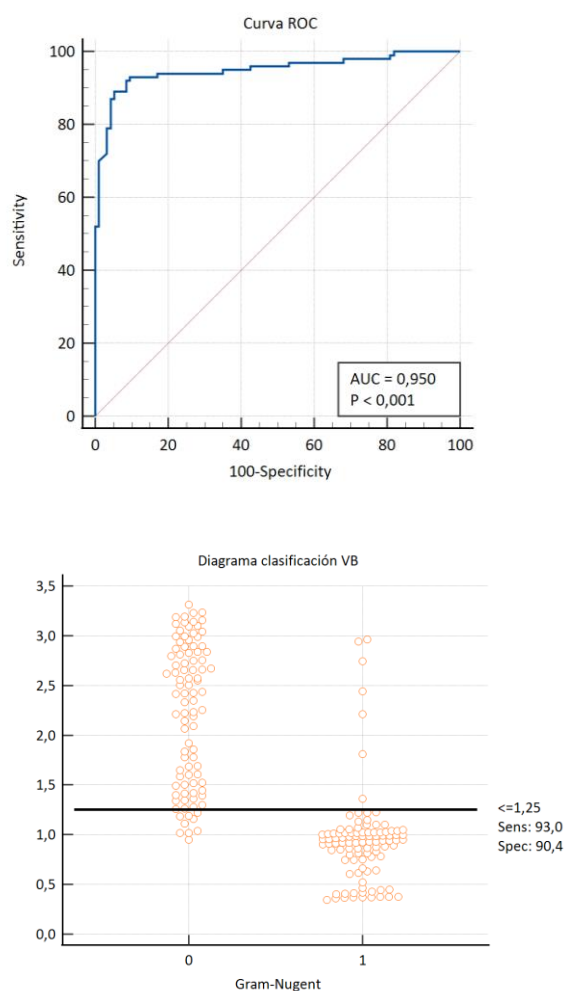


Figura 21. Curva ROC y diagrama de los resultados obtenidos para el rendimiento de la prueba molecular en la clasificación entre VB y microbiota vaginal normal. El área bajo la curva es de 0.950, lo que indica una excelente capacidad discriminatoria de la prueba para diferenciar entre ambas condiciones. El error estándar es de 0.0164 y el valor de p es < 0.0001, lo que demuestra una significancia estadística elevada.

Abreviaturas: AUC, área bajo la curva; Sens, sensibilidad; Spec, especificidad.

Además de la clasificación anterior, se decidió establecer una clasificación adicional en cuatro grados para proporcionar un resultado más detallado del estado de la microbiota, basado en la cantidad de cada microorganismo presente. Esta clasificación se obtiene a partir de los mismos resultados previos, pero aplicando un análisis distinto al logaritmo de la cuantificación obtenida. Para ello, cada diana se analiza de forma independiente y, en función del resultado conjunto, se clasifica la muestra en uno de los grados definidos (Tabla 31). La interpretación de cada grado es la siguiente:

- **Grado 1:** corresponde con una microbiota normal, donde únicamente está presente *Lactobacillus* spp. En este grado, se detecta *Lactobacillus* spp., mientras que *G. vaginalis* y *F. vaginae* no son detectables.
- **Grado 2:** corresponde con una microbiota normal dominada por la presencia de *Lactobacillus* spp., pero con detección de *G. vaginalis* y/o *F. vaginae*. En este estado, se observa amplificación positiva de *Lactobacillus* spp. junto con *G. vaginalis* y/o *F. vaginae*.
- **Grado 3:** corresponde a una microbiota asociada a VB. *Lactobacillus* spp. está presente, pero su dominancia es superada por *G. vaginalis* y/o *F. vaginae*. En este caso, se detecta *Lactobacillus* spp., pero hay amplificación significativa de *G. vaginalis* y/o *F. vaginae*.
- **Grado 4:** corresponde con microbiota asociada a VB. Puede presentarse de dos maneras: (1) con baja o nula presencia de *Lactobacillus* spp. y una alta presencia de *G. vaginalis* y/o *F. vaginae*; o (2) con baja o nula presencia tanto de *Lactobacillus* spp. como de *G. vaginalis* y/o *A. vaginae*.

Tabla 31. Clasificación de la microbiota vaginal por el test molecular desarrollado.

1º Clasificación (VB)		2º Clasificación (grado)	
Microbiota normal	Ratio > 1.25	Grado 1	Log LB >4, Log GV=0.002 y Log AV=0.002
		Grado 2	Log LB >3, Log GV ≥0.002 y/o Log AV ≥0.002
VB	Ratio ≤1.25	Grado 3	Log LB >3, Log GV ≥0.002 y/o Log AV ≥0.002
		Grado 4	Log LB ≤3

Abreviaturas: GV: *G. vaginalis*; AV: *A. vaginae*; LB: *Lactobacillus* spp.

Aunque la clasificación de Nugent y el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit emplean métodos y criterios distintos para el diagnóstico de VB y la caracterización de la microbiota vaginal, es posible establecer ciertas equivalencias entre ambas técnicas, ya que ambas evalúan la presencia y predominancia de bacterias específicas (Tabla 32).

Tabla 32. Equivalencia entre el método de Nugent y el test Vaginal Panel Realtime PCR kit.

Microbiota presente	Interpretación Vaginal panel realtime PCR kit	Puntuación de Nugent
Solo <i>Lactobacillus</i> spp. está presente.	MN (G1)	0-3
Predominancia de <i>Lactobacillus</i> spp., pero presencia de <i>G. vaginalis</i> y/o <i>F. vaginae</i>	MN (G2)	0-3 4-6
Predominancia de <i>G. vaginalis</i> y/o <i>F. vaginae</i> con presencia de <i>Lactobacillus</i> spp.	VB (G3)	4-6 7-10
<i>Lactobacillus</i> spp. escaso o ausente con predominancia de <i>G. vaginalis</i> y/o <i>F. vaginae</i>	VB (G4)	7-10
Ausencia de amplificación de <i>Lactobacillus</i> spp., <i>G. vaginalis</i> y <i>F. vaginae</i>	VB (G4)	7-10

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; MN, microbiota normal; G1-4, grados 1 a 4.

4.4.1. Detección de *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* spp. y BVAB-2

Debido al carácter polimicrobiano de la VB, se decidió valorar la inclusión en el algoritmo definido de otras bacterias asociadas a esta condición: *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* spp. y BVAB-2.

Para este análisis, se seleccionaron al azar 71 muestras del Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Grupo 1), 37 muestras clasificadas como VB y 34 como microbiota normal. Al aplicar el algoritmo previamente detallado, se identificaron 18 muestras con resultados discrepantes: 11 muestras clasificadas como VB fueron categorizadas como microbiota normal y 9 muestras clasificadas como microbiota normal fueron categorizadas como VB.

Todas las muestras fueron analizadas utilizando oligonucleótidos y sondas diseñados para la detección específica de *Mobiluncus* spp. Se obtuvo amplificación positiva en 26 muestras, con un rango de valores de Ct entre 19 y 34, y en 28 muestras con un rango de Ct entre 24 y 37.

Además, se analizaron 35 muestras (21 clasificadas como VB y 14 como microbiota normal) con oligonucleótidos y sondas específicas para *Megasphaera* spp. y BVAB-2. De las muestras clasificadas como VB, 7 presentaron amplificación positiva para ambos microorganismos, mientras que, de las clasificadas como microbiota normal, 2 resultaron positivos para *Megasphaera* spp. y 1 para BVAB-2.

Los resultados detallados de este análisis se presentan en la Tabla 33, que muestra la presencia de *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* spp. y BVAB-2 en las diferentes muestras analizadas.

Tabla 33. Resultados del análisis de *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* spp. y BVAB-2 en muestras clasificadas como VB y microbiota normal.

	VB (n = 37)		Microbiota normal (n = 34)	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
<i>Mobiluncus</i> spp.	26 (70.3%)	11 (29.7%)	28 (82.4%)	6 (17.6%)
	VB (n = 21)		Microbiota normal (n = 14)	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
<i>Megasphaera</i> spp.	7 (33.3%)	14 (66.7%)	2 (14.3%)	12 (85.7%)
BVAB-2	7 (33.3%)	14 (66.7%)	1 (7.1%)	13 (92.9%)

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; BVAB-2, bacterias asociadas a VB tipo 2

Ante estos resultados, se decidió realizar un análisis adicional de las muestras que presentaron discrepancias entre el método de referencia (Nugent) y el algoritmo diseñado, con el fin de refinar la precisión del algoritmo (Tabla 34). Todas las muestras analizadas presentaron amplificación positiva para *Lactobacillus* spp., lo que confirma su presencia en ambas condiciones.

Tabla 34. Resultados del análisis de *F. vaginae*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Megasphaera* spp y BVAB-2 para las muestras discrepantes.

Nugent	<i>G. vaginalis</i>		<i>F. vaginae</i>		<i>Megasphaera</i> spp.		BVAB-2		<i>Mobiluncus</i> spp.	
	Pos	Ct	Pos	Ct	Pos	Ct	Pos	Ct	Pos	Ct
VB (n = 11)	7 (63.6%)	21-28	3 (27.3%)	26-28	0	-	0	-	8 (72.7%)	23-32
MN (n = 9)	9 (100%)	14-25	5 (55.6%)	15-28	1 (11.1%)	17	1 (11.1%)	16	4 (44.4%)	24-31

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; Pos, positiva; MN, microbiota normal; BVAB-2, bacterias asociadas a VB tipo 2.

Las muestras clasificadas como microbiota normal según el método de Nugent presentaron altas concentraciones de *G. vaginalis* y *F. vaginae*, e incluso amplificación en un caso de *Megasphaera* spp. y BVAB-2, lo que llevó a su clasificación como VB en el algoritmo propio. Por otro lado, las muestras clasificadas como VB por Nugent mostraron una menor tasa de resultados positivos y valores de Ct más bajos tanto para *G. vaginalis* como para *F. vaginae*. Aunque *Mobiluncus* spp. amplificó en un mayor número de muestras positivas para VB en comparación con microbiota normal, los valores de Ct fueron muy similares en ambos casos.

4.5. PCR a tiempo real

Para la optimización de las condiciones de qPCR, se establecieron las siguientes especificaciones:

- La combinación final de oligonucleótidos y sondas TaqMan para cada microorganismo debe presentar una sensibilidad analítica igual o inferior a 10 copias/μl (50 copias/reacción).
- Especificidad del 100%
- Punto de corte de Ct establecido en 40 ciclos.
- Volumen final de mezcla de PCR ajustado a 20 μl por tubo.

Inicialmente, se optimizó el ensayo en formato *singleplex* (qPCR individual para cada diana), para determinar las condiciones óptimas de oligonucleótidos y sondas que permitieran una amplificación eficiente y específica de cada microorganismo. Una vez definidas estas condiciones y seleccionados los oligonucleótidos y sondas a utilizar, se procedió al ajuste de la PCR en formato *multiplex* (qPCR múltiple). En esta etapa, se realizaron numerosas pruebas variando las concentraciones de oligonucleótidos y sondas para cada diana, hasta lograr que todas alcanzaran una sensibilidad similar igual o inferior a 10 copias/μl. Se probaron concentraciones de cebadores entre 100 y 800 nM, y de sondas entre 60 y 500 nM. El objetivo fue identificar las condiciones en las que la señal de fluorescencia alcanzara al menos 3000-5000 unidades de fluorescencia relativa (RFU). Para ello, se utilizaron muestras control cuantificadas. Del mismo modo, se ajustaron las concentraciones de oligonucleótidos y sondas para el control interno, asegurando que también cumplieran con los requisitos de sensibilidad y especificidad establecidos.

La optimización de la qPCR también incluye el ajuste del programa de amplificación. Se tomaron como referencia las condiciones recomendadas por el fabricante del *master mix*, y se ajustó la temperatura de alineamiento (*annealing*) en función de los oligonucleótidos diseñados. Se ensayaron temperaturas de alineamiento en un rango de 55 a 64 °C para identificar aquella que ofreciera la mejor combinación de sensibilidad y especificidad.

Dado que los termocicladores convencionales cuentan con cinco canales de detección y se requiere la identificación de más de cinco dianas, se decidió dividir la detección de los distintos microorganismos en dos tubos de reacción. Esta estrategia permite asignar cada canal del equipo a la detección de un microorganismo específico, optimizando la capacidad del termociclador y minimizando posibles interferencias entre las reacciones.

4.5.1. Optimización detección del género *Candida*

Para la optimización del diseño para la detección de *Candida*, se analizaron muestras clínicas cedidas por el Hospital Universitario Lozano Blesa y el Hospital Universitario Virgen de las Nieves

(Grupo 1). Para investigar las discordancias, se utilizaron tres métodos complementarios: cultivo, qPCR con un test comercial y secuenciación.

4.5.1.1. Especies *Candida no albicans*

En las muestras del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, se observaron 7 resultados discordantes. En estas 7 muestras, el método en evaluación no logró detectar *Candida no albicans*.

Para analizar estas discordancias, se incluyeron como controles dos muestras previamente identificadas de forma precisa por ambos métodos: una positiva para *C. albicans* (nº muestra 41223183) y otra positiva para *Candida spp.* (nº muestra 41223244). En todos los casos, se verificó la amplificación de la diana ARNsa P humana, lo que descartó la posibilidad de degradación de las muestras como causa de los resultados discordantes.

Caracterización por cultivo

Todas las muestras fueron sembradas inicialmente en placas de agar sangre, y las colonias obtenidas fueron subcultivadas en agar Sabouraud Dextrose Chloramphenicol. Posteriormente, se realizó PCR directamente a partir de las colonias. Tras este análisis, se llevaron a cabo cultivos adicionales en medio RPMI para completar la caracterización.

Los resultados obtenidos tras la incubación incluyen tanto la observación macroscópica de las colonias en las placas como las características detectadas mediante observación al microscopio. Además, se incluyen los resultados previamente obtenidos con el test de rutina del hospital y los obtenidos con el test en evaluación, para una comparación integral de todos los métodos (Tabla 35).

Las muestras utilizadas como control garantizaron la verificación de todos los procedimientos realizados. La caracterización de estas muestras reportó el mismo resultado, no detectándose *Candida no albicans* en ningún caso.

Caracterización por otra PCR

Para descartar que las especies de *Candida no albicans* no detectadas fueran *C. glabrata* o *C. krusei*, se analizaron las colonias obtenidas con el test BIOGX *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Trichomonas vaginalis* Open System PCR Reagents. En todos los casos se obtuvo el mismo resultado que con el test en evaluación.

Tabla 35. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras discrepantes, incluyendo las muestras utilizadas como control. Se muestran los resultados de PCR obtenidos con el método de referencia y el test en evaluación, los resultados de los diferentes cultivos y los resultados de la PCR de colonias, métodos realizados para analizar las discrepancias.

	Allplex Vaginitis Screening assay		Test en evaluación			Cultivo en agar sangre		Resultado siembra agar Sabouraud Dextrose Chloramphenicol	Resultado PCR de colonias	Cultivo RPMI
Nº muestra	<i>C. albicans</i> (Ct)	<i>Candida</i> otros ¹ (Ct)	<i>C. albicans</i> (Ct)	<i>C. krusei/ C. glabrata</i> (Ct)	<i>Candida</i> spp. ² (Ct)	Observación placa	Observación al microscopio			
41223183	26	ND	24.27	ND	ND	Colonias blancas con forma estrella	Levaduras forma de huevo	Colonias forma estrella	ALB	ALB
41298147	30,6	37	23.20	ND	ND	Colonias blancas redondas con aspecto cremoso	Levaduras	Colonias redondas	ALB	ALB
41300599	25	34	24.43	ND	ND	Colonias blancas con forma estrella	Levaduras	Colonias forma estrella	ALB	ALB
41300757	27	33	24.26	ND	ND	Colonias blancas redondas y con forma de estrella	Levaduras	Estría redonda: colonias redondas	ALB	ALB
								Estría estrella: colonias redondas y alguna estrella	ALB	ALB
41223250	29	33	24.27	ND	ND	Colonias blancas redondas	Levaduras	Colonias redondas	ALB	ALB
41223251	ND	39	ND	ND	ND	Colonias grandes, grisáceas con aspecto mucoso	Proteo/enterobacteria	No se siembra por ausencia de levaduras	-	-
41300758	ND	31	ND	ND	ND	No crecimiento	-	No se siembra por ausencia de levaduras	-	-
41258821	ND	31	ND	ND	ND	Colonias redondas	Bacterias; no levaduras	No se siembra por ausencia de levaduras	-	-
41223244	ND	25	ND	ND	23.21	Colonias redondas	Levaduras	Colonias redondas	NO ALB	NO ALB

¹ *Candida* otros incluye la detección de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*.

² *Candida* spp.: incluye la detección de *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.

Abreviaturas: ND, no detectado; ALB, *C. albicans*.

4.5.1.2. Especie *C. albicans*

En el análisis de muestras positivas para *C. albicans* provenientes del Hospital Universitario Lozano Blesa, se identificaron 5 muestras positivas en cultivo que no fueron detectadas mediante la PCR diseñada. Para determinar si esta discrepancia se debía a un problema en el diseño de los oligonucleótidos o a la conservación de las muestras, se decidió enviar estas muestras a secuenciación.

Las 5 muestras, junto con una muestra control positiva para *C. albicans*, fueron amplificadas por qPCR utilizando oligonucleótidos específicamente diseñados para secuenciación. Posteriormente, los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar el tamaño del fragmento amplificado. Una vez confirmado el resultado, el producto de PCR fue purificado y enviado al servicio de secuenciación.

En todas las muestras, se obtuvo un resultado positivo de amplificación, confirmando la presencia de un fragmento entre 300 y 400 pb (Figura 22).

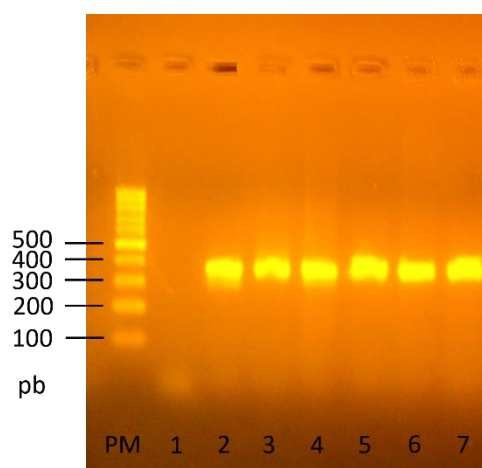


Figura 22. Electroforesis en gel de Agarosa de los productos de PCR de las 6 muestras analizadas. En la imagen se muestra la muestra control (2) junto con las 5 muestras discrepantes (3-7). La muestra 1 corresponde al control negativo del ensayo donde no se observó banda ni amplificación. Abreviaturas: PM, marcador de peso molecular de 100 pb.

Tras recibir los resultados de la secuenciación, se procedió al análisis detallado de las secuencias obtenidas. En la Figura 23 se muestran los alineamientos de las secuencias derivadas de las 5 muestras junto con la secuencia de referencia consensuada para *C. albicans*. El análisis de estos alineamientos permitió identificar la presencia de mutaciones puntuales en las regiones de unión de los oligonucleótidos y sondas diseñados para la detección de esta especie.

En base a estos hallazgos, se llevó a cabo un rediseño estratégico de los oligonucleótidos y sondas, considerando las mutaciones detectadas. Este rediseño permitió corregir las

deficiencias del diseño original, solucionando el problema de detección de *C. albicans* en las muestras afectadas.

Muestra.3	-----AATACCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	42
Muestra.2	-----CGTACTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	42
Muestra.4	-----GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	41
Muestra.5	-----CATGCCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	45
Referencia	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	60
Muestra.1	-----TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA	40
	: * *****	
Muestra.3	ATATGAATGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	102
Muestra.2	ATATGAATGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	102
Muestra.4	ATATGAATGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	101
Muestra.5	ATATGAATGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	105
Referencia	ATATGAATGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	120
Muestra.1	ATATGAA-TTCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT	99
	***** * *****	
Muestra.3	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGCCTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	162
Muestra.2	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGCGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	162
Muestra.4	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGCGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	161
Muestra.5	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGCGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	165
Referencia	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGCCTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	180
Muestra.1	ATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGCGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTT	159
	***** * *****	
Muestra.3	GAGCA-ATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	221
Muestra.2	GAGCA-ATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	221
Muestra.4	GAGCA-ATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	220
Muestra.5	GAGCA-ATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	224
Referencia	GAGCA-ATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	239
Muestra.1	GAGCGAATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGAC	219
	. **	
Muestra.3	A-ATGGCTTAGGTCTAACCAAAAAACA-TTGCTTGCGGCGGTGGTAACGTCTACCACGTAT	279
Muestra.2	A-ATGGCTTAGGTCTAACCAAAAAACATTCGCTTGCGGC---GGTAACGTCTACTACGTAT	277
Muestra.4	A-ATGGCTTAGGTCTAACCAAAAAAC-ATTGCTTGCGGC---GGTAACGTCTACTACGTAT	275
Muestra.5	A-ATGGCTTAGGTCTAACCAAAAAAC-ATTGCTTGCGGC---GGTAACGTCCACCACGTAT	279
Referencia	A-ATGGCTTAGGTCTAACCAAAAAAC-ATTGCTTGCGGC---GGTAACGTCTACCACGTAT	294
Muestra.1	GAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAACTATTGCTTGCGGC---GGTAACGTCTACTACGTAT	276
	. ***** * *****	
Muestra.3	ATCTTCAAAC-TGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACATAAGCATATCAATA	338
Muestra.2	ATCTTCAAACTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCTAAGCATATCA---	334
Muestra.4	ATCTTCAAAC-TGACCTCAAATCAGGTAGGCTACCGCTGAACCTAAGCTTATCAAAA	334
Muestra.5	ATCTTCAAACTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGAACCGCTGAACCTAAGCATATCAATA	339
Referencia	ATCTTCAAACTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCTAAGCATATCAAWA	354
Muestra.1	ATCTTCAAACTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCTAAGCATATCAATA	336
	***** ***** . :*****:*****:*****	

Figura 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas de las 5 muestras discordantes para *C. albicans* en comparación con la secuencia de referencia. Los asteriscos (*) indican posiciones donde todas las secuencias coinciden. Las posiciones marcadas con un punto (.) o dos puntos (:) representan coincidencias parciales o sustituciones conservativas, respectivamente. Los espacios en blanco indican posiciones de discordancia.

4.5.2. Master mix para la qPCR

Se evaluaron diversos *master mixes* de diferentes casas comerciales para identificar el que ofreciera los mejores resultados en términos de sensibilidad, especificidad y estabilidad. Además, uno de los requisitos fundamentales era que el mix seleccionado fuera apto para liofilización. Para cumplir con estos criterios, se llevaron a cabo pruebas exhaustivas con productos de las marcas Promega, New England Biolabs, Apto-Gen y Meridian Bioscience.

En las etapas iniciales del diseño del test, se comenzó la optimización utilizando el *master mix* de Promega. Esta elección se basó en la experiencia previa con este producto, que había

demostrado resultados consistentes de sensibilidad y especificidad. Paralelamente, se evaluó el mix de New England Biolabs, explorando su desempeño en comparación con el mix de Promega. Conforme avanzaba el diseño del test, se incorporaron a las pruebas los *master mixes* de Apto-Gen y Meridian Bioscience. Para determinar la mejor opción, se analizaron los siguientes parámetros: sensibilidad, la intensidad de señal o fluorescencia (tanto en fresco como en liofilizado) y la especificidad de la amplificación.

En la comparación directa entre los diferentes *master mixes*, se descartaron tanto el producto de Promega como el de New England Biolabs. Aunque inicialmente se obtuvieron buenos resultados, estos mixes mostraron valores de fluorescencia inferiores y una menor sensibilidad, con amplificaciones que se retrasaban aproximadamente 2 ciclos de Ct en comparación con las otras alternativas. Tras descartar los *master mixes* de Promega y New England Biolabs, se centraron los experimentos en la comparación entre Apto-Gen y Meridian Bioscience. Se procedió a la realización de pruebas para evaluar tres variantes de los *master mixes* de Meridian Bioscience con el objetivo de identificar la opción más adecuada.

En el punto de realización de estos ensayos, el mix de PCR se componía de dos tubos de reacción: tubo A, que incluye la detección de *G. vaginalis*/*F. vaginae* en el canal FAM, *Lactobacillus* spp. en el canal HEX, *T. vaginalis* en Cy5 y el control interno en Texas red; y, tubo B que incluye *C. glabrata* en FAM, *C. albicans* en HEX, *C. krusei* en Cy5 y el control interno en Texas red.

En el análisis del control positivo del test, se observaron resultados muy similares entre los *master mixes* MM2 y MM3, con una diferencia máxima de 0.4 Cts para todas las dianas evaluadas. En contraste, el *master mix* MM4 presentó mayores diferencias al compararse con MM2 y MM3. Las diferencias más notables se identificaron en las dianas *Lactobacillus* y del control interno. Para la diana *Lactobacillus*, el MM3 mostró una ventaja en sensibilidad, amplificando 2.2 Cts antes que MM4. En comparación, el MM2 superó a MM4 en 1.7 Cts, mostrando también mayor sensibilidad en esta diana. Para la diana del control interno, el MM4 demostró la mejor sensibilidad, con amplificaciones 1.8-2 Cts antes que MM2 y MM3. La diferencia entre MM4 y MM2 en esta diana osciló entre 1.5 y 1.8 Cts, favoreciendo nuevamente al MM4.

En el análisis específico por diana, el MM3 se destacó como más sensible y consistente en las dianas *G. vaginalis*/*F. vaginae* y *Lactobacillus*. El MM4 mostró amplificaciones más tempranas en la diana del control interno en ambos tubos, además de una ligera amplificación más temprana en la diana *T. vaginalis*, aunque con diferencias mínimas. Para las dianas *C.*

glabrata, *C. albicans* y *C. krusei*, MM4 proporcionó los mejores resultados de sensibilidad, con amplificaciones más tempranas en todos los casos. En estas dianas, MM3 presentó valores promedio ligeramente más altos que MM4, pero menores diferencias entre réplicas.

Los resultados obtenidos resaltan que MM4 es el *master mix* con los mejores resultados de sensibilidad global, especialmente en las dianas del control interno y las asociadas a especies de *Candida*. MM3, aunque algo menos sensible para las dianas de las especies de *Candida*, *T. vaginalis* y el control interno, mostró resultados más consistentes entre réplicas en todas las dianas evaluadas. Finalmente, MM2 mostró peores resultados de sensibilidad en todas las dianas en comparación con los otros *master mixes*.

En la Tabla 36 se presentan los valores de Ct obtenidos para cada *master mix* y cada diana, lo que permite observar las diferencias en sensibilidad entre los *master mixes* evaluados. En la Figura 24 se muestra una comparación gráfica de los promedios de Ct para cada diana, destacando visualmente las tendencias observadas en los resultados y facilitando la interpretación de los resultados.

Tabla 36. Resultados de Ct para el control positivo con diferentes *master mixes* de Meridian Bioscience. MM2: Lyo-ready One-step RT-qPCR mix; MM3: Lyo-ready qPCR Mix; MM4: Lyo-ready dUTP 1-Step RT-qPCR virus mix.

	Valores Ct – Tubo A					Valores Ct – Tubo B			
	GV/FV	LB	CI	TV		CG	CA	CI	CK
Master mix	FAM	HEX	TEXAS	CY5	Master mix	FAM	HEX	TEXAS	CY5
MM2	28,90	29,38	29,64	30,71	MM2	28,59	28,40	29,92	28,44
MM2	28,68	29,16	29,36	30,60	MM2	28,34	28,17	29,55	28,19
MM2	28,66	29,21	29,71	30,61	MM2	28,37	28,22	29,95	28,21
MM3	28,38	28,87	29,74	30,35	MM3	28,30	28,10	29,95	28,01
MM3	28,36	28,83	30,03	30,24	MM3	28,29	28,08	30,20	28,02
MM3	28,27	28,73	29,60	30,32	MM3	28,22	28,03	29,77	27,94
MM4	28,43	30,94	28,08	29,87	MM4	28,08	27,56	28,23	27,73
MM4	28,34	30,69	28,06	29,84	MM4	28,04	27,50	28,23	27,63
MM4	28,52	31,24	27,93	29,97	MM4	28,20	27,71	27,61	27,87

Abreviaturas: GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; CI, control interno; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*.

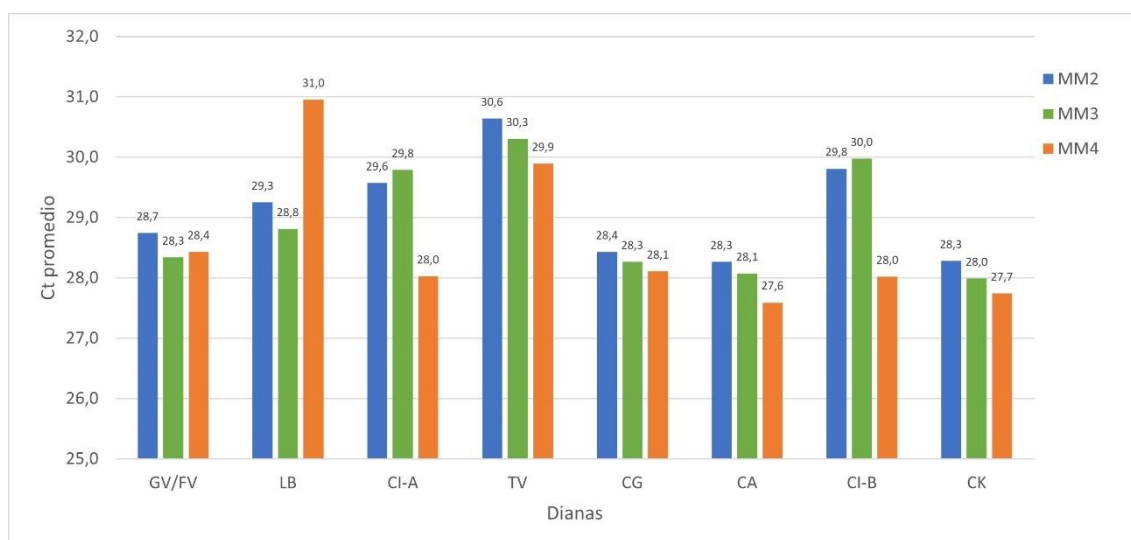


Figura 24. Comparación de valores promedio de Ct entre *master mixes* para distintas dianas.

Diagrama de barras que muestra la comparación de los valores promedio de Ct para las diferentes dianas GV/AV, LB, CI, TV, CG, CA, CK entre los tres *master mixes* (MM2, MM3, MM4).

Abreviaturas: GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; CI, control interno; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*; MM2: Lyo-ready One-step RT-qPCR mix; MM3: Lyo-ready qPCR Mix; MM4: Lyo-ready dUTP 1-Step RT-qPCR virus mix.

También se realizó una comparación de los resultados de amplificación en RFU para cada diana entre los diferentes *master mixes*, como se muestra en la Figura 25. Este análisis complementa la comparación de los valores de Ct al evaluar también la intensidad de fluorescencia generada durante la amplificación, proporcionando una visión más completa del desempeño de cada mix en términos de sensibilidad y especificidad. Se llevó a cabo una comparación de los niveles más altos de fluorescencia alcanzados por cada master mix y para cada diana.

Se observó un resultado muy similar en términos de fluorescencia entre los tres *master mixes* para la mayoría de las dianas, con algunas diferencias. En general, el MM3 presentó mayores niveles de fluorescencia en la mayoría de las dianas, salvo en las dianas control interno (A) y *C. krusei*, donde el MM4 mostró valores ligeramente superiores. En particular, para la diana *Lactobacillus*, el MM4 presentó aproximadamente la mitad de fluorescencia en comparación con el MM3, lo que se tradujo en una menor sensibilidad para la detección de esta diana. Sin embargo, para el control interno (A), el MM4 mostró un tercio más de fluorescencia que el MM3, posicionándose como el más eficiente para esta diana.

Ante los buenos resultados de sensibilidad y fluorescencia obtenidos, se seleccionó el *master mix* MM3 de la marca Meridian Bioscience para continuar con la optimización del test.

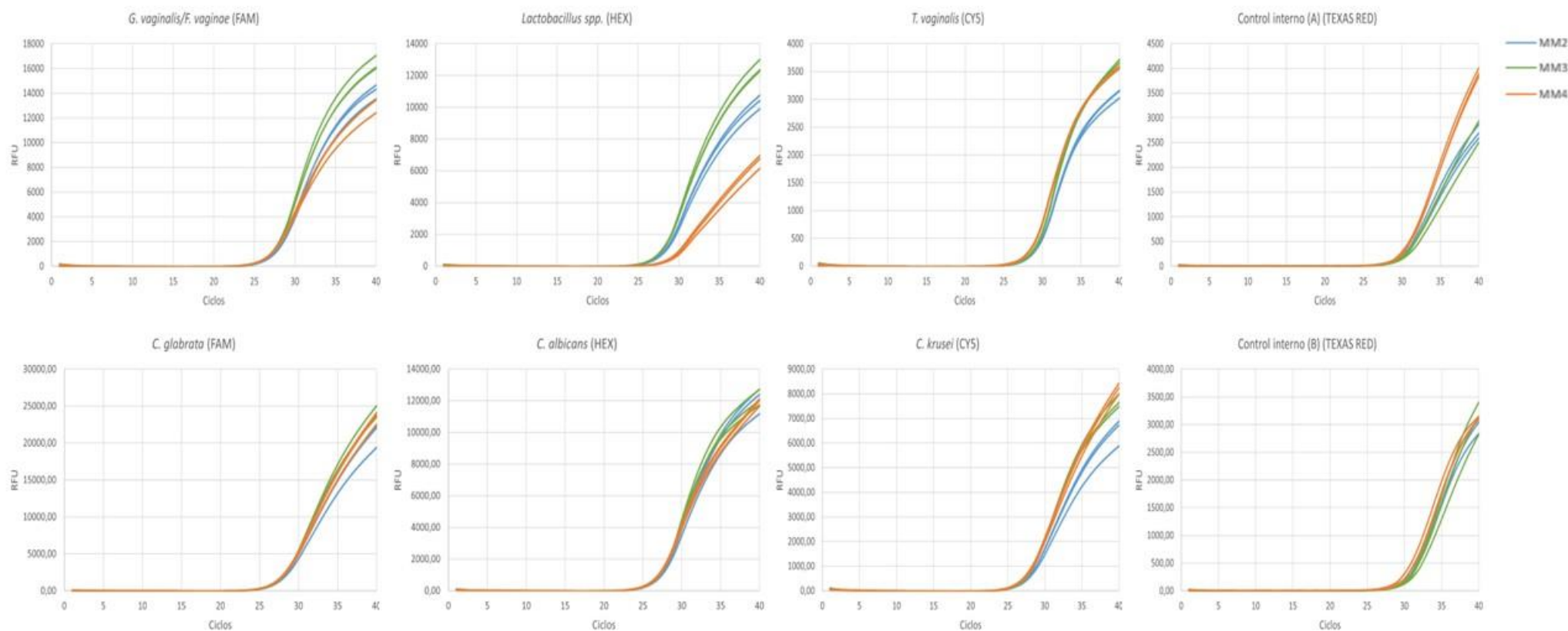


Figura 25. Comparación de fluorescencia entre los tres tipos de *master mixes* de la casa comercial Meridian Bioscience. Los resultados muestran valores de RFU muy similares entre los diferentes *master mixes* para la mayoría de las dianas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en dos casos específicos: *Lactobacillus* spp., donde el MM2 presentó aproximadamente el doble de fluorescencia en comparación con el MM3, lo que refleja una mayor intensidad de señal para esta diana; y, el Control interno (A), donde el MM3 mostró un tercio más de fluorescencia, destacándose como el más eficiente en esta diana.

Abreviaturas: RFU, unidades relativas de fluorescencia.

En este punto, el diseño del test presentaba la siguiente configuración: en el tubo A, detección de *G. vaginalis* en el canal FAM, *Lactobacillus spp.* en el canal HEX, *F. vaginae* en el canal Texas Red, *T. vaginalis* en el canal Cy5 y el control interno en el canal Q705; y en el tubo B, detección de *C. glabrata* en el canal FAM, *C. albicans* en el canal Texas Red, *C. krusei* en el canal Cy5, *Candida spp.* en el canal HEX y el control interno en el canal Q705. Se procedió a comparar el rendimiento del *master mix* de la marca Meridian Bioscience con el de la marca Apto-Gen. Para esta comparación, se analizaron los valores de Ct y los niveles de fluorescencia obtenidos a partir de tres muestras positivas correspondientes a las diferentes dianas del test, además del control positivo (Tabla 37). Este análisis permitió evaluar el desempeño relativo de ambos master mixes bajo condiciones equivalentes.

En todas las dianas, excepto en la del control interno, se obtuvo mejor sensibilidad y amplificación más temprana con el MM3. Sin embargo, la diana del control interno mostró un comportamiento variable dependiendo de la muestra analizada. Esta variabilidad se atribuye a que su concentración en la mezcla de reacción es menor, con el objetivo de no comprometer la sensibilidad de las demás dianas en caso de un resultado positivo. Al excluir esta diana del análisis, las diferencias en Ct entre los *master mixes* oscilaron entre 0.3 y 3.4 Cts, siendo las mayores diferencias observadas en las dianas *T. vaginalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. El control interno presentó resultados menos consistentes. En algunas muestras se logró mejor amplificación con el MM3, mientras que en otras el MM1 amplificó antes.

Tabla 37. Resultados de Ct para cada muestra y el control positivo con el *master mix* de Meridian Bioscience y Apto-Gen. MM1: Apto-Gen; MM3: Meridian Bioscience.

Muestra	MM3 - TUBO A					MM1 - TUBO A				
	GV	LB	FV	TV	CI	GV	LB	FV	TV	CI
	FAM	HEX	TEXAS	CY5	Q705	FAM	HEX	TEXAS	CY5	Q705
CP	31,37	28,58	30,06	30,22	29,71	32,98	29,30	30,97	32,21	30,07
CP	32,28	28,76	29,97	28,42	29,84	32,98	29,28	30,63	33,20	29,64
M1	35,23	N/A	34,23	N/A	34,43	38,01	N/A	35,20	N/A	34,63
M1	37,50	N/A	36,26	N/A	34,04	36,3	N/A	35,25	N/A	34,34
M2	N/A	N/A	N/A	33,96	34,12	N/A	N/A	N/A	35,15	33,01
M2	N/A	N/A	N/A	34,15	33,19	N/A	N/A	N/A	34,73	33,31
M3	N/A	34,94	N/A	N/A	36,58	N/A	35,7	N/A	N/A	35,68
M3	N/A	34,61	N/A	N/A	37,08	N/A	34,7	N/A	N/A	36,27

Continuación Tabla 37

Muestra	MM3 - TUBO B					MM1 - TUBO B				
	CG	CSPP	CA	CK	CI	CG	CSPP	CA	CK	CI
	FAM	HEX	TEXAS	CY5	Q705	FAM	HEX	TEXAS	CY5	Q705
CP	31,03	33,40	30,71	31,99	29,85	33,04	34,23	32,07	33,62	30,10
CP	31,00	33,43	31,02	31,65	29,52	32,95	33,97	32,14	33,45	29,80
M1	N/A	33,45	N/A	34,81	34,29	N/A	34,63	N/A	38,48	33,52
M1	N/A	33,52	N/A	36,09	34,10	N/A	34,35	N/A	37,36	33,71
M2	34,85	35,90	34,13	N/A	33,42	36,52	36,16	35,28	N/A	33,93
M2	35,10	35,03	34,33	N/A	33,35	36,8	35,47	34,77	N/A	33,39
M3	N/A	36,12	N/A	N/A	38,34	N/A	36,54	N/A	N/A	35,91
M3	N/A	36,20	N/A	N/A	36,19	N/A	36,29	N/A	N/A	34,30

Abreviaturas: N/A, no amplifica; CP, control positivo; M1-3, muestra 1-3; GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; CI, control interno; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*; CSPP, *Candida* spp.

Asimismo, se realizó una comparación de los resultados de fluorescencia para cada diana y cada muestra entre ambos *master mixes*, como se muestra en la Figura 26. A diferencia de la comparación realizada entre los *master mixes* de Meridian Bioscience, en este caso no se observó un patrón uniforme en los niveles de fluorescencia. En las dianas marcadas con los fluoróforos FAM y HEX, los niveles de fluorescencia fueron más altos con el MM1, lo que indica un mejor desempeño de este mix en dichas dianas. Por el contrario, en las dianas marcadas con Texas Red y Cy5, los valores de fluorescencia fueron ligeramente superiores con el MM3. En el control interno, en ambos tubos, los niveles de fluorescencia fueron similares entre los dos *master mixes*, sin diferencias significativas. Las mayores diferencias se identificaron en el control positivo, específicamente en las dianas *G. vaginalis* y *Lactobacillus* spp., donde los niveles de fluorescencia fueron 3.5 veces menores y 1.8 veces menores, respectivamente, con el MM3 en comparación con el MM1. Cabe destacar que en ningún caso se observaron resultados de amplificación inespecífica.

Finalmente, se seleccionó el *master mix* MM3 de la casa comercial Meridian Bioscience como candidato final para la mezcla de PCR, ya que presentó el mejor desempeño en términos de sensibilidad y óptimos resultados en fluorescencia, sin reportar problemas de especificidad.

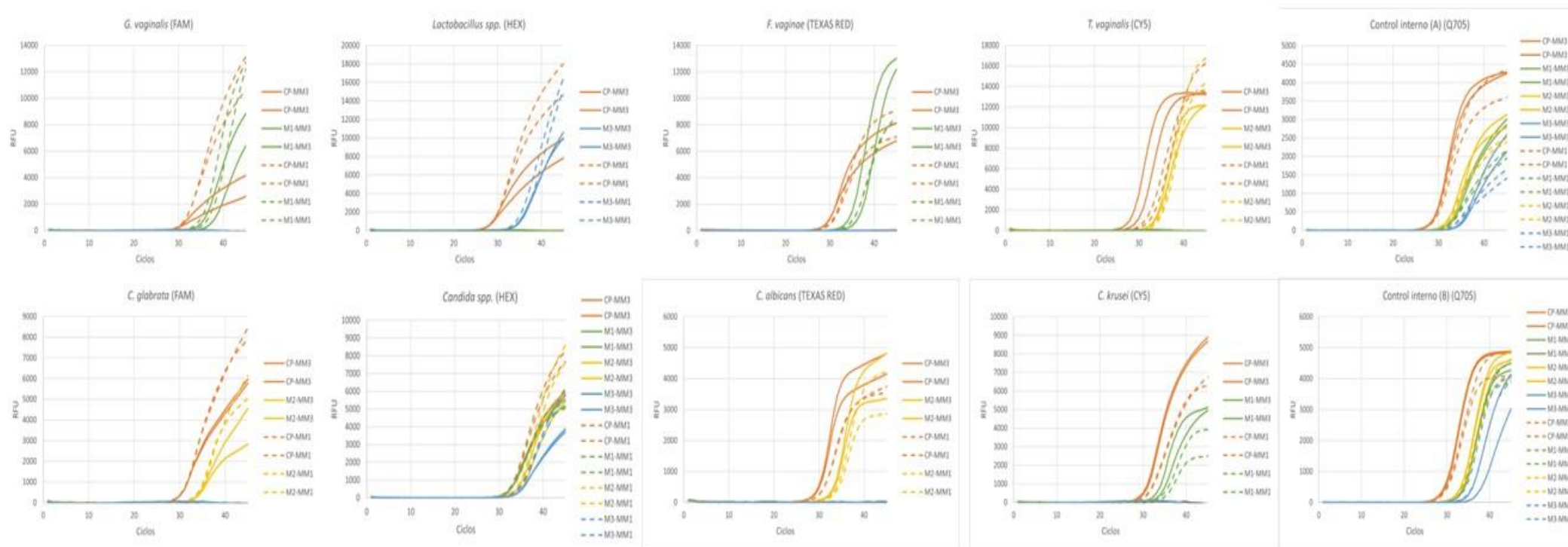


Figura 26. Comparación de fluorescencia entre los *master mixes* de Meridian Bioscience (MM3) y Apto-Gen (MM1). Se observaron diferentes niveles de RFU dependiendo de la diana y la muestra analizada, sin un patrón uniforme entre los casos. Las diferencias más significativas se identificaron en el control positivo, particularmente en las dianas *G. vaginalis* y *Lactobacillus* spp., donde los niveles de fluorescencia fueron 3.5 y 1.8 veces menores respectivamente con el MM3. Abreviaturas: RFU, unidades relativas de fluorescencia.

4.5.3. Control interno del kit

Desde los primeros diseños, se propuso la inclusión de un control interno en la mezcla de reacción de qPCR para asegurar la calidad tanto del montaje del ensayo como del proceso de amplificación. Como control, se consideró el uso del bacteriófago MS2, un microorganismo exógeno a las infecciones a estudio. Sin embargo, tras el diseño y optimización de esta diana en ensayos de qPCR, tanto en *singleplex* como en *multiplex*, y revisión bibliográfica, se decidió reemplazar este control. Como alternativa, se seleccionó la inclusión de un control interno endógeno, considerando el gen *ARNsa P* humano y el gen *B-globina* como opciones, debido a su amplio uso como genes control (*housekeeping genes*) en ensayos moleculares [128,129]. Este cambio no solo permite verificar la precisión del montaje y la amplificación, sino también controlar la calidad de la toma de muestra, su transporte, procesamiento y la extracción del material genético.

Se estudió la sensibilidad y especificidad de ambos controles y se obtuvo un resultado muy equivalente. Por ser más ampliamente utilizado en el tipo de muestra a estudio, se decidió incluir el gen *ARNsa P humano*. La inclusión de este gen implicó el diseño de oligonucleótidos y sondas específicos para su detección y la consecuente optimización de la diana en la mezcla de qPCR.

Se evaluó también la posibilidad de incluir en cada tubo de reacción un control diferente, en un tubo el bacteriófago MS2 y en el otro tubo el gen *ARNsa P* humano. Sin embargo, se concluyó que el uso de *ARNsa P* humano en los dos tubos era un indicador más robusto para verificar tanto el montaje del ensayo como la posible presencia de inhibidores en la muestra, que podrían afectar negativamente la reacción.

Finalmente, se optimizó la amplificación del control interno en ambos tubos de reacción, ajustando las condiciones para evitar que esta amplificación compitiera con las otras dianas incluidas en el test, con el objetivo de asegurar que la detección del gen *ARNsa P* humano permita el control de la muestra y el proceso sin interferir en la sensibilidad.

4.5.4. Condición final

Para la composición final del test, se seleccionó el *master mix* de la casa comercial Meridian Bioscience a concentración 1x, ya que demostró un desempeño óptimo en términos de sensibilidad y especificidad.

La reacción de qPCR se optimizó para un volumen final de 20 µl. En el proceso de ajuste de sensibilidad en *multiplex*, se evaluaron concentraciones de 100 a 800 nM para los oligonucleótidos y de 60 a 500 nM para las sondas TaqMan, hasta lograr la configuración más

eficiente para la detección precisa de todas las dianas. La concentración final de oligonucleótidos y sondas optimizada para el test Vaginal panel realtime PCR kit se detalla en la Tabla 38.

Tabla 38. Concentración final de oligonucleótidos y sondas TaqMan en la mezcla de qPCR para el test Vaginal panel realtime PCR kit.

Microorganismo	Componente	Concentración (nM)
<i>G. vaginalis</i>	Oligonucleótidos	400
	Sonda TaqMan	100
<i>F. vaginae</i>	Oligonucleótidos	400
	Sonda TaqMan	80
<i>Lactobacillus</i> spp.	Oligonucleótidos	400
	Sonda TaqMan	300
<i>T. vaginalis</i>	Oligonucleótidos	500
	Sonda TaqMan	300
<i>C. albicans</i>	Oligonucleótidos	800
	Sonda TaqMan	350
<i>C. glabrata</i>	Oligonucleótidos	600
	Sonda TaqMan	350
<i>C. krusei</i>	Oligonucleótidos	600
	Sonda TaqMan	300
<i>C. parapsilosis</i>	Oligonucleótidos	600
	Sonda TaqMan	80
<i>C. tropicalis</i>	Oligonucleótidos	600
	Sonda TaqMan	100
<i>C. dublinensis</i>	Oligonucleótidos	600
	Sonda TaqMan	100
Control interno	Oligonucleótidos	80
	Sonda TaqMan	100

Una vez ajustada la mezcla de qPCR, se procedió a la liofilización de la misma, con el objetivo de mejorar la conservación del producto y facilitar su uso. El mix liofilizado fue diseñado para reconstituirse con 15 µL de una solución de reconstitución, a la que se le añaden 5 µL de muestra (ADN purificado) para completar el volumen total de reacción.

La detección y diferenciación de cada uno de los microorganismos se distribuye en dos tubos de reacción: VIRCELL VAG RT-PCR MIX A (tubo A) y VIRCELL VAG RT-PCR MIX B (tubo B). En el tubo A se incluyen los oligonucleótidos y sondas para la detección de *G. vaginalis* (marcada con el fluoróforo FAM), *Lactobacillus* spp. (HEX/VIC), *A. vaginae* (Texas Red/ROX) y *T. vaginalis* (Cy5), mientras que en el tubo B se incluyen los oligonucleótidos y sondas para la detección y diferenciación de las principales especies de *Candida*: *C. albicans* (Texas Red/ROX), *C. glabrata* (FAM), *C. krusei* (Cy5) y *Candida* spp. (HEX/VIC). Además, en cada uno de los tubos se incluyen oligonucleótidos y sondas para la detección del control interno, gen *ARNsa P* humano, marcado con el fluoróforo Quasar 705.

El control positivo del test fue formulado utilizando gblocks sintéticos para cada una de las dianas específicas del test y un plásmido sintético para la diana ARNsa P humana, en un volumen final de 100 μL (Tabla 39). Este control está diseñado para permitir la amplificación de todas las dianas incluidas en el test. Para mejorar su conservación, el control positivo también se proporciona en formato liofilizado. Durante su desarrollo, se realizaron pruebas con distintos adyuvantes hasta lograr optimizar la mezcla para obtener un resultado óptimo en el proceso de liofilización.

Tabla 39. Componente y concentración del control positivo del test.

Componente	Concentración
gblockGVA-gC	5e-8 ng/ μL
gblockAVA-gC	5e-8 ng/ μL
gblockLACT-gC	5e-7 ng/ μL
gblockTV2-G3HP2	2,5e-6 ng/ μL
gblockCGLA-gC	1e-9 ng/ μL
gblockCALB-gC	5e-7 ng/ μL
gblockCKRU-gC	1e-9 ng/ μL
gblockCPARA-gC	2,5e-7 ng/ μL
RNAseP_pUC57	5e-5 ng/ μL
Adyuvante 1	9%
Adyuvante 2	1%
Tris-EDTA pH 7	csp.

Abreviaturas: csp, cantidad suficiente para completar el volumen de reacción.

El control negativo del test está formulado en un volumen final de 200 μL y se compone exclusivamente de agua desionizada. Este control tiene como propósito fundamental monitorizar posibles contaminaciones, ya sea de los reactivos utilizados o del entorno durante la preparación y ejecución del ensayo. Su inclusión es crucial para garantizar la fiabilidad de los resultados, ya que la ausencia de amplificación en este control confirma la integridad de las condiciones experimentales y la ausencia de contaminantes que puedan interferir en el análisis.

El programa de amplificación optimizado se presenta en la Tabla 40. Las sondas utilizadas en el test están marcadas con los fluoróforos FAM, HEX, Texas Red, Cy5 y Quasar 705, lo que requiere que los ensayos de qPCR se realicen en un termociclador que disponga de al menos cinco canales de detección para permitir la correcta lectura de todos los fluoróforos.

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizó el sistema CFX96™ Real-Time System. Este equipo fue seleccionado por su capacidad para manejar configuraciones complejas y su compatibilidad con los fluoróforos utilizados en el test.

Tabla 40. Programa de amplificación optimizado para reacción de qPCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	3 minutos
45	95 °C	15 segundos
45	58 °C	45 segundos (lectura fluorescencia)

4.6. Métodos de extracción

Durante el diseño y la optimización del test para validar los métodos de extracción disponibles, se analizaron muestras clínicas caracterizadas mediante los métodos rutinarios de cada hospital. Dado que, en la mayoría de los casos, el método de referencia era el cultivo, no fue posible realizar una comparación directa con los resultados de amplificación. La comparación se llevó a cabo utilizando criterios de sensibilidad y especificidad para cada microorganismo entre el método de extracción y la qPCR. Los resultados de la extracción se consideraron óptimos cuando se detectaban correctamente los microorganismo objetivo.

4.6.1. Comparación Hain Lifescience, PCR BIO y TANBead

Se evaluó el rendimiento de los kits de extracción de Hain Lifescience, PCR BIO y TANBead utilizando muestras de exudado vaginal para la detección de los distintos microorganismos.

Se comparó el número de resultados positivos y el promedio del valor de Ct para la detección de 20 muestras recogidas en paralelo en los medios Deltaswab Amies y DeltaSwab ViCUM®, procesadas con los tres métodos de extracción. Para este ensayo se utilizaron las muestras del Grupo 2 del Hospital Universitario Vall d’Hebron.

Los métodos TANBead y Hain Lifescience mostraron un rendimiento muy similar para las tres dianas, obteniendo resultados equivalentes en cuanto al número de positivos y diferencias menores a 1.3 Cts, tanto entre los medios de recolección como entre los métodos utilizados. En contraste, el método PCR BIO presentó una mayor variabilidad en los valores de Ct y, en algunos casos, no detectó el microorganismo objetivo. En términos de detección, se obtuvieron 15/20 y 19/20 muestras positivas para *G. vaginalis*/*F. vaginae* en los medios DeltaSwab ViCUM® y Deltaswab Amies, respectivamente. Para *Candida*/*T. vaginalis*, se detectaron 10/20 muestras en el medio DeltaSwab ViCUM® y 14/20 en el medio Deltaswab Amies. En cuanto a las diferencias

en los valores de Ct, entre los medios de recolección se observó una diferencia máxima de 1.3 ciclos. Sin embargo, al comparar entre los métodos de extracción, las diferencias oscilaron entre 3 y 5.7 Cts, dependiendo de la diana evaluada (Tabla 41).

Tabla 41. Comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos de extracción y entre los dos medios de recogida Deltaswab Amies y DeltaSwab ViCUM®. En el caso de *Lactobacillus* spp., el número de total de muestras fue 19 puesto que una de las muestras no presentaba presencia de este microorganismo. A: TANBead; B: PCRBIO; C: Hain Lifescience.

Medio transporte	Nº muestras positivas			Nº muestras positivas			Diferencia de Ct entre medios			Diferencia de Ct entre métodos					
	DeltaSwab ViCUM®			Deltaswab Amies						DeltaSwab ViCUM®			Deltaswab Amies		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A-B	A-C	B-C	A-B	A-C	B-C
Kit de extracción															
GV/FV	20	15	20	20	19	20	0,7	1,3	0,3	3,9	0,4	4,0	3,5	0,5	3,0
LB	19	19	19	19	19	19	0,7	0,6	0,4	4,5	0,2	4,3	4,6	1,3	3,3
Candida/TV	20	10	20	20	14	20	0,7	0,5	0,3	3,1	0,9	4,2	4,4	0,6	5,7

Abreviaturas: GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; TV, *T. vaginalis*; Ct, umbral de ciclo de amplificación.

Dado que *T. vaginalis* es un protozoo cuya extracción es especialmente compleja, se decidió comparar el método PCRBIO en evaluación con el método de referencia Hain Lifescience. Esta comparación se llevó a cabo utilizando 25 muestras positivas de exudado vaginal del Hospital Universitario Lozano Blesa. Los resultados indicaron que, con el método PCRBIO, 4 muestras (TV6, TV22, TV23 y TV24) no presentaron amplificación, mientras que el método de referencia Hain Lifescience sí logró detectarlas. Además, se observó una diferencia promedio de 4 Cts entre los métodos, con un rango que osciló entre 0.2 y 7.6 Cts (Figura 27).

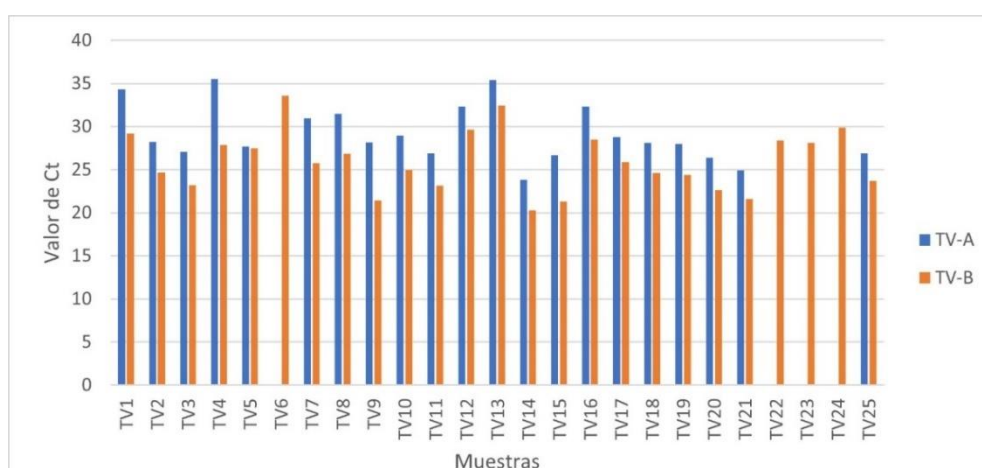


Figura 27. Comparación de los resultados de Ct para las 25 muestras de *T. vaginalis* con los métodos PCRBIO (A) y Hain Lifescience (B).

Abreviaturas: TV, *T. vaginalis*.

4.6.2. Optimización protocolo extracción

Una vez finalizado el diseño y la optimización del test, y antes de realizar la evaluación funcional interna para el marcado CE, se llevó a cabo una comparación de dos protocolos de extracción utilizando el método TANBead, con el objetivo de optimizar el tiempo de extracción de los ácidos nucleicos. Para esta evaluación, se seleccionaron 32 muestras de exudado vaginal del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Grupo 3), eligiendo específicamente muestras positivas para *Candida* y *T. vaginalis*, ya que estos microorganismos presentan mayor complejidad en su extracción.

Aunque estas muestras solo estaban caracterizadas para *Candida* y *T. vaginalis*, se realizó una comparación de los resultados de todas las dianas del test utilizando ambos métodos. Los datos mostraron una alta equivalencia entre los dos protocolos, obteniéndose los mismos resultados de amplificación, con diferencias no significativas en los valores de Ct. La mayor discrepancia observada fue de 0.8 Cts para las dianas de *Lactobacillus* spp. y *C. glabrata*. Asimismo, los niveles de fluorescencia obtenidos fueron prácticamente idénticos con ambos protocolos.

Tabla 42. Diferencias en los valores de Ct entre dos protocolos de extracción utilizando el kit TANBead. A: protocolo estándar; B: protocolo simplificado.

Tubo reacción	Diana	Promedio de diferencia en Ct
TUBO A	<i>G. vaginalis</i>	0,3
	<i>Lactobacillus</i> spp.	0,8
	<i>F. vaginae</i>	0,4
	<i>T. vaginalis</i>	0,1
	Control interno	0,5
TUBO B	<i>C. glabrata</i>	0,8
	<i>Candida</i> spp.	0,2
	<i>C. albicans</i>	0,2
	<i>C. krusei</i>	0,4
	Control interno	0,3

4.7. VAGINAL PANEL REALTIME PCR KIT

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de un test de qPCR para la detección de los principales microorganismos asociados con la VB, VVC y tricomoniasis, denominado Vaginal Panel RealTime PCR Kit. Los microorganismos seleccionados para el diagnóstico de estas

infecciones, previamente definidos, incluyen: *G. vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *F. vaginae*, *T. vaginalis*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* y *Candida* spp.

Dentro de las especies de *Lactobacillus* detectadas se encuentran *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners* y *L. gasseri*, las principales especies presentes en la microbiota vaginal. Por otro lado, el test también permite la detección de diversas especies de *Candida* spp., incluyendo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*. Este test se pretende validar para su uso en muestras de exudado vaginal de origen humano.

La detección y diferenciación de cada uno de los microorganismos se realiza en dos tubos de reacción: VIRCELL VAG RT-PCR MIX A (tubo A) y VIRCELL VAG RT-PCR MIX B (tubo B).

La composición del producto VAGINAL PANEL REALTIME PCR KIT es la siguiente:

- **qPCR MIX:** compuesto por VAG RT-PCR MIX A y VAG RT-PCR MIX B en formato predispensado y liofilizado. Para 48 reacciones.
- **Control positivo:** 1 vial de 100 µl con mezcla de ácidos nucleicos no infecciosos. Liofilizado.
- **Control negativo:** 1 vial con 200 µl de agua desionizada.
- **Solución de reconstitución del qPCR mix:** 2 viales con 1 ml de solución acuosa para reconstituir el qPCR mix.
- **Solución de reconstitución del control positivo:** 1 vial con 500 µl de solución acuosa para reconstituir el control positivo.
- **Tiras de tapones qPCR:** 12 tiras de tapones compatibles con qPCR.
- **Lámina adhesiva para qPCR:** 1 lámina adhesiva termosellable compatible con qPCR.

Los termocicladores convencionales, como el CFX96™ Real-Time System, están diseñados para placas de 96 pocillos de reacción, organizadas en un formato de 8 columnas por 12 filas. En este caso, el test utiliza dos tubos de reacción por muestra, lo que permite procesar hasta 48 muestras de forma simultánea. Las tiras estándar de PCR, compuestas por 8 pocillos cada una, facilitan una configuración modular. El producto se presenta en un formato que incluye 12 tiras de 8 pocillos divisibles, bajo la referencia RTPCR005-LPD. En la Figura 28 se muestra una imagen del test con todos sus componentes.



Figura 28. Producto Vaginal Panel RealTime PCR Kit. En la imagen se muestran los componentes principales del test: una gradilla de PCR con 12x8 tiras de tubos predispensados y liofilizados termosellados con una lámina de aluminio impermeable, viales para la solución de reconstitución del mix (con tapones amarillos), la solución de reconstitución para el control positivo (tapón marrón), el control negativo (tapón verde) y el control positivo liofilizado envasado en un sobre termosellado. Contiene además una bolsa con tiras de tapones y lámina adhesiva.

Teniendo en cuenta estas características, y considerando que el test se suministra en formato predispensado, se diseñó una configuración específica para los tubos de reacción, garantizando que la orientación de las tiras no interfiera con el montaje (Figura 29-A). Cada muestra se dispensa en dos pocillos contiguos de la tira, tal como se ilustra en la Figura 29-B.

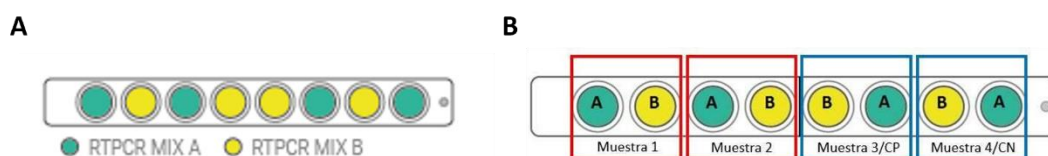


Figura 29-A. Distribución de los tubos en la tira de PCR, con alternancia entre RT-PCR MIX A (verde) y RT-PCR MIX B (amarillo), diseñada para evitar errores de orientación durante el montaje.

Figura 29-B. Ejemplo de configuración para la adición de muestras en la tira de PCR. Cada muestra se distribuye en dos pocillos contiguos: el primero asociado a RT-PCR MIX A (A) y el segundo a RT-PCR MIX B (B).

El test permite un análisis cualitativo de los microorganismos incluidos destinado para ser usado como ayuda al diagnóstico. Según las condiciones optimizadas de amplificación, se define que una muestra con un valor de Ct inferior a 40 es positiva (presencia de amplificación), mientras que una muestra sin valor de Ct o con Ct superior a 40 es negativa (ausencia de amplificación). En la Tabla 43 se muestran algunos ejemplos de posibles resultados y su interpretación.

Tabla 43. Ejemplos de posibles resultados obtenidos con el Vaginal Panel RealTime PCR Kit. En la tabla se representa la interpretación del resultado en función del resultado de amplificación obtenido para cada diana.

Resultado	RT-PCR MIX A						RT-PCR MIX B				Interpretación
	GV (FAM)	LB (HEX)	FV (Texas)	TV (Cy5)	IC (Q705)	CG (FAM)	CSPP (HEX)	CA (Texas)	CK (Cy5)	IC (Q705)	
1	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	FN G1
2	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	FN G1 y CK
3	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	FN G1 y TV
4	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	FN G2 y AV
5	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	FN G1 y CA
6	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	FN G2, AV y CA
7	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	VB G3 y AV
8	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	VB G4 y AV
9	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	VB G4 y CG
10	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	VB G4, CSPP y CA
11	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	VB G4, TV y CA
12	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	VB G4
13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Inválido

Abreviaturas: NEG, negativo; POS, positivo; GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; CI, control interno; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*; CSPP, *Candida* spp.; FN, flora normal o microbiota normal; VB, vaginosis bacteriana; G1-G4, grado 1 a 4.

El control interno se considera positivo cuando su valor de Ct es inferior a 35 en cada tubo. Si la diana de algún microorganismo está presente en altas concentraciones, esto puede interferir con la amplificación del control interno. Sin embargo, cualquier retraso o falta de amplificación del control interno no afecta la interpretación final del resultado.

Si se obtiene un resultado inválido o no concluyente, se sugiere realizar una nueva extracción de ADN a partir de la muestra original y repetir el análisis. Si el control interno no amplifica, esto podría indicar una extracción deficiente de los ácidos nucleicos o la presencia de inhibidores que afectaron la amplificación. En tal situación, se recomienda procesar una nueva muestra para garantizar resultados confiables.

Como se muestra en la Figura 28, el equipo incluye, además, un control negativo y un control positivo de amplificación. El control negativo está configurado para proporcionar un resultado negativo (sin amplificación) para todas las dianas incluidas. Este control permite monitorizar la posible contaminación de reactivos o contaminación ambiental. Por el contrario, el control positivo del test está diseñado para generar un resultado positivo (amplificación) para todas las dianas incluidas (Tabla 44). Su función es monitorizar posibles fallos de los reactivos y garantizar el correcto funcionamiento del procedimiento esencial.

Tabla 44. Resultados de amplificación para cada una de las dianas e interpretación para los controles negativo y positivo del test.

RT-PCR MIX A						RT-PCR MIX B					Interpretación
Control	GV (FAM)	LB (HEX)	FV (Texas)	TV (Cy5)	CI (Q705)	CG (FAM)	CSPP (HEX)	CA (Texas)	CK (Cy5)	CI (Q705)	
Control positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	Válido
	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Inválido
Control negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Válido
	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	Inválido

Abreviaturas: NEG, negativo; POS, positivo; GV, *G. vaginalis*; FV, *F. vaginae*; LB, *Lactobacillus* spp.; CI, control interno; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*; CSPP, *Candida* spp..

En la Figura 30 se presentan las curvas de amplificación generadas con el software del termociclador CFX96™ Real-Time System, correspondientes al control positivo, control negativo y dos muestras con interpretaciones diferentes. Estas gráficas muestran los perfiles de amplificación para cada caso.

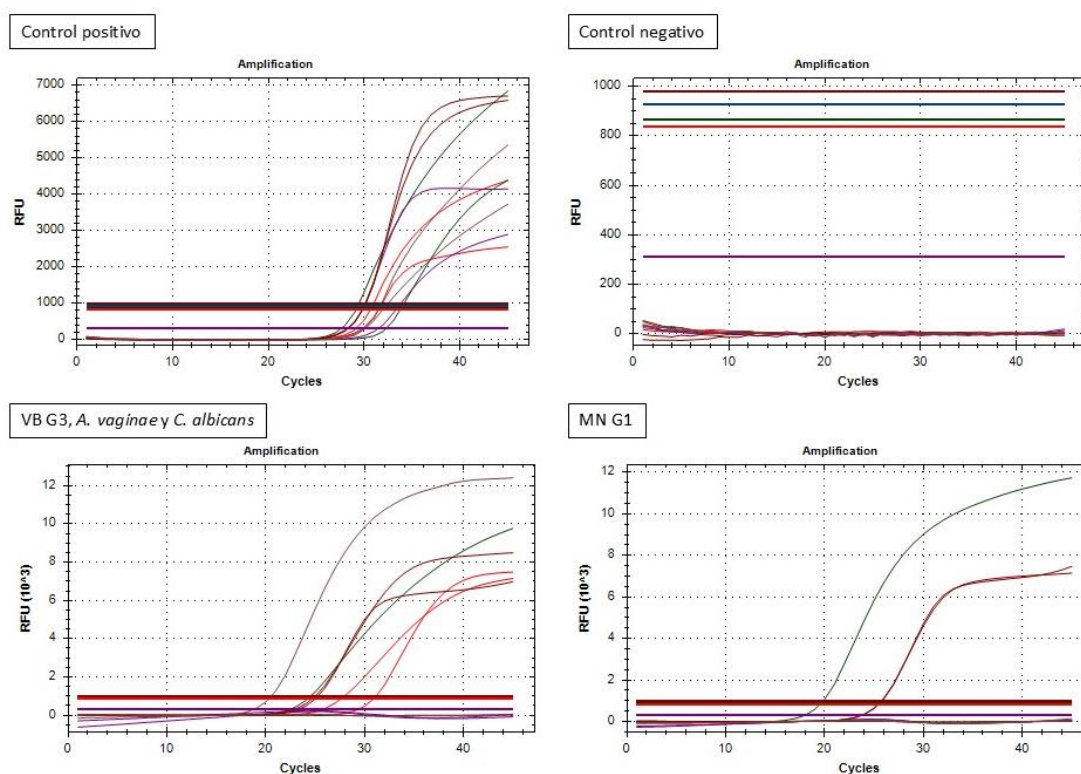


Figura 30. Curvas de amplificación generadas con el software del termociclador CFX96™ Real-Time System, correspondientes al control positivo, control negativo y dos muestras clínicas. En el control positivo se observa la amplificación de todas las dianas, mientras que en el control negativo no se detecta ninguna amplificación. La primera muestra clínica es positiva para VB (VB G3), *F. vaginae* y *C. albicans*, mostrando amplificación de los microorganismos mencionados junto con los controles internos. La segunda muestra clínica, interpretada como microbiota normal grado 1 (FN G1), presenta amplificación de *Lactobacillus* spp. y de los controles internos.

Además, se procedió a su integración en el software Vircom PCR LIS Connection para la interpretación automática de los resultados (Figura 31). Esta herramienta tiene como objetivo facilitar el análisis de resultados, dada la complejidad del test. Este asistente permite la validación de resultados para posterior conexión con el LIS. El Vircom PCR LIS Connection importa los resultados obtenidos del termociclador y los analiza aplicando las tablas de interpretación definidas. Además, incorpora el algoritmo diseñado para clasificar la muestra como VB o microbiota normal, así como en los cuatro grados establecidos. Dado que *F. vaginae* forma parte del algoritmo, y su detección podría ser clave para la selección del tratamiento, el software notifica específicamente este resultado en caso de amplificación positiva.

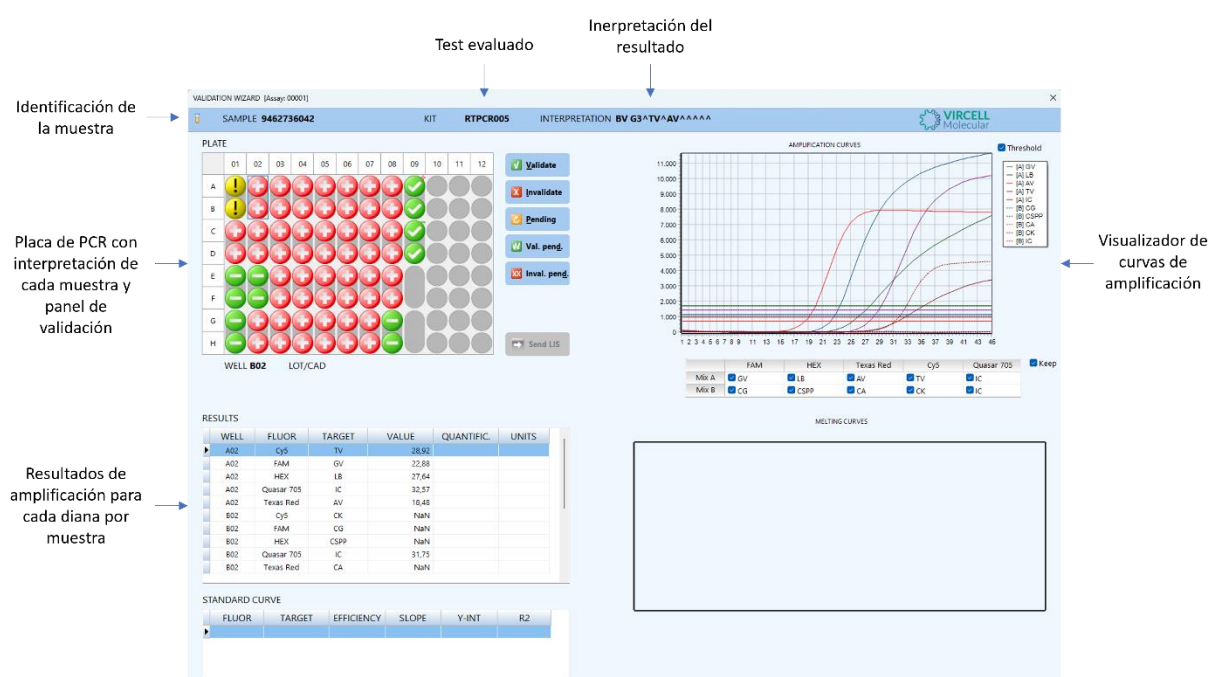


Figura 31. Asistente de validación del software Vircom PCR LIS Connection. Este incluye en el encabezado la identificación de cada muestra, test evaluado e interpretación del resultado. Asimismo, permite la visualización de la placa de PCR con la interpretación en símbolos de cada muestra, de las curvas de amplificación y de los resultados de valores de Ct obtenidos.

4.7.1. Evaluación interna

Tras completar el desarrollo del test, se procedió a su fabricación y posterior evaluación funcional. Los ensayos realizados en esta etapa tuvieron como objetivo demostrar la validez científica del método, así como su rendimiento analítico y clínico, de acuerdo con los requisitos establecidos para el marcado CE. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes ensayos: LoD, precisión, sensibilidad y especificidad clínica, reactividad cruzada, inclusividad y estabilidad.

4.7.1.1. Límite de detección

El LoD fue evaluado para cada uno de los microorganismos incluidos en el test. En la Tabla 45 se presentan las concentraciones analizadas y los resultados obtenidos para cada una de las dianas en la estimación preliminar del LoD (LoD preliminar) y en la determinación final del LoD, definida como el nivel en el que se obtiene un 95% de réplicas positivas. Se obtuvo un LoD con valores entre 0.7 y 10 copias/ μ L para todas las dianas (Tabla 46).

Tabla 45. Resultados obtenidos en la determinación del LoD. En la tabla se muestra la concentración en copias/ μ L para cada microorganismo y número de resultados positivos frente al total analizado. Se destaca el LoD obtenido para cada microorganismo.

		LoD preliminar			LoD 95%		
<i>G. vaginalis</i>	Concentración (copias/ μ L)	10	5	1	0.9	0.7	0.5
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	19/20	2/20
<i>F. vaginalis</i>	Concentración (copias/ μ L)	10	5	2	7	5	4
	Positivos/total	5/5	5/5	0/5	20/20	20/20	12/20
<i>L. crispatus</i>	Concentración (copias/ μ L)	100	50	10	4	2	1
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	8/20
<i>L. jensenii</i>	Concentración (copias/ μ L)	10	5	1	2.5	1.5	0.5
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	8/20
<i>T. vaginalis</i>	Concentración (copias/ μ L)	100	50	10	1	0.5	0.1
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	10/20
<i>C. glabrata</i>	Concentración (copias/ μ L)	10	5	2.5	4.4	2.2	1.1
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	18/20
<i>C. albicans</i>	Concentración (copias/ μ L)	20	10	5	12	10	8
	Positivos/total	5/5	5/5	1/5	20/20	20/20	15/20
<i>C. krusei</i>	Concentración (copias/ μ L)	30	20	10	10	7	5
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	19/20	14/20

		LoD preliminar			LoD 95%		
<i>C. parapsilosis</i>	Concentración (copias/μl)	10	5	1	4	3	2
	Positivos/total	5/5	5/5	2/5	20/20	20/20	15/20
<i>C. tropicalis</i>	Concentración (copias/μl)	10	5	1	2	1	0.8
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	17/20
<i>C. dubliniensis</i>	Concentración (copias/μl)	10	5	1	0.9	0.7	0.5
	Positivos/total	5/5	5/5	5/5	20/20	20/20	18/20

Tabla 46. LoD determinado para cada microorganismo. Se muestra el LoD expresado en copias/μl, copias/ml y copias/reacción.

	GV	AV	LC	LJ	TV	CG	CA	CK	CPa	CT	CD
LoD (copias/μL)	0,7	5	2	1,5	0,5	2,2	10	7	3	1	0,7
LoD (copias/mL)	700	5000	2000	1500	500	2200	10000	7000	3000	1000	700
LoD (copias/reacción)	3,5	25	10	7,5	2,5	11	50	35	15	5	3,5

Abreviaturas: GV: *G. vaginalis*; AV: *A. vaginae*; LC: *L. crispatus*; LJ: *L. jensenii*; TV: *T. vaginalis*; CG: *C. glabrata*; CA: *C. albicans*; CK: *C. krusei*; CPa: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*; CD: *C. dubliniensis*.

4.7.1.2. Precisión

Se evaluaron la repetitividad y la reproducibilidad del test mediante el análisis de las siguientes métricas de precisión: precisión intra-ensayo, precisión inter-ensayo, precisión entre días y precisión entre equipos. En la Tabla 47 se presentan los resultados del estudio de precisión, que incluyen el valor promedio de Ct, la desviación estándar (DE) y el %CV para cada una de estas métricas. Se llevaron a cabo un total de 80 mediciones por muestra.

Los resultados muestran un %CV máximo de 3.9% en los diferentes parámetros analizados, lo que indica un alto grado de consistencia en los resultados. Además, el control negativo incluido en el kit no mostró amplificación positiva en ningún caso, lo que confirma la ausencia de contaminación cruzada.

Tabla 47. Resultados del estudio de precisión. En la tabla se muestra el valor promedio de Ct obtenido del análisis de los resultados para cada muestra y diana, además de las desviaciones estándar y los porcentajes de coeficientes de variación para cada parámetro.

Muestra	Media	Precisión intra-ensayo		Precisión inter-ensayo		Precisión entre días		Precisión entre equipos	
		DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV	DE	%CV
CP – GV	31,78	0,45	1,43	0,88	2,78	0,42	1,31	0,90	2,83
CP – LB	28,98	0,29	1,00	0,18	0,61	0,04	0,12	0,34	1,18
CP – FV	30,40	0,19	0,62	0,57	1,88	0,31	1,02	0,68	2,23
CP – TV	30,22	0,52	1,70	0,34	1,13	0,30	0,98	0,69	2,27
CP – CG	31,74	0,36	1,14	0,55	1,74	0,11	0,34	0,65	2,05
CP – Cspp	33,80	0,22	0,66	0,29	0,85	0,17	0,49	0,32	0,95
CP – CA	31,45	0,28	0,88	0,75	2,40	0,41	1,30	0,90	2,87
CP – CK	32,17	0,28	0,88	0,75	2,40	0,41	1,30	0,90	2,87
M1 – GV	33,26	0,36	1,08	0,39	1,18	0,15	0,45	0,55	1,66
M1 – LB	29,52	0,17	0,58	0,28	0,94	0,45	1,52	0,56	1,88
M1 – FV	32,55	0,26	0,79	0,24	0,75	0,51	1,56	0,62	1,91
M1 – TV	31,06	0,25	0,81	0,57	1,83	0,43	1,40	0,76	2,44
M1 – CG	31,52	0,47	1,51	0,61	1,93	0,55	1,76	0,95	3,01
M1 – Cspp	31,87	0,36	1,13	0,29	0,91	0,25	0,79	0,53	1,65
M1 – CA	30,91	0,35	1,13	1,05	3,41	0,47	1,52	1,21	3,90
M1 – CK	30,94	0,51	1,59	0,66	2,04	0,53	1,65	0,99	3,07
M2 – GV	36,48	0,80	2,19	0,51	1,39	0,35	0,95	1,01	2,76
M2 – LB	34,97	0,64	1,84	0,15	0,42	0,47	1,33	0,78	2,23
M2 – FV	35,82	0,89	2,48	0,13	0,38	0,40	1,12	0,96	2,69
M2 – TV	35,53	0,36	1,01	0,58	1,63	0,25	0,70	0,73	2,04
M2 – CG	36,19	1,12	3,08	0,08	0,22	0,62	1,72	1,28	3,54
M2 – Cspp	36,67	0,76	2,07	0,39	1,06	0,04	0,10	0,85	2,32
M2 – CA	35,43	0,85	2,41	0,65	1,83	0,88	2,50	1,39	3,92
M2 – CK	35,99	0,51	1,42	0,92	2,55	0,36	1,01	1,11	3,09

Abreviaturas: CP: control positivo; M1: muestra 1; M2: muestra 2; GV: *G. vaginalis*; FV: *F. vaginae*; LB: *Lactobacillus* spp.; TV: *T. vaginalis*; CG: *C. glabrata*; CA: *C. albicans*; CK: *C. krusei*; Cspp: *C. parapsilosis*.

4.7.1.3. Reactividad cruzada, especificidad analítica

La especificidad del test fue validada mediante la evaluación de un panel de microorganismos asociados, seleccionados por su relación taxonómica y/o sindrómica con el tipo de muestra o infección analizada. Este panel incluyó los microorganismos especificados en la Tabla 24 la sección 3.14.3. del apartado de Materiales y Métodos. Los ensayos realizados confirmaron que no se producen reacciones cruzadas con ninguno de los 42 microorganismos evaluados en el panel.

Se realizó un análisis *in silico* para evaluar la especificidad del test frente a microorganismos cuya evaluación *in situ* no fue posible. Este análisis incluyó las secuencias de 42 microorganismos

especificados en la Tabla 25 de la sección 3.14.3. del apartado de Materiales y Métodos. De los 42 microorganismos analizados, dos (*Atopobium minutum* y *Candida inconspicua*) mostraron una homología superior al 80% con los oligonucleótidos diseñados para detectar *F. vaginae* y *C. krusei*, respectivamente. Aunque no se pudo realizar un ensayo experimental para confirmar posibles reacciones cruzadas o interferencias con el test debido a la presencia de estos microorganismos, se considera poco probable que estas ocurran dada la especificidad del diseño y los resultados observados en otros análisis.

4.7.1.4. Inclusividad

Se llevó a cabo un análisis *in silico* de los oligonucleótidos y sondas incluidos en el test para evaluar su inclusividad, calculando el porcentaje de homología con las secuencias analizadas (Tabla 48). En el conjunto total de secuencias estudiadas, se obtuvo un 100% de homología para *F. vaginae*, las diversas especies de *Lactobacillus*, *T. vaginalis*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*. En el caso de *G. vaginalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, se identificaron entre 1 y 2 discordancias (mismatches) en algunas de las secuencias analizadas con alguno de los nucleótidos y/o sondas TaqMan.

El análisis determinó que estas discordancias no afectan de manera significativa a la amplificación, ya que no alteran las regiones clave para la unión de los oligonucleótidos o sondas al ADN objetivo. Además, la tolerancia de la PCR a pequeñas variaciones genéticas asegura que el proceso de amplificación continúe de manera efectiva, incluso en presencia de estas diferencias.

Tabla 48. Porcentaje de homología entre las secuencias analizadas y los oligonucleótidos y sondas incluidos en el test. Se muestran el número de secuencias con un 100% de homología y el número de secuencias con discordancias para cada diana, oligonucleótido y sonda.

Microorganismo	Diana	Oligonucleótido/ sonda	% de homología	Discordancias
<i>G. vaginalis</i>	Gen 16S	Forward	7 secuencias: 100%	
		Reverse	7 secuencias: 100%	
		Sonda	7 secuencias: 100%	2 secuencias 96,4% (1 discordancia)
<i>F. vaginae</i>	Gen 16S	Forward	15 secuencias: 100%	
		Reverse	15 secuencias: 100%	
		Sonda	15 secuencias: 100%	
<i>L. crispatus</i>	Gen <i>rplK</i>	Forward	7 secuencias: 100%	
		Reverse	7 secuencias: 100%	
		Sonda	7 secuencias: 100%	
<i>L. jensenii</i>	Gen <i>rplK</i>	Forward	5 secuencias: 100%	
		Reverse	5 secuencias: 100%	
		Sonda	5 secuencias: 100%	
<i>L. gasseri</i>	Gen <i>rplK</i>	Forward	7 secuencias: 100%	
		Reverse	7 secuencias: 100%	
		Sonda	7 secuencias: 100%	

Microorganismo	Diana	Oligonucleótido/ sonda	% de homología	Discordancias
<i>L. iners</i>	Gen <i>rplK</i>	Forward	7 secuencias: 100%	
		Reverse	7 secuencias: 100%	
		Sonda	7 secuencias: 100%	
<i>T. vaginalis</i>	Gen <i>TRIDNATARP</i>	Forward	4 secuencias: 100%	
		Reverse	4 secuencias: 100%	
		Sonda	4 secuencias: 100%	
<i>C. glabrata</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	24 secuencias: 100%	
		Reverse	20 secuencias: 100%	4 secuencias 90% (2 discordancias)
		Sonda	22 secuencias: 100%	2 secuencias 94,8% (1 discordancia)
<i>C. albicans</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	16 secuencias 100%	
		Reverse	16 secuencias 100%	
		Sonda	16 secuencias 100%	
<i>C. krusei</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	22 secuencias 100%	
		Reverse	22 secuencias 100%	
		Sonda	22 secuencias 100%	
<i>C. parapsilosis</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	17 secuencias 100%	
		Reverse	15 secuencias 100%	2 secuencias 85% (2 discordancias)
		Sonda	17 secuencias 100%	
<i>C. tropicalis</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	12 secuencias 100%	
		Reverse	10 secuencias 100%	1 secuencias 95% (1 discordancia); 1 secuencias 90% (2 discordancias)
		Sonda	10 secuencias 100%	2 secuencias 95% (1 discordancia)
<i>C. dubliniensis</i>	Gen <i>ITSR</i>	Forward	15 secuencias 100%	
		Reverse	15 secuencias 100%	
		Sonda	15 secuencias 100%	

4.7.1.5. Sensibilidad y especificidad analítica

Se analizó la sensibilidad y especificidad del test para cada uno de los microorganismos incluidos con muestras clínicas previamente caracterizadas por un método de referencia. Estas muestras están definidas en el apartado 3.14.5 de Materiales y Métodos.

En la Tabla 49, Tabla 50 y Tabla 51 se muestran los resultados de rendimiento analítico obtenidos para la detección de VB, las distintas especies de *Candida* y *T. vaginalis*.

Tabla 49. Resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos para el diagnóstico de VB.

	VB
Número de muestras	100
Sensibilidad (%)	96
95% IC	87-99
Especificidad (%)	92
95% IC	81-97
VPP (%)	92.3
VPN (%)	96
LR+/LR-	-1.05/-1.03
Verdaderos positivos	48
Verdaderos negativos	46
Falsos positivos	4
Falsos negativos	2
Dudosos	0

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza; PPV: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo; LR+: coeficiente de verosimilitud positivo; LR-: coeficiente de verosimilitud negativo

Tabla 50. Rendimiento analítico obtenido para la detección de las especies de *Candida*.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>Candida spp.</i>
Número de muestras	100	100	100	113
Sensibilidad (%)	94	96	96	97
95% IC	84-98	87-99	87-99	88-99
Especificidad (%)	100	100	100	100
95% IC	93-100	93-100	93-100	93-100
VPP (%)	100	100	100	100
VPN (%)	94	96	96	96
LR+/LR-	-0,95/-0,93	-0,97/-0,95	-0,97/-0,95	-0,98/-0,96
Verdaderos positivos	47	48	48	61
Verdaderos negativos	50	50	50	50
Falsos positivos	0	0	0	0
Falsos negativos	3	2	2	2
Dudosos	0	0	0	0

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza; PPV: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo; LR+: coeficiente de verosimilitud positivo; LR-: coeficiente de verosimilitud negativo

Tabla 51. Resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos para la detección de *T. vaginalis*.

<i>T. vaginalis</i>	
Número de muestras	100
Sensibilidad (%)	96
95% IC	87-99
Especificidad (%)	100
95% IC	93-100
VPP (%)	100
VPN (%)	96
LR+/LR-	-0,97/-0,95
Verdaderos positivos	48
Verdaderos negativos	50
Falsos positivos	0
Falsos negativos	2
Dudosos	0

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza; PPV: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo; LR+: coeficiente de verosimilitud positivo; LR-: coeficiente de verosimilitud negativo

4.7.1.6. Estabilidades

Se llevaron a cabo diversos ensayos para evaluar la estabilidad del equipo y de cada uno de sus componentes bajo diferentes condiciones finales, basándose en las características del producto. Utilizando los valores de Ct obtenidos para cada condición, lote, muestra y diana, se calculó el %CV en cada caso (Tabla 52).

En el análisis global, el %CV osciló entre un mínimo de 0.2% y un máximo de 5.4%, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos. Las condiciones de estabilidad que mostraron los valores más altos de %CV fueron la estabilidad en uso de la mezcla de PCR durante 60 minutos y la estabilidad en condiciones de transporte. En el análisis por dianas, los %CV más altos se registraron para *G. vaginalis*, *C. glabrata* y *C. albicans*, mientras que los más bajos correspondieron a *Lactobacillus* spp. y *C. tropicalis*. Cabe destacar que en ningún caso se observó amplificación positiva en el control negativo, confirmando la especificidad y la ausencia de contaminación cruzada.

Tabla 52. Resultados de %CV obtenidos en las distintas condiciones de estabilidad. Se muestran los resultados para cada diana en las muestras analizadas y los controles del test. La estabilidad acelerada y real del equipo en condiciones cerradas se analizó en tres lotes mientras que la estabilidad acelerada del equipo en condiciones abiertas, en uso y en transporte se realizó en un lote.

Condición	Lote	Muestra	GV %CV	LB %CV	FV %CV	TV %CV	CG %CV	CA %CV	CPa %CV	CT %CV	CD %CV	CK %CV
Real	1	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	0.5	0.9	0.5	1.4	1.1	2.2	0.2	0.2	0.2	0.9
		Muestra	1.3	2.2	2.2	1.4	4.3	1.7	1.7	1.6	1.9	3.8
	2	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	0.9	0.8	0.8	1.1	1.7	2.6	1.0	1.0	1.0	2.0
		Muestra	3.4	1.0	2.5	1.1	1.8	2.0	1.3	0.5	0.8	0.6
	3	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	1.5	0.3	0.5	1.0	0.7	2.4	0.7	0.7	0.7	0.7
		Muestra	1.9	1.5	1.4	1.3	3.9	2.4	2.4	0.7	0.4	2.0
Acelerada cerrado	1	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	2.7	1.3	1.2	0.7	2.8	1.8	1.5	1.5	1.5	1.1
		Muestra	3.2	1.4	2.6	0.6	1.5	1.8	2.0	0.2	0.9	1.8
	2	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	1.9	1.1	1.3	0.7	2.2	1.8	1.3	1.3	1.3	0.8
		Muestra	4.5	2.1	1.8	0.5	0.6	0.9	0.9	0.9	3.2	1.6
	3	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	2.6	0.5	1.3	0.8	0.8	2.4	0.5	0.5	0.5	0.7
		Muestra	2.5	0.9	1.7	0.6	1.2	0.8	1.2	0.3	0.4	1.3
Acelerada abierto	1	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	1.2	0.8	1.7	1.3	1.7	1.5	1.9	1.9	1.9	2.4
		Muestra	2.6	1.0	2.0	0.7	2.7	0.5	1.7	0.5	0.8	1.5
En uso – 60 minutos	1	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	5.4	1.7	0.5	2.0	5.0	2.4	1.9	1.9	1.9	0.7
		Muestra	2.6	1.1	2.2	1.4	1.6	0.9	1.8	0.6	2.0	1.0
En uso – Congelación CP	1	CP	1.2	1.6	0.5	0.6	0.9	0.8	2.0	2.0	2.0	0.5
Transporte	1	CN	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
		CP	1.3	1.1	3.0	1.8	2.1	3.0	1.6	1.6	1.6	2.6
		Muestra	3.1	1.1	2.5	2.8	5.0	4.7	3.7	1.5	1.1	3.9

Abreviaturas: CN: control negativo; CP: control positivo; Na: no amplifica; GV: *G. vaginalis*; FV: *F. vaginae*; LB: *Lactobacillus* spp.; TV: *T. vaginalis*; CG: *C. glabrata*; CA: *C. albicans*; CK: *C. krusei*; CPa: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*; CD: *C. dubliniensis*.

4.7.2. Automatización

Durante el diseño, desarrollo y evaluación funcional interna del test, se utilizó el kit Optipure viral Nucleic Acid Extraction Kit en el equipo Maelstrom™ 4800 para la extracción del ADN de las muestras. El procesamiento de las muestras y el montaje de los ensayos de qPCR se realizaron de forma manual.

Con el objetivo de automatizar el proceso completo, se evaluó el test en el sistema MagXtract® 3200 system. Para la validación, se procesaron 70 muestras de exudado vaginal procedentes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Grupo 3) en paralelo con el equipo Maelstrom™ 4800 y MagXtract® 3200 system (Tabla 53). La concordancia entre ambos sistemas fue del 98.6%, observándose únicamente un resultado discrepante en la clasificación de VB y microbiota normal entre los equipos.

Tabla 53. Comparación de resultados entre MagXtract® 3200 system y Maelstrom™ 4800.

Clasificación	MagXtract® 3200	Maelstrom™ 4800
VB	38	39
Microbiota normal	32	31
Especies <i>Candida</i>	45	45
<i>T. vaginalis</i>	11	11

Por otro lado, se compararon los resultados obtenidos con el equipo MagXtract® 3200 frente a los resultados de referencia de estas muestras con el objetivo de evaluar el rendimiento clínico de la técnica utilizando el procesador automático. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad superiores al 90% para *Candida* y *T. vaginalis*. Sin embargo, los valores para VB fueron ligeramente inferiores, con una sensibilidad del 86.1% y una especificidad del 79.4% (Tabla 54).

Tabla 54. Rendimiento clínico del test Vaginal Panel RealTime PCR Kit procesado con MagXtract® 3200 en comparación con Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Clasificación	VP	VN	FP	FN	% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)	% VPP (IC 95%)	% VPN (IC 95%)
VB	31	27	7	5	86.1% (70.5-95.3%)	79.4% (62.1-91.3%)	81% (69.3-89.7%)	84.4% (70.2-92.5%)
Especies <i>Candida</i>	41	24	2	3	93.2% (81.34-98.57%)	92.3% (74.9-99.1%)	95.4% (84.4-98.7%)	88.9% (72.7-96%)
<i>T. vaginalis</i>	9	61	0	0	100% (66.4-100%)	100% (94.9-100%)	100% (66.4-100%)	100% (94.9-100%)

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; IC, intervalo de confianza; VP, verdadero positivo; VN, verdadero negativo; FP, falso positivo; FN, falso negativo

4.7.3. Compatibilidad con otro termociclador

Se llevó a cabo la evaluación de compatibilidad del test con otro modelo de termociclador disponible en el mercado, el equipo Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System. La realización de estas pruebas surge de la reciente colaboración establecida entre Vircell SL, y la empresa

fabricante de este termociclador, en el marco de un acuerdo para la distribución de este modelo. Esto amplía las opciones de equipos compatibles con los test desarrollados por Vircell SL, ofreciendo a los usuarios una mayor flexibilidad y facilidad de integración en sus plataformas existentes.

Se llevó a cabo una comparación exhaustiva de la detección e interpretación del Vaginal Panel Real-Time PCR Kit utilizando dos modelos de termocicladores: el Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System y el CFX96™ Real-Time PCR Detection System. El objetivo fue evaluar la consistencia y fiabilidad del test en ambos sistemas de detección.

En el análisis de las 14 muestras procesadas, se obtuvieron resultados idénticos entre ambos equipos (Tabla 55). No se observaron curvas inespecíficas en ninguno de los casos, lo que demuestra la precisión y especificidad del test bajo las condiciones evaluadas. Además, los valores de Ct fueron altamente consistentes entre ambos termocicladores, sin diferencias significativas que pudieran afectar la interpretación de los resultados. En la Figura 32 se presentan las curvas de amplificación obtenidas para cada una de las muestras analizadas, comparando los resultados generados por ambos termocicladores.

Tabla 55. Interpretación de los resultados obtenidos con cada termociclador. Las muestras M1-M3 se testaron a la concentración preparadas y a una dilución 1:10, 1:20 y 1:40, respectivamente, con el objetivo de comprobar la interpretación con diferentes rangos de amplificación.

Nº	Muestra	CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System
1	Control negativo	Válido	Válido
2	Control positivo	Válido	Válido
3	Muestra 1	VB G4, FV, CSPP, CK	VB G4, FV, CSPP, CK
4	Muestra 1 diluida	VB G4, FV, CSPP, CK	VB G4, FV, CSPP, CK
5	Muestra 2	VB G4, TV, CG, CSPP, CA	VB G4, TV, CG, CSPP, CA
6	Muestra 2 diluida	VB G4, TV, CG, CSPP, CA	VB G4, TV, CG, CSPP, CA
7	Muestra 3	MN G1, CSPP	MN G1, CSPP
8	Muestra 3 diluida	MN G1, CSPP	MN G1, CSPP
9	30026687	VB G3, FV, CA	VB G3, FV, CA
10	65503800	MN G1, CG	MN G1, CG
11	65702411	MN G1, CA	MN G1, CA
12	41719731	VB G3, FV	VB G3, FV
13	30022126	VB G4, TV, FV	VB G4, TV, FV
14	65402777	VB G3, TV, FV, CA	VB G3, TV, FV, CA

Abreviaturas: FV, *F. vaginae*; TV, *T. vaginalis*; CG, *C. glabrata*; CA, *C. albicans*; CK, *C. krusei*; CSPP, *Candida* spp.; MN, microbiota normal; VB, vaginosis bacteriana; G1-G4, grado 1 a 4.

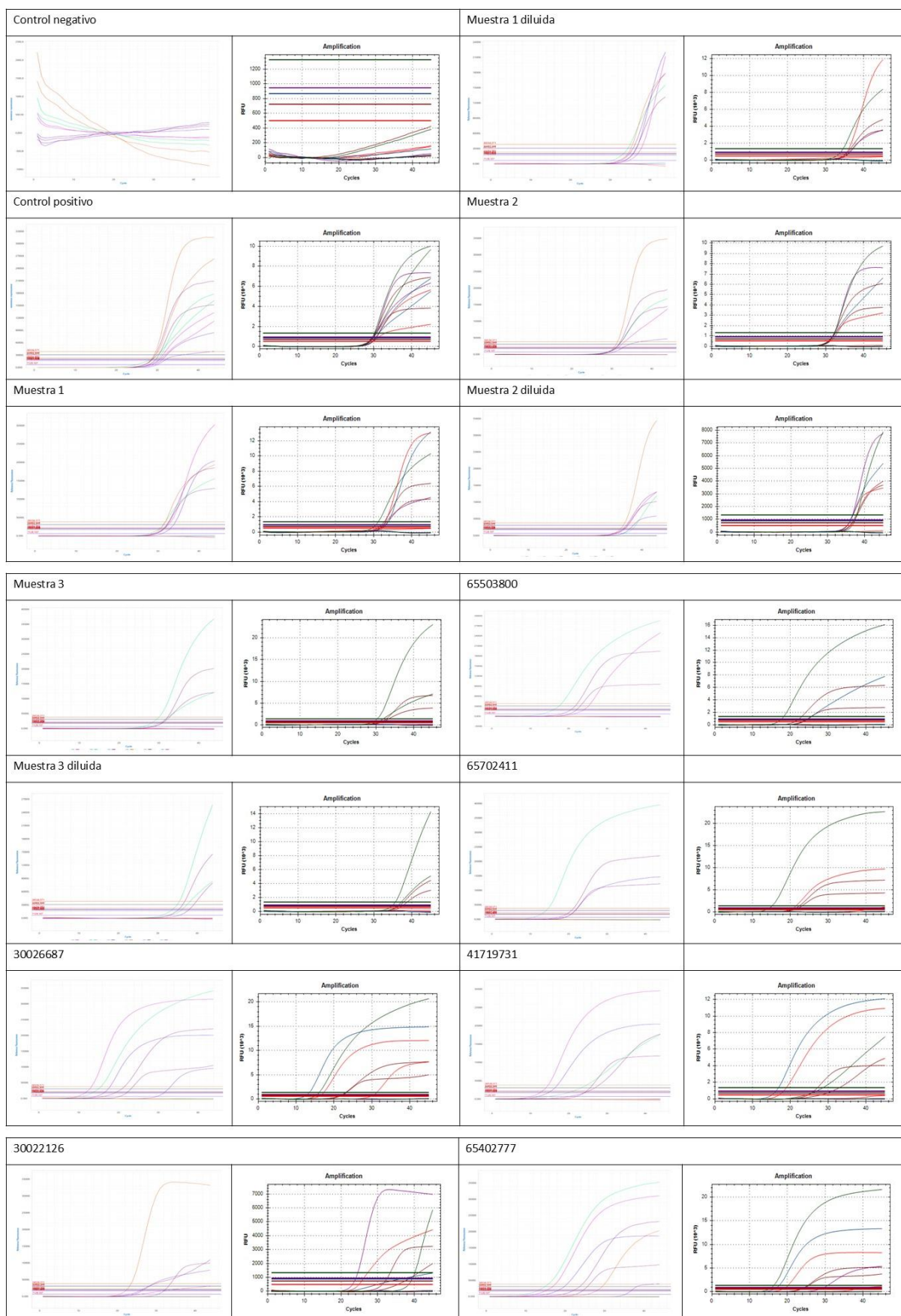


Figura 32. Curvas de amplificación de cada muestra con los termocicladores Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System (izquierda) y el CFX96™ Real-Time PCR Detection System (derecha).

4.7.4. Evaluación externa

Tras completar la validación interna del test desarrollado y obtener la certificación CE, que garantiza el cumplimiento de los estándares europeos de calidad y seguridad para pruebas diagnósticas, se llevaron a cabo dos estudios clínicos. Estos estudios se realizaron para comparar el desempeño del test con los métodos de diagnóstico tradicionales y con un método de diagnóstico NAAT.

El objetivo de estos estudios fue verificar el desempeño del test en condiciones clínicas reales para evaluar su efectividad en entornos hospitalarios, contribuyendo así a confirmar su utilidad en el diagnóstico clínico rutinario.

4.7.4.1. Comparación con métodos tradicionales

Se llevó a cabo un estudio en colaboración con el Hospital Universitario San Cecilio para comparar el test Vaginal Panel Realtime PCR kit con tinción de Gram-Nugent para VB, cultivo más MALDI-TOF MS para *Candida* y cultivo para *T. vaginalis*.

Se analizaron un total de 1011 muestras de exudado vaginal de pacientes de entre 14 y 98 años. Del total de muestras analizadas, trece fueron descartadas por los siguientes motivos: dos muestras por proporcionar un resultado inválido por el test Vaginal Panel Realtime PCR kit (no se obtuvo amplificación del control interno); en seis muestras la detección de *Candida* no pudo ser confirmada con un tercer método; y, en cinco muestras no fue posible reevaluar la tinción de Gram. La prevalencia de cada microorganismo entre los métodos de rutina y el test Vaginal Panel Realtime PCR kit se presenta en la Tabla 56.

Tabla 56. Prevalencia total obtenida para VB, candidiasis y tricomoniasis mediante el método de referencia y el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit.

	Método de rutina		Vaginal Panel Realtime PCR Kit	
	Prevalencia (%)	IC 95%	Prevalencia (%)	IC 95%
VB	42.2%	38.17-46.19	43.6%	39.51-47.66
Candida total	25.3%	22.15-28.35	25.5%	22.34-28.57
<i>C. albicans</i>	22.1%	19.24-25.05	21.9%	19.05-24.84
<i>C. glabrata</i>	1.7%	0.90-2.51	1.9%	1.05-2.76
<i>C. krusei</i>	0.4%	0.01-0.79	0.4%	0.01-0.79
<i>Candida</i> spp.	0.5%	0.06-0.94	0.7%	0.18-1.22
Codetección ^a	0.5%	0.06-0.94	0.5%	0.06-0.94
<i>T. vaginalis</i>	0.0%		1.5%	0.75-2.26

^aLa VB en los métodos diagnósticos de rutina se consideró cuando la puntuación de Nugent fue de 7 a 10. Las muestras con puntuación de Nugent intermedia (4 a 6) no se incluyeron en el análisis.

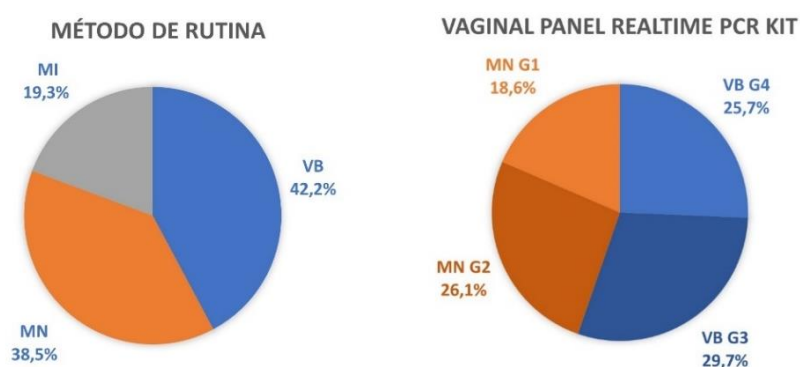
^bEl método de rutina detectó específicamente *C. parapsilosis*.

^cLa codetección se refiere a la detección simultánea de dos especies de *Candida*.

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; IC, intervalo de confianza.

Vaginosis bacteriana

La combinación de la tinción de Gram con la clasificación de Nugent y el cultivo de *G. vaginalis* permitió clasificar 421 muestras como VB (puntuación de Nugent entre 7 y 10), 384 como microbiota normal (puntuación entre 0 y 3) y 193 como microbiota intermedia (puntuación entre 4 y 6). El test Vaginal Panel Realtime PCR Kit interpretó 435 muestras como VB y 370 como microbiota normal. De las 193 muestras caracterizadas como microbiota intermedia mediante el método de rutina, 117 (60.6%) fueron interpretadas como VB y 76 (39.4%) como microbiota normal por el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit (Figura 33).

**Figura 33.** Porcentaje de muestras clasificadas en cada categoría según cada método. El método de referencia clasifica las muestras en VB, MN y MI, mientras que el Vaginal Panel Realtime PCR kit las clasifica en VB y MN y dentro de estas categorías en cuatro grados (G1, G2, G3, y G4).

Abreviaturas: VB: vaginosis bacteriana; MN, microbiota normal; MI, microbiota intermedia; G1-G4, grado 1 a 4.

Se realizó una comparación de los resultados de ambos métodos para las muestras clasificadas como VB y microbiota normal, con el fin de evaluar la concordancia en el diagnóstico de VB. Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se obtuvo una sensibilidad del 93.1% y una especificidad del 88.8%. Las diferencias en sensibilidad y especificidad no alcanzaron significancia estadística (valor de $p = 0.125$). También se calculó el coeficiente kappa de Cohen, obteniéndose un valor de kappa de 0.82, lo cual indica una concordancia casi perfecta entre métodos. En la Tabla 57 se presentan los resultados obtenidos del rendimiento clínico del test en evaluación en comparación el método de rutina. De 193 especímenes caracterizados como intermedios por los métodos de diagnóstico de uso rutinario, 117 (60.6%) fueron interpretados como BV y 76 (39.4%) como microbiota normal según la prueba de qPCR.

Tabla 57. Rendimiento clínico del test Vaginal Panel Realtime PCR kit para la detección de VB.

Método de rutina (Nugent)	No. de muestras positivas para VB (G3 y G4)	No. de muestras positivas para MN (G1 y G2)	% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)	% VPP (IC 95%)	% VPN (IC 95%)	Índice kappa (IC 95%)
VB ^a	392	29	93,1	88,8	90,1	92,2	0,82
Microbiota normal	43	341	(90,3-95,3)	(85,2-91,8)	(87,3- 92,4)	(89,2-94,4)	(0,781-0,860)

^aSe consideró VB cuando se obtuvo una puntuación de Nugent de 7 a 10 y microbiota normal en el caso de una puntuación de Nugent de 0 a 3.

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; IC, intervalo de confianza; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; MN, microbiota normal.

El test Vaginal Panel Realtime PCR Kit detecta y proporciona una semicuantificación de las dianas *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* y *F. vaginae* de manera individual. En las muestras clasificadas como VB, se comparó el porcentaje de aquellas que contenían tanto *G. vaginalis* como *F. vaginae* con el porcentaje de muestras que contenían solo una de estas bacterias. También se determinó el porcentaje de casos en los que no se detectó ninguna bacteria (incluyendo *Lactobacillus* spp.). Los resultados mostraron que un alto porcentaje de las muestras contenía ambas bacterias, *G. vaginalis* y *F. vaginae* (53.1%), en comparación con aquellas que contenían solo una de estas bacterias (19.2% y 4.2%, respectivamente). En el 23.6% de las muestras no se detectó ninguna bacteria. Además, se realizó una caracterización adicional de las muestras para un análisis cuantitativo de los resultados. La carga bacteriana de *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* y *F. vaginae* se determinó utilizando la curva estándar definida en el algoritmo para la semicuantificación de cada bacteria. Los perfiles de cuantificación de la carga bacteriana

para cada categoría de puntuación según la tinción de Gram aplicando la puntuación de Nugent y el test en evaluación se muestran en la Figura 34.

El test en evaluación mostró un perfil gradual con un aumento progresivo de la carga de *Lactobacillus* spp. de VB a microbiota normal, en un rango de 3.6 a 7.5 log copias/mL. Las cargas de *G. vaginalis* y *F. vaginae* aumentaron ligeramente de VB G4 a VB G3 (5.9 a 7.7 log copias/mL y 5.5 a 6.9 log copias/mL, respectivamente), pero mostraron una disminución progresiva de VB G3 a NM G1 (7.7 a 1.6 log copias/mL y 6.9 a 1.5 log copias/mL, respectivamente (Figuras 34-A y 34-C).

Los resultados del método de rutina mostraron un perfil de carga de *Lactobacillus* spp. similar entre VB y microbiota normal (6.8 a 7.6 log copias/mL). Para *G. vaginalis* y *F. vaginae*, mostraron una disminución gradual (7.4 a 4.4 log copias/mL y 6.8 a 3.4 log copias/mL, respectivamente (Figuras 34-B y 34-C).

Cabe destacar que la categoría VB G4 mostró una baja carga de *Lactobacillus* spp., junto con dos poblaciones distintas de *G. vaginalis* y/o *F. vaginae* según el algoritmo del test molecular. Esta distribución bimodal se atribuye a la presencia de dos poblaciones dentro de esta categoría: muestras con cargas bajas y altas de bacterias *G. vaginalis* y *F. vaginae* (Figura 34-A).

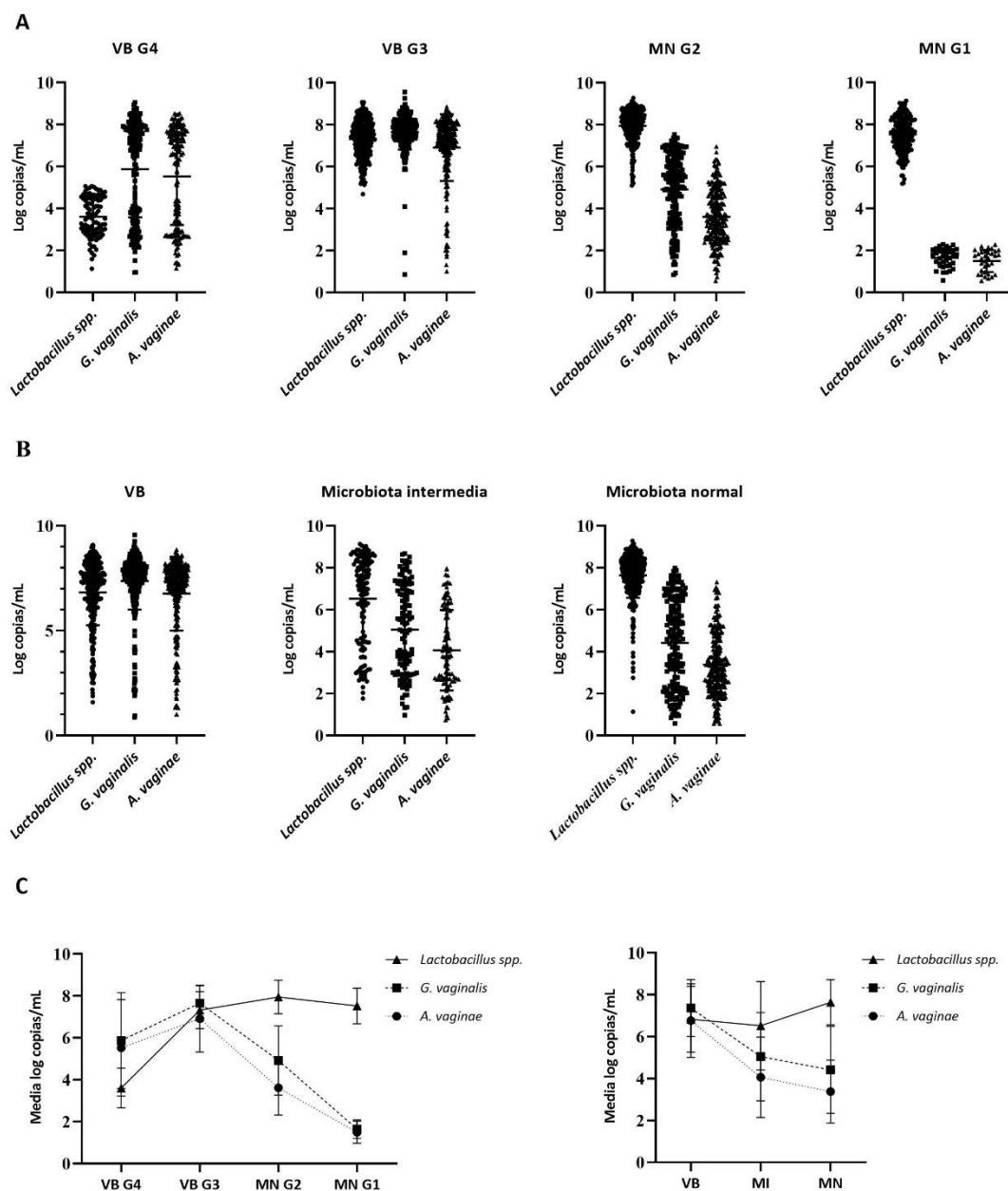


Figura 34. Diagramas de dispersión que muestran la carga bacteriana (log copias/mL) de *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* y *F. vaginae* para las cuatro categorías del test Vaginal Panel Realtime PCR Kit (A) y las tres categorías de la puntuación de Nugent (B). La media y la DE se representan para cada microorganismo (C). Al comparar los perfiles de ambos métodos, el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit muestra una mayor variación en la carga bacteriana de los tres microorganismos entre VB G4 y NM G1 (A). En contraste, la puntuación de Nugent presenta un perfil más constante a través de las diferentes categorías (B).

Abreviaturas: G1-G4, grados 1, 2, 3 y 4; VB, vaginosis bacteriana; MN, microbiota normal.

Candidiasis vulvovaginal

Se identificaron 258 muestras con presencia de especies de *Candida* mediante métodos diagnósticos rutinarios, siendo *C. albicans* la especie más común, seguida por *C. glabrata*. Seis muestras se excluyeron del análisis final, ya que la presencia de *Candida* no pudo ser confirmada

con un tercer método y las muestras originales no estaban disponibles para su verificación. En la Tabla 58 se presentan los valores de sensibilidad, especificidad, PPV y NPV del test Vaginal Panel Realtime PCR Kit en comparación con los métodos de rutina. La sensibilidad general para la detección de *Candida* fue del 96.0%, y la especificidad alcanzó un 98.4%. Tanto la sensibilidad como la especificidad entre las distintas especies de *Candida* fueron muy consistentes, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.625$).

Tabla 58. Rendimiento clínico para las especies de *Candida*. Se compararon los métodos de cultivo y MALDI-TOF MS con el test en evaluación.

Cultivo y MALDI-TOF MS	Vaginal Panel Realtime PCR Kit				% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)	% VPP (IC 95%)	% VPN (IC 95%)
	VP	FP	VN	FN				
<i>C. albicans</i> (n=221)	212	7	770	9	95.9 (92.4-98.1)	99.1 (98.2-99.6)	96.8 (93.5-98.5)	98.8 (97.8-99.4)
<i>C. glabrata</i> (n=17)	17	2	979	0	100 (80.5-100)	99.8 (99.3-100)	89.5 (68.0-97.1)	100
<i>C. krusei</i> (n=4)	4	0	994	0	100 (39.8-100)	100 (99.6-100)	100	100
<i>Candida</i> spp. (n=5)	4	3	990	1	80.0 (28.4-99.5)	99.7 (99.1-99.9)	57.1 (28.4-81.8)	99.9 (99.4-100)
Codetección ^a (n=5)	5	0	993	0	100 (54.1-100)	100 (99.6-100)	100	100
<i>Candida</i> total (n=252)	242	12	734	10	96.0 (92.8-98.1)	98.4 (97.2-99.2)	95.3 (92.0-97.3)	98.7 (97.6-99.3)

^aCodetección se refiere a la detección dual de *Candida*. En cinco muestras, ambos métodos reportaron un resultado positivo para *C. albicans* y *C. glabrata*.

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; VP, verdaderos positivos; VN, verdaderos negativos; FP, falsos positivos; FN, falsos negativos; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo;

Además, el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit identificó 32 muestras positivas para *Candida* que no fueron reportadas por los métodos de diagnóstico rutinarios. Estos resultados positivos fueron confirmados mediante otra prueba NAAT, el test Candidosis Real-TM Quant. Entre las muestras adicionales positivas detectadas, 23 muestras fueron positivas para *C. albicans*, 4 muestras para *C. glabrata*, 1 muestra para *Candida* spp., y 4 muestras mostraron codetección, indicando la presencia de una combinación de dos especies. Asimismo, con el objetivo de comparar la sensibilidad del cultivo con los métodos moleculares, se reanalizaron estas muestras. Los resultados de los tres métodos para estas muestras se presentan en la Tabla 59. El cultivo resultó positivo cuando el valor de Ct obtenido en los métodos moleculares fue inferior a Ct 32.

Tabla 59. Resultados obtenidos con las distintas pruebas diagnósticas para las 32 muestras positivas adicionales para *Candida*.

Especie	Vaginal Panel Realtime PCR Kit	Candidosis Real- TM Quant	Cultivo + MALDI- TOF MS
<i>C. albicans</i>	23	23	8
<i>C. glabrata</i>	4	4	2
<i>Candida</i> spp.	1	1	1
Codetección de <i>C. albicans</i> y <i>C. krusei</i>	1	1	0
Codetección de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	2	2	0 ^a
Codetección de <i>C. krusei</i> y <i>Candida</i> spp.	1	1	1

^aCon el método de rutina solo se detectó *C. albicans*.

Trichomoniasis

El examen al microscopio reveló 57 muestras con presencia de leucocitos, presumiblemente positivas para *T. vaginalis*. Siguiendo los procedimientos de laboratorio, estas muestras se cultivaron en medio Roiron, pero el parásito no fue observado microscópicamente en ninguna de las muestras cultivadas. El test Vaginal Panel Realtime PCR kit detectó quince muestras positivas para *T. vaginalis* entre todas las muestras analizadas. Para confirmar el resultado obtenido con el test en evaluación, estas quince muestras positivas fueron analizadas mediante otro método NAAT, el test GeneProof Trichomonas vaginalis PCR Kit. El método molecular alternativo confirmó un resultado positivo para *T. vaginalis* en doce de estas muestras.

Infección múltiple

La vaginitis puede ser causada por una o varias infecciones simultáneamente. Dado que las causas de la vaginitis son diversas, es importante considerar la posibilidad de infecciones concomitantes al momento del diagnóstico. Con el objetivo de evaluar la presencia de múltiples etiologías en los casos de vaginitis, se realizó un análisis combinado de los resultados obtenidos, determinando el porcentaje de infecciones únicas y múltiples.

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 35. En los métodos de rutina, los resultados indicaron que hubo más casos de infección múltiple de VB junto con VVC (10.5%) en comparación con la infección única por VVC (10.3%). Con el Vaginal Panel Realtime PCR Kit se obtuvo un porcentaje ligeramente superior de infección múltiple de VB junto con VVC al porcentaje de los métodos de rutina (12,2%). En lo referente a la tricomoniasis, los resultados obtenidos con el test en evaluación mostraron un mayor porcentaje de casos de infección múltiple con VB (1.3%) en comparación con los casos de infección única por *T. vaginalis* (0.2%).

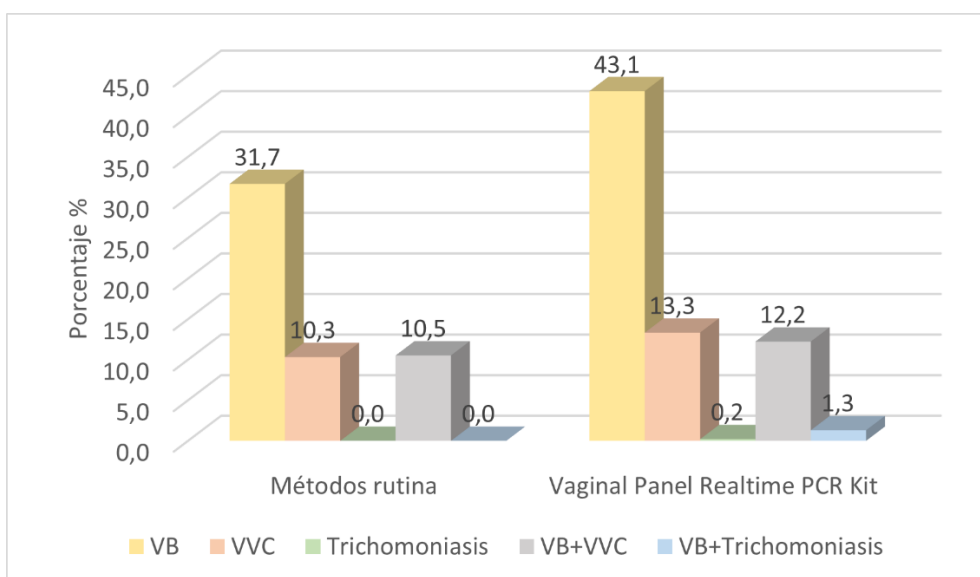


Figura 35. Porcentaje de muestras con infección única y múltiple reportadas por ambos métodos de diagnóstico.

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana; VVC, candidiasis vulvovaginal.

Resultados inválidos

El procesamiento de las muestras, desde su descarga en medio líquido hasta la extracción de ácidos nucleicos y la preparación para las qPCR con el test Vaginal Panel realtime PCR kit, se realizó utilizando el sistema MagXtract® 3200 System. La calidad del proceso fue monitorizada mediante los controles internos del test, diseñados específicamente para identificar posibles errores en cualquier fase.

Una vez finalizado el procesamiento de todas las muestras, se evaluó el porcentaje de resultados inválidos obtenidos. Para ello, el proceso se dividió en dos etapas principales: (1) el pipeteo de la muestra desde el tubo primario al reactivo de extracción y (2) la preparación de la qPCR. Con el objetivo de identificar el origen de los resultados inválidos, en cada caso donde se obtuvo un resultado inválido inicialmente, se repitió la PCR manualmente utilizando el eluido previamente obtenido. En aquellos casos donde el resultado seguía siendo inválido tras la repetición manual, se procedió a repetir todo el proceso, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la preparación y ejecución de la qPCR.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 60, proporcionando el número y porcentaje de muestras afectadas en cada etapa del procedimiento. Durante todos los ensayos realizados, no se registraron fallos mecánicos del equipo MagXtract® 3200 System, por lo que ningún ensayo tuvo que ser abortado debido a problemas técnicos del sistema.

Tabla 60. Resultados inválidos obtenidos durante el procesamiento automatizado de muestras con el MagXtract® 3200 System.

Nº TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS	1011		
Nº MUESTRAS FALLO ETAPA 1	16	1.6	%
Nº MUESTRAS FALLO ETAPA 2	48	4.7	%

Comparación entre la tinción de Gram-Nugent y el test Vaginal Panel Realtime PCR kit

En la comparación de resultados entre las técnicas de tinción de Gram-Nugent y el test Vaginal Panel realtime PCR kit, se identificaron tanto coincidencias como discrepancias en los resultados reportados por ambas metodologías. Para una evaluación detallada, se tomaron fotografías de los portaobjetos correspondientes a las tinciones, y se compararon con los resultados de amplificación obtenidos por qPCR, permitiendo un análisis exhaustivo de cada técnica.

Se seleccionaron aleatoriamente varias muestras que mostraban tanto resultados concordantes como discrepantes entre ambas metodologías. Con el objetivo de asegurar una representación precisa y significativa, en la tinción se observaron múltiples campos por cada muestra. De cada uno de ellos, se eligió una región que mostraba las características más representativas, la cual fue fotografiada.

En el análisis de las tinciones de Gram-Nugent, se identificaron y caracterizaron los principales morfotipos bacterianos, destacando: *Lactobacillus*, bacilos grandes Gram-positivos; cocos, bacilos y cocobacilos cortos Gram-negativos o Gram-variables, asociados principalmente con *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp. y *Mobiluncus* spp.; y, células guía, células epiteliales recubiertas por bacterias, que son un marcador diagnóstico característico de vaginosis bacteriana. Además, se registró la presencia de levaduras, lo que sugiere una posible infección por *Candida* spp., así como leucocitos, que son indicadores de una respuesta inflamatoria asociada a infección o inflamación activa.

En la Figura 36 se presentan las imágenes de las tinciones y las curvas de amplificación de qPCR correspondientes. Las muestras con resultados concordantes entre ambas técnicas se ilustran en la Figura 36 (A-F), mientras que las discrepancias se evidencian en la Figura 36 (G-L).

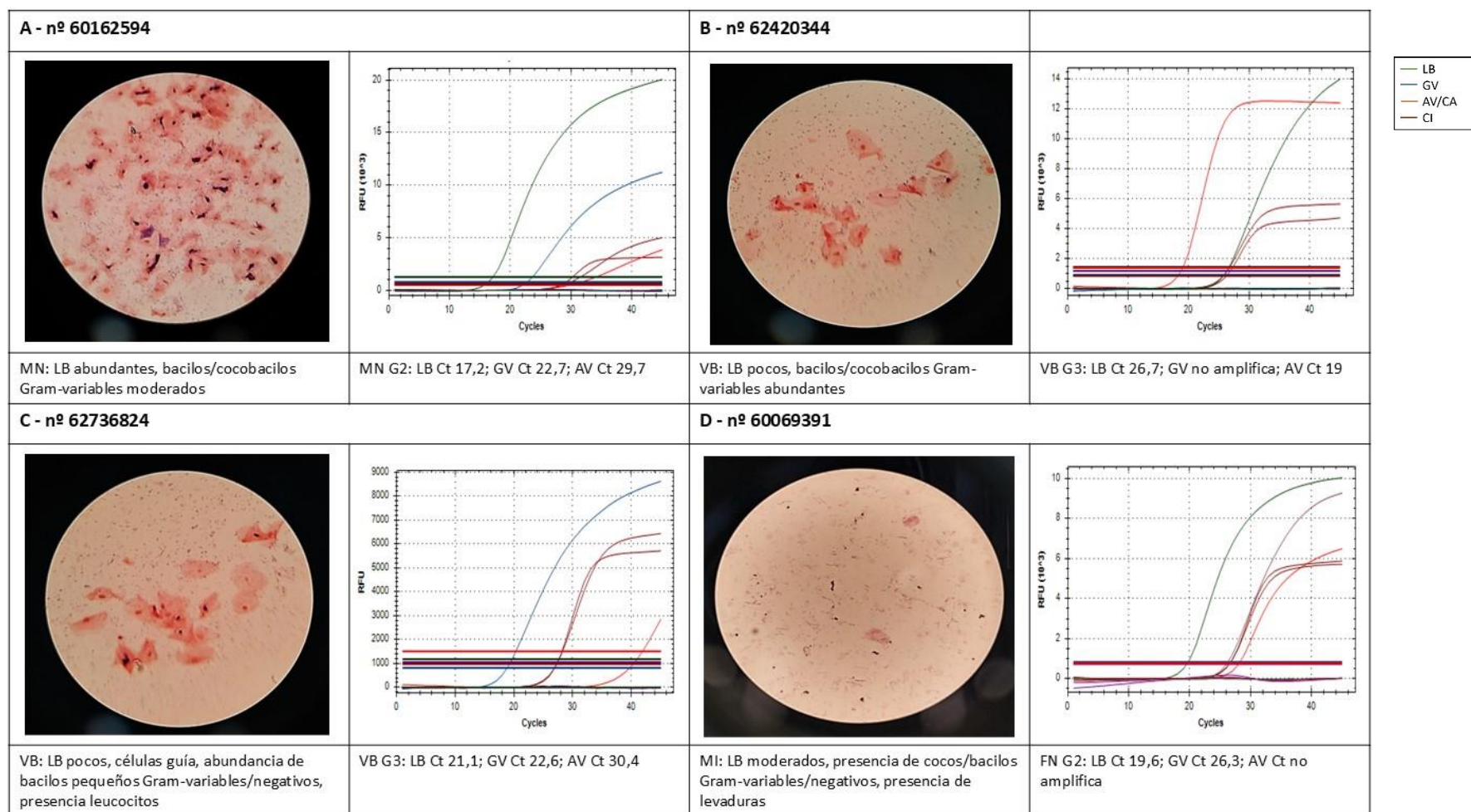
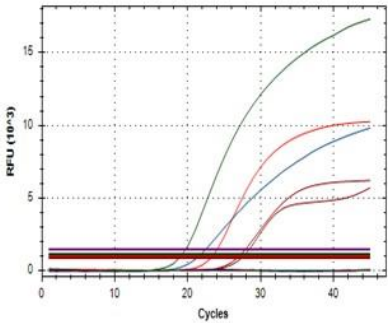
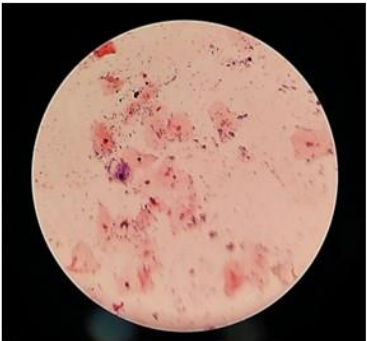
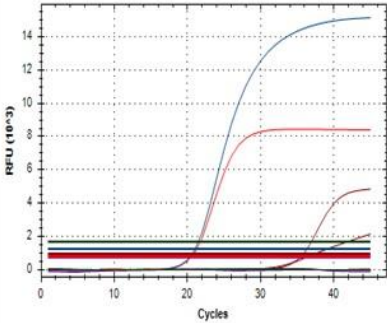
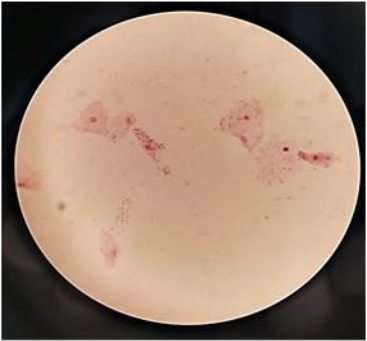
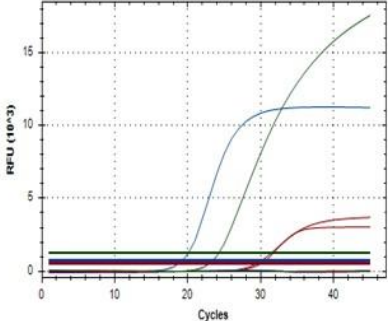
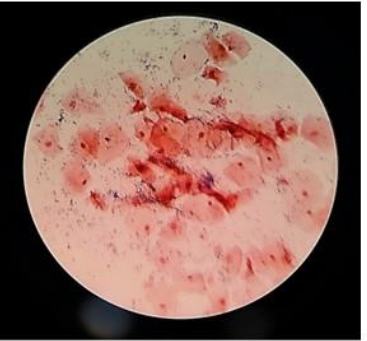
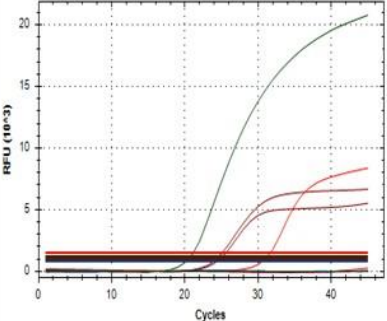
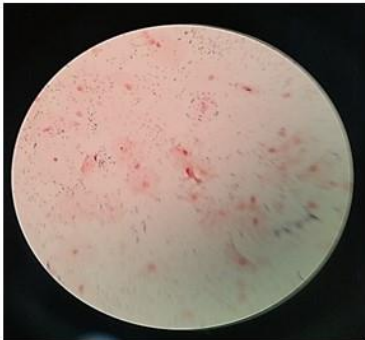
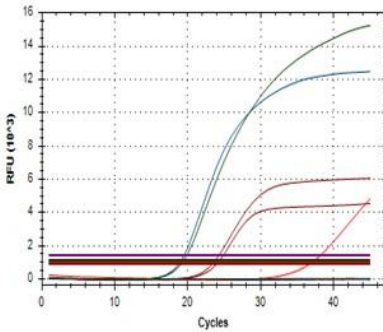
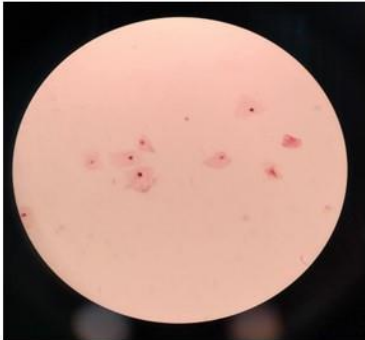
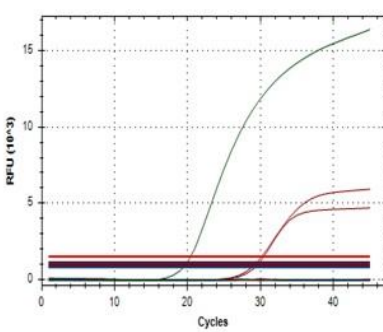
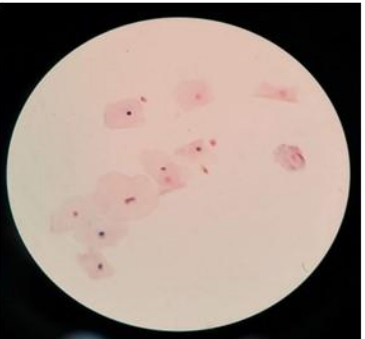
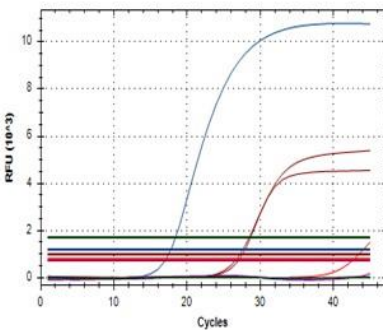
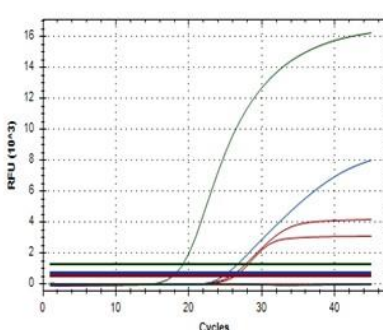


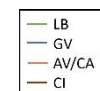
Figura 37. Comparación de resultados entre la tinción de Gram-Nugent y el test Vaginal Panel realtime PCR kit para 6 muestras con resultados concordantes y 6 muestras con resultados discordantes. En cada interpretación se resumen los hallazgos más relevantes, destacando los aspectos críticos de cada metodología para facilitar la comparación.

Abreviaturas: MN, microbiota normal; VB, vaginosis bacteriana; G1-G4, grados 1-4; LB, *Lactobacillus*; GV, *G. vaginalis*; AV, *F. vaginae*; CA, *C. albicans*.

E - nº 63651412		F - nº 64679375	
			
MI: LB moderados, bacilos/cocobacilos Gram-variables moderados	FN G2: LB Ct 19,2; GV Ct 21,4; AV Ct 23,3	VB: LB pocos o escasos, bacilos/cocobacilos Gram-variables moderados, presencia células guía	VB G4: LB no amplifica; GV Ct 20,6; AV Ct 21,1
G - nº 63240132		H - nº 60071592	
			
FN: LB moderados, ausencia de cocos/bacilos Gram-positivos o Gram-variables	VB G3: LB Ct 24,3; GV Ct 19,3; AV no amplifica	VB: LB pocos o escasos, presencia de cocos/bacilos Gram-variables	FN G1: LB Ct 20,7; GV y AV no amplifica; CA Ct 31,7

Continuación Figura 37

I - nº 61161474		J - nº 62168989	
			
FN: LB abundantes, presencia de cocobacilos Gram-negativos/variables y de levaduras	VB G3: LB Ct 19,4; GV Ct 18,2; AV no amplifica; CA Ct 26,4	VB: LB ausentes, cocos/bacilos Gram-negativos/variables pocos, presencia de leucocitos	FN G1: LB Ct 20; GV y AV no amplifica
K - nº 63757594		L - nº 60388213	
			
MI: LB pocos, presencia de pequeños bacilos Gram-variables	VB G4: LB no amplifica; GV Ct 17,8; AV no amplifica	VB: LB pocos, bacilos Gram-negativos/variables abundantes	FN G2: LB Ct 19,2; GV Ct 25,4; AV no amplifica



Continuación Figura 37

4.7.4.2. Comparación con un método NAAT

Con el objetivo de evaluar el rendimiento clínico del test diseñado en comparación con otro método NAAT, se realizó un estudio analizando 147 muestras clínicas previamente caracterizadas mediante el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay. Se compararon los resultados obtenidos con cada test para la detección de VB, candidiasis (*C. albicans* y *Candida no albicans*) y tricomoniasis. Los valores obtenidos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN se presentan en la Tabla 61.

Los niveles más altos de sensibilidad y especificidad se obtuvieron para *C. albicans* y *T. vaginalis*. En el caso de VB, se registró una sensibilidad alta del 90.5%, pero con una especificidad moderada del 77.4%. Por otro lado, para *Candida no albicans*, la sensibilidad fue considerablemente menor, alcanzando un 31%, mientras que la especificidad fue muy alta, del 100%.

Para analizar si las diferencias entre las clasificaciones de los dos métodos son estadísticamente significativas, se aplicó el test de McNemar. En el caso de *C. albicans* y *T. vaginalis*, los valores de *p* obtenidos fueron superiores a 0.05 (0.48 y 0.32, respectivamente), lo que indica que no existen diferencias significativas en las clasificaciones realizadas por ambos métodos. Por otro lado, para la detección de VB y *Candida no albicans*, los valores de *p* inferiores a 0.05 (0.009 y 0.000008, respectivamente) mostrando que hay diferencias significativas en el diagnóstico entre los métodos evaluados.

Tabla 61. Rendimiento clínico del test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit en comparación con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay y para el diagnóstico de VB, *C. albicans*, *Candida no albicans* y *T. vaginalis*.

Clasificación	TP	TN	FP	FN	% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)	% VPP (IC 95%)	% VPN (IC 95%)
VB	57	65	19	6	90,48 (80,41-96,42)	77,38 (66,95-85,80)	75,00 (66,71-81,79)	91,55 (83,38-95,90)
<i>C. albicans</i>	60	79	3	5	92,31 (82,95-97,46)	96,34 (89,68-99,24)	95,24 (86,79-98,38)	94,05 (87,18-97,35)
<i>Candida no albicans</i>	9	118	0	20	31,03 (15,28-50,83)	100,00 (96,92-100,00)	100,00 (66,37-100,00)	85,51 (82,21-88,28)
<i>T. vaginalis</i>	14	132	0	1	93,33 (68,05-99,83)	100,00 (97,24-100,00)	100,00 (76,84-100,00)	99,25 (95,21-99,89)

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; VP, verdaderos positivos; VN, verdaderos negativos; FP, falsos positivos; FN, falsos negativos; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo;

Dado el mayor número de discrepancias observadas en el diagnóstico de VB y *Candida no albicans*, se decidió realizar un análisis detallado enfocado en estas dos condiciones. En el caso

de VB, se analizó el porcentaje de detección de cada microorganismo en los distintos grupos de muestras (Tabla 62). Tanto en las muestras clasificadas como microbiota normal como en aquellas clasificadas como VB, el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit detectó un mayor porcentaje de *Lactobacillus* spp. (48.3% y 32.0%, respectivamente) en comparación con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay (31.3% y 9.5%). En cuanto a *G. vaginalis* y *F. vaginae*, ambos métodos mostraron un porcentaje de detección menor en microbiota normal en comparación con VB. Sin embargo, el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit presentó porcentajes más altos en ambos casos. En los casos no detectados por el test en evaluación para *Candida no albicans*, los valores de Ct oscilaron entre 33 y 40, lo que indica que las muestras no detectadas presentan una baja cantidad de material genético.

La detección de *Mobiluncus* spp. no pudo ser comparada, ya que este microorganismo no está incluido en el Vaginal Panel Real-Time PCR Kit. No obstante, en las muestras clasificadas como microbiota normal según el test de referencia, el porcentaje de *Mobiluncus* spp. detectado fue mayor que en aquellas clasificadas como VB.

Tabla 62. Porcentaje de microorganismos identificados en la detección de VB por ambos métodos.

	Allplex™ Vaginitis Screening Assay		Vaginal Panel Realtime PCR kit	
	Microbiota normal	VB	Microbiota normal	VB
<i>Lactobacillus</i> spp. (%)	31,3	9,5	48,3	32,0
<i>G. vaginalis</i> (%)	19,0	34,0	17,0	42,2
<i>A. vaginae</i> (%)	6,8	29,3	15,0	36,1
<i>Mobiluncus</i> spp. (%)	23,8	18,4	No incluido	No incluido

Abreviaturas: VB, vaginosis bacteriana.

En la Figura 38 se presenta un análisis comparativo de los resultados obtenidos por el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay y el test Vaginal Panel Realtime PCR kit para las diferentes categorías de muestras. En el caso de microbiota normal, ambos métodos mostraron resultados muy similares (29 frente a 28 muestras, respectivamente). Para VB, se observó que el test Vaginal Panel Realtime PCR kit detectó un mayor número de casos (35) en comparación con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay (25). En cuanto a la infección mixta con *Candida*, para microbiota normal con *C. albicans*, los resultados entre ambos métodos fueron similares (27 frente a 29 muestras). Sin embargo, para microbiota normal con otras especies de *Candida*, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay reportó un mayor número de casos (15 frente a 7). En la detección de VB con *C. albicans*, el método en evaluación identificó más casos (32) que el método de referencia (22). Para la detección de VB con *C. albicans* y *Candida no albicans* el test

test Allplex™ Vaginitis Screening Assay identificó 7 casos frente a ninguno reportado por el Vaginal Panel Real-Time PCR Kit. En las categorías relacionadas con *T. vaginalis*, ambos métodos reportaron seis casos de microbiota normal con *T. vaginalis*. Sin embargo, en el caso de VB con *T. vaginalis*, el test Vaginal Panel Realtime PCR kit detectó dos casos más. En cuanto a la infección mixta con *Candida* y *T. vaginalis*, tanto en caso de VB como de microbiota normal, el número de muestras positivas por el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay fue mayor que por el test Vaginal Panel Realtime PCR kit.

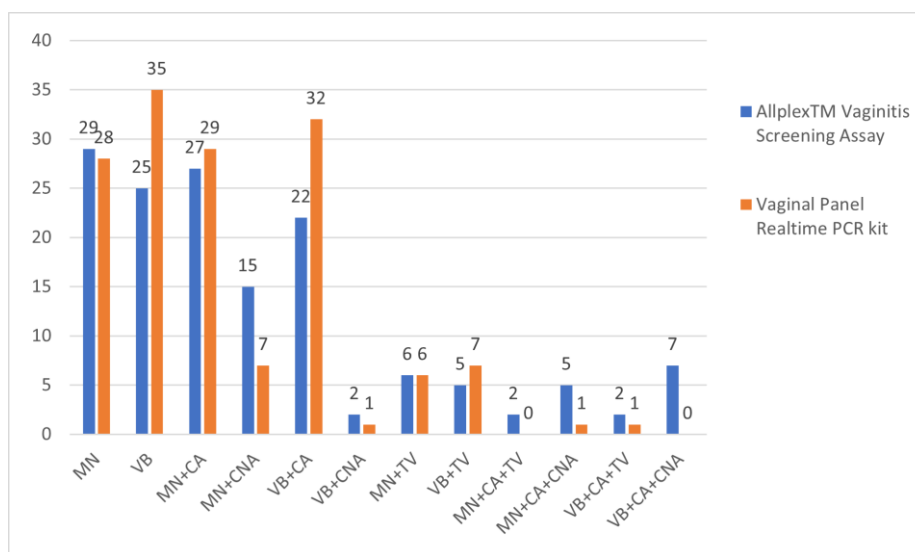


Figura 38. Comparación de los resultados obtenidos entre el Allplex™ Vaginitis Screening Assay y el Vaginal Panel Realtime PCR kit para las diferentes categorías de muestras.

Abreviaturas: MN, microbiota normal; VB, vaginosis bacteriana; CA, *C. albicans*; CNA, *Candida no albicans*; TV, *T. vaginalis*.

4.7.5. Comparación del rendimiento del Vaginal Panel Realtime PCR kit con otros test comerciales

Tras evaluar el rendimiento del test Vaginal Panel Realtime PCR kit tanto a nivel interno como externo, se realizó una comparación con otros test comerciales disponibles en el mercado. Esta comparación se basó en datos de estudios clínicos que analizan el desempeño de diversas pruebas diagnósticas con un amplio número de muestras, en relación con los métodos tradicionales: los criterios de Amsel y Nugent para VB, y la microscopía y el cultivo para VVC y tricomoniasis.

Los resultados del análisis muestran que el test Vaginal Panel Realtime PCR kit tiene un rendimiento clínico comparable a otros tests comerciales (Tabla 63). En particular, los valores obtenidos para sensibilidad, especificidad y valores predictivos demuestran la capacidad del algoritmo de diagnóstico del test para identificar con precisión las especies responsables de VB.

Tabla 63. Rendimiento de test para el diagnóstico de VB, VVC y tricomoniasis en comparación con otros test comerciales. La tabla compara sensibilidad, especificidad y valores predictivos (VPP y VPN) de distintos test comerciales en el diagnóstico de infecciones vaginales comunes.

Test	Dianas	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Referencia
BD MAX™ vaginal panel (Becton Dickinson)^{1,2}	VB	89.8-90.5	85.8-96.5	86.7-89	87.7-97.3	Coleman et al. 2018 [61] Aguirre-Quiñonero et al. 2019 [70] Thompson et al. 2020 [130]
	<i>Candida</i> spp. (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , y <i>C. dubliniensis</i>)	90.7-98.4	91.4-96.8	84.1-93.9	95.7-99.2	
	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	75.9-100	99.6-100	81-100	99.6-100	
	<i>T. vaginalis</i>	93.1-100	99.1-100	89.4-100	99.4-100	
Aptima BV assay (Hologic)^{1,2}	VB	95.0–97.3	85.8–89.6			Schwebke et al. 2020 [131]
Aptima CV/TV assay (Hologic)^{1,2}	<i>Candida</i> spp. (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>)	91.7-92.9	91.0-94.9			
	<i>C. glabrata</i>	84.7-86.2	99.1-98.7			
	<i>T. vaginalis</i>	96.5-97.1	95.1-98.9			
GeneXpert Xpress multiplex vaginal panel (Cepheid, California, EEUU)²	VB			93.8–94	92.9–93.8	Lillis et al. 2023 [46]
	<i>Candida</i> spp. (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>)			97.5-98	92.1-94.6	
	<i>C. glabrata/C. krusei</i>			93.6-97.8	99.3-99.6	
	<i>T. vaginalis</i>			97.3	99.6-99.8	
NuSwab VB (LabCorp, Carolina del Norte, EE. UU)	VB	96.7	92.2	94	95.6	Coleman et al. 2018 [61]
Allplex™ Vaginitis Screening Assay (Seegene)	VB	87.9-91.7	86.6-87.7	66.2-76.3	94.1-97.3	Vieira-Baptista et al. 2021 [132]
	<i>C. albicans</i>	66.7-88.1	98.2-98.8	84.3-85.7	96.4-98.7	
	<i>Candida</i> spp. (<i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i> y <i>C. dubliniensis</i>)	91.1-91.7	95.6-96.2	75.9-78.6	98.6-98.7	
	<i>T. vaginalis</i> ³	94.4-100	99.9	83.3-94.4	99.9-100	
Vaginal Panel Realtime PCR kit (Viracell SL)	VB	93.1-96	88.8-92	90.1-92.3	92.2-96	Este estudio
	<i>C. albicans</i>	94-95.9	99.1-100	96.8-100	94-98.8	
	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	96-100	99.8-100	89.5-100	96-100	
	<i>Candida</i> spp. (<i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>)	80-97	99.7-100	57.1-100	96-99.9	
	<i>T. vaginalis</i>	96	100	100	96	

¹Aprobados por la FDA.

²Los resultados aquí reportados se basan en estudios de datos recolectados tanto de autotoma como de muestras obtenidas por personal clínico.

³Esta comparación es con el GeneXpert TV.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo resaltan avances significativos en el uso de técnicas moleculares, evidenciando mejoras tanto en sensibilidad como en especificidad en comparación con las metodologías tradicionales y otras pruebas disponibles comercialmente. A continuación, se plantea la discusión de varios aspectos clave identificados durante el desarrollo de este proyecto.

La identificación de dianas genéticas altamente conservadas y específicas para cada microorganismo objetivo constituye un paso crítico en el desarrollo de cualquier herramienta de diagnóstico molecular. En este proyecto, la selección de genes para los principales patógenos implicados en VB, VVC y tricomoniasis se basó en criterios clínicos, moleculares y de inclusividad, priorizando su aplicabilidad y especificidad diagnóstica.

Para las especies de *Lactobacillus* spp., inicialmente se consideró el gen 16S ARNr debido a su uso generalizado en estudios microbiológicos. Sin embargo, su alta variabilidad entre especies y su naturaleza multicopia dificultaron alcanzar la especificidad requerida. Por ello, se optó por el gen *rplK*, que permite la identificación más precisa de las principales especies predominantes en la microbiota vaginal: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners* [133]. Aunque inicialmente se propuso incluir únicamente la detección de *L. crispatus*, por ser la especie más frecuente, diversos estudios han destacado la relevancia de incluir otras especies (*L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners*), dada su alta prevalencia y papel clave en la disbiosis vaginal [20,134–136]. Las especies *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* se caracterizan por su capacidad de proteger el entorno vaginal mediante la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. Por esta razón, una microbiota dominada por estas especies se considera un biomarcador confiable de un ecosistema vaginal saludable. Sin embargo, *L. iners* presenta un caso particular. Aunque su presencia se detecta tanto en microbiotas saludables como en estados de disbiosis, su capacidad limitada para producir peróxido de hidrógeno y una forma menos activa de ácido láctico ha generado debate sobre su utilidad como indicador positivo de salud vaginal [1,16]. A pesar de esta controversia, investigaciones recientes han confirmado que *L. iners* es una de las especies más prevalentes en ciertas poblaciones vaginales [14]. Asimismo, algunos estudios sugieren que podría ser una especie transicional, desempeñando un papel clave en la recolonización del entorno vaginal tras alteraciones microbianas [135,137]. Aunque su rol exacto en la estructura de la comunidad

bacteriana vaginal no está completamente definido, su alta prevalencia en muestras vaginales resalta su relevancia dentro del ecosistema microbiano. Los ensayos realizados confirmaron la presencia de estas cuatro especies de *Lactobacillus* en el 94.1% de los casos analizados, destacando *L. iners* como la especie más frecuente, tanto en muestras clasificadas como VB como en microbiota normal, seguida por *L. gasseri* (Figura 18).

Las bacterias *G. vaginalis* y *F. vaginae* se seleccionaron por ser marcadores clave en el desarrollo de VB. La región 16S del ARNr es ampliamente utilizada en diagnósticos moleculares debido a su alta conservación y especificidad dentro del género. Aunque la variabilidad entre especies cercanas es baja, los alineamientos realizados garantizan la diferenciación necesaria para evitar falsos positivos. Estudios previos han destacado que esta región es fundamental para la detección precisa de estos microorganismos ante disbiosis vaginal [47,138,139].

La diana ITSr ha sido validada en múltiples estudios como la mejor opción para la identificación de especies de *Candida*. Esta región contiene secuencias específicas que permiten diferenciar entre *C. albicans* y especies no albicans, como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. La inclusión de la diana ITSr permite diagnósticos diferenciales para guiar el tratamiento antifúngico [48,140]. Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie más prevalente, estudios recientes han demostrado un aumento en la incidencia de las especies *Candida* no albicans, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Este cambio epidemiológico tiene importantes implicaciones clínicas, ya que estas especies presentan patrones de resistencia a tratamientos antifúngicos estándar, particularmente fluconazol, uno de los medicamentos más comúnmente utilizados para tratar infecciones por *Candida* [22,88,89]. Mientras que fluconazol es eficaz contra la mayoría de las infecciones por *C. albicans*, especies como *C. glabrata* y *C. krusei* muestran susceptibilidad reducida o resistencia intrínseca, lo que representa un desafío terapéutico significativo [86]. Estas dificultades son especialmente preocupantes en infecciones recurrentes, ya que la VVC causada por *C. glabrata* se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencia en comparación con la causada por *C. albicans* [86,141].

Para la detección del protozoo *T. vaginalis*, se seleccionó la diana TRIDNATARP debido a que es altamente conservada, específica y está presente en múltiples copias dentro del genoma de *T. vaginalis*. Estas características no solo incrementan la sensibilidad del diagnóstico, sino que también permiten una diferenciación precisa entre *T. vaginalis* y otros protozoos relacionados, lo cual es crítico en entornos clínicos [38].

En las etapas iniciales del diseño, se evaluó la posibilidad de incluir otros microorganismos relacionados, como *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*. Sin

embargo, esta opción fue descartada debido a la alta ubicuidad de estos microorganismos, ya que no siempre están asociados con la patología en cuestión. *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. son las especies que colonizan con mayor frecuencia el tracto urogenital humano, pudiendo aislarse tanto en hombres como en mujeres, y su presencia no siempre indica enfermedad. Aunque en la mayoría de los casos son asintomáticos, se han asociado con afecciones como cervicitis o uretritis [142].

La evaluación clínica tradicional de la vaginitis se basa en una combinación de factores, incluidos los síntomas clínicos, el historial médico, las técnicas de microscopía y el cultivo microbiológico [6,22].

Para el diagnóstico de VB, la tinción de Gram aplicando el método de Nugent es considerado el estándar de referencia [47,61]. El examen microscópico de un frotis en fresco y el cultivo en medio selectivo han sido los métodos tradicionalmente empleados para diagnosticar especies de *Candida* y *T. vaginalis*. Estas técnicas ofrecen ventajas como su bajo costo y la simplicidad de implementación, ya que no requieren equipamiento avanzado, lo que implica que sigan utilizándose en muchos laboratorios clínicos. Sin embargo, presentan importantes limitaciones: requieren transporte rápido de las muestras, son laboriosas y dependen de personal altamente cualificado para interpretar los resultados. Además, los cultivos pueden tardar hasta una semana en generar resultados, lo que retrasa tanto el diagnóstico como el inicio del tratamiento [44,47,61,88]. En el caso de *T. vaginalis*, estas técnicas presentan una sensibilidad limitada debido a la baja motilidad del parásito, lo que dificulta su detección mediante métodos tradicionales. Por esta razón, se recomienda el uso de NAATs para un diagnóstico más preciso [22,38,143,144]. Además, se ha demostrado que las técnicas convencionales no son adecuadas para el diagnóstico de tricomoniasis en hombres, donde la carga parasitaria suele ser más baja y el acceso a muestras representativas es más complicado [39,54]. El uso de NAATs ofrece importantes ventajas sobre las pruebas tradicionales gracias a su alta sensibilidad y especificidad. Su capacidad de automatización para procesar varias muestras de manera simultánea, rapidez y compatibilidad con una variedad de tipos de muestras genitales, como orina, hisopos vaginales autocolectados y endocervicales, facilita significativamente el diagnóstico de vaginitis.

Dadas las diversas etiologías y perfiles bacterianos involucrados, el algoritmo diagnóstico para la VB sigue siendo un tema de discusión constante. Además, el microbioma vaginal experimenta fluctuaciones dinámicas a lo largo de la vida de las mujeres, especialmente en

respuesta a cambios hormonales [1]. Las bacterias patógenas más prevalentes asociadas con la VB son *G. vaginalis* y *A. vaginae*. Otros géneros descritos recientemente como potenciales causantes de VB incluyen *Megasphaera* spp., BVAB-2 y el género *Mobiluncus*. Ciertas investigaciones identifican a *Gardnerella* spp. como la bacteria predominante y un buen indicador de infección, sin embargo, estas bacterias también pueden encontrarse en mujeres sin VB [23,47,61,145]. En particular, la combinación de *G. vaginalis* con *F. vaginae* se ha relacionado estrechamente con la formación de biofilms, lo que contribuye a las recurrencias y dificulta el tratamiento [5,25,26,61,146].

Aunque algunos estudios cuestionan la utilidad de *Lactobacillus* como indicador para el diagnóstico de VB, su presencia refleja la capacidad del sistema para defenderse frente a infecciones y el grado de alteración de la microbiota vaginal. Además, puede ser un marcador útil para evaluar la necesidad de administrar probióticos, especialmente durante tratamientos con antibióticos. Estudios recientes que emplean NAATs han destacado las ventajas de incluir especies de *Lactobacillus* como indicadores positivos de una microbiota vaginal saludable [130,132,147,148]. Un metaanálisis de Muñoz-Barreno et al. (2021) concluyó que las terapias combinadas de antibióticos y probióticos no solo mejoran las tasas de curación, sino que también reducen significativamente las tasas de recurrencia de infecciones vaginales [149]. Estas evidencias respaldan la integración de especies beneficiosas de *Lactobacillus* en los enfoques terapéuticos y diagnósticos, promoviendo estrategias más efectivas para el manejo de infecciones vaginales recurrentes.

La detección de especies como *F. vaginae*, que no suelen identificarse mediante técnicas tradicionales como la tinción de Gram o el cultivo, mejora significativamente la sensibilidad diagnóstica en comparación con métodos convencionales. Esto resalta la necesidad de implementar pruebas moleculares complementarias para identificar otros agentes etiológicos implicados en el diagnóstico de VB [14,150]. La relevancia clínica de *F. vaginae* radica en su asociación con la resistencia a los tratamientos, como el metronidazol, que actualmente es el tratamiento de primera línea para la VB destacando la importancia de métodos diagnósticos avanzados para un manejo terapéutico más eficaz [4,26,83].

En base a estos hallazgos, para el algoritmo de detección de VB se decidió incluir la detección de *G. vaginalis*, *F. vaginae* y *Lactobacillus* spp.. Inicialmente, se consideró la inclusión de *Megasphaera* spp., BVAB-2 y el género *Mobiluncus*. Sin embargo, los resultados obtenidos llevaron a descartar a *Mobiluncus* spp. debido a su alta prevalencia tanto en muestras de VB (70.3%) como en microbiota normal (82.4%), lo que sugiere que su presencia no es específica de VB. Por otro lado, *Megasphaera* spp. y BVAB-2 mostraron una prevalencia inferior al 15% en

microbiota normal, aunque también tuvieron un porcentaje relativamente bajo (33.3%) en muestras positivas para VB, lo que generó dudas sobre su relación con esta condición y resultó en su exclusión del algoritmo (Tabla 33).

El uso de modelos de regresión para definir el diagnóstico, como se ha propuesto en estudios previos [138,151], permitió implementar un algoritmo con una excelente capacidad discriminatoria, evidenciada por un AUC de 0.950. La sensibilidad del 93% y la especificidad del 90.4% obtenidas en las muestras analizadas refuerzan su utilidad clínica (Figura 21).

La selección del *master mix* es un componente crucial en el diseño y desarrollo de cualquier ensayo de qPCR, ya que impacta directamente en la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y robustez del ensayo. Los resultados obtenidos en este estudio durante la evaluación y optimización del *master mix* destacan la importancia de evaluar diferentes formulaciones para identificar aquella que ofrezca el mejor desempeño bajo las condiciones experimentales específicas. Se analizaron *master mix* de Promega, New England Biolabs, Apto-Gen y Meridian Bioscience, observándose variaciones significativas en términos de sensibilidad, intensidad de fluorescencia y estabilidad. El MM3 de Meridian Bioscience fue seleccionado como el más adecuado, gracias a su capacidad para lograr valores de Ct más bajos (mejor sensibilidad) y mayor consistencia entre réplicas. Aunque el MM4, también de Meridian Bioscience, mostró un mejor rendimiento para el control interno y ciertas dianas específicas (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*), presentaba mayor variabilidad y menor reproducibilidad en comparación con el MM3. Adicionalmente, el análisis de los niveles de fluorescencia relativa confirmó que el MM3 generaba señales más intensas en la mayoría de las dianas analizadas.

La inclusión del gen *ARNsa P* humano como control interno endógeno es un elemento clave para garantizar la calidad de las muestras y detectar posibles inhibiciones en la reacción. Este control asegura que el ADN extraído sea de alta calidad y valida la eficacia del proceso de amplificación. Su inclusión en el test añade una capa adicional de robustez al ensayo, aumentando la fiabilidad de los resultados. Esto es particularmente relevante para las muestras obtenidas mediante autotoma, una metodología en creciente demanda que facilita tanto la recolección de muestras como el diagnóstico de infecciones de este tipo [50,152].

Para evitar interferencias entre señales y maximizar la capacidad de detección del termociclador, se decidió dividir las dianas en dos tubos separados, asignando diferentes canales

de fluorescencia a cada diana. Esta estrategia, común en diseños de PCR *multiplex*, mejora significativamente la precisión diagnóstica. La validación del formato *multiplex* demostró que las señales de todas las dianas eran consistentes y no presentaban interferencias significativas.

La extracción de ADN es una etapa crítica en el desarrollo de pruebas moleculares, ya que impacta directamente en la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del diagnóstico. En este estudio, se evaluaron diferentes medios de recolección, métodos y protocolos de extracción para garantizar que el test desarrollado ofreciera resultados confiables y consistentes.

Se analizaron tres métodos de extracción utilizando kits comerciales de Hain Lifescience, TANBead y PCR BIO. Los kits de Hain Lifescience y TANBead fueron seleccionados por su compatibilidad con la automatización, facilidad de uso y resultados óptimos en estudios previos. Por otro lado, el kit de PCR BIO fue evaluado como una alternativa manual y rápida. Para validar estos métodos, se compararon dos medios de recolección: DeltaSwab Amies y DeltaSwab ViCUM®. Las diferencias en el rendimiento y los valores de Ct permitieron evaluar la eficiencia de cada combinación de método y medio de recolección. Los kits basados en partículas magnéticas (TANBead y Hain Lifescience) mostraron un rendimiento comparable, con diferencias en los valores de Ct inferiores a 1.3 ciclos para las dianas analizadas, independientemente del medio de recolección. Sin embargo, el kit de PCR BIO presentó una mayor variabilidad en los valores de Ct y un rendimiento inferior en la detección de *G. vaginalis*/*A. vaginae*, *Candida* spp. y *T. vaginalis*. Este efecto fue más pronunciado al utilizar el medio DeltaSwab ViCUM® en comparación con DeltaSwab Amies. En comparación con los kits de TANBead y Hain Lifescience, el kit de PCR BIO mostró diferencias en Ct de entre 3 y 5.7 ciclos, lo cual es significativo, ya que representa aproximadamente una orden de magnitud en la cantidad de ADN detectado (Tabla 41). Aunque el número de muestras disponibles para esta comparación fue limitado (20 muestras), los resultados sugieren que la composición y capacidad de estabilización del DeltaSwab Amies facilitan una mejor preservación del material genético de estos microorganismos. Este medio se ha descrito como una opción adecuada para la recolección y transporte de muestras debido a su capacidad para preservar la viabilidad de los microorganismos, lo que permite un análisis microbiológico posterior eficiente [153,154].

Dada la complejidad en la extracción de ADN de *T. vaginalis*, se realizó un análisis específico comparando el rendimiento del kit de PCR BIO con el de Hain Lifescience. Cuatro muestras (TV6, TV22, TV23 y TV24) resultaron negativas con el kit de PCR BIO pero positivas con el de Hain

Lifescience, lo que destaca la menor sensibilidad del kit PCRBIO para la detección de este protozoo (Figura 27). Este desempeño se atribuye a la posible menor eficiencia de los reactivos y del protocolo de extracción de PCRBIO para esta diana en particular.

La comparación de los métodos de extracción destaca que TANBead y Hain Lifescience son opciones igualmente confiables para la extracción de ADN en pruebas moleculares, superando en desempeño al método PCRBIO. Los protocolos evaluados mostraron variaciones en la calidad y cantidad de ADN extraído, diferencias atribuibles a factores como el tiempo de lisis, los tampones de lavado y los volúmenes de elución. Estos resultados respaldan la preferencia por los métodos automatizados en entornos clínicos, ya que reducen significativamente la variabilidad técnica y minimizan el riesgo de contaminación cruzada. Esto asegura un desempeño más robusto, consistente y reproducible en el diagnóstico molecular.

La evaluación funcional interna del test constituye un elemento clave en el desarrollo y validación de herramientas diagnósticas, ya que permite establecer parámetros como la fiabilidad, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad bajo condiciones controladas. En este trabajo, se llevaron a cabo pruebas exhaustivas para garantizar que el diseño final del test cumpliera con los estándares clínicos y regulatorios del Reglamento (UE) 2017/746 para la comercialización de dispositivos IVD, mostrando su desempeño en la detección de infecciones vaginales.

El LoD del test se determinó en un rango de 0.7 a 10 copias/ μ L para todas las dianas analizadas (Tabla 46). Este rango asegura una alta sensibilidad, permitiendo la detección precisa de cargas microbianas bajas.

En el estudio de precisión, se calcularon los coeficientes de variación intraensayo, interensayo, entre días y entre equipos para varias muestras positivas y el control positivo. Los valores obtenidos fueron consistentemente inferiores al 4%, evidenciando una elevada reproducibilidad y repetitividad del método propuesto (Tabla 47).

La evaluación de la especificidad analítica y la reactividad cruzada, realizada tanto *in situ* como *in silico*, confirmó la alta especificidad del diseño. Se descartó, entre otros, la amplificación inespecífica de especies no objetivo dentro del género *Candida* y de bacterias asociadas a la microbiota vaginal normal.

La capacidad del método para detectar diversas variantes de las dianas genéticas fue corroborada mediante un estudio de inclusividad, en el cual se obtuvo un alto porcentaje de homología entre las secuencias analizadas y los oligonucleótidos y sondas integrados en el test

(Tabla 48). Esto garantiza la detección de las dianas a nivel global, asegurando su eficacia en diferentes contextos clínicos y poblacionales.

Se evaluaron la sensibilidad y la especificidad analítica del test para garantizar su desempeño clínico. Los resultados mostraron una sensibilidad en el rango de 94-97% para todas las dianas objetivo, y una especificidad de 92% para VB y del 100% para *Candida* y *T. vaginalis* (Tabla 49-51). La menor especificidad observada para VB puede atribuirse a la naturaleza polimicrobiana de esta condición, caracterizada por una combinación de especies bacterianas, así como a las diferencias entre los métodos diagnósticos utilizados. El criterio de Nugent clasifica VB mediante una evaluación semicuantitativa de la microbiota vaginal, basada en la observación microscópica de tres grupos bacterianos principales: *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp. y *Mobiluncus* spp. En contraste, el test molecular utiliza marcadores genéticos específicos para identificar directamente *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* y *F. vaginae*. Estas diferencias metodológicas pueden generar discrepancias en la clasificación de los casos, lo que impacta la especificidad del test.

El formato del producto, que incluye la mezcla de PCR y el control positivo en presentación liofilizada, demostró una excelente estabilidad, lo que facilita su transporte y almacenamiento. El porcentaje de CV máximo de 5.4% indica una alta reproducibilidad del kit incluso bajo condiciones exigentes como el transporte o el uso prolongado (Tabla 52). Los ensayos de estabilidad acelerada permitieron estimar la estabilidad del producto durante toda su vida útil, resultados que fueron posteriormente confirmados mediante estudios de estabilidad en condiciones reales.

Las pruebas realizadas en plataformas como Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System y MagXtract® 3200 System demostraron la adaptabilidad del test a diferentes sistemas, ampliando su aplicabilidad en diversos laboratorios clínicos. En la comparación entre el Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System y el CFX96™ Real-Time PCR Detection System, se obtuvieron resultados idénticos, evidenciando la funcionalidad del test en ambos sistemas de amplificación. Por su parte, el MagXtract® 3200 System mostró una alta concordancia (98.6%) con el equipo Maelstrom™ 4800, confirmando que ambos sistemas son equivalentes en términos de rendimiento técnico.

El test Vaginal Panel RealTime PCR Kit procesado con MagXtract® 3200 demostró una alta eficacia en la extracción de patógenos como *Candida* y *T. vaginalis*, alcanzando sensibilidades del 93.2% y 100%, respectivamente, en comparación con el método de referencia utilizado en

este estudio, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay. No obstante, los valores de sensibilidad y especificidad para la VB fueron ligeramente inferiores, registrando un 86.1% y un 79.4%, respectivamente (Tabla 54). Estas discrepancias pueden atribuirse a diferencias en los algoritmos de clasificación de VB entre los métodos. Los resultados de amplificación y del control interno no evidenciaron inhibición ni fallos en la extracción que pudieran haber afectado la eficiencia del kit.

La validación y comparación del test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit en un entorno hospitalario frente a métodos tradicionales como la tinción de Gram-Nugent, cultivo y MALDI-TOF MS y frente a otros métodos moleculares es un componente esencial para establecer su utilidad en el diagnóstico clínico.

En el caso de la VB, la puntuación de Nugent clasifica las muestras en tres grupos, mientras que el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit las clasifica en dos grupos, subdivididos en dos grados cada uno. Debido a esta discrepancia en la clasificación, las muestras identificadas como microbiota intermedia según Nugent fueron excluidas del análisis presentado en la Tabla 57. Estudios previos que evaluaron métodos moleculares enfrentaron problemas similares, con la necesidad de excluir estas muestras debido a las diferencias entre las clasificaciones de métodos tradicionales y moleculares [69,155]. Los resultados obtenidos demuestran un alto desempeño del test en evaluación, con una sensibilidad del 93.1% y una especificidad del 88.8%, lo que indica que las dianas y el algoritmo incluidos en el test son herramientas precisas para el diagnóstico de VB.

El microbioma vaginal experimenta fluctuaciones a lo largo de la vida de las mujeres, a menudo en respuesta a cambios hormonales [1]. Estudios que utilizan NAATs, tanto de desarrollo propio como comerciales, han destacado las ventajas de incluir *Lactobacillus* como un marcador positivo de una microbiota saludable [130,132,148,150]. Los hallazgos de este estudio son consistentes con investigaciones previas, subrayando que la presencia de *Lactobacillus* en el diagnóstico de VB constituye un indicador confiable de infección. Se identificó que un 23.6% de los casos de VB presentaban niveles muy bajos o ausencia de bacterias anaerobias, además de una ausencia de *Lactobacillus*. Por lo tanto, la inclusión de este marcador es crucial para evaluar el estado del microbioma vaginal e identificar casos en los que la infección podría atribuirse a otros microorganismos. Estudios reportan que el diagnóstico de *Lactobacillus* es particularmente importante en mujeres posmenopáusicas debido a la disminución de estos microorganismos afectando a la salud del microbioma vaginal [39,47,88,89].

La formación de biofilms desempeña un papel crucial en la patogénesis de la VB, las recurrencias y los fracasos terapéuticos [146]. Los resultados del test Vaginal Panel Realtime PCR Kit revelaron un porcentaje significativamente alto de muestras positivas para *G. vaginalis* y *F. vaginae* (53.1%), en comparación con aquellas positivas para solo una de estas bacterias (19.2% y 4.2%).

El análisis cuantitativo de la carga bacteriana mediante curvas estándar mostró diferencias significativas entre las categorías de puntuación de Nugent y los resultados del test a estudio. Mientras que los métodos diagnósticos tradicionales indicaron cargas similares de *Lactobacillus* spp. en las tres categorías de Nugent, el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit mostró un aumento gradual de *Lactobacillus* desde VB G4 hasta NM G1 (Figura 34-C). Esta capacidad de detectar y cuantificar especies bacterianas permite una evaluación más precisa de la VB y del estado general del microbioma vaginal. El test en evaluación identificó una distribución bimodal dentro de la categoría VB G4, sugiriendo que no todos los casos VB G4 son homogéneos. Algunos podrían representar estados transicionales de equilibrio microbiano caracterizados por niveles variables de *G. vaginalis* y *F. vaginae*. Esta distinción tiene relevancia clínica, ya que pacientes en la categoría VB G4 podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas personalizadas basadas en sus perfiles bacterianos. Por el contrario, los métodos diagnósticos tradicionales mostraron cargas similares de *Lactobacillus* spp. entre VB y microbiota normal, pero reflejaron una disminución más consistente en las cargas de *G. vaginalis* y *F. vaginae*. Estos resultados resaltan la utilidad del test Vaginal Panel Realtime PCR Kit para detectar variaciones sutiles en las poblaciones bacterianas que no son identificadas por los métodos tradicionales. Este test podría utilizarse para el seguimiento clínico de las pacientes, permitiendo analizar la evolución y las variaciones en la microbiota vaginal.

Para el diagnóstico de especies de *Candida*, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN mostraron una alta concordancia entre el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit y los métodos de diagnóstico de rutina (Tabla 58). La prevalencia de *C. albicans* fue significativamente mayor, alcanzando un 87.7%, en comparación con las especies de *Candida* no *albicans* (10.3%), en concordancia con datos reportados previamente [35,88]. Sin embargo, dada la creciente incidencia de especies de *Candida* no *albicans* en los últimos años, su diagnóstico requiere especial atención, ya que estas especies están asociadas con infecciones recurrentes y fracasos terapéuticos [6,35,85,88]. Además, los resultados obtenidos con el test en evaluación identificaron 32 muestras adicionales positivas para *Candida* que no fueron detectadas por los métodos diagnósticos tradicionales. Estos hallazgos fueron corroborados mediante otro ensayo NAAT, el test Candidosis Real-TM Quant, destacando la capacidad superior de los NAATs para

identificar infecciones por *Candida* que podrían haber pasado desapercibidas con métodos convencionales. La detección de infecciones mixtas en cuatro muestras es especialmente relevante, ya que estas infecciones pueden requerir estrategias terapéuticas distintas en comparación con las infecciones mono-especie.

Respecto al tratamiento de infecciones por VVC, el fluconazol es eficaz para muchas especies de *Candida*, particularmente *C. albicans*. Sin embargo, especies como *C. glabrata* y *C. krusei* muestran una susceptibilidad reducida o incluso resistencia a este antifúngico, lo que representa un desafío significativo para su manejo clínico [86]. Además, la VVC causada por *C. glabrata* está asociada con un mayor riesgo de recurrencia en comparación con las infecciones provocadas por *C. albicans*. [88]. En esta línea, el test Vaginal Panel Realtime PCR Kit permite detectar de manera eficaz las especies más comunes de *Candida* no *albicans*, facilitando una detección más temprana y precisa en comparación con los métodos diagnósticos convencionales.

En el diagnóstico de *T. vaginalis*, el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit identificó 15 casos positivos que no fueron detectados por los métodos tradicionales, lo que pone de manifiesto la baja sensibilidad de estas técnicas convencionales y respalda la recomendación de utilizar NAATs para el diagnóstico de este patógeno [22,39,45]. El análisis con otro test NAAT, el test GeneProof Trichomonas vaginalis PCR Kit, confirmó 12 de los resultados, mostrando una alta concordancia entre ambos métodos. Sin embargo, los tres casos positivos detectados por el test qPCR pero no confirmados por el otro NAAT podrían representar falsos positivos o diferencias en la sensibilidad entre las pruebas. Estos hallazgos refuerzan la superioridad de los NAATs para la detección confiable de *T. vaginalis*, en comparación con métodos tradicionales como el examen en fresco, la tinción de Gram y el cultivo.

Las infecciones múltiples, que incluyen VB, VVC y tricomoniasis, aunque menos comunes que las infecciones individuales, representan un desafío clínico importante. Tradicionalmente, estas infecciones se han estudiado de forma aislada debido a sus etiologías y síntomas clínicos distintivos. Sin embargo, la disbiosis vaginal asociada con VB puede predisponer el entorno vaginal a la colonización por otros patógenos, lo que incrementa el riesgo de ITS y otras infecciones vaginales, como VVC y tricomoniasis [27,89]. Estudios han reportado que la tricomoniasis a menudo modifica el microbioma vaginal, induciendo un estado característico de VB [38,89]. Estas infecciones múltiples pueden causar síntomas más severos y episodios recurrentes, lo que resalta la importancia de un diagnóstico preciso y un tratamiento adecuado. Los resultados obtenidos evidenciaron una alta incidencia de infecciones múltiples, destacando particularmente las infecciones mixtas de VB con VVC y de VB con tricomoniasis (Figura 35). Comprender la relación entre la disbiosis vaginal inducida por VB y el mayor riesgo de

colonización por patógenos es crucial para desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento. No solo con el objetivo de mejorar la salud vaginal, sino también de reducir el riesgo de complicaciones e infecciones asociadas.

En la evaluación del rendimiento del procesador MagXtract® 3200 System, se registró un porcentaje de resultados inválidos entre el 1.6% y el 4.7% (1.6% en la etapa 1 y 4.7% en la etapa 2), lo que demuestra la funcionalidad y confiabilidad del sistema.

La comparación de resultados entre la tinción de Gram-Nugent y el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit destaca tanto las fortalezas como las limitaciones de cada metodología en el diagnóstico de infecciones vaginales. Los análisis de muestras concordantes y discordantes, junto con el examen detallado de tinciones y curvas de amplificación, subrayan la complementariedad de ambas técnicas, que difieren fundamentalmente en su enfoque: la identificación visual de morfotipos bacterianos frente a la detección cualitativa y cuantitativa de ADN bacteriano. Las discrepancias observadas entre los métodos se atribuyen principalmente a varios factores. En el caso de la tinción de Gram-Nugent, estas incluyen la dependencia de la experiencia del técnico, la subjetividad en la evaluación de los morfotipos y la falta de cuantificación precisa de bacterias específicas. Por otro lado, en el caso de la qPCR, las discrepancias pueden derivarse del uso de umbrales definidos para clasificar las muestras según las proporciones de carga bacteriana, lo que puede resultar en una sobreclasificación de VB en muestras con microbiota intermedia.

Con el objetivo de comparar el rendimiento clínico del test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit con otro método molecular de características similares, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay, se determinaron la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para el diagnóstico de VB, candidiasis y tricomoniasis. Para la detección de VB, el test en evaluación mostró una sensibilidad del 90,5% y una especificidad del 77,4% (Tabla 61). Aunque la sensibilidad es alta, lo que indica que el test detecta la mayoría de los casos de VB, la especificidad es moderada, con un VPP del 75%. Esto sugiere la presencia de un número significativo de falsos positivos, posiblemente debido a las diferencias en las definiciones diagnósticas entre los métodos utilizados, puesto que ambos métodos emplean algoritmos propios para la clasificación de la microbiota y presentan dos diferencias de detección. Por un lado, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay incluye la detección de *Mobiluncus* spp.. Al analizar los casos positivos para *Mobiluncus* spp., se observó una mayor detección en muestras clasificadas como microbiota normal según el método de referencia (Tabla 62). Estos resultados cuestionan el papel de

Mobiluncus spp. en el diagnóstico de VB. Aunque el criterio de Nugent también considera la presencia de *Mobiluncus* spp., su detección y relevancia clínica requieren estudios adicionales para comprender mejor su papel en el diagnóstico y manejo de VB. Por otro lado, el test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit incluye la detección de *L. iners*. lo que podría justificar la mayor tasa de detección de *Lactobacillus* spp. con este test en comparación con el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay tanto en los casos de VB como en de microbiota normal.

El rendimiento del test para la detección de *C. albicans* fue excelente, con una sensibilidad del 92.3% y una especificidad del 96.3%. Estos valores, junto con un VPP del 95.2% y un VPN del 94.1%, reflejan la alta capacidad del test para identificar esta especie con precisión, minimizando falsos positivos y negativos (Tabla 61). Este rendimiento es clínicamente relevante, ya que *C. albicans* es la especie más prevalente en la VVC, representando entre el 80% y el 92% de los casos [48,88]. Sin embargo, para *Candida* no *albicans*, el test en evaluación mostró una baja sensibilidad (31.0%), aunque con una especificidad alta (100%). Los valores de Ct obtenidos en estas muestras sugieren una carga genética baja, lo que podría deberse a una menor sensibilidad del test o a una baja especificidad del método de referencia para estas especies. Además, el test Allplex™ Vaginitis Screening Assay incluye la detección de *C. lusitaniae*, una especie no contemplada en el test en evaluación. Sin embargo, la baja prevalencia de esta especie hace poco probable que todas las muestras discrepantes correspondan a *C. lusitaniae* [74,76]. Estudios de secuenciación serían necesarios para resolver estas discrepancias.

Para el diagnóstico de *T. vaginalis*, el rendimiento del test fue excelente, con una sensibilidad del 93.3% y una especificidad del 100%. No se observaron falsos positivos, lo que respalda la alta confiabilidad del test en la detección de este patógeno. El VPN del 99.3% confirma su capacidad para descartar infecciones por *T. vaginalis* con gran precisión. Este resultado demuestra la alta sensibilidad y especificidad de los métodos NAATs para la detección de este patógeno subdiagnosticadas con métodos tradicionales como la tinción de Gram y el cultivo [39].

A pesar de las diferencias observadas, ambos métodos mostraron ser efectivos para la detección simultánea de VB, VVC y tricomoniasis. Un estudio previo en el que se evaluó el rendimiento del test Allplex™ Vaginitis Screening Assay mostró resultados similares a los obtenidos en este trabajo, excepto para la detección de *Candida*. En ese estudio, el test presentó un rendimiento inferior para *C. albicans* pero excelente para *Candida* no *albicans* [132]. La discrepancia puede explicarse por las diferencias en la prevalencia de las especies entre ambos estudios. En el presente trabajo, las muestras fueron seleccionadas, lo que podría haber influido en los resultados. Un análisis más amplio podría ayudar a esclarecer estas diferencias.

Los resultados obtenidos en la comparación del rendimiento del test Vaginal Panel Realtime PCR kit con otros test comerciales destacan que el test desarrollado es una herramienta diagnóstica altamente eficiente, con un rendimiento clínico comparable al de otros test comerciales aprobados y utilizados internacionalmente, como el BD MAX™ Vaginal Panel, Aptima BV/CV/TV assays y GeneXpert Xpress Vaginal Panel. Los valores altos de sensibilidad y especificidad obtenidos para VB, *C. albicans*, *C. glabrata*/*C. krusei* y *T. vaginalis* son consistentes con los reportados por otros test, e incluso en algunos casos superiores, lo que resalta la fiabilidad del algoritmo de diagnóstico del test desarrollado. La variabilidad observada en el rendimiento para otras especies de *Candida* spp. (como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*), que muestran una sensibilidad más baja en comparación con la especificidad, podría deberse a la menor prevalencia de estas especies en las muestras clínicas evaluadas o a posibles limitaciones en la capacidad de detección del test para estas especies específicas.

No obstante, es importante considerar que los datos comparativos se basan en estudios realizados en diferentes contextos clínicos, lo que incluye variaciones en las poblaciones evaluadas, el tipo de muestras (autotoma frente a muestras tomadas por personal clínico) y los diseños metodológicos de los estudios. Por lo tanto, la estandarización de estos parámetros podría facilitar una comparación más precisa y uniforme entre los distintos test comerciales disponibles.

El diagnóstico preciso de la vaginitis es esencial para proporcionar tratamientos adecuados y reducir el riesgo de infecciones recurrentes. En los últimos años, la creciente necesidad de diagnósticos más rápidos y precisos, especialmente ante infecciones emergentes o difíciles de detectar, ha impulsado la evolución del diagnóstico microbiológico pasando de métodos tradicionales basados en cultivos y observación fenotípica a tecnologías moleculares avanzadas. Los métodos tradicionales destacan por su simplicidad y bajo coste, pero presentan limitaciones como el tiempo requerido y la necesidad de especialistas capacitados para identificar los microorganismos e interpretar los resultados. Por otro lado, las tecnologías moleculares, como las pruebas NAAT, ofrecen ventajas significativas al ser rápidas y precisas. Sin embargo, su alto coste, la necesidad de equipos especializados y personal capacitado limitan su accesibilidad, especialmente en países con recursos limitados. Además, la mayor sensibilidad de estas técnicas podría llevar al sobrediagnóstico en algunos casos. Para optimizar los resultados, se recomienda combinar las pruebas moleculares con la evaluación clínica y el historial médico del paciente. Estas técnicas no solo permiten detectar múltiples microorganismos de manera simultánea, sino

que también abordan desafíos como la resistencia antifúngica, mejorando el diagnóstico y manejo integral de las infecciones vaginales.

El diagnóstico conjunto de infecciones como VB, VVC y tricomoniasis es crucial debido a la similitud de sus síntomas y la frecuencia de coinfecciones, que complican el tratamiento y aumentan el riesgo de recurrencias y transmisión de otras infecciones. La coinfección con *T. vaginalis* puede contribuir a una mayor susceptibilidad a otras infecciones de transmisión sexual, como el VIH, lo que subraya aún más la relevancia clínica de un diagnóstico conjunto y un manejo integral [22,89,156,157].

El test Vaginal Panel Real-Time PCR Kit responde a los principales desafíos en el diagnóstico de infecciones vaginales al proporcionar un diagnóstico rápido (3-4 horas) y preciso, con alta sensibilidad y especificidad. Su compatibilidad con plataformas automatizadas permite simplificar el proceso, reducir significativamente el tiempo de trabajo manual y estandarizar los resultados entre laboratorios, asegurando consistencia y confiabilidad diagnóstica. Comparado con los métodos tradicionales y otros basados en NAAT, este test se posiciona como una herramienta prometedora para el diagnóstico clínico de infecciones vaginales. Su capacidad de semi-cuantificación, combinada con su robustez técnica, facilita su uso y adaptabilidad en una amplia variedad de entornos clínicos. Las evaluaciones realizadas en este trabajo demuestran que ofrece un rendimiento comparable al de otros test comerciales disponibles (Tabla 63). Además, a diferencia de otras soluciones en el mercado, como las ofrecidas por fabricantes como Becton Dickinson, Cepheid o Roche Diagnostics, este test ha sido diseñado para no requerir equipos ni instrumentación específica, lo que facilita su implementación en laboratorios con recursos limitados y lo hace adaptable a diversas necesidades clínicas. Esta ventaja competitiva amplía su alcance, permitiendo su uso tanto en laboratorios altamente especializados como en aquellos con menor infraestructura tecnológica. El Hospital Universitario San Cecilio ha incorporado esta herramienta en su protocolo de diagnóstico de infecciones vaginales, logrando reducir significativamente los tiempos de respuesta diagnóstica. Esto ha mejorado la atención clínica y optimizado los recursos hospitalarios al agilizar el diagnóstico y tratamiento.

En conclusión, el test **Vaginal Panel Real-Time PCR Kit** no solo constituye una innovación técnica, sino que también representa un avance práctico significativo en el diagnóstico microbiológico. Este test establece un nuevo estándar en la identificación rápida y precisa de infecciones vaginales, combinando alta sensibilidad y especificidad con una metodología eficiente y adaptable a diferentes entornos clínicos. Su capacidad para reducir los tiempos de diagnóstico y estandarizar los resultados entre laboratorios refuerza su relevancia como una

herramienta clave para mejorar la calidad de la atención médica y optimizar los recursos en el manejo de estas infecciones.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La combinación de dianas genéticas altamente conservadas y específicas, junto con el diseño *multiplex* en dos tubos de reacción y la inclusión del gen *ARNsa P* humano como control interno, ha permitido el desarrollo de un test de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad. Asimismo, la detección específica de *F. vaginae*, relevante por su capacidad para formar biofilms, así como la identificación y diferenciación de *C. albicans* y las especies más comunes de *Candida* no *albicans*, que suelen mostrar mayor resistencia a los tratamientos antifúngicos convencionales, contribuyen de manera significativa a mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de las infecciones vaginales.
2. El desarrollo de un algoritmo propio de diagnóstico para VB, basado en un modelo de regresión, resultó en una herramienta de alto rendimiento. Este algoritmo alcanzó un AUC de 0,950, con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 90,4%, en comparación con la tinción de Gram-Nugent, reconocida como el *gold standard* en el diagnóstico de VB.
3. La evaluación interna realizada para demostrar la validez científica del método, así como su rendimiento analítico y clínico, conforme al Reglamento (UE) 2017/746, permitió obtener la certificación CE.
4. En comparación con los métodos tradicionales, la evaluación externa del test Vaginal Panel Realtime PCR Kit demostró su excelente desempeño analítico para el diagnóstico de VB y VVC, con una sensibilidad superior al 93% y una especificidad del 88%. Para *T. vaginalis*, los métodos tradicionales mostraron una baja sensibilidad y especificidad, resaltando la importancia de emplear técnicas basadas en PCR, como recomiendan las guías clínicas. En comparación con un método NAAT equivalente, el test desarrollado mostró un buen rendimiento clínico, alcanzando una sensibilidad superior al 90,5% para VB, *C. albicans* y tricomoniasis, y una especificidad superior al 96,3% para *C. albicans* y tricomoniasis. Sin embargo, para VB, la especificidad fue inferior (77,4%), posiblemente debido a diferencias en los microorganismos detectados y al algoritmo específico empleado por cada test.

5. La comparación del rendimiento del test Vaginal Panel Realtime PCR kit frente a resultados de estudios publicados, demuestra que este test ofrece un rendimiento clínico equiparable al de otros test comerciales disponibles en el mercado.

6. La compatibilidad del test con diversas plataformas de amplificación, como el CFX96™ Real-Time PCR Detection System y el Azure Cielo™ 6 Real-Time PCR System, y la integración en sistemas automatizados, como el MagXtract® 3200 System, garantiza su adaptabilidad a diferentes sistemas, facilitando su implementación en una amplia variedad de laboratorios y entornos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5: 1–11. doi:10.3389/fmed.2018.00181
2. Vazquez F, Fernández-Blázquez A, García B. Vaginosis. Vaginal microbiota. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37: 592–601. doi:10.1016/j.eimc.2018.11.009
3. Jespers V, Menten J, Smet H, Poradosú S, Abdellati S, Verhelst R, et al. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*. 2012;12: 1–10. doi:10.1186/1471-2180-12-83
4. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 1–15. doi:10.3389/fcimb.2021.631972
5. Cancelo Hidalgo MJ, Beltrán Vaquero D, Calaf Alsina J, Campillo Arias-Camisón F, Cano Sánchez A, Guerra Guirao JA, et al. Protocolo Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia de diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales. Protocolo actualizado en 2012. *Prog Obstet Ginecol*. 2013;56: 278–284. doi:10.1016/j.pog.2012.09.006
6. Paladine HL, Desai UA. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2018;97: 321–329.
7. Workowski KA, Bolan GA. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. *CDC MMWR Recomm Rep*. 2015;64: 1–137.
8. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012;343: 2–9. doi:10.1097/MAJ.0b013e31823ea228
9. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol*. 2002;92: 451–459. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01547.x
10. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70: 2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107

11. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108: 4680–4687. doi:10.1073/pnas.1002611107
12. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol*. 2017;8: 1–16. doi:10.3389/fmicb.2017.01162
13. Saraf VS, Sheikh SA, Ahmad A, Gillevet PM, Bokhari H, Javed S. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Arch Microbiol*. 2021;203: 3793–3802. doi:10.1007/s00203-021-02414-3
14. Redelinghuys MJ, Geldenhuys J, Jung H, Kock MM. Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10: 1–20. doi:10.3389/fcimb.2020.00354
15. France M, Alizadeh M, Brown S, Ma B, Ravel J. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. *Nat Microbiol*. 2022;7: 367–378. doi:10.1038/s41564-022-01083-2
16. Zheng N, Guo R, Wang J, Zhou W, Ling Z. Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 1–12. doi:10.3389/fcimb.2021.792787
17. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol*. 2017;595: 451–463. doi:10.1113/JP271694
18. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol*. 2015;6: 1–23. doi:10.3389/fphys.2015.00164
19. Kwak YK, Daroczy K, Colque P, Kühn I, Möllby R, Kopp Kallner H. Persistence of *Lactobacilli* in Postmenopausal Women - A Double-Blind, Randomized, Pilot Study. *Gynecol Obstet Invest*. 2017;82: 144–150. doi:10.1159/000446946
20. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact*. 2020;19: 1–24. doi:10.1186/s12934-020-01464-4
21. Eckert LO. Acute Vulvovaginitis. *N Engl J Med*. 2006;355: 1244–1252. doi:10.1056/NEJMcp053720

22. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. CDC MMWR Recomm Rep. 2021;70: 1–187. doi:10.15585/mmwr.rr7004a1
23. Bautista CT, Wurapa E, Saterén WB, Morris S, Hollingsworth B, Sanchez JL. Bacterial vaginosis: A synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. Mil Med Res. 2016;3: 1–10. doi:10.1186/s40779-016-0074-5
24. Catlint BW. Gardnerella vaginalis: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. Clin Microbiol Rev. 1992;5: 213–237. doi:10.1128/CMR.5.3.213
25. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial vaginosis biofilms: Challenges to current therapies and emerging solutions. Front Microbiol. 2016;6: 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.01528
26. Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. An update on the role of Atopobium vaginae in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review. Arch Gynecol Obstet. 2019;300: 1–6. doi:10.1007/s00404-019-05142-8
27. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? Front Cell Infect Microbiol. 2022;11: 1–13. doi:10.3389/fcimb.2021.672429
28. Shvartsman E, Hill JE, Sandstrom P, MacDonald KS. Gardnerella Revisited: Species Heterogeneity, Virulence Factors, Mucosal Immune Responses, and Contributions to Bacterial Vaginosis. Infect Immun. 2023;91: 1–15. doi:10.1128/iai.00390-22
29. Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, Herbst-Kralovetz MM. Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. Curr Opin Infect Dis. 2020;33: 59–65. doi:10.1097/QCO.0000000000000620
30. Achilles SL, Austin MN, Meyn LA, Mhlanga F, Chirenje ZM, Hillier SL. Impact of contraceptive initiation on vaginal microbiota. Am J Obstet Gynecol. 2018;218: 622.e1-622.e10. doi:10.1016/j.ajog.2018.02.017
31. Cetin M, Ocak S, Gungoren A, Hakverdi AU. Distribution of Candida species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. Scand J Infect Dis. 2006;39: 584–588. doi:10.1080/00365540601148491
32. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007;369: 1961–1971. doi:10.1016/S0140-6736(07)60917-9

33. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 2015;122: 785–794. doi:10.1111/1471-0528.12994
34. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. 2021;64: 583–602. doi:10.1111/myc.13248
35. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42: 905–927. doi:10.3109/1040841X.2015.1091805
36. David H, Solomon AP. Molecular association of *Candida albicans* and vulvovaginal candidiasis: focusing on a solution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13: 1–21. doi:10.3389/fcimb.2023.1245808
37. Sobel JD. Genital candidiasis. *Medicine*. 2005;33: 62–65. doi:10.1383/medc.2005.33.10.62
38. Edwards T, Burke P, Smalley H, Hobbs G. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42: 406–417. doi:10.3109/1040841X.2014.958050
39. Van Gerwen OT, Opsteen SA, Graves KJ, Muzny CA. Trichomoniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2023;37: 245–265. doi:10.1016/j.idc.2023.02.001
40. Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol*. 1992;6: 853–862. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb01536.x
41. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect*. 1999;2: 149–156. doi:10.1016/s1286-4579(99)80006-9
42. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11: 300–317. doi:10.1128/CMR.11.2.300
43. Furtado R, Da Costa M, Souza W De, Benchimol M, Alderete JF, Andrés Morgado-Díaz J. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Res*. 2005;15: 704–716. doi:10.1038/sj.cr.7290340
44. Kissinger PJ, Gaydos CA, Seña AC, Scott McClelland R, Soper D, Secor WE, et al. Diagnosis and Management of *Trichomonas vaginalis*: Summary of Evidence Reviewed for the 2021

- Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022;74: S152–S161. doi:10.1093/cid/ciac030
45. Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis*. 2015;15: 1–8. doi:10.1186/s12879-015-1055-0
 46. Lillis RA, Parker RL, Ackerman R, Ackerman J, Young S, Weissfeld A, et al. Clinical Evaluation of a New Molecular Test for the Detection of Organisms Causing Vaginitis and Vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2023;61: 1–9. doi:10.1128/jcm.01748-22
 47. Muzny CA, Cerca N, Elnaggar JH, Taylor CM, Sobel JD, Van Der Pol B. State of the Art for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2023;61: 1–15. doi:10.1128/jcm.00837-22
 48. Chen Z, Jin J, Chen H, Chen Y, Feng S. The bacterial communities in vagina of different *Candida* species-associated vulvovaginal candidiasis. *Microb Pathog*. 2023;177: 1–7. doi:10.1016/j.micpath.2023.106037
 49. Peebles K, Velloza J, Balkus JE, McClelland RS, Barnabas R V. High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sex Transm Dis*. 2019;46: 304–311. doi:10.1097/OLQ.0000000000000972
 50. Galán JC, Lepe JA, Otero L, Serra J, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 24a. SEIMC. 2018;1: 1–94.
 51. Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2018;18: e339–e347. doi:10.1016/S1473-3099(18)30103-8
 52. Pereyre S, Laurier Nadalié C, Bébéar C, Arfeuille C, Beby-Defaux A, Berçot B, et al. *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23: 122.e1-122.e7. doi:10.1016/j.cmi.2016.10.028
 53. Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, Kissinger P, Nyirjesy P, Schwebke JR, et al. A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clin Infect Dis*. 2015;61: S837-848. doi:10.1093/cid/civ738
 54. Hobbs MM, Seña AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect*. 2013;89: 434–438. doi:10.1136/sextrans-2013-051057

55. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections, 2008. WHO. 2012; 1–28.
56. World Health Organization. Guidelines for the management of symptomatic Sexually Transmitted Infections. WHO. 2021; 1–216.
57. Bachmann LH, Hobbs MM, Seña AC, Sobel JD, Schwebke JR, Krieger JN, et al. *Trichomonas vaginalis* genital infections: Progress and challenges. *Clin Infect Dis*. 2011;53: S160–S172. doi:10.1093/cid/cir705
58. Morris M, Nicoll A, Simms I, Wilson J, Catchpole M. Bacterial vaginosis: a public health review. *Br J Obstet Gynaecol*. 2001;108: 439–450. doi:10.1111/j.1471-0528.2001.00124.x
59. Lazenby GB, Soper DE, Nolte FS. Correlation of leukorrhea and *Trichomonas vaginalis* infection. *J Clin Microbiol*. 2013;51: 2323–2327. doi:10.1128/JCM.00416-13
60. Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17: 794–803. doi:10.1128/CMR.17.4.794-803.2004
61. Coleman JS, Gaydos CA. Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis: an Update. *J Clin Microbiol*. 2018;56: 1–9. doi:10.1128/jcm.00342-18
62. Amsel R, Patricia Totten MA, Carol Spiegel MA, S Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific Vaginitis. Diagnostic Criteria and Microbial and Epidemiologic Associations. *Am J Med*. 1983;74: 14–22. doi:10.1016/0002-9343(83)91112-9
63. Schwebke JR, Hillier SL, Sobel JD, McGregor JA, Sweet RL. Validity of the Vaginal Gram Stain for the Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *Obstet Gynecol*. 1996;88: 573–576. doi:10.1016/0029-7844(96)00233-5
64. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 1991;29: 297–301. doi:10.1128/jcm.29.2.297-301.1991
65. 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: 413–415. doi:10.1136/sti.78.6.413
66. Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Ison C, Pearson J. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarage. *Br Med J*. 1994;308: 298–302. doi:10.1136/bmj.308.6924.295

67. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol.* 2005;5: 1–11. doi:10.1186/1471-2180-5-61
68. Brown HL, Fuller DD, Jasper LT, Davis TE, Wright JD. Clinical evaluation of Affirm VPIII in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12: 17–21. doi:10.1080/1064744042000210375
69. Richter SS, Otiso J, Goje OJ, Vogel S, Aebly J, Keller G, et al. Prospective Evaluation of Molecular Assays for Diagnosis of Vaginitis. *J Clin Microbiol.* 2019;58: 1–5. doi:10.1128/JCM.01264-19
70. Aguirre-Quiñonero A, de Castillo-Sedano IS, Calvo-Muro F, Canut-Blasco A. Accuracy of the BD MAX™ vaginal panel in the diagnosis of infectious vaginitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38: 877–882. doi:10.1007/s10096-019-03480-8
71. Sherrard J, Wilson J, Donders G, Mendling W, Jensen JS. 2018 European (IUSTI/WHO) International Union against sexually transmitted infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO) guideline on the management of vaginal discharge. *Int J STD AIDS.* 2018;29: 1258–1272. doi:10.1177/0956462418785451
72. Neal CM, Martens MG. Clinical challenges in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *SAGE Open Med.* 2022;10: 1–7. doi:10.1177/20503121221115201
73. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30: 635–644. doi:10.1016/j.eimc.2012.01.012
74. Maldonado I, Cataldi S, Garbasz C, Rellosio S, Striebeck P, Guelfand L, et al. Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35: 151–154. doi:10.1016/j.riam.2018.02.002
75. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 3340–3345. doi:10.1128/JCM.00213-06

76. Nyirjesy P, Brookhart C, Lazenby G, Schwebke J, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022;74: S162–S168. doi:10.1093/cid/ciab1057
77. Asian DL, Evin Gulbahce H, Stelow EB, Setty S, Brown CA, McGlennen RC, et al. The diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in liquid-based pap tests: Correlation with PCR. *Diagn Cytopathol*. 2005;32: 341–344. doi:10.1002/dc.20256
78. Nye MB, Schwebke JR, Body BA. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200: 188.e1-188.e7. doi:10.1016/j.ajog.2008.10.005
79. Amy L. Leber. Collection, Transport, and Manipulation of Clinical Specimens and Initial Laboratory Concerns. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press; 2016. pp. 2.1.1-2.1.30. doi:10.1128/9781555818814.ch2.1
80. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods: approved guideline. MM13-A. CLSI. 2005;25: 1–51.
81. Strauss RA, Eucker B, Savitz DA, Thorp JM. Diagnosis of bacterial vaginosis from self-obtained vaginal swabs. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005;13: 31–35. doi:10.1080/10647440400025611
82. Nelson DB, Bellamy S, Gray TS, Nachamkin I. Self-collected versus provider-collected vaginal swabs for the diagnosis of bacterial vaginosis: An assessment of validity and reliability. *J Clin Epidemiol*. 2003;56: 862–866. doi:10.1016/S0895-4356(03)00073-8
83. Menard JP. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: Current and emerging therapies. *Int J Womens Health*. 2011;3: 295–305. doi:10.2147/ijwh.s23814
84. Bagnall P, Rizzolo D. Bacterial vaginosis: A practical review. *J Am Acad Physician Assist*. 2017;30: 15–21. doi:10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa
85. Dovnik A, Golle A, Novak D, Arko D, Takač I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2015;24: 5–7. doi:10.15570/actaapa.2015.2

86. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol.* 2017;7: 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.02173
87. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol.* 2012;120: 1407–1414. doi:10.1097/AOG.0b013e31827307b2
88. Wang Y, Liu Z, Chen T. Vaginal microbiota: Potential targets for vulvovaginal candidiasis infection. *Heliyon.* 2024;10: 1–12. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27239
89. Sobel JD, Vempati YS. Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis Pathophysiologic Interrelationship. *Microorganisms.* 2024;12: 1–10. doi:10.3390/microorganisms12010108
90. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 11060–11065. doi:10.1073/pnas.1502875112
91. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N, et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep.* 2015;5: 1–9. doi:10.1038/srep08988
92. Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas.* 2016;91: 42–50. doi:10.1016/j.maturitas.2016.05.015
93. Aguin TJ, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis in Pregnancy. *Curr Infect Dis Rep.* 2015;17: 1–6. doi:10.1007/s11908-015-0462-0
94. Koss CA, Baras DC, Lane SD, Aubry R, Marcus M, Markowitz LE, et al. Investigation of metronidazole use during pregnancy and adverse birth outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56: 4800–4805. doi:10.1128/AAC.06477-11
95. Ajiji P, Uzunali A, Ripoche E, Vittaz E, Vial T, Maison P. Investigating the efficacy and safety of metronidazole during pregnancy; A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X.* 2021;11: 1–9. doi:10.1016/j.eurox.2021.100128
96. Donders GGG, Bellen G, Grinceviciene S, Ruban K, Vieira-Baptista P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Res Microbiol.* 2017;168: 845–858. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.004

97. Dong M, Wang C, Li H, Yan Y, Ma X, Li H, et al. Aerobic Vaginitis Diagnosis Criteria Combining Gram Stain with Clinical Features: An Establishment and Prospective Validation Study. *Diagnostics*. 2022;12: 1–14. doi:10.3390/diagnostics12010185
98. Rumyantseva TA, Bellen G, Savochkina YA, Guschin AE, Donders GGG. Diagnosis of aerobic vaginitis by quantitative real-time PCR. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;294: 109–114. doi:10.1007/s00404-015-4007-4
99. Wang C, Fan A, Li H, Yan Y, Qi W, Wang Y, et al. Vaginal bacterial profiles of aerobic vaginitis: a case–control study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;96: 1–11. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2019.114981
100. Cerikcioglu N, Sinan Beksac M. Cytolytic vaginosis: Misdiagnosed as candidal vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004;12: 13–16. doi:10.1080/10647440410001672139
101. Yang S, Zhang Y, Liu Y, Wang J, Chen S, Li S. Clinical Significance and Characteristic Clinical Differences of Cytolytic Vaginosis in Recurrent Vulvovaginitis. *Gynecol Obstet Invest*. 2016;82: 137–143. doi:10.1159/000446945
102. Suresh A, Rajesh A, Bhat RM, Rai Y. Cytolytic vaginosis: A review. *Indian J Sex Transm Dis*. 2009;30: 48–50. doi:10.4103/0253-7184.55490
103. Sobel JD, Reichman O, Misra D, Yoo W. Prognosis and treatment of desquamative inflammatory vaginitis. *Obstet Gynecol*. 2011;117: 850–855. doi:10.1097/AOG.0b013e3182117c9e
104. Lynch C. Vaginal Estrogen Therapy for the Treatment of Atrophic Vaginitis. *J Womens Health*. 2009;18: 1595–1606. doi:10.1089/jwh.2008.1281
105. Ortiz-de la Tabla V, Gutiérrez F. Cervicitis: Etiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;37: 661–667. doi:10.1016/j.eimc.2018.12.004
106. Dei M, Di Maggio F, Di Paolo G, Bruni V. Vulvovaginitis in childhood. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2010;24: 129–137. doi:10.1016/j.bpobgyn.2009.09.010
107. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: 597–600. doi:10.1093/nar/gkt376
108. Altschup SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

109. Thompson JD, Plewniak F, Thierry J-C, Poch O. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Res.* 2000;28: 2919–2926. doi:10.1093/nar/28.15.2919
110. Owczarzy R, Tataurov A V., Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008;36: W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198
111. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47: 721–726. doi:10.1128/JCM.01384-08
112. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry.* 1977;74: 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
113. Sánchez C, Guerrero C, Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica: recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. *SEIMC.* 2003;1: 1–27.
114. Gadea I, Cuenca M, Martín E, Pemán J, Potón J, Rodríguez JL. Procedimientos en Microbiología Clínica: Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *SEIMC.* 2006;1: 1–69.
115. Limoncu ME, Kilimcioğlu AA, Kurt Ö, Östan I, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res.* 2007;100: 599–602. doi:10.1007/s00436-006-0292-y
116. Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline. Second Edition. EP15-A2. CLSI. 2005;25: 1–64.
117. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. EP25-A. CLSI. 2009;29: 1–56.
118. Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Proposed Guideline. Second Edition. MM3-P2. CLSI. 2005;25: 1–71.
119. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. Second Edition. EP12-A2. CLSI. 2008;28: 1–45.
120. Deshpande SS. Enzyme Immunoassays. From Concept to Product Development. Springer NY. 1996;1: 275–359. doi:10.1007/978-1-4613-1169-0

121. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: approved guideline. Second edition. EP5-A2. CLSI. 2004;24: 1–52.
122. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry: approved guideline. Second edition. EP7-A2. CLSI. 2005;25: 1–120.
123. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: approved guideline. EP17-A. CLSI. 2004;24: 1–52.
124. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends Food Sci Technol. 2014;37: 115–126. doi:10.1016/j.tifs.2014.03.008
125. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23: 550–576. doi:10.1128/CMR.00074-09
126. Food and Drug Administration. Highly Multiplexed Microbiological/Medical Countermeasure In Vitro Nucleic Acid Based Diagnostic Devices Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. FDA. 2014; 1–32.
127. Thompson JS. Colistin-Oxolinic Acid Blood Agar: a Selective Medium for the Isolation of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol. 1985;21: 843. doi:10.1128/jcm.21.5.843-.1985
128. Choobin H, Asiyabi S, Hesamizadeh K, Bamdad T. False-negative results in taqman one-step rt-pcr test: Evaluation of endogenous internal control function used in sars-cov-2 detection tests. Jundishapur J Microbiol. 2021;14: 1–9. doi:10.5812/jjm.116533
129. Vinayagamoorthy T, Maryanski D, Vinayagamoorthy D, Hay KSL, Yo J, Carter M, et al. Improved internal control for molecular diagnosis assays. MethodsX. 2015;2: 159–164. doi:10.1016/j.mex.2015.03.002
130. Thompson A, Timm K, Borders N, Montoya L, Culbreath K. Diagnostic performance of two molecular assays for the detection of vaginitis in symptomatic women. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39: 39–44. doi:10.1007/s10096-019-03694-w/Published
131. Schwebke JR, Taylor SN, Ackerman R, Schlaberg R, Quigley NB, Gaydos CA, et al. Clinical validation of the aptima bacterial vaginosis and aptima Candida/Trichomonas vaginitis assays: Results from a prospective multicenter clinical study. J Clin Microbiol. 2020;58: 1–10. doi:10.1128/JCM.01643-19

132. Vieira-Baptista P, Silva AR, Costa M, Aguiar T, Saldanha C, Sousa C. Clinical validation of a new molecular test (Seegene Allplex™ Vaginitis) for the diagnosis of vaginitis: a cross-sectional study. *BJOG*. 2021;128: 1344–1352. doi:10.1111/1471-0528.16661
133. Demkin V V., Koshechkin SI, Slesarev A. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli. *Mol Cell Probes*. 2016;32: 33–39. doi:10.1016/j.mcp.2016.11.006
134. Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol*. 2015;6: 1–18. doi:10.3389/fphys.2015.00081
135. Balashov S V., Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyga SE. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78: 321–327. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.004
136. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners. *BMC Microbiol*. 2007;7: 1–13. doi:10.1186/1471-2180-7-115
137. Oyenih AB, Haines R, Trama J, Faro S, Mordechai E, Adelson ME, et al. Molecular characterization of vaginal microbiota using a new 22-species qRT-PCR test to achieve a relative-abundance and species-based diagnosis of bacterial vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14: 1–22. doi:10.3389/fcimb.2024.1409774
138. Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50: 2321–2329. doi:10.1128/JCM.00506-12
139. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 3270–3276. doi:10.1128/JCM.01272-07
140. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic Candida species. *J Microbiol Methods*. 2015;111: 50–56. doi:10.1016/j.mimet.2015.02.004
141. Sobel JD. Treatment of vaginitis caused by non-albicans Candida species. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2024;22: 289–296. doi:10.1080/14787210.2024.2347953

142. Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? – a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32: 1845–1851. doi:10.1111/jdv.15146
143. Van Der Pol B. Clinical and Laboratory Testing for *Trichomonas vaginalis* Infection. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 7–12. doi:10.1128/JCM.02025-15
144. Patil MJ, Nagamoti JM, Metgud SC. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet mount microscopy, in pouch TV culture system, and PCR. *J Glob Infect Dis*. 2012;4: 22–25. doi:10.4103/0974-777X.93756
145. Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, et al. Development and validation of a highly accurate quantitative real- time PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 1017–1024. doi:10.1128/JCM.03104-15
146. Bradshaw CS, Sobel JD. Current Treatment of Bacterial Vaginosis-Limitations and Need for Innovation. *J Infect Dis*. 2016;214: S14–S20. doi:10.1093/infdis/jiw159
147. Kusters JG, Reuland EA, Bouter S, Koenig P, Dorigo-Zetsma JW. A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34: 1779–1785. doi:10.1007/s10096-015-2412-z
148. Lynch T, Peirano G, Lloyd T, Read R, Carter J, Chu A, et al. Molecular diagnosis of vaginitis: Comparing quantitative PCR and microbiome profiling approaches to current microscopy scoring. *J Clin Microbiol*. 2019;57: 1–13. doi:10.1128/JCM.00300-19
149. Muñoz-Barreno A, Cabezas-Mera F, Tejera E, Machado A. Comparative effectiveness of treatments for bacterial vaginosis: A network meta-analysis. *Antibiotics*. 2021;10: 1–16. doi:10.3390/antibiotics10080978
150. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*. 2008;47: 33–43. doi:10.1086/588661
151. Beck D, Foster JA. Machine learning classifiers provide insight into the relationship between microbial communities and bacterial vaginosis. *BioData Min*. 2015;8: 1–9. doi:10.1186/s13040-015-0055-3

152. Polo R, Palacios R, Barberá MJ. Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. GESIDA. 2017;1: 1–105.
153. Tyrrell KL, Citron DM, Leoncio ES, Goldstein EJC. Comparison of the Copan eSwab system with an agar swab transport system for maintenance of fastidious anaerobic bacterium viability. *J Clin Microbiol.* 2016;54: 1364–1367. doi:10.1128/JCM.03246-15
154. Fontana C, Favaro M, Limongi D, Pivonkova J, Favalli C. Comparison of the eSwab collection and transportation system to an amies gel transystem for Gram stain of clinical specimens. *BMC Res Notes.* 2009;2: 1–6. doi:10.1186/1756-0500-2-244
155. Schwebke JR, Gaydos CA, Nyirjesy P, Paradis S, Kodsí S, Cooper CK. Diagnostic Performance of a Molecular Test versus Clinician Assessment of Vaginitis. *J Clin Microbiol.* 2018;56: 1–13. doi:10.1128/JCM.00252-18
156. Schwebke JR, Nyirjesy P, Dsouza M, Getman D. Vaginitis and risk of sexually transmitted infections: results of a multi-center U.S. clinical study using STI nucleic acid amplification testing. *J Clin Microbiol.* 2024;62: 1–13. doi:10.1128/jcm.00816-24
157. Seña AC, Goldstein LA, Ramirez G, Parish AJ, McClelland RS. Bacterial Vaginosis and Its Association with Incident *Trichomonas vaginalis* Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sex Transm Dis.* 2021;48: E192–E201. doi:10.1097/OLQ.0000000000001537

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I. Aprobación del comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio.



DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D. ANTONIO SALMERÓN GARCÍA, EN CALIDAD DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA PROVINCIA DE GRANADA (CEIM/CEI GRANADA)

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador: , para realizar el estudio titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Validación del test Vaginal Panel Realtime PCR kit RTPCR005 (Viracell S.L) para el diagnóstico molecular de los principales patógenos implicados en la Vaginosis Bacteriana (VB), Vulvovaginitis Candidiásica (VVC) y Vulvovaginitis por Trichomonas (VVT).

Código protocolo: MIC_VAG_1

Código Portal de Ética: 1517-N-22

Investigador Principal: ADOLFO DE SALAZAR GONZALEZ

Centro: Hospital San Cecilio

Versión de los documentos:

Protocolo	Versión: 2.0 de fecha 05/10/2022
-----------	----------------------------------

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.
- El protocolo del estudio contempla de forma adecuada toda la legislación aplicable
- Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Por lo que este Comité ha acordado emitir DICTAMEN FAVORABLE para la realización del dicho estudio, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro/os correspondiente/s determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevarlo a cabo.

En el caso de que su estudio requiera acceso y uso de la información sanitaria contenida en los sistemas de información del sistema sanitario público de Andalucía, tendrán que estar a lo establecido en la Resolución Conjunta 1/2021 de fecha 04/12/2021, de la Secretaría General de Investigación, Desarrollo e Innovación en Salud de la Consejería de Salud y Familias y de la Dirección Gerencia del SAS, por la que se aprueban las Instrucciones para la ordenación de acceso y uso de la información sanitaria contenida en los sistemas de información del Sistema Sanitario Público de Andalucía con fines de investigación e innovación por la entidades dependientes de la Consejería de Salud y Familias.

Lo que firmo en Granada

Código:	6b9E564FP1R4rhtTuxaTVV1J63H	Fecha:	19/10/2022
Firmado Por:	ANTONIO SALMERON GARCIA		
Url De Verificación:	https://uz856.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	Página:	1/3



Es responsabilidad del Investigador Principal garantizar que todos los investigadores asociados con este proyecto, conozcan las condiciones de aprobación y los documentos aprobados.

El Investigador Principal debe informar a la Secretaría del CEIm, mediante una enmienda, informe anual de seguimiento o notificación, de

- Cualquier cambio significativo en el proyecto y la razón de ese cambio, incluida una indicación de las implicaciones éticas (si las hubiera)
- Cualquier evento imprevisto o inesperado, como desviaciones de protocolo
- El cambio de Investigador Principal
- Informe anual de seguimiento
- La fecha de finalización del estudio
- Informe final del estudio y/o publicación de resultados

ANEXO I COMPOSICIÓN DEL CEI/CEIM DE GRANADA

El Comité tanto en su composición como en los PNTs, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)

En dicha reunión del Comité se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador o se detecte conflicto de interés, este se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

PRESIDENTA: D ^a Aurora Bueno Cavanillas	Catedrática M. Preventiva y S. Pública (UGR)
VICEPRESIDENTA: D ^a Paloma Muñoz de Rueda	Doctora en Ciencias Biológicas - Unidad de Apoyo Investig - HUSCC
SECRETARIO: D. Antonio Salmerón García	F.E.A Farmacia Hospitalaria.- HUCSC
VOCAL:	
Álvarez López, Miguel	F.E.A Cardiología HUVN
Arias Santiago, Salvador	F.E.A. Dermatología UGR (Vinculado HUVN)
Cardona Contreras Jesús	F.E.A. Obstetricia y Ginecología HUCSC
Cobos Vargas, Angel	Enfermero HUCSC-Respos. Seguridad del Paciente
Cuadros Celormio, Marta Eugenia	Doctora en Farmacia UGR
Delgado Pérez, Juan Ramón	F.E.A. HUVN (Jefe Sección Oncología)
Del Pozo Gevilán, Esperanza	Catedrática Farmacología Clínica UGR
Domenech Gil, Luis Miguel	Enfermero HUCSC

Código:	6ba5384f22854rkiTnuatYVY363H	Fecha:	19/10/2022
Firmado Por:	ANTONIO SALMERON GARCIA		
Url De Verificación:	https://wz050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	Página:	2/3



 Junta de Andalucía Consejería de Salud y Familias GOBIERNO DE ANDALUCÍA		Metodología/Estadística HUCSC
Dominguez Almendros, Sonia		
Espínola García Esther	Distrito Granada-Metropolitano (Farmaceutica AP)	
Gálvez Martín, Patricia	Doctora en Farmacia.- BIOIBERICA S.A.U	
García Lirola, M.ª Angeles	Distrito Granada-Metropolitano Farmaceutica A.P	
García Valverde, M.ª Dolores	Profesora Facultad Derecho.-Doctors en Derecho	
Gorlat Sánchez Berta	Enfermera/Supervisora HUVN	
Guijosa Campos Pilar	Distrito Granada-Metropolitano (Epidemiología)	
Jimenez Pacheco, Antonio	F.E.A Urología.- HUCSC	
López Guadalupe Miguel	Miembro LEGO – Prof. titular Hº UGR	
Luque Martínez, Francisco M.	Técnico Función Admva.- HUVN	
Manzano Manzano Fco. Luis	F.E.A. Medicina Intensiva (HUVN)	
Marín Jiménez, Rafael	Técnico Oficina Delegado Protección de datos del SSPA	
Martín Díaz, Manuel	F.E.A. Cirugía General HOSP. SANTA ANA MOTRIL	
Martínez Galán Joaquina	F.E.A. Oncología Médica HUVN	
Martínez García, Encarnación	Matrona.- Hospital Alta Resolución Guadix	
Martínez González Luis Javier	Doctor en Ciencias Biológicas.Investigador GENYO	
Molina Rivas, Esther	Profesora Facultad Ciencias Salud (Enfermera)	
Morales Romero Antonio	Enfermero.- Distrito Granada-Metropolitano	
Moron Romero, Rocío	F.E.A. Farmacia Hospitalaria HUCSC	
Mozas Moreno Juan	F.E.A. Obstetricia y Ginecología UGR Vínculo HUVN	
O'Valle Ravassa, Francisco Javier	Vicerrectorado de Investigación UGR	
Pérez Fernández, Antonio Juan	C. Etica Asistencial AGS Sur	
Sánchez López, José Darío	F.E.A Cirugía Oral y Maxilofacial.- HUVN	

Que dicho Comité, está constituido y actua de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en Granada a

Código:	6bafe564ff39f4b017e0a770026291	Fecha:	19/10/2022
Firmado Por:	ANTONIO SALMERON GARCIA		
Url De Verificación:	https://wz856.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	Página:	3/3

