

Comparación de los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana y análisis de los resultados discordantes por el método de Ison y Hay

MARÍA ANGÉLICA MARTÍNEZ^{1,a}, ALFREDO OVALLE²,
ANA MARÍA GAETE¹, EDUARDO LILLO^{3,b}, FELIPE DE LA FUENTE^{1,c},
FABIÁN ARANEDA^{1,3,b}, RODRIGO VILLASECA^{1,3,b}, HUGO SALINAS⁴

¹Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Servicio y Departamento de Obstetricia, Ginecología y Neonatología, Hospital San Borja Arriarán. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

³Escuela de Obstetricia y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

⁴Maternidad Hospital Clínico Universidad de Chile.

^aMV, MSc, Ph.D.

^bLicenciado Matrn.

^cEstudiante de Enfermería.

No hubo aporte financiero para el desarrollo de este estudio ni existen conflictos de intereses.

Recibido el 21 de abril de 2010, aceptado el 2 de diciembre de 2010

Correspondencia a:
María Angélica Martínez Tagle
Ph.D.

Suecia 1524 Depto. 403
Teléfono: 56 (2) 9786639
Fax: 56 (2) 7355855
E-mail: mamartin@med.uchile.cl

Nugent and Spiegel criteria for the diagnosis of bacterial vaginosis. Analysis of discordant specimens by the Ison and Hay method

Background: Vaginal infection is the commonest cause of genital symptoms and has obstetric and gynecological implications. **Aim:** To compare the Nugent and Spiegel methods for the diagnosis of bacterial vaginosis (BV) and to analyze discordant specimens using Ison and Hay (Ison/Hay) criteria. **Material and Methods:** After discarding cases with Candidiasis, deficient specimens or those lacking bacteria, a total of 348 Gram-stained smears vaginal specimens received for the diagnosis of BV, were analyzed. **Results:** Vaginal microbiota was classified as normal in 203 and 237 samples (58 and 68% of samples), according to Nugent and Spiegel criteria, respectively. One hundred and five (30%) and 111 samples (32%), were classified as VB according to Nugent and Spiegel criteria, respectively. Both criteria were concordant in 308 samples (88.5%). The 40 (11.5%) discordant specimens were classified as intermediate microflora by the Nugent system and as normal or BV by Spiegel. Among these, the Ison/Hay procedure identified four categories of microbiota. Ten (25%) specimens were classified as grade II microbiota, confirming their categorization by Nugent as intermediate microbiota, six (15%) were classified in the III category, confirming the diagnosis of BV by Spiegel, 13 (32.5%) corresponded to the category III, that does not exist in the Nugent and Spiegel categorization systems. Finally, 11 specimens could not be assigned to one category due to microscopic limitations to distinguish bacterial morphotypes. **Conclusions:** The systems proposed by Spiegel, Nugent and Ison / Hay are comparable for the diagnosis of BV. However, we recommend the use of Ison/Hay procedure to evaluate vaginal microbiota, due to its wider range of categories, allowing a better discrimination of the vaginal microbiota.

(Rev Med Chile 2011; 139: 66-71).

Key words: Gram's stain; Staining and labeling; Vaginosis, bacterial.

Las infecciones vulvovaginales son un motivo frecuente de consulta a un especialista en mujeres en edad reproductiva. El diagnóstico específico permite un tratamiento apropiado disminuyendo los costos y efectos secundarios de la automedicación o las compli-

caciones de una enfermedad inadecuadamente tratada¹. La vaginosis bacteriana (VB) con una prevalencia cercana a 30%, es la infección vaginal más frecuente².

Los antecedentes actualmente disponibles recomiendan el tratamiento de VB en pacientes

sintomáticas, las que representan el 50% de los casos, como asimismo de embarazadas con riesgo de parto prematuro³. No obstante, la VB ha sido también asociada con complicaciones ginecológicas y es un factor de riesgo significativo de adquirir infecciones de transmisión sexual (ITS)^{4,5}. Es por ello necesario contar con un procedimiento de diagnóstico rápido, económico y eficiente.

El diagnóstico de VB puede ser efectuado aplicando criterios clínicos, o por evaluación de los morfotipos bacterianos presentes en el Gram de la secreción vaginal. El diagnóstico clínico requiere la demostración de 3 de 4 parámetros: secreción vaginal grisácea, pH vaginal > 4,5, prendimiento de mal olor al agregar KOH al 10% a la secreción y presencia de "clue cells" en el examen microscópico directo⁶. Los procedimientos microscópicos se crearon como una alternativa al diagnóstico clínico, reemplazándolo paulatinamente. Entre ellos, los métodos denominados Spiegel y Nugent por sus autores, son los primeros en ser estandarizados^{7,8}.

El sistema de Nugent clasifica la microbiota vaginal en normal, intermedia y VB⁸, para lo cuál considera y cuantifica los lactobacilos y otros dos morfotipos: cocobacilos Gram variable/gramnegativos, característicos de *Gardnerella vaginalis/Prevotella* spp, respectivamente y a los bacilos Gram variable curvos que caracterizan a *Mobiluncus* spp. En comparación, el sistema de clasificación de la microbiota vaginal de Spiegel es dicotómico, ya que no existe la categoría de microbiota intermedia⁷. No obstante, incluye en el diagnóstico de VB tanto los morfotipos considerados por Nugent como otros morfotipos representantes de bacterias que han sido asociadas con VB, como son cocáceas grampositivas y las fusobacterias⁷. El método de Nugent, es el más utilizado actualmente para el diagnóstico de VB, pero un escaso número de estudios ha comparado su utilidad con respecto al sistema de Spiegel. Más recientemente Ison y Hay (Ison/Hay) (2002), ampliaron el sistema de evaluación de Nugent, incluyendo dos nuevas categorías que destacan la dominancia de las cocáceas grampositivas en el ecosistema vaginal y la ausencia de bacterias en un frotis, respectivamente⁹.

Los objetivos de este estudio fueron comparar la eficiencia de los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de VB y analizar las muestras discordantes mediante el sistema de Ison/Hay.

Material y Método

Muestras clínicas

Se efectuó examen microscópico directo de 369 muestras de secreción vaginal de mujeres en edad fértil, entre enero de 2006 y noviembre de 2009. Las muestras fueron tomadas con tórula de la pared vaginal, extendidas en un portaobjetos y teñidas mediante Gram. Las muestras clínicas fueron obtenidas durante el desarrollo de estudios destinados a conocer la prevalencia de VB en el Área Metropolitana por los investigadores clínicos HS y EL. Se excluyó de la toma de muestras a pacientes con tratamiento antimicrobiano en los últimos 30 días, inmunosupresión o tratamiento con fármacos inmunosupresores. Las investigaciones fueron autorizadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y tuvieron el consentimiento informado de las pacientes. Trescientas seis (83%) muestras fueron obtenidas de mujeres en consulta ginecológica o de planificación familiar y 63 (17%) de embarazadas.

Evaluación microscópica de las muestras

Los frotis fueron interpretados por al menos dos investigadores quienes en forma independiente los evaluaron de acuerdo a los criterios de Nugent y Spiegel. Para ello, luego de ser teñidos con Gram, los frotis fueron observados con objetivo de inmersión (1.000 X), procediendo a promediar todos los morfotipos bacterianos presentes en 20 campos de inmersión. Las muestras discordantes fueron analizadas de acuerdo al procedimiento de Ison/Hay⁹. Es necesario destacar que como contraindicación se utilizó safranina en la tinción de Gram.

Procedimiento de Nugent

Se anotó la presencia y cantidad de i) bacilos grampositivos largos (*Lactobacillus* spp); ii) cocobacilos Gram variable/gramnegativos (*Gardnerella vaginalis/Prevotella* spp.) y iii) bacilos curvos Gram variable (*Mobiluncus* spp)⁸. Los morfotipos fueron ponderados de 0 a 10 según el protocolo que se presenta en la Tabla 1. Un puntaje de 0-3 correspondió a microbiota normal, una ponderación de 4 a 6 puntos clasificó a la microbiota como intermedia y un puntaje de 7 a 10 puntos, correspondió a VB.

Procedimiento de Spiegel

Se consideró microbiota normal al predominio en la muestra del morfotipo lactobacilar con

Tabla 1. Ponderación del sistema de evaluación de la microbiota vaginal de Nugent

Puntaje	Morfortipo bacteriano*		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Gardnerella-Prevotella</i>	<i>Mobiluncus</i>
0	> 30	0	0
1	5-30	< 1	1-4
2	1-4	1-4	> 5
3	< 1	5-30	
4	0	> 30	

* Promedio del número de bacterias por campo de inmersión.

Tabla 2. Características de las muestras vaginales que fueron excluidas de la evaluación microscópica (n = 21)

Causa de eliminación	n (%) de muestras
No contiene muestra clínica	6 (28,6)
Contiene solo células eucarióticas	4 (19)
Vulvovaginitis micótica	11 (52,4)
Total	21 (100)

Tabla 3. Clasificación de la microbiota vaginal de acuerdo a los criterios de Nugent y Spiegel (n = 348)

Criterio de evaluación microscópica de la microbiota vaginal	n (%) de las muestras clasificadas en cada categoría
Método de Nugent	
- Microbiota normal	203 (58,3)
- Microbiota intermedia	40 (11,5)
- Vaginosis bacteriana	105 (30,2)
Total	348 (100)
Método de Spiegel	
- Microbiota normal	237 (68,1)
- Vaginosis bacteriana	111 (31,9)
Total	348 (100)

Tabla 4. Análisis de los resultados discordantes por el sistema de evaluación de Ison/Hay (n=40)

Categoría de Ison/Hay	n (%) de muestras en el grupo
II	10 (25%)
III	6 (15%)
IV	13 (32,5)
No clasificable	11 (27,5%)
Total	40 (100)

o sin presencia de cocobacilos Gram variable y VB a la presencia de < 5 bacterias del morfortipo lactobacilar, conjuntamente con ≥ 5 bacterias de al menos dos de los siguientes morfortipos: cocobacilos Gram variable/gramnegativos, bacilos curvos Gram variable, bacilos gramnegativos fusiformes y cocáceas grampositivas⁷.

Procedimiento de Ison/Hay

Se clasificó a la microbiota en 5 grados: I, microbiota normal; II, microbiota intermedia; III, vaginosis bacteriana; IV, microbiota compuesta por cocáceas grampositivas y 0, a la presencia de elementos celulares y ausencia de bacterias. Microbiota normal correspondió a la presencia de sólo el morfortipo lactobacilar, microbiota intermedia correspondió a la disminución del número de lactobacilos con una mezcla de morfortipos y vaginosis bacteriana a una microbiota mixta en ausencia o con un escaso número de lactobacilos⁹.

Análisis estadístico

Para una prevalencia esperada de 25% de VB, considerando un nivel de confianza de 95% y un error de 5%, se requirió un tamaño muestral de $n = 338^{10}$.

Resultados

Se analizaron 369 exámenes directos de muestras vaginales teñidos con Gram, de acuerdo a los criterios de evaluación microscópica de Nugent y de Spiegel. De estas, 21(5,7%) muestras no pudieron ser evaluadas por no contener muestra, por no contener bacterias, o corresponder a vulvovaginitis micótica (Tabla 2). De las 348 muestras definitivas, se encontró concordancia entre los procedimientos en 308 muestras (88,5%). Como se aprecia en la Tabla 3, la microbiota vaginal fue clasificada como normal en 203

(58,3%) y en 237(68,1%) casos por los criterios de Nugent y Spiegel respectivamente. Ciento cinco (30,2%) y 111 (31,9%) muestras respectivamente fueron clasificadas como VB mediante Nugent y Spiegel. Las 40 (11,5%) muestras discordantes correspondieron a la categoría de microbiota intermedia de Nugent. De ellas, 6 (15%) fueron clasificadas como VB y 34 (85%) como muestras normales por el sistema de Spiegel.

Las 40 muestras discordantes fueron analizadas por el sistema de evaluación de Ison/Hay. Como se aprecia en la Tabla 4, 10 (25%) fueron clasificadas en la categoría II, confirmando su clasificación como intermedia, 6(15%) fueron clasificadas en la categoría III, confirmando el diagnóstico de VB de Spiegel, 13 (32,5%) correspondieron a la categoría IV, que no es considerada por los sistemas de Nugent o Spiegel y 11 (27,5%) no pudieron ser clasificadas en este sistema.

Discusión

En la actualidad existen varios procedimientos de diagnóstico de VB, pero desconocemos sus ventajas y limitaciones comparativas. Keane y cols investigaron los métodos de diagnóstico empleados en clínicas ginecológicas en el Reino Unido, demostrando que la mayoría de ellas utiliza procedimientos microscópicos y solamente 16,9% usa el método de Amsel¹¹. De 99 clínicas ginecológicas que informaron utilizar métodos microscópicos, 29 usan Nugent, 8 emplean Spiegel, 33 el procedimiento de Ison/Hay y 34 utilizan "algún otro" procedimiento¹¹. Los investigadores recomiendan el sistema de Ison/Hay con el objeto de adoptar un método universal y lograr consistencia nacional, pero no existe una base científica que avale la superioridad de algún procedimiento. En lo que si existe consenso es en desincentivar el diagnóstico de VB a través de la detección de *G. vaginalis* mediante cultivo o PCR, porque esta bacteria forma parte de la microbiota vaginal normal.

Para el diagnóstico mediante procedimientos moleculares, varios estudios demuestran que la detección de otras bacterias tiene una especificidad superior para el diagnóstico de VB¹²⁻¹³. Entre ellas destacan *Megasphaera* spp, *Leptotrichia* spp, especies relacionadas con el género *Eggerthella*, como asimismo 3 nuevas especies relacionadas con el orden *Clostridiales* y por el momento conocidas

como BVA (bacterial vaginosis associated)^{1-3,12-13}. Estas bacterias son aún poco conocidas en el ámbito biomédico, ya que son difíciles de cultivar o no cultivables, pero han sido detectadas en líquido amniótico en pacientes con parto prematuro^{14,15}.

Nuestro primer objetivo fue comparar los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de VB, encontrando una buena correlación aunque el sistema de Spiegel diagnosticó un porcentaje levemente mayor, lo que fue confirmado por el sistema de evaluación Ison-Hay. Esta diferencia se debe a que los métodos de Spiegel e Ison-Hay, enfatizan la presencia de una microbiota vaginal mixta y de lactobacilos en un número ≤ 5 para el diagnóstico de VB, mientras que el sistema de Nugent concede más peso a la ausencia de lactobacilos. Como la presencia de >30 morfotipos de *Gardnerella/Prevotella* en este sistema de categorización solo otorga 4 puntos, se requiere que haya < 1 morfotipo de lactobacilo para alcanzar la ponderación de VB.

Nuestro segundo objetivo fue analizar las muestras discordantes para lo cuál utilizamos el sistema de Ison/Hay, que contiene un rango de categorías más amplio. Se encontraron 4 grupos distintos entre las 40 muestras clasificadas como microbiota intermedia por el sistema de Nugent. El primer grupo, 25% de muestras, fue confirmado como microbiota intermedia. La categoría intermedia es una microbiota cuyas implicancias en la homeostasis del ecosistema vaginal no están bien determinadas. Existen evidencias que demuestran que es parte de un continuo entre microbiota normal y VB y que es una microbiota de transición e inestable^{15,16}. Al respecto, Hillier y cols enrolaron embarazadas a las 23 y 26 semanas de gestación observando que el 38% de mujeres que inició el estudio con microbiota intermedia continuó con esta microbiota, un 30% evolucionó a microbiota normal y 32% a VB. Por otra parte, 12% y 19% de mujeres que inicialmente presentaron microbiota normal y VB respectivamente, evolucionaron a microbiota intermedia¹⁵.

Un segundo grupo de muestras, 32,5%, correspondieron a la categoría IV de Ison/Hay. Esta categoría incluye varias especies que forman parte de la microbiota normal y que poseen el morfotipo de cocácea grampositiva, por lo que es importante para su interpretación como microbiota normal o patológica incluir el recuento de leucocitos¹⁷⁻¹⁹. Este grupo correspondería a la vaginitis aeróbica de Donders^{18,19}.

La posibilidad de *Streptococcus agalactiae* debiera considerarse siempre en embarazadas por su asociación etiológica con infección neonatal. En un estudio nacional, en 23/56 muestras vaginales en las que se aisló *S. agalactiae* se detectó una cantidad regular o abundante de cocáceas grampositivas y en 12 de ellas (52,2%) fue el único morfotipo presente²⁰. Otras especies frecuentes de *Streptococcus* en la microbiota vaginal son las pertenecientes al Grupo anginosus, consistentes en *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*²¹. Estas especies contienen cepas que tienen hemólisis α y cepas que exhiben hemólisis β . Sus antígenos de Lancefield varían clasificando a los microorganismos en los grupos C, F, G, o como no clasificables. Como la identificación fenotípica de las especies es difícil e inconsistente, son normalmente informados por los laboratorios clínicos como *Streptococcus* "viridans", lo que ha retardado el reconocimiento de su importancia clínica. Dentro del grupo anginosus, *S. anginosus* se aísla generalmente en infecciones genitales o del tracto gastrointestinal²². En nuestra experiencia, la mayoría de las cepas son α hemolíticas, pertenecen al Grupo F de Lancefield y han sido aislados como únicos agentes en la microbiota vaginal de una diversidad de procesos patológicos: parto prematuro, infertilidad, vaginitis. Sin embargo, no existen estudios que hayan demostrado su importancia clínica.

Finalmente, debemos considerar a *Peptostreptococcus* spp cocáceas grampositivas anaerobias que participan sinérgicamente en VB junto a otras especies anaerobias y anaerobias facultativas. Dadas sus características de asociación microbiana, creemos poco probable que constituyan microbiota única, como para conformar la categoría IV.

El tercer grupo de muestras discordantes, 27,5%, correspondiente al 3,16% de las 348 muestras evaluadas, no pudieron ser adjudicadas a alguna categoría de Ison/Hay. Todas ellas correspondieron a muestras con regular a abundante cantidad de cocobacilos gramnegativos junto a regular a abundante cantidad de bacilos grampositivos pleomórficos, los que fueron adjudicados al morfotipo lactobacilar.

Varios investigadores han señalado que la mayor dificultad en la categorización de la microbiota vaginal es la identificación de los bacilos grampositivos cuando no son microbiota predominante, cuando están en pequeño número o cuando son

pequeños, cortos o pleomórficos, puesto que no existe un criterio que permita asignarlos a un grupo, pudiendo ser clasificados como lactobacilos pequeños, *Gardnerella*, difteromorfos o bifidobacterias^{9,22-23}.

En dos oportunidades la presencia de "clue cells" podría haber permitido el diagnóstico de VB, pero en 9 casos no se encontró alguna base para clasificarlas como VB, ya que los sistemas de categorización no clasifican como VB a muestras con un contenido importante de lactobacilos.

Finalmente, se encontró un grupo de 6 muestras clasificadas como VB por el sistema de Spiegel y confirmadas por Ison/Hay y que analizamos anteriormente.

En conclusión, nuestros resultados permiten sugerir que los sistemas propuestos por Spiegel, Nugent e Ison/Hay son comparables para el diagnóstico de VB. No obstante, recomendamos el sistema de Ison/Hay como procedimiento general de evaluación de la microbiota vaginal ya que cuenta con un rango más amplio de categorías permitiendo una mejor discriminación de la microbiota vaginal, lo que es clínicamente relevante.

Referencias

1. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 355-73.
2. Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2: 28-37.
3. Centers for disease control and prevention (CDC). Sexually transmitted diseases. Treatment guidelines, 2006. *MMWR* 2006; 55(RR-11): 1-94.
4. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 663-8.
5. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 2008; 22: 1493-501.
6. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
7. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 170-7.
8. Nugent R P, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diag-

- nosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297-301.
9. 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: 413-5.
 10. Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. 1991; OMS, Ginebra.
 11. Keane FE, Maw R, Pritchard C, Ison CA. Methods employed by genitourinary medicine clinics in the United Kingdom to diagnose bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 155-7.
 12. 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: 3270-6.
 13. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H et al. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 128. doi: 10.1186/1471-2334-7-128.
 14. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 38-47.
 15. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, Gibbs RS. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 938-44.
 16. Hay PE, Morgan DJ, Ison CA, Bhide SA, Romney M, McKenzie P, et al. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 1048-53.
 17. Ovalle A, Martínez MA, Giglio MS, Fuentes A, Villablanca E. Microbiología aislada en la rotura prematura de membranas de pretérmino. Relación con morbilidad infecciosa materna neonatal e intervalo rotura de membranas-parto. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1995; 60: 252-62.
 18. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002; 109: 34-43.
 19. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009; 116: 1315-24.
 20. Martínez MA, Reid S. Diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) de muestras vaginales. *Rev Chil Infect* 1995; 12: 160-63.
 21. Summanen PH, Rowlinson M-C, Wootton J, Finegold SM. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for differentiation of the members of the Anginosus group streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1123-28.
 22. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, Schmidt H, Beverly A, Bjornerem A, et al. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS* 2002; 110: 811-8.
 23. 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; 5:61. doi: 10.1186/1471-2180-5-61.