

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Jefe de redacción

Magnus Unemo

Redactores

Ronald Ballard, Catherine Ison, David Lewis, Francis Ndowa, Rosanna Peeling



Organización
Mundial de la Salud

OFICINA REGIONAL PARA LAS Américas



Organización
Panamericana
de la Salud

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Jefe de redacción

Magnus Unemo

Redactores

Ronald Ballard

Catherine Ison

David Lewis

Francis Ndowa

Rosanna Peeling



**Organización
Panamericana
de la Salud**



**Organización
Mundial de la Salud**
OFICINA REGIONAL PARA LAS **Américas**

Catalogación por la Biblioteca de la OMS:

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana / editado por Magnus Unemo ... [et al].

1. Doenças Sexualmente Transmissíveis – diagnóstico. 2. Infecções por HIV – diagnóstico. 3. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos. 4. Laboratorios. I. Unemo, Magnus. II. Ballard, Ronald. III. Jison, Catherine. IV. Lewis, David. V. Ndowa, Francis. VI. Peeling, Rosanna VII. Organización Mundial de la Salud.

ISBN 978 92 4 350584 8

(Clasificación NLM: WC 503.1)

© Organización Mundial de la Salud, 2014

Se reservan todos los derechos. Las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud están disponibles en el sitio web de la OMS (www.who.int) o pueden comprarse a Ediciones de la OMS, Organización Mundial de la Salud, 20 Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; correo electrónico: bookorders@who.int). Las solicitudes de autorización para reproducir o traducir las publicaciones de la OMS - ya sea para la venta o para la distribución sin fines comerciales - deben dirigirse a Ediciones de la OMS a través del sitio web de la OMS (http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en los mapas representan de manera aproximada fronteras respecto de las cuales puede que no haya pleno acuerdo.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales de ciertos productos no implica que la Organización Mundial de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las denominaciones de productos patentados llevan letra inicial mayúscula.

La Organización Mundial de la Salud ha adoptado todas las precauciones razonables para verificar la información que figura en la presente publicación, no obstante lo cual, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ni explícita ni implícita. El lector es responsable de la interpretación y el uso que haga de ese material, y en ningún caso la Organización Mundial de la Salud podrá ser considerada responsable de daño alguno causado por su utilización.

Las opiniones expresadas en la presente publicación son responsabilidad exclusiva de los autores cuyo nombre se menciona.

Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, 2013

Redactor jefe

Magnus Unemo

Centro colaborador de la OMS para la gonorrea y otras ITS
Hospital Universitario de Örebro
Örebro (Suecia)

Redactores

Ronald Ballard

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Atlanta, Georgia (Estados Unidos de América)

Catherine Ison

Public Health England (anteriormente Health Protection Agency)
Londres (Reino Unido)

David Lewis

National Institute for Communicable Diseases
Johannesburgo (Sudáfrica)

Francis Ndowa

Organización Mundial de la Salud
Ginebra (Suiza)

Rosanna Peeling

London School of Hygiene and Tropical Medicine
Londres (Reino Unido)



**Organización
Panamericana
de la Salud**



**Organización
Mundial de la Salud**
OFICINA REGIONAL PARA LAS **Américas**

Índice

Siglas y abreviaturas	vii
Prefacio	ix
Agradecimientos	xi
1 Elección de las pruebas diagnósticas de las infecciones de transmisión sexual Edward W. Hook III, Francis Ndowa, David Mabey, Manju Bala y Ye Tun	1
2 Gestión de la calidad en los laboratorios Catherine Ison y Ronald Ballard	9
3 Micoplasmas genitales Jørgen Skov Jensen y Magnus Unemo	15
4 Gonorrea Magnus Unemo y Catherine Ison	21
5 Infecciones por clamidias Barbara Van Der Pol y Magnus Unemo	57
6 Tricomoniasis Yaw Adu-Sarkodie, Magnus Unemo y Barbara Van Der Pol	79
7 Vaginosis bacteriana Yaw Adu-Sarkodie y Catherine Ison	89
8 Candidiasis Yaw Adu-Sarkodie y Catherine Ison	95
9 Infecciones por el virus del herpes simple Laurent Bélec	99
10 Sífilis Ronald Ballard y Edward W. Hook III	115
11 Linfogranuloma venéreo Ronald Ballard	141
12 Chancro blando David Lewis	143
13 Donovanosis (granuloma inguinal) David Lewis	151
14 Infecciones por los virus de los papilomas humanos Suzanne Garland	155
15 Infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana Bharat S. Parekh, Dennis Ellenberger, Larry Westerman, Chunfu Yang y John N. Nkengasong	167

Anexos

Anexo 1. Microscopia y principios que rigen la tinción	
Catherine Ison	181
Anexo 2. Principios que rigen las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención	
Rosanna Peeling	189
Anexo 3. Principios que rigen las pruebas moleculares para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual	
Cheng Y. Chen y Magnus Unemo	197
Anexo 4. Medios, reactivos, pruebas diagnósticas y tinciones (recetas de laboratorio)	
Stefania Starnino y Jo-Anne R. Dillon	215
Anexo 5. Material de laboratorio	
Stefania Starnino y Jo-Anne R. Dillon	235

Siglas y abreviaturas

ARAS	Artritis reactiva adquirida sexualmente	FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
ARV	Antirretroviral	FRVIH	Farmacorresistencia del VIH
ATC	Agar tripticasa de cisteína	FTA-Abs	Prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos fluorescentes
AVAD	Año de vida ajustado en función de la discapacidad	G	Aceleración debida a la gravedad
BD	Becton, Dickinson and Company	GASP	Programa de Vigilancia de la Sensibilidad de los Gonococos a los Antimicrobianos
bDNA	DNA ramificado	GC	Garantía de calidad
BR	Tipos de bajo riesgo	GCMB	Medio base de agar para gonococos
C2CA	Amplificación círculo a círculo	gG	Glicoproteína G
CC	Control de calidad	GKNP	Solución de glucosa-potasio-sodio-fosfato
CCI	Control de calidad interno	HPA	Ensayo de protección de la hibridación
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg (Gotemburgo, Suecia)	VHS	Virus del herpes simple
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, Estados Unidos)	ICT	Prueba inmunocromatográfica
CH/CH2	Captura de híbridos/Captura de híbridos 2	IF	Inmunofluorescencia
CIA	Ensayo de quimioluminiscencia	IFA	Ensayo de inmunofluorescencia
CIM	Concentración inhibitoria mínima	IgA/IgG/IgM	Inmunoglobulina A, G, M
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	IGD	Infección gonocócica diseminada
CO2	Dióxido de carbono	IMDM-VGA	Medio de Dulbecco con modificación de Iscove
CSPS	Control de sustancias peligrosas para la salud	IP	Inmunoperoxidasa
Ct	Umbral de ciclos	ISO	Organización Internacional de Normalización
CdV	Coeficiente de variación	ITS	Infección de transmisión sexual
CV	Carga viral	KOH	Hidróxido de potasio
CVA	Cofactores-vitaminas-aminoácidos	LCR	Líquido cefalorraquídeo
CVV	Candidiasis vulvovaginal	LGV	Linfogranuloma venéreo
DE	Desviación estándar	LIA	Inmunoensayo lineal
DFA	Ensayo de inmunofluorescencia directa	LIAG	Lesión intraepitelial de alto grado
DNA	Ácido desoxirribonucleico	LIBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
dsDNA	DNA bicatenario	LJ	Gráficos de Levey-Jennings
DTL	Diagnóstico temprano de los lactantes	LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
EA	Éster de acridinio	LPS	Lipopolisacárido
EDL	Ensayos desarrollados en el laboratorio	MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo
EEC	Evaluación externa de la calidad	MH	Mueller-Hinton
EIA	Enzimoimmunoanálisis	MIF	Microinmunofluorescencia
EIC	Evaluación interna de la calidad	MOMP	Proteína principal de la membrana externa
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica	MS	Espectrometría de masas
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción	MTM	Medio de Thayer-Martin modificado
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	NASBA	Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico
EUG	Enfermedad ulcerosa genital	NCTC	National Collection of Type Cultures
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos		
FITC	Isotiocianato de fluoresceína		

NHAN	Pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación	<i>spp.</i>	Especies
		SSTF	Solución salina tamponada con fosfato
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control	TAR	Tratamiento antirretroviral
		TC	Captura de dianas
NIC	Neoplasia intraepitelial cervicouterina	TMA	Amplificación mediada por transcripción
nvCT	Nueva variante de <i>Chlamydia trachomatis</i>	TPHA	Prueba de hemaglutinación de <i>Treponema pallidum</i>
NYC	Agar New York City		
OMS	Organización Mundial de la Salud	TPPA	Prueba de aglutinación pasiva de partículas de <i>Treponema pallidum</i>
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA	TRUST	Prueba de rojo de toluidina en suero no calentado
PA	Punto de atención		
PAAN	Prueba de amplificación de ácidos nucleicos	TSB	Caldo con triptona y soja
		UE	Unión Europea
Pap	Papanicolaou	UFC	Unidades formadoras de colonias
PC	Prueba de curación	UNG	Uretritis no gonocócica
PET	Prueba de detección de enzimas preformadas	UNGNC	Uretritis no gonocócica no causada por clamidias
PIP	Prolil iminopeptidasa	VB	Vaginosis bacteriana
POE	Procedimiento operativo estándar	VDRL	Prueba serológica luética
PRR	Papilomatosis respiratoria recidivante	VHB	Virus de la hepatitis B
RCA	Amplificación mediante círculo rodante	VHC	Virus de la hepatitis C
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa	VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
RCUT	Prueba rápida de utilización de carbohidratos	VPH	Virus de los papilomas humanos
		VPN	Valor predictivo negativo
RHR	Department of Reproductive Health and Research	VPP	Valor predictivo positivo
		WB	Inmunoelctrotransferencia (<i>Western blot</i>)
RNA	Ácido ribonucleico	WHO/TDR	Programa Especial de la OMS de Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales
RPR	Reagina plasmática rápida		
RT	Retrotranscriptasa		
RW	Reacción de Wasserman		
SDA	Amplificación por desplazamiento de cadena		
SGC	Sistema de gestión de la calidad		
sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida		
SNEEC	Servicio Nacional de Evaluación Externa de la Calidad del Reino Unido		
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido		
SPG	Sacarosa-fosfato-glutamato		

Prefacio

Las infecciones de transmisión sexual (ITS), incluidas las causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo 1 y 2, siguen siendo un área prioritaria para la salud pública mundial por la alta morbilidad que se asocia a estas infecciones, como las secuelas de las infecciones genitales, el cáncer cervicouterino, la sífilis congénita, el embarazo ectópico y la infertilidad, así como la morbilidad por enfermedades relacionadas con el VIH y la muerte por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Las estrategias de salud pública para controlar las ITS consisten en promover un comportamiento sexual más seguro y proporcionar condones (prevención primaria), así como el tratamiento temprano y eficaz de los pacientes con ITS por medio de enfoques clínicos sindrómicos o etiológicos.

En el caso del enfoque sindrómico, el tratamiento accesible, asequible y eficaz de las personas que tienen alguna ITS se basa en el uso de diagramas de flujo (algoritmos) para cada síndrome. Los algoritmos permiten diagnosticar los síndromes comunes de ITS, proporcionar tratamiento actualizado y apropiado para cada país, brindar orientación sobre el tratamiento de compañeros sexuales, y poner de relieve la importancia de realizar la prueba de detección del VIH en la misma consulta. Los algoritmos deben basarse en datos etiológicos y de susceptibilidad antimicrobiana a escala local recopilados por medio de relevamientos periódicos de los laboratorios. En general, en la mayor parte de los pacientes con ITS que reciben tratamiento sindrómico no se realizan pruebas de laboratorio. Sin embargo, puede ser necesario tomar muestras para realizar pruebas de laboratorio en aquellos pacientes que no logran buenos resultados con el tratamiento de primera línea, a fin de establecer el diagnóstico o de determinar si el fracaso terapéutico se debe a la resistencia a los antimicrobianos. En los países que pueden costear el enfoque de diagnóstico etiológico, el laboratorio tiene una función mucho más importante en cuanto a la identificación de microorganismos patógenos específicos de las ITS y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Además desempeña un papel clave en cuanto a la vigilancia de las ITS y los programas de investigación tanto en los países de escasos recursos como en los países de mayor abundancia.

La Organización Mundial de la Salud publicó en 1999 una versión anterior de este manual, denominada *Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de transmisión sexual*, con el propósito de brindar una guía integral de procedimientos normalizados para aislar, detectar y diagnosticar las ITS, dirigida a microbiólogos y auxiliares médicos. Había sido concebida como un manual práctico de referencia dirigido a las necesidades y las capacidades de los laboratorios a distintos niveles del sistema de atención de salud. Este manual resultó muy popular tanto en los países como en los laboratorios.

Desde la publicación del manual de 1999, se ha registrado una serie de importantes adelantos en cuanto a los procedimientos de diagnóstico, en particular, con respecto a la amplificación de ácidos nucleicos y las pruebas rápidas en el lugar de atención, así como en relación con la metodología y las recomendaciones sobre el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos. En consecuencia, un grupo de expertos internacionales ha actualizado a fondo los capítulos del manual de 1999. Además, en esta versión revisada se han incorporado nuevos capítulos sobre diversos temas como las técnicas de diagnóstico para *Mycoplasma genitalium*, las pruebas en el lugar de atención para las ITS y la gestión de la calidad en los laboratorios. A pesar de que esta versión actualizada abarca los microorganismos patógenos más importantes de las ITS, no debe considerarse exhaustiva, por lo que puede ser necesario que el lector consulte otros recursos de referencia para obtener más información sobre temas como las políticas nacionales de ITS, las pautas sobre los antibiogramas, aspectos médico-jurídicos y la realización de las pruebas de detección de ITS en menores de edad.

En este nuevo manual, *Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*, se proporciona una comprensión básica de los principios que rigen las pruebas de laboratorio en el contexto de los enfoques de detección y diagnóstico, así como el antibiograma, como componentes del control de las ITS. Del mismo modo que en el manual de 1999, en el presente manual se aborda cada enfermedad en un capítulo por separado, en el que se suministra información detallada sobre la obtención y el transporte de

muestras, y las pruebas de laboratorio. Al final del manual se incluyen dos anexos útiles en los que se describe el equipo, las pruebas, los medios, los reactivos y las tinciones.

Se espera que este manual actualizado resulte ilustrativo para los administradores, los directores de programas, el personal médico y de enfermería, así como para el público destinatario principal que siguen siendo los microbiólogos y los auxiliares médicos. El manual puede ser útil para ayudar a adquirir las pruebas de diagnóstico más apropiadas para cada entorno, idealmente por medio de comités consultivos de expertos nacionales o locales. También es un recurso valioso para aquellos que capacitan a estudiantes y para los propios estudiantes, tanto dentro como fuera del entorno de laboratorio. Por último, como seguramente en los próximos años el número de productos y métodos de diagnóstico continuará en aumento, será importante entonces que todos los lectores se mantengan al día con respecto a los últimos adelantos en este campo.

Agradecimientos

La presente edición de *Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana* se actualizó usando la misma estructura que se había empleado y probado en el manual de 1999 creado por Eddie Van Dyck del Instituto de Medicina Tropical, Amberes (Bélgica); André Z. Meheus de la Universidad de Amberes (Bélgica); y Peter Piot, Director Ejecutivo del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA). El Departamento de Salud Reproductiva e Investigación (RHR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Ginebra (Suiza) desea manifestar su reconocimiento y gratitud a todos ellos por su visión, y agradece además el permiso que otorgaron para que se pudiera actualizar el manual a fin de que mantuviese su importancia mundial al incorporar las nuevas tecnologías y métodos de diagnóstico.

Algunos expertos con amplia experiencia en diferentes campos de la medicina de diagnóstico actualizaron el documento para procurar recoger la amplia gama de métodos disponibles para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual (ITS) y actualizar la información en la medida de lo posible dado que se trata de un campo de la medicina en constante y rápido cambio. OMS/RHR quisiera agradecer a algunos de estos expertos y sus instituciones por su dedicación y entusiasmo, que han garantizado la alta calidad y la perspectiva mundial de este documento con respecto al diagnóstico de las ITS.

Damos las más sinceras gracias a Yaw Adu-Sarkodie, Manju Bala, Ronald Ballard, Alan Herring, Edward W. Hook III, Catherine Ison, David Mabey, Rosanna Peeling y Magnus Unemo, quienes examinaron el manual de 1999 y determinaron las áreas que debían modificarse y actualizarse, además de los nuevos capítulos que debía agregarse. El grupo también propuso la lista de los posibles autores para revisar los capítulos existentes y preparar los nuevos, e identificaron posibles revisores de los capítulos.

OMS/RHR quisiera agradecer también a los siguientes autores que examinaron las primeras versiones de los capítulos y luego siguieron trabajando en sus respectivos capítulos hasta que estuvieron listos: Manju Bala, Ronald Ballard, Laurent Bélec, Fatim Cham, Jo-Anne Dillon, Suzanne Garland, Edward W. Hook III, Catherine Ison, David Lewis, Bharat Parekh, Rosanna Peeling, Ye Tun, Magnus Unemo y Barbara Van Der Pol. Los siguientes funcionarios del departamento de la OMS hicieron aportes y sugerencias para la finalización del manual: Nathalie Broutet, Lori Newman e Igor Toskin; y Francis Ndowa dirigió el proceso de revisión.

OMS/RHR además reconoce y agradece a los restantes autores: Cheng Y. Chen, Dennis Ellenberger, Jørgen Skov Jensen, John Nkengasong, Stefania Starnino, Larry Westerman y Chunfu Yang por su gran esfuerzo y por el considerable tiempo que dedicaron para que los capítulos fueran de la mayor calidad posible.

OMS/RHR agradece a las siguientes personas que examinaron los capítulos relacionados con sus respectivos campos de especialización: Rajesh Bhatia, Xiang-Sheng Chen, Charlotte Gaydos, Monica Lahra, Jérôme Le Goff, Jeanne Marrazzo, Allan Ronald y Patricia Totten.

OMS/RHR también quisiera reconocer la dedicación de Fatim Cham, quien comprobó las observaciones de los revisores, recopiló los capítulos y garantizó la armonía de las distintas secciones y anexos.

OMS/RHR aprecia la asistencia brindada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (CDC), en Atlanta (Georgia) para corregir la versión final del manual, al igual que la asistencia brindada por el equipo de Green Ink (Reino Unido) por el diseño, la maquetación y la lectura de las pruebas de galera de la versión en inglés.

La traducción al español fue realizada por la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud.

Capítulo 1

Elección de las pruebas diagnósticas de las infecciones de transmisión sexual

1.1 Introducción

El grupo de las infecciones de transmisión sexual (ITS) debe su nombre a la forma de transmisión de más de 30 microorganismos patógenos bacterianos, virales y parasitarios. Desde el punto de vista epidemiológico, el contacto sexual es su principal forma de transmisión, aunque algunos de ellos se pueden adquirir por otra vía distinta a la sexual (cuadro 1.1).

Las pruebas de laboratorio y las pruebas diagnósticas en el punto de atención contribuyen en gran medida al manejo y el control de las ITS al facilitar la prevención de la transmisión y sus secuelas. La elección de las pruebas diagnósticas idóneas resulta difícil debido al gran número de infecciones de transmisión sexual y a la diversidad de pruebas posibles para cada una de ellas. En este momento, se cuenta con una amplia gama de pruebas existentes que tienen características y limitaciones potenciales que podrían influir en cómo utilizarlas para mejorar el control de las ITS. Además, en una época en la que los recursos son limitados, resulta difícil tomar una decisión acerca de cuántas y cuáles de las infecciones de transmisión sexual merecen que se invierta en mejorar su detección, a quién se le deben realizar las pruebas diagnósticas y cuáles de entre las múltiples existentes deben utilizarse para ese fin. La selección de las pruebas debe hacerse conforme a un proceso de asignación de prioridades que tenga en cuenta la prevalencia, la repercusión y las complicaciones de las infecciones en las personas y en la población, así como las características de desempeño de las pruebas, su costo y el motivo por el que se realizan.

Las pruebas de detección de las ITS pueden tener diferentes finalidades que, a su vez, afectan a la elección de la prueba. Entre los diferentes motivos para realizarlas están la vigilancia, la validación de algoritmos de manejo sindrómico, la garantía de la calidad, el diagnóstico de las personas con signos y síntomas de posible ITS, la detección sistemática o cribado de las personas asintomáticas vulnerables y el estudio

de la sensibilidad a los antibióticos. Algunos de estos elementos clave se describen a continuación:

- **Vigilancia.** La vigilancia es la recopilación sistemática, comparación y análisis de datos para determinar la frecuencia de una infección en una comunidad o población. Es un elemento esencial de la planificación para las iniciativas de control de las ITS. No se otorgará una prioridad elevada a la inversión en la vigilancia de las infecciones poco comunes o de aquellas con escasa repercusión directa sobre la salud pública si los recursos son limitados, si la infección es poco frecuente (por ejemplo, el chancro blando, en particular en países desarrollados) o si la morbilidad es moderada (por ejemplo, las ladillas). En general, el tiempo necesario para obtener el resultado de una prueba analítica cuya finalidad sea la vigilancia no es de gran importancia. En algunos casos, las muestras recogidas para la vigilancia pueden usarse también para el seguimiento de otros factores clínicamente importantes como la resistencia a los antibióticos (por ejemplo, en el caso de *Neisseria gonorrhoeae*).
- **Validación del manejo sindrómico.** El diagnóstico sindrómico es un elemento valioso en las iniciativas de control de las ITS, puesto que proporciona una evaluación diagnóstica rápida para la elección del tratamiento oportuno de las personas con signos y síntomas de infección. En entornos en los que el diagnóstico sindrómico forma parte de las iniciativas de manejo de las ITS, deben realizarse pruebas analíticas periódicas a los pacientes diagnosticados y tratados utilizando algoritmos de manejo sindrómico para asegurar que el diagnóstico sindrómico consigue identificar las infecciones para las que se ha proyectado una intervención. En aquellas situaciones en las que el diagnóstico sindrómico no logra que las ITS seleccionadas reciban tratamiento, se debe evaluar las razones de dicho fracaso. La información obtenida mediante la realización periódica de pruebas de evaluación de la calidad de los servicios clínicos puede ser útil para la retroalimentación y para

Cuadro 1.1: Principales microorganismos patógenos de transmisión sexual y enfermedades que causan

Microorganismo patógeno	Manifestaciones clínicas y otras enfermedades asociadas
Infecciones bacterianas	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GONORREA Hombres: secreción uretral (uretritis), epididimitis, orquitis, infertilidad. Mujeres: cervicitis, endometritis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad, ruptura prematura de membranas, perihepatitis; generalmente asintomática.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	INFECCIÓN POR CLAMIDIAS Hombres: secreción uretral (uretritis), epididimitis, orquitis, infertilidad. Mujeres: cervicitis, endometritis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad, ruptura prematura de membranas, perihepatitis; generalmente asintomática. Ambos sexos: proctitis, faringitis, síndrome de Reiter. Recién nacidos: conjuntivitis, neumonía.
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serotipos L1–L3)	LINFOGRANULOMA VENÉREO Ambos sexos: úlcera, tumefacción inguinal (bubón), proctitis.
<i>Treponema pallidum</i>	SÍFILIS Ambos sexos: úlcera primaria (chancro) con adenopatía local, erupciones cutáneas, condiloma lata; daños neurológicos, cardiovasculares y esqueléticos. Mujeres: pérdida de embarazos (aborto, mortinato), parto prematuro. Recién Nacidos: mortinato, sífilis congénita.
<i>Haemophilus ducreyi</i>	CHANCRO BLANDO Ambos sexos: úlceras genitales dolorosas; a veces con bubón.
<i>Klebsiella (Calymmatobacterium) granulomatis</i>	DONOVANOSIS (GRANULOMA INGUINAL) Ambos sexos: inflamación nodular y lesiones ulcerosas de la zona inguinal y anogenital. Hombres: secreción uretral (uretritis no gonocócica) Mujeres: cervicitis, endometritis, probablemente enfermedad pélvica inflamatoria.
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Hombres: secreción uretral (uretritis no gonocócica) Mujeres: cervicitis, endometritis, probable enfermedad pélvica inflamatoria.
Infecciones virales	
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (sida) Ambos sexos: Enfermedades relacionadas con el VIH, sida.
Virus del herpes simple de tipo 2 Virus del herpes simple de tipo 1 (menos frecuente)	HERPES GENITAL Ambos sexos: lesiones vesiculares y ulceraciones anogenitales. Recién Nacidos: herpes neonatal (a menudo mortal).
Virus de los papilomas humanos	VERRUGAS GENITALES Hombres: verrugas peneanas y anales; carcinoma de pene. Mujeres: verrugas vulvares, anales y cervicouterinas, carcinoma cervicouterino, carcinoma vulvar, carcinoma anal. Recién nacidos: papiloma laríngeo.

Cuadro 1.1: Principales microorganismos patógenos de transmisión sexual y enfermedades que causan
(continuación)

Microorganismo patógeno	Manifestaciones clínicas y otras enfermedades asociadas
Infecciones virales (continuación)	
Virus de la hepatitis B	HEPATITIS VIRAL Ambos sexos: hepatitis aguda, cirrosis hepática, cáncer de hígado.
Citomegalovirus	INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS Ambos sexos: fiebre subclínica o inespecífica, tumefacción difusa de los ganglios linfáticos, hepatopatía, etc.
Virus del molusco contagioso	MOLUSCO CONTAGIOSO Ambos sexos: nódulos cutáneos umbilicados, de consistencia firme; situados en la zona genital o generalizados.
Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (herpesvirus humano de tipo 8)	SARCOMA DE KAPOSI Ambos sexos: cáncer de gran malignidad en personas con inmunodepresión.
Infecciones protozoarias	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TRICOMONIASIS Hombres: secreción uretral (uretritis no gonocócica); a menudo asintomática. Mujeres: vaginosis con flujo vaginal profuso y espumoso; parto prematuro, niños de peso bajo al nacer. Recién nacidos: peso bajo al nacer.
Infecciones fúngicas	
<i>Candida albicans</i>	CANDIDIASIS Hombres: infección superficial del glande Mujeres: vulvo-vaginitis con flujo vaginal espeso similar a cuajada, prurito vulvar o escozor.
Infestaciones parasitarias	
<i>Phthirus pubis</i> <i>Sarcoptes scabiei</i>	INFESTACIÓN PUBIANA POR LADILLAS ESCABIOSIS o SARNA

adoptar medidas que permitan mejorar la atención al paciente.

- **Garantía y mejora de la calidad.** El gran ámbito de la garantía de la calidad incluye el control de la calidad realizado para asegurar que las pruebas analíticas están resultando tal como se habían diseñado y la evaluación de la calidad llevada a cabo para asegurar que las pruebas se emplean de manera apropiada y que se están llevando a cabo correctamente todos los pasos necesarios para que las pruebas sirvan para prestar asistencia a los pacientes. La exactitud de las pruebas analíticas de las ITS puede verse alterada por una serie

de factores, entre los que destacan el cambio de reactivos, el funcionamiento del equipo y la competencia técnica.

En consecuencia, se recomienda realizar pruebas periódicas de muestras control para evaluar la competencia del laboratorio y garantizar la exactitud analítica esperada. Estas muestras se pueden obtener en organizaciones acreditadas o generar en el propio laboratorio. La evaluación de las muestras control puede poner de manifiesto la necesidad de capacitar de nuevo al personal o de evaluar la calidad de los componentes individuales de las pruebas de laboratorio.

- **Diagnóstico.** Los síntomas de las ITS más frecuentes no suelen ser específicos y generalmente la variedad de posibles agentes causales exige tratamientos diferentes. Por lo tanto, las pruebas diagnósticas son útiles para obtener un diagnóstico certero y para orientar el abordaje de la pareja sexual, así como para el control de la calidad de los algoritmos de manejo sindrómico, como se mencionó anteriormente. La elección de las pruebas, cuando se usan para el diagnóstico, debe tener en cuenta el tiempo necesario para obtener los resultados que orientarán el tratamiento, ya que las personas infectadas pueden transmitir la infección, sufrir complicaciones debidas a la propia infección o no presentarse al seguimiento en el intervalo entre la prueba y la notificación de los resultados (1, 2). Cuando las pruebas diagnósticas se realizan como parte de los servicios clínicos, suele ser útil hacer un seguimiento durante el intervalo entre la prueba y el tratamiento de las personas con resultados analíticos positivos como una medida de la calidad asistencial.
- **Cribado.** La detección sistemática es un elemento esencial para mejorar el tratamiento y las estrategias de control de las ITS que se basa en las aportaciones del manejo sindrómico y las pruebas diagnósticas. Todas las ITS pueden presentarse de forma asintomática o pasar desapercibidas en las personas infectadas. A pesar de la ausencia de síntomas reconocidos, las personas con infecciones asintomáticas pueden correr el riesgo de transmitirlos a otros y de presentar las complicaciones de la infección. En consecuencia, el cribado (es decir, la realización de pruebas a las personas vulnerables sin signos ni síntomas visibles) detectará a las personas infectadas, por lo que disminuirá el riesgo de complicaciones o de transmisión de la infección. Al igual que en el caso de las pruebas diagnósticas, el intervalo entre la prueba y la aplicación del tratamiento, así como la proporción de personas que lo reciben, si algunas no se han presentado al seguimiento, constituyen mediciones útiles de la calidad. La detección sistemática de las ITS será más costoeficiente si se dirige a subgrupos de riesgo de la población, lo que suele conseguirse mejor si se usan los datos de vigilancia.
- **Determinación de la sensibilidad a los antibióticos.** En el caso de algunas ITS (*N. gonorrhoeae* es un ejemplo digno de mención), la continua aparición de resistencia lleva periódicamente a modificaciones en el tratamiento recomendado. La vigilancia sistemática de la sensibilidad a los antibióticos o la realización de antibiogramas a cepas específicas proporciona información que puede servir para ajustar las recomendaciones de tratamiento con antelación, de ser posible antes de que el fracaso del tratamiento se convierta en un problema. Es mejor determinar la sensibilidad a los antibióticos en cepas clínicas de microorganismos cultivados y normalmente se usa más para orientar el tratamiento recomendado para la población que para el de un paciente en particular. En general, la vigilancia de la resistencia a los antibióticos se realiza en los laboratorios de referencia con muestras recogidas en una serie de lugares geográficamente representativos y poblaciones de interés.

1.2 Tipo de pruebas diagnósticas

El progreso científico ha proporcionado una gran variedad de pruebas para la identificación de las ITS. Estas pruebas varían enormemente en cuanto a su complejidad (es decir, los requisitos técnicos para la realización óptima de las mismas), los gastos que supone realizarlas (tanto materiales como de mano de obra) y el desempeño. Por tanto, cada tipo de prueba diagnóstica tiene sus ventajas e inconvenientes. En consecuencia, en algunos entornos, la prueba más exacta puede que no sea la mejor si es tan cara que no puede utilizarse para examinar a un gran número de personas vulnerables o si la prueba es tan compleja que los resultados no se obtienen a tiempo para guiar el tratamiento del paciente. Por último, en algunos casos, las pruebas de laboratorio de las ITS se comercializan en una variedad de formatos y plataformas, que determinan el número de pruebas que pueden realizarse en un tiempo dado. Por lo tanto, la producción o capacidad analítica (el número de pruebas realizadas en un tiempo dado) también debe tenerse en cuenta a la hora de elegir las pruebas. En algunos entornos, volúmenes mayores o menores de pruebas harán que algunas pruebas o sistemas analíticos sean preferibles. En general, las pruebas diagnósticas se agrupan en al menos tres tipos diferentes. En primer lugar, la detección directa de los propios microorganismos es el método más obvio

para el diagnóstico de las ITS y se realiza mediante el examen microscópico de una tinción o el examen en fresco para visualizar los microorganismos patógenos. Por otro lado, el cultivo, la detección del antígeno o la detección de ácidos nucleicos mediante pruebas de amplificación o no de ácidos nucleicos son a menudo más sensibles que la microscopia, pero las exigencias técnicas para una realización óptima son más complejas y el intervalo entre la realización de la prueba y la obtención de los resultados más largo (las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención ayudan a superar esta última posible limitación). Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes. La microscopia, en particular cuando se realiza mientras los pacientes están presentes, puede proporcionar resultados inmediatos para orientar las decisiones de tratamiento pero, como las otras pruebas, requiere un equipo especializado (microscopio), una conexión eléctrica y procedimientos de tinción especiales, y el resultado depende de la capacitación y la experiencia del microscopista.

Por el contrario, las otras pruebas de laboratorio, como el cultivo o la prueba de amplificación de ácidos nucleicos, pueden exigir métodos especiales para el transporte de las muestras y un equipo y procedimientos especializados para el desempeño óptimo, lo que supone un retraso en la obtención de los resultados necesarios para tomar las decisiones de tratamiento inmediato.

El segundo tipo de pruebas diagnósticas se centra en la detección de la respuesta del huésped a la infección (anticuerpos), que en el caso de muchas ITS graves (la sífilis y el VIH son ejemplos frecuentes) es la prueba diagnóstica preferida. La ventaja de las pruebas serológicas es que pueden ser útiles no solo para el diagnóstico sino también para la vigilancia. Todas las pruebas serológicas tienen de vez en cuando resultados positivos falsos. El problema de los positivos falsos a menudo se soluciona analizando con una segunda prueba serológica de confirmación de las muestras que dieron un resultado positivo en el cribado inicial, pero en este caso la prueba estará dirigida

Cuadro 1.2: Efecto de la prevalencia, la especificidad y la sensibilidad analíticas sobre el valor predictivo positivo, utilizando solo pruebas básicas u otras pruebas complementarias,

Prevalencia en la población = 1%					
	A	B	C	D	E
Sensibilidad/especificidad de las pruebas básicas	99%/99%	99%/99,9%	99%/99%	99,5%/99,5%	99,5%/99,5%
Sensibilidad/especificidad de las pruebas complementarias/confirmatorias	SD	SD	99%/99%	ND	99,5%/99,5%
Número analizado	1.000	1.000	11	1.000	15
Negativos					
Número total	980	989	1	985	5
Negativos verdaderos	980	989	1	985	5
Negativos falsos	0	0	0	0	0
Positivos					
Total	20	11	10	15	10
Positivos verdaderos	10	10	10	10	10
Positivos falsos	10	1	0	5	0
Valor predictivo positivo (VPP)	50%	91%	100%	67%	100%

SD: sin determinar.

a un antígeno diferente (el recurso a las pruebas confirmatorias se trata con más detalle en la sección de pruebas serológicas de la sífilis y el VIH). Algunas pruebas serológicas son capaces de diferenciar las infecciones recientes de las más antiguas o las ya tratadas mediante la detección de la inmunoglobulina M (IgM) presente en las infecciones recientes. Uno de los inconvenientes del diagnóstico serológico es que los anticuerpos frente a los patógenos de las ITS pueden persistir mucho tiempo después de un tratamiento eficaz. De este modo, las pruebas serológicas realizadas en la población darán una indicación del número total de infecciones acumuladas en lugar de indicar el número de infecciones contraídas más recientemente.

El tercer tipo está integrado por las pruebas que detectan metabolitos microbianos, como las sustancias que alteran el pH de las secreciones genitales y las aminas biógenas. Estas pruebas son complementos útiles para el diagnóstico en algunos entornos. Un ejemplo claro es la importancia de las pruebas de pH, del “olor a pescado” o de aminas en el diagnóstico de la vaginosis bacteriana.

1.3 Desempeño analítico

En último término, el valor de las pruebas para la detección de las ITS también depende en gran medida de su desempeño (cuadro 1.2). En tanto que medida del desempeño, los cálculos de sensibilidad y especificidad (3) —siempre que dichos cálculos se realicen con muestras suficientemente grandes— representan estimaciones fidedignas del desempeño general de las pruebas. Sin embargo, los valores predictivos (tanto positivos como negativos) de estas pruebas pueden variar sustancialmente de una población a otra en función de la prevalencia de una determinada infección en la comunidad.

Por lo tanto, las pruebas con tasas elevadas de resultados positivos falsos para las infecciones relativamente poco frecuentes (es decir, prevalencia baja) tendrán un valor predictivo positivo bajo a pesar de tener una sensibilidad elevada para la detección de la infección.

En general, la bibliografía arbitrada que se encuentra publicada proporciona estimaciones fiables de la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Sin embargo, en cualquier entorno específico, la prevalencia de enfermedades locales determinará parcialmente el

valor predictivo de las pruebas de laboratorio. Por lo tanto, la vigilancia para determinar la prevalencia de las enfermedades locales proporciona datos valiosos a la hora de elegir las pruebas de las ITS.

1.4 Tipos y funciones del laboratorio

Aunque el método tradicional para el diagnóstico de las ITS ha consistido en realizar análisis clínicos en el laboratorio que determinan los agentes causales, no deben realizarse todas las pruebas en todos los laboratorios para todos los fines. El diagnóstico por el laboratorio de las ITS suele ser costoso en lo que se refiere al equipo, los reactivos, la infraestructura y el mantenimiento. Pero el principal problema, concretamente en entornos con recursos limitados, es que no hay laboratorios para procesar la mayor parte de las muestras de los pacientes con ITS (2). Para adaptarse a situaciones de este tipo en las que no se dispone de laboratorios, la Organización Mundial de la Salud elaboró guías sobre el manejo sintromico para el tratamiento de algunas ITS y viene recomendando su uso desde mediados de los años ochenta a raíz de la realización de evaluaciones sobre el terreno de su desempeño (3). Posteriormente, varios estudios sobre el terreno revelaron que el manejo sintromico da resultados satisfactorios en el tratamiento del hombre sintomático con secreción uretral y en el tratamiento del hombre y la mujer con úlceras genitales bacterianas (4, 5). No es el caso, sin embargo, en el diagnóstico y tratamiento de la infección cervicouterina por *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis*, excepto en casos en los que en el examen se observa mucopús, erosiones y friabilidad del cuello uterino, así como antecedentes de sangrado entre menstruación y durante el coito (6). No obstante, el tratamiento aplicado tras el diagnóstico sintromico tiene la ventaja de ofrecer asistencia sanitaria inmediata en el primer punto de atención al que acude el paciente en busca de evaluación y es de bajo costo: ni el paciente ni el proveedor de servicio ni el Estado incurren en gastos directos de laboratorio. Recurrir al manejo sintromico también facilita la normalización del diagnóstico, el tratamiento y la notificación en un entorno o situación particular. Los pacientes con sospecha de ITS pueden tratarse en centros como los establecimientos de atención primaria de salud, los consultorios de planificación familiar y los consultorios de médicos particulares, así como en los propios consultorios especializados en ITS (7). Inevitablemente, puede ocurrir que con el manejo sintromico se diagnostique y trate en exceso a pacientes que no estén infectados por los

supuestos microorganismos causales del síndrome en cuestión (8).

Por consiguiente, con objeto de apoyar el enfoque sindrómico para el diagnóstico, debe alentarse a los laboratorios clínicos locales a que realicen las pruebas necesarias para facilitar el abordaje clínico de las personas vulnerables y con riesgo de ITS. En algunos entornos en los que el transporte de muestras no es complicado, las economías de escala hacen que el procesamiento de muestras en laboratorios centrales sea tan oportuno y más eficiente que la tentativa de realizar los análisis en laboratorios locales.

No todos los laboratorios necesitan llevar a cabo prácticas analíticas de un laboratorio de la referencia como el antibiograma.

Los laboratorios pueden clasificarse arbitrariamente en tres niveles basados en el grado de atención y servicios de tratamiento prestados por cada categoría. Sin embargo, debe tenerse presente que la infraestructura de laboratorio y la capacidad de diagnóstico varían mucho de los países con recursos limitados a los industrializados. Las siguientes categorías se consideran una orientación general:

1. Laboratorios periféricos que dan apoyo a los servicios de atención primaria de salud, tienen poco material de laboratorio y la capacitación del personal es mínima. Estos laboratorios están diseñados para proporcionar un diagnóstico rápido en el lugar en el que se presta la asistencia sanitaria de las ITS.
2. Laboratorios de nivel intermedio que dan apoyo a los laboratorios de los servicios de atención primaria de salud y a los consultorios y hospitales de atención intermedia o de distrito.
3. Laboratorios de nivel central que dan apoyo a los consultorios de atención terciaria de salud, incluidos los consultorios especializados de referencia de las ITS así como los laboratorios de los consultorios de atención de salud de nivel inferior y los consultorios.

Aunque las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención pueden carecer de sensibilidad, las características de especificidad son generalmente buenas y resultan económicas para el tratamiento de algunos síntomas como el flujo vaginal en el nivel de atención de salud periférico.

En este manual se describen métodos analíticos que van desde los más básicos y de bajo costo a los más complejos y caros.

Los directores de programas y los analistas de laboratorio, en colaboración con las instancias normativas, deben determinar la factibilidad y la utilidad de incorporar pruebas de laboratorio en los diferentes niveles de los establecimientos de asistencia sanitaria. La elección también dependerá de si en estos diferentes niveles se usa el manejo sindrómico (básico o modificado), el etiológico o ambos.

1.5 Vista de conjunto

No existe una única prueba óptima para la detección de los agentes que causan las ITS. Para la toma de decisiones programática, deben tenerse en cuenta las múltiples ITS y poblaciones afectadas como una matriz para guiar no solo qué prueba de laboratorio es la más adecuada para la comunidad en cuestión, sino también qué proporción de los recursos totales disponibles (presupuesto, personal, etc.) debe asignarse para analizar cada ITS (cuadro 1.3).

Las decisiones relativas a la elección de las pruebas deben tomarse dentro del marco de prevalencia de la infección en cuestión, su repercusión en la

Cuadro 1.3: Factores potenciales que influyen en la elección de las pruebas para las ITS

1. Finalidad de la prueba
<ul style="list-style-type: none">• Vigilancia• Garantía de la calidad• Evaluación del diagnóstico sindrómico• Diagnóstico• Cribado• Antibiograma
2. Consideraciones específicas de las pruebas
<ul style="list-style-type: none">• Desempeño (sensibilidad, especificidad, valor predictivo)• Toma de muestras, transporte y conservación y requisitos de transporte• Prevalencia• Morbilidad asociada• Recursos• Aspectos financieros• Personal• Infraestructura (servicios públicos, etc.)• Importancia relativa entre otras prioridades

comunidad, los recursos existentes para los análisis y el tratamiento, y la asignación de prioridad a esa infección en el contexto de otras ITS.

Además, al elegir las pruebas diagnósticas, es también fundamental la consideración de algunos factores como la complejidad, el tiempo para obtener los resultados y el costo. Se ha demostrado claramente con modelos matemáticos que, en situaciones y entornos en los que se dispone de los resultados en el momento de la evaluación inicial del paciente y en los que puede haber una demora para que el paciente reciba el tratamiento si no se le da en el momento de la evaluación, las pruebas menos sensibles proporcionadas inmediatamente pueden, en realidad, aumentar el número de personas tratadas y reducir las complicaciones de la infección en comparación con las pruebas más sensibles que requieren más tiempo para la obtención de los resultados (2).

1.6 Referencias

1. Geisler WM et al. The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(2):119–123.
2. Gift TL et al. The rapid test paradox: when fewer cases detected lead to more cases treated: a decision analysis of tests for *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Diseases*, 1999, 26(4):232–240.
3. Kuypers J, Gaydos CA, Peeling RW. Principles of laboratory diagnosis of STIs. In: Holmes KK et al., eds. *Sexually transmitted diseases*, 4th ed. New York, McGraw-Hill Medical, 2008:937–958.
4. Adler MW et al. Sexual health and care: sexually transmitted infections: guidelines for prevention and treatment. [Occasional paper]. Londres, ODA, 1996.
5. *Management of patients with sexually transmitted diseases*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1991 (OMS, Serie de Informes Técnicos, No. 810).
6. Alary M et al. Evaluation of clinical algorithms for the diagnosis of gonococcal and chlamydial infections among men with urethral discharge or dysuria and women with vaginal discharge in Benin. *Sexually Transmitted Infections*, 1998, 74(Suppl. 1):S44–49.
7. Moherdau F et al. Validation of national algorithms for the diagnosis of sexually transmitted diseases in Brazil: results from a multicentre study. *Sexually Transmitted Infections*, 1998, 74(Suppl. 1):S38–43.
8. Vuylsteke B. Current status of syndromic management of sexually transmitted infections in developing countries. *Sexually Transmitted Infections*, 2004, 80(5):333–334.

Capítulo 2

Gestión de la calidad en los laboratorios

2.1 Introducción

La finalidad de un sistema de calidad es procurar que todos los informes producidos por el laboratorio que orientarán el tratamiento de los pacientes sean de alta calidad. A fin de mantener un servicio de alta calidad, los laboratorios deben tener un programa de mejora de la calidad y estar acreditados por un organismo nacional o internacional apropiado, como la Organización Internacional de Normalización (www.iso.org). La acreditación consiste en una auditoría externa de la capacidad de prestar un servicio de alta calidad al establecer una norma definida de práctica confirmada por medio del arbitraje. Sin embargo, no incluye evaluar la idoneidad de la prueba elegida para el diagnóstico de la infección específica o para la población que se someterá a la prueba (véase el capítulo 1).

A fin de facilitar la comprensión, en el cuadro 2.1 se definen los términos que se utilizan en este capítulo.

La acreditación es un procedimiento lento y costoso que muchos laboratorios no logran llevar a buen puerto, aunque todos los laboratorios deberían intentar mejorar los procedimientos que afectan la exactitud de la información que guía el tratamiento de los pacientes. En muchas partes del mundo, se han puesto en marcha sistemas para fortalecer los laboratorios por medio de la ejecución gradual de mejoras sobre la base de una lista de verificación (1–5).

Cuadro 2.1: Definición de los términos principales que se emplean en el capítulo sobre gestión de la calidad

Acreditación	Auditoría externa de los procedimientos de laboratorio que contribuye a que los informes sean de buena calidad.
Control de calidad interno	Se usa para detectar problemas o fallas en uno o varios reactivos mediante una prueba.
Procedimientos Operativos Estándares	Normas sobre el control de sustancias peligrosas para la salud.
Evaluación de pruebas	Proceso amplio y sistemático en el que se comparan diferentes sistemas concebidos para cumplir la misma función o funciones similares.
Evaluación externa de la calidad	Permite introducir muestras de una fuente independiente cuyo contenido se conoce, pero no se divulga, en el procedimiento de prueba ordinario de un laboratorio.
Evaluación interna de la calidad	Consiste en someter nuevamente a prueba diversas muestras clínicas anónimas y seleccionadas aleatoriamente dentro del mismo laboratorio para asegurar la reproducibilidad de los resultados.
Garantía de la calidad	Proceso sistemático a fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos de calidad con respecto a un producto o servicio.
Procedimiento normalizado de trabajo	Documento en el que se describe en detalle el procedimiento específico para cada protocolo o prueba que se utiliza en el laboratorio. La finalidad de estos procedimientos es garantizar que las operaciones se realicen correctamente y siempre de la misma manera, y deben estar disponibles en el laboratorio en todo momento.
Sistema de gestión de la calidad	Marco para adoptar un enfoque sistemático de gestión de la calidad en los procedimientos de laboratorio.
Validación de pruebas	Sirve para examinar el proceso completo que se está usando a fin de verificar que los resultados sean correctos.

2.2 Gestión de la calidad

El sistema de garantía de la calidad debe establecerse en un manual que describa el sistema de gestión del laboratorio. Este manual sirve para informar a la propia dirección y al personal del laboratorio, y para suministrar información a los clientes de los servicios de laboratorio, además de los organismos de acreditación.

Organización y gestión

El laboratorio debe contar con una estructura orgánica en la que se definan claramente las funciones y las responsabilidades de cada persona. Generalmente se utiliza una estructura jerárquica encabezada por un director o jefe de departamento, con jefes de sección o de unidad, un gerente de laboratorio y un conjunto de técnicos especializados en las diferentes áreas. Debe haber un responsable de la calidad, que puede ser una función de tiempo completo o parte de una descripción de puesto más amplia. El manual de calidad debe incluir un organigrama de las funciones de las personas y la línea jerárquica de la que dependen, al igual que una descripción de sus responsabilidades. Cada miembro del personal debe tener una descripción de puesto detallada, que debe examinarse anualmente.

Capacitación y matriculación del personal

- *Todo el personal del laboratorio debe capacitarse apropiadamente y matricularse, donde sea posible, en un organismo nacional; además debe recibir capacitación con respecto a todos los métodos que empleará en su trabajo diario y debe verificarse su competencia de manera sistemática. Debe llevarse un registro de capacitación para cada funcionario. El personal también debe capacitarse de manera constante para mantener su pericia y competencia. La auditoría de los procedimientos que se emplean en el laboratorio debe formar parte de un sistema que garantice una buena calidad y, además, es necesaria para la acreditación. Las funciones individuales deben contar con el apoyo de las siguientes reuniones de distintos grupos dentro del laboratorio:*
- *Reuniones de la gerencia o de los funcionarios superiores:* deben contar con la presencia del director o el jefe del laboratorio, el gerente de laboratorio, los jefes de sección, el gerente de garantía de la calidad, el funcionario responsable de la bioseguridad del laboratorio y el asistente del director. Este grupo debe reunirse de manera periódica —habitualmente

de seis a ocho veces al año— a fin de tratar todos los asuntos pertinentes, como las finanzas, la administración, la dotación de personal, el equipo, la evaluación interna y externa de la calidad, la acreditación y cualquier otro asunto que afecte la prestación del servicio de laboratorio. Deben redactarse actas de estas reuniones en las que se incluyan las medidas a tomarse, que luego deben examinarse en reuniones posteriores.

- *Reuniones de todo el personal:* deben asistir todas las categorías de personal del laboratorio. Este grupo debe reunirse al menos ocho veces al año para tratar los asuntos pertinentes, como las finanzas, la administración, la dotación de personal, la bioseguridad, la acreditación y cualquier otro asunto que se plantee. Deben redactarse actas de estas reuniones con medidas a tomarse, que luego deben examinarse en reuniones posteriores.
- *Reuniones de gestión de la bioseguridad:* deben contar con la presencia del director o el jefe del laboratorio, el gerente del laboratorio, el funcionario responsable de la seguridad del laboratorio, el funcionario adjunto a cargo de la seguridad, los jefes de sección, un representante del personal, y el asesor de salud y seguridad (de haberlo). Este grupo debe reunirse cada seis meses o según sea necesario. Las actas de estas reuniones deben ser de libre acceso y deben colocarse en la cartelera de anuncios y noticias del laboratorio.
- *Reuniones anuales de gestión:* deben celebrarse reuniones anuales de gestión y deben prepararse informes para examinar todos los aspectos del desempeño del laboratorio y el servicio que proporciona a sus clientes.

Procedimientos normalizados de trabajo

All procedures used within the laboratory should be documented as SOPs and are critical in reducing errors in variation in testing. The principle details of the reagents and methodology, including internal controls and interpretative criteria, should be included. SOPs should be written by individuals performing the method/test and authorized by a senior member of staff. SOPs should cross-reference to risk assessments and safety information (chemical and biological COSHH) and should be reviewed and updated. No procedure should be undertaken in the laboratory without SOPs being

in place and readily accessible in the laboratory for daily use. SOPs should be reviewed regularly, checked and authorized by senior technical staff as part of the laboratory QMS. In some countries, local SOPs can be informed by national SOPs.

Todos los procedimientos empleados en el laboratorio deben estar documentados como procedimientos normalizados de trabajo, fundamentales para reducir los errores y las variaciones en las pruebas. Debe incluirse la información principal sobre los reactivos y la metodología, incluidos los controles internos y los criterios de interpretación. Estos procedimientos deben ser redactados por las personas que emplean el método o realizan la prueba, y aprobados por un funcionario superior. Los procedimientos deben remitir a las evaluaciones del riesgo y la información de bioseguridad (normas sobre el control de sustancias peligrosas para la salud de tipo químico y biológico), y deben examinarse y actualizarse regularmente. No debe emprenderse ningún procedimiento en el laboratorio sin que los procedimientos estén en su sitio, fácilmente accesibles para su uso diario. Estos procedimientos deben ser examinados, comprobados y autorizados por los técnicos superiores de manera periódica como parte del sistema de gestión de la calidad del laboratorio. En algunos países, los procedimientos normalizados de trabajo a nivel local pueden basarse en los procedimientos establecidos a nivel nacional.

La **evaluación y validación de las pruebas** es esencial en todo laboratorio a fin de proporcionar una valoración basada en la evidencia de la capacidad de desempeño de una prueba antes de que se la incorpore en el servicio que se ofrece.

- La **evaluación** es un proceso sistemático y amplio en el que se comparan diferentes sistemas concebidos para cumplir la misma función o funciones similares.

Por ejemplo, las evaluaciones en el campo de la microbiología incluyen la comparación de distintos métodos diseñados para detectar el mismo marcador o diana, la comparación de diferentes medios de cultivo para aislar el mismo organismo o la comparación de distintos instrumentos con la misma función. Los resultados de la evaluación deben transmitirse a las partes interesadas, por ejemplo, mediante la publicación. En caso de que dos estuches tengan características de desempeño equivalentes, podría preferirse el que sea más fácil de usar, más barato, más rápido o que requiera una muestra que sea más fácil de obtener.

- La **validación** se usa para examinar el proceso completo que se está usando a fin de verificar que los resultados sean correctos. Cada laboratorio debe validar su capacidad de lograr resultados aceptables con el método o sistema en cuestión. Para documentar esa capacidad, cada laboratorio debe crear un archivo de validación de cada método o sistema. Ese archivo debe incluir una serie de datos y tener un énfasis distinto si el laboratorio está usando un sistema comercial o ha desarrollado un sistema internamente. Normalmente, el archivo incluiría secciones como los datos de evaluación, las pruebas en muestras conocidas, vademécums, publicaciones pertinentes, datos de control de calidad en curso, los procedimientos normalizados de trabajo pertinentes, los logaritmos de error y las quejas de clientes.

El propósito de la validación es aportar documentación que indique que una prueba diagnóstica o un aparato están funcionando de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Esto puede incluir los resultados de experimentos para determinar su exactitud, sensibilidad, fiabilidad y reproducibilidad. Una validación puede ser amplia (por ejemplo, para validar un método interno recién desarrollado) o de un alcance más reducido (por

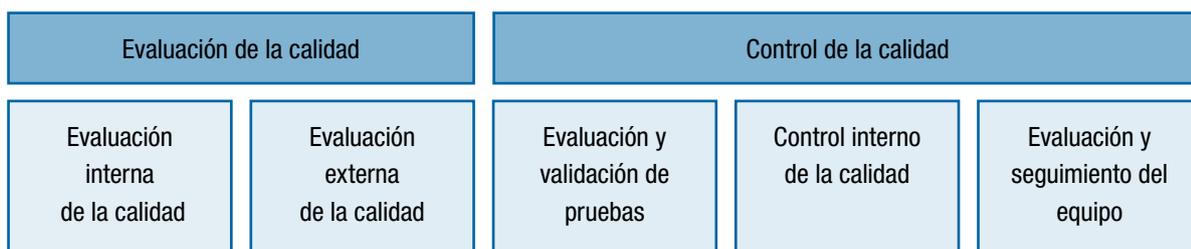


Figura 2.1
Distintos elementos que contribuyen a la garantía de calidad

ejemplo, para validar un método comercial que ya está en uso y ha tenido modificaciones menores).

En el caso de los métodos que ya se encuentran en uso, pero para los cuales no se cuenta con ninguna validación específica, es importante proporcionar pruebas documentadas que justifiquen su uso. Generalmente basta con preparar un archivo basado en datos históricos, como resultados de comparaciones u otros estudios realizados, copia de estudios publicados, evaluaciones internas y externas de la calidad, resultados del control interno de calidad, etc. De ser apropiado, se puede hacer referencia a los registros de trabajo en el informe de validación.

Garantía de la calidad

La garantía de la calidad es un aspecto fundamental para la labor del laboratorio, para mantener la calidad del servicio y para procurar que los resultados sean exactos y reproducibles. La exactitud es la cercanía entre el valor medio obtenido a partir de una serie de resultados de pruebas y un valor aceptado de referencia, y la reproducibilidad es la capacidad de producir esencialmente el mismo resultado de diagnóstico independientemente de variaciones en cuanto al técnico, el lote de prueba, el laboratorio o el equipo auxiliar validado.

La garantía de la calidad está compuesta por dos elementos principales: la evaluación de la calidad, tanto interna como externa, y el control de la calidad, que abarca la evaluación y validación de pruebas, el control interno de calidad y la evaluación del equipo y su seguimiento (fig. 2.1).

Control de la calidad

El control interno de la calidad sirve para detectar problemas o fallas en uno o varios reactivos mediante una prueba. Por ejemplo, en el caso de los sistemas de cultivo, puede usarse una o varias cepas de referencia comprobadas para asegurar que los medios sirven de soporte para el crecimiento del organismo deseado y, si se trata de un medio selectivo, que además inhiben el crecimiento de los organismos innecesarios. Esto permitirá detectar la ausencia o la concentración inadecuada de un factor de crecimiento o agente selectivo

En el caso del análisis molecular, el control interno de la calidad debe incluir un muestreo de control, un

control del aislamiento de ácidos nucleicos, un control de amplificación, un control de contaminación y un control de inhibiciones. Esto evitará que las reacciones en cadena de la polimerasa arrojen resultados negativos falsos al detectar la falla de uno o varios reactivos, de la amplificación, del ciclado térmico o de la inhibición de la amplificación.

En el caso de las pruebas serológicas, deben hacerse a diario pruebas de las muestras de control de la calidad e incluir tanto el control interno de calidad suministrado con el estuche como muestras externas de control de la calidad, donde estén disponibles, y deben hacerse las pruebas con ellas de la misma manera que con las muestras que provienen de pacientes. Debe establecerse el rango de estas muestras de control de la calidad para cada laboratorio usando al menos 20 mediciones a lo largo de un período; luego deben calcularse los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Debe prepararse un diagrama de Levey-Jennings para cada control y compararse los resultados de control de calidad de cada serie. Las comparaciones deben estar dentro de las dos desviaciones estándares y no deben informarse los resultados si el valor de control de la calidad es superior a tres desviaciones estándares. Estos diagramas deben examinarse regularmente para comprobar que no se estén registrando resultados o tendencias anormales. Se debe establecer un nuevo rango para cada nuevo lote de reactivo de control de calidad.

Evaluación y seguimiento del equipo

En todos los laboratorios es fundamental controlar el funcionamiento del equipo en forma sistemática y registrar los datos obtenidos (6). Para ello se debe mantener un inventario del equipo, que se debe examinar regularmente. Se deben controlar los gabinetes de seguridad microbiológica y se debe registrar semanalmente el flujo de aire; además se debe registrar a diario la temperatura de todas las incubadoras, los baños de agua, los refrigeradores y congeladores. Cualquier falla debe ponerse en conocimiento del gerente de laboratorio.

Evaluación de la calidad

Evaluación interna de la calidad

La evaluación interna de la calidad se realiza al someter nuevamente a prueba una serie de muestras clínicas anónimas seleccionadas al azar dentro del mismo

laboratorio a fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados. Todas las muestras sometidas para evaluar internamente la calidad deben pasar por el procedimiento habitual y no deben recibir ningún tipo de tratamiento especial. Para que suministre tanto información útil como pertinente, la evaluación interna de la calidad se realiza regularmente para todos los tipos de muestras. Las muestras son seleccionadas por un miembro capacitado del personal, que no debe ser la misma persona que hará la prueba. La selección debe ser aleatoria para prevenir el sesgo y deben reintroducirse en el sistema de laboratorio de la misma manera que las muestras normales.

El número de muestras y la frecuencia de las pruebas dependerán del número total de muestras que se reciban, pero se sugiere que aproximadamente 1% de las muestras sean sometidas nuevamente a las pruebas de manera mensual.

Los resultados deben ser compilados y comparados por una persona independiente; toda discrepancia debe ser investigada y, de ser necesario, debe repetirse la prueba.

Evaluación externa de la calidad

La evaluación externa de la calidad se realiza por medio de baterías de pruebas de competencia de proveedores como el Servicio Nacional de Evaluación Externa de la Calidad del Reino Unido (<http://www.ukneqas.org.uk>), Quality Assessment International (<http://qasidirect.COM>), el Colegio de Patólogos Estadounidenses (<http://www.cap.org>) o el programa australiano de garantía de la calidad (<http://www.rcpaqap.com.au>), o por medio del intercambio de muestras entre laboratorios de referencia a fin de evaluar una amplia gama de técnicas y análisis realizados en el laboratorio clínico.

La evaluación externa de la calidad debe estar a cargo de personal especializado con la capacitación correspondiente y en ella se debe seguir, en la medida de lo posible, las prácticas habituales del laboratorio. Como generalmente las muestras de la evaluación externa de la calidad son fácilmente reconocibles, existe la posibilidad de que se las manipule de una manera que exceda los procedimientos normales de laboratorio, por ejemplo, haciendo que sean manipuladas por miembros del personal superior, repitiendo la prueba, etc., por lo que deben adoptarse medidas para evitar que esto suceda.

La evaluación externa de la calidad proporciona varios beneficios al laboratorio:

- brinda al personal una apreciación del desempeño del laboratorio;
- compara el desempeño del laboratorio con el de otros laboratorios en el ámbito nacional o internacional;
- mejora la norma de los exámenes;
- determina posibles áreas problemáticas;
- demuestra a los clientes, los colegas y los organismos de acreditación que hay un compromiso con la calidad;
- educa al personal al proporcionar una mejor comprensión de la repercusión de los resultados incorrectos.

Procesamiento de las muestras:

1. Las muestras deben ser reconstituidas lo antes posible. Esto debe realizarse en un gabinete de bioseguridad microbiológica de clase 1 dado que posiblemente se desconozca el riesgo.
2. La prueba o el procedimiento solicitado debe realizarse según los procedimientos normalizados de trabajo.
3. Toda muestra residual debe almacenarse hasta que se conozcan los resultados para que se pueda repetir la prueba en caso de que haya alguna discrepancia.
4. Cuando se reciben los resultados del proveedor externo (evaluador externo), deben registrarse y documentarse para conocer el desempeño del laboratorio.
5. Toda falla o discrepancia debe investigarse repitiendo la prueba.
6. Los resultados deben ser examinados por un funcionario técnico con experiencia y deben ser transmitidos al personal de laboratorio, incluidos los éxitos y los fracasos, para permitir un análisis cabal.

2.3 Indicadores de la calidad

Los laboratorios deben considerar la posibilidad de establecer indicadores que reflejen la calidad de sus resultados. Las metas con respecto al tiempo de las pruebas pueden usarse para intentar reducir al mínimo el plazo desde que se toma una muestra hasta que el paciente recibe los resultados.

- Un sistema de control de la calidad es crucial para mejorar y mantener la exactitud y la reproducibilidad de los resultados producidos por un laboratorio.
- Todos los laboratorios deben esforzarse por mejorar calidad y trabajar para lograr la acreditación.
- Se debe contar con una estructura orgánica y reuniones ordinarias de diferentes niveles del personal para examinar el sistema de calidad del laboratorio.
- La evaluación y validación de pruebas es esencial para aportar una base de datos probatorios antes de que las pruebas se usen en el laboratorio.
- La garantía de la calidad abarca el control y la evaluación de la calidad.
- Los laboratorios deben usar indicadores para vigilar la calidad de sus pruebas de laboratorio.

2.4 Referencias

1. Dobbs T et al. A comprehensive evaluation of the proficiency testing program for the HIV-1 BED incidence assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(10):3470–3473.
2. Alemnji GA et al. Strengthening national laboratory health systems in the Caribbean Region. *Global Public Health*, 2012, 7(6):648–660.
3. Nkengasong JN et al. Laboratory systems and services are critical in global health: time to end the neglect? *American Journal of Clinical Pathology*, 2010, 134(3):368–373.
4. Yao K et al. Improving quality management systems of laboratories in developing countries: an innovative training approach to accelerate laboratory accreditation. *American Journal of Clinical Pathology*, 2010, 134(3):401–409.
5. Westerman LE et al. A quality management systems approach to CD4 testing in resource-poor settings. *American Journal of Clinical Pathology*, 2010, 134(4):556–567.
6. Fonjuno PN et al. Laboratory equipment maintenance: A critical bottleneck for strengthening health systems in sub-Saharan Africa. *Journal of Public Health Policy*, 2012, 33:34–45.

Capítulo 3

Micoplasmas genitales

3.1 Introducción

“Micoplasmas” es el nombre común con que se designa a las bacterias de la clase *Mollicutes*. Los micoplasmas son bacterias de vida independiente y tamaño muy pequeño, generalmente entre 0,3 y 0,5 µm. Carecen de la pared celular rígida presente en otras bacterias, característica que los hace resistentes a las penicilinas y otros antibióticos relacionados.

M. genitalium y *M. hominis*, y las dos especies de ureaplasmas *U. urealyticum* (previamente conocido como *U. urealyticum*, biovariedad 2) y *U. parvum* (previamente conocido como *U. urealyticum*, biovariedad 1) se encuentran generalmente en el aparato genitourinario humano. Es importante señalar que antes de que *U. urealyticum* y *U. parvum* fueran reconocidos como especies distintas, se les designaba a ambos como *U. urealyticum*, lo que dificulta la interpretación de los resultados de estudios anteriores. En el cuadro 3.1 se muestran las asociaciones mórbidas.

En los estudios poblacionales, *M. genitalium* se observa en 1% a 3% de los hombres y mujeres sexualmente activos. Los ureaplasmas se pueden encontrar en el cuello uterino o la vagina de 40% a 80% de las mujeres sexualmente activas y asintomáticas, y *M. hominis* en 20% a 50% (1–4).

En consecuencia, los ureaplasmas y *M. hominis* se deben considerar principalmente como comensales cuando se detectan en el tracto genital inferior. Sin embargo, estos micoplasmas se consideran como una causa de enfermedades extragenitales en pacientes con deficiencias de células B (hipo y agammaglobulinemia) y en lactantes prematuros (5).

M. genitalium se ha asociado de manera estrecha y uniforme con uretritis no gonocócica (UNG) en más de 30 estudios, y se ha detectado en la uretra de 15% a 25% de los hombres con UNG sintomática en comparación con aproximadamente 5% a 10% de los que no tienen esta enfermedad (1). En aquellos estudios que evaluaron la asociación con la UNG no causada por clamidias (UNGNC), la asociación fue en general más estrecha, lo que indica que *M. genitalium* y *C. trachomatis* actúan como causas separadas de UNG. En varios estudios, *M. genitalium* se ha encontrado en más de un tercio de los hombres con UNGNC (1). En las poblaciones que acuden a los consultorios por infecciones de transmisión sexual (ITS), aproximadamente 90% de los hombres infectados por *M. genitalium* tienen signos microscópicos de uretritis y casi tres de cada cuatro refieren síntomas (6, 7).

Cuadro 3.1: Asociaciones mórbidas de los micoplasmas urogenitales

Especies	Asociaciones mórbidas ^a						
	Uretritis	Cervicitis	Vaginosis bacteriana	Endometritis o EIP	Prematuridad	Infertilidad (mujeres)	Transmisión del VIH
<i>M. genitalium</i>	++++	+++	–	+++	+/-	+	+
<i>M. hominis</i>	–	–	++++	+/-	+/-	–	SD
Ureaplasmas (sin distinción de especie)	+/-	–	+++	SD	+	+/-	SD
<i>U. urealyticum</i>	+	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<i>U. parvum</i>	–	SD	SD	SD	SD	SD	SD

SD: sin determinar; EIP: enfermedad inflamatoria pélvica.

^a ++++ asociación constante; +++ asociación en la mayor parte de los estudios; + asociación solo en unos pocos estudios; +/- resultados dispares.

Varios estudios clínicos han indicado una gran correlación entre *M. genitalium* y la UNG persistente o recurrente, probablemente como consecuencia de la poca eficacia microbiológica del tratamiento con tetraciclinas. *M. genitalium* generalmente se erradica en menos de un tercera parte de los pacientes infectados tras un tratamiento con dosis habituales de tetraciclinas (8).

M. genitalium se ha encontrado en hasta 41% de los hombres con uretritis persistente o recurrente tras el tratamiento con doxiciclina (9, 10).

Más recientemente, se notificó el fracaso del tratamiento tras una dosis única de 1 g de azitromicina en 28% de los hombres con UNG por *M. genitalium* y este fracaso se correlacionó con la resistencia a los macrólidos aparecida durante el tratamiento con una dosis única en la mayor parte de los pacientes (11).

En contraposición a la sistematización con la que los estudios asocian *M. genitalium* con la UNG, la influencia de los ureaplasmas en esta enfermedad ha sido objeto de debate y no hay indicios que apoyen el papel de *M. hominis* como causa de uretritis (5). Claramente, la demostración de la presencia de ureaplasmas en un hombre con UNG no indica necesariamente que este organismo sea la causa de la enfermedad si se tiene en cuenta la elevada tasa de colonización. Este es también el caso aunque se emplee un método de cultivo cuantitativo. Por lo tanto, se desconoce la proporción exacta de los casos en que los ureaplasmas son responsables de la uretritis. La división de los ureaplasmas humanos en dos especies, *U. urealyticum* y *U. parvum*, condujo a estudios que sugieren que *U. urealyticum* se puede asociar con UNG en hombres más jóvenes con un menor número de parejas sexuales (12) o cuando se detectan valores altos. Por lo tanto, los cultivos corrientes que no distinguen entre especies parecen tener un valor limitado.

Se ha asociado *M. genitalium* con la cervicitis, pero esta asociación es más débil que la observada entre *M. genitalium* y la uretritis masculina, posiblemente como consecuencia de la dificultad y los diferentes criterios utilizados en el diagnóstico de la cervicitis en mujeres (1). Sin embargo, en algunos estudios, la asociación ha sido tan estrecha como la observada con *C. trachomatis* (7). En estudios en los que se han notificado signos de uretritis, esta se ha asociado

significativamente con la infección por *M. genitalium* en las mujeres (1).

Se ha detectado *M. genitalium* en el endometrio de 60% de las mujeres con determinaciones positivas en cuello uterino, y su presencia en las biopsias de endometrio se ha asociado estrechamente con endometritis histológica y con enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) recurrente (13, 14). La presencia de cicatrices tubáricas se ha vinculado indirectamente con la infección por *M. genitalium*, ya que se ha observado una proporción significativamente mayor de mujeres con infertilidad por causa tubárica que presentan anticuerpos contra la bacteria en comparación con las mujeres con infertilidad por otras causas (15). Se ha detectado *M. genitalium* en el líquido sinovial de una paciente con artritis reactiva adquirida sexualmente (ARAS) (16) y la experiencia clínica indica que es frecuente detectar ARAS después de una UNG por *M. genitalium*. No obstante, no se han presentado estudios sistemáticos al respecto ni tampoco se ha demostrado nuevamente la presencia de *M. genitalium* en el líquido sinovial. Se ha comprobado que las mujeres infectadas por el VIH y con mayores cargas de organismos de *M. genitalium* tenían mayores probabilidades de excretar VIH (17), pero solo recientemente se ha demostrado que la infección por *M. genitalium* predispone a la adquisición del VIH (18). No existen indicios de que *M. hominis* o los ureaplasmas puedan desempeñar una función similar.

- *M. genitalium* es una causa común de uretritis en hombres y mujeres, y causa cervicitis e infecciones del tracto genital superior en mujeres.
- *M. hominis* y los ureaplasmas se detectan generalmente en personas sanas. Su asociación con infecciones urogenitales en hombres o mujeres aún no se ha demostrado de una manera concluyente.

3.2 Descripción de los métodos de diagnóstico de *M. genitalium* disponibles

A efectos prácticos, el diagnóstico de *M. genitalium* se limita a la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN), ya que el cultivo resulta extremadamente lento (varios meses), difícil y poco sensible (19). Hasta la fecha, ningún análisis serológico, análisis de detección de antígenos o pruebas realizadas en el lugar de

atención han resultado útiles para el diagnóstico de las infecciones urogenitales por *M. genitalium*.

- La PAAN es el único método práctico para el diagnóstico de *M. genitalium*.

3.3 Recogida, transporte y condiciones de almacenamiento de las muestras

La obtención de muestras debe llevarse a cabo como se describe en el capítulo 5 para la detección de *C. trachomatis*. Los hisopos y el medio de transporte no deben contener sustancias que inhiban las PAAN. También resulta apropiado utilizar un medio de transporte que sea compatible con el análisis de detección de *C. trachomatis*, ya que las pruebas de detección de este organismo deben recibir la más alta prioridad. Sin embargo, es preciso señalar que la carga de organismos de *M. genitalium* es cien veces inferior a la de *C. trachomatis* (20), de manera que se deben evitar los medios de transporte que diluyan innecesariamente la muestra. Lamentablemente, no se puede proporcionar ninguna guía clara en cuanto al tipo de muestra óptima para la detección de *M. genitalium*, ya que los dispositivos de recolección, los métodos de preparación de las muestras y los sistemas de detección varían en los diferentes estudios. Cuando solo se analiza una muestra de cada paciente, parece ser que la primera orina del día en los hombres y los hisopados vaginales en las mujeres contienen las cargas más altas de bacterias.

3.4 Detección de *M. genitalium* mediante la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN)

El único método factible de detección de *M. genitalium* es la PAAN, pero no existe ninguna prueba comercializada que haya recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y la mayor parte de las pruebas actualmente disponibles han sido objeto de una evaluación muy limitada en las publicaciones. La mayor parte de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se basan en la detección del gen de la adhesina MgPa de *M. genitalium* (21). Sin embargo, algunas partes del gen MgPa son muy variables y los cebadores dirigidos a estas regiones no funcionarán satisfactoriamente con las muestras clínicas (21, 22).

Aunque en el cebador directo se puede observar un desajuste sencillo en varias de sus posiciones con algunas cepas, la prueba de detección en tiempo real de la MgPa mediante sondas TaqMan, descrita por Jensen *et al.* (23), se ha utilizado ampliamente a escala mundial con buenos resultados. Además, la RCP convencional de la MgPa, descrita como una de las primeras RCP de *M. genitalium* (24), y sus modificaciones (25) han demostrado ser muy reproducibles y tienen la ventaja de que el fragmento amplificado puede ser secuenciado para un buen análisis de tipificación. El gen rRNA 16S también se usa como diana de la RCP de *M. genitalium*; sin embargo, como consecuencia de la homología entre *M. genitalium* y *M. pneumoniae*, es relativamente difícil diseñar cebadores y sondas que sean específicos y sensibles.

En algunas pruebas de RCP del gen rRNA 16S, la detección de *M. genitalium* se basa en la amplificación mediante cebadores universales de *Mollicutes* (micoplasmas y ureaplasmas) y la posterior hibridación con sondas específicas de especie. Aunque este método permite la detección de varias especies de micoplasmas a partir de la misma reacción primaria de amplificación, la competencia con la amplificación de las secuencias del gen rRNA 16S de ureaplasmas en particular dará lugar a una sensibilidad deficiente para la detección del DNA de *M. genitalium*, que puede ser significativa incluso cuando se encuentra en pequeñas cantidades (21, 23).

Se han elaborado diversas técnicas de RCP en tiempo real de *M. genitalium* (21). Aunque las técnicas de RCP convencionales bien optimizadas pueden tener la misma sensibilidad que las pruebas en tiempo real bien optimizadas, estas últimas son menos propensas a la contaminación. Por lo tanto, la combinación de sensibilidad, especificidad y robustez elevadas, y el riesgo reducido de contaminación por amplicones, característicos de este formato de RCP, indican que la RCP en tiempo real debe ser el principal método de diagnóstico de *M. genitalium*. La cuantificación del DNA de *M. genitalium* no parece ser válida como medio de diagnóstico habitual.

Como alternativa a la RCP, se dispone de una prueba de amplificación mediada por transcripción (TMA) cuya diana es el rRNA 16S para uso exclusivo en investigación (Gen-Probe, San Diego, CA, EUA). La ventaja de este método es la presencia de múltiples

copias de moléculas de rRNA 16S por célula, con lo que se logra una sensibilidad de detección potencialmente mayor en comparación con la sensibilidad de las pruebas de RCP dirigidas a genes de copia única. Esta prueba de TMA ha demostrado ser sensible, específica y de alto rendimiento para la detección de *M. genitalium*, pero no se han realizado suficientes estudios para determinar si es superior a otras PAAN (26).

A falta de PAAN comercializadas y plenamente validadas, es de suma importancia que los laboratorios que realicen procedimientos de diagnóstico de *M. genitalium* validen cuidadosamente y garanticen la calidad de sus análisis internos (véanse los capítulos 1 y 2, y el anexo 3, con respecto a las PAAN y su garantía de calidad, y la validación de las PAAN no aprobadas). En general, la mayor parte de los análisis múltiples conllevan alguna falta de sensibilidad en el diagnóstico de *M. genitalium* ya que este organismo a menudo se halla presente en niveles muy bajos, incluso en pacientes sintomáticos (20, 23).

- La preparación de las muestras y la sensibilidad de la prueba deben ser óptimas para poder detectar *M. genitalium*, ya que este microorganismo patógeno se halla presente en concentraciones cien veces inferiores a las de *C. trachomatis*. La mayor parte de las pruebas múltiples muestran una sensibilidad algo inferior que las pruebas con una única diana.
- Las PAAN dirigidas al gen MgPa de *M. genitalium* deben diseñarse cuidadosamente con objeto de evitar las regiones variables del gen.

En consecuencia, es preciso tratar de optimizar la fase de preparación de las muestras mediante la centrifugación a gran velocidad con el objeto de concentrar la muestra y evitar la pérdida de DNA durante la extracción.

3.5 Pruebas de resistencia y sensibilidad de *M. genitalium* a los antibióticos

La obtención del antibiograma de *M. genitalium* es muy complicada y solo resulta factible en laboratorios de referencia especializados. La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante dilución

en caldo con un inóculo corriente se utiliza como método de referencia, pero también ha resultado exitosa la determinación de la CIM de *M. genitalium* en crecimiento únicamente en cultivo de células (27). Los fracasos en el tratamiento de las infecciones por *M. genitalium* han llevado a que se preste mayor atención a la resistencia en esta especie. Sin embargo, dado que *M. genitalium* solo se puede cultivar en algunos laboratorios del mundo, y como su crecimiento es demasiado lento para proporcionar resultados significativos en el paciente individual, se ha empleado el análisis molecular de las mutaciones que median la resistencia en un número cada vez mayor de estudios y en la práctica clínica diaria de algunos países.

Varios estudios clínicos han indicado que las tetraciclinas son inferiores a la azitromicina en la erradicación de *M. genitalium* (8) y, aunque las CIM *in vitro* indicarían que esta especie debería ser sensible a las tetraciclinas, la experiencia clínica muestra lo contrario. No se han llevado a cabo análisis moleculares para detectar la resistencia a las tetraciclinas. Se ha demostrado la resistencia a los macrólidos mediante el aislamiento de cepas de *M. genitalium* en pacientes en los que fracasa el tratamiento con azitromicina (28) y las principales mutaciones que median la resistencia se han observado en la región V del gen rRNA 23S, principalmente A2058G y A2059G (numeración de *E. coli*), pero se ha detectado una variedad de otras combinaciones en las muestras de pacientes en los que ha fracasado el tratamiento con azitromicina.

Estas mutaciones se pueden detectar directamente en las muestras clínicas mediante la secuenciación de los amplicones de la RCP, lo que permite obtener información clínicamente útil a falta de cultivo. Se ha demostrado que el tratamiento con azitromicina en dosis única de 1 g conduce a la aparición de resistencia o a la selección de variantes resistentes preexistentes (28, 29), y los datos preliminares sugieren que el nivel de resistencia de *M. genitalium* a los macrólidos en la comunidad depende en gran medida del empleo de una dosis única de 1 g en el tratamiento de la infección de *C. trachomatis*. Así lo ponen de manifiesto la baja prevalencia de la resistencia en los países que emplean la doxiciclina como fármaco primario para tratar las UNG y la alta tasa de resistencia de hasta un 100% en Groenlandia, donde se utiliza la azitromicina para el tratamiento de las UNG y donde la

prevalencia de infecciones por *C. trachomatis* es extremadamente alta (30). El moxifloxacino se ha mostrado como un tratamiento eficaz de segunda línea (31), pero algunos informes procedentes de Japón indican que pueden aparecer resistencia a una fluoroquinolona relacionada, la gatifloxacina (32), y se han aislado cepas con un alto grado de resistencia combinada a la quinolonas y los macrólidos (J.S. Jensen, datos inéditos de abril del 2013). Aunque se han encontrado mutaciones en las regiones que determinan la resistencia a las quinolonas (32), no se han determinado sus correlatos clínicos.

- La resistencia de *M. genitalium* a los macrólidos es muy frecuente en los pacientes en los que fracasa el tratamiento con azitromicina y moxifloxacina es el fármaco usado con mayor frecuencia en el tratamiento de segunda línea.
- La resistencia de *M. genitalium* a los macrólidos, mediada por mutaciones específicas en el gen rRNA 23S, puede detectarse mediante la amplificación por RCP y la secuenciación de este gen directamente de las muestras clínicas.
- Se han encontrado mutaciones en las regiones de *M. genitalium* que determinan la resistencia a las quinolonas en pacientes en los que ha fracasado el tratamiento con quinolonas, pero no se han determinado sus correlatos clínicos.

3.6 Bibliografía

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to multicolored butterfly. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(3):498–514.
2. Andersen B et al. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. *Sexually Transmitted Infections*, 2007, 83(3):237–241.
3. Manhart LE et al. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *American Journal of Public Health*, 2007, 97(6):1118–1125.
4. McCormack WM et al. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *Journal of the American Medical Association*, 1972, 221(12):1375–1377.
5. Totten PA, Taylor-Robinson D, Jensen JS. Genital mycoplasmas. In: Holmes KK et al., eds. *Sexually transmitted diseases*, 4ª ed. New York, McGraw-Hill Medical, 2008:709–736.
6. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Infections*, 2004, 80(4):289–293.
7. Anagnrius C, Loré B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sexually Transmitted Infections*, 2005, 81(6):458–462.
8. Manhart LE, Broad JM, Golden MR. *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 53(Supl. 3):S129–S142.
9. Horner P et al. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 32(7):995–1003.
10. Wikström A, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline. *Sexually Transmitted Infections*, 2006, 82(4):276–279.
11. Bradshaw CS et al. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(7):1149–1152.
12. Wetmore CM et al. *Ureaplasma urealyticum* is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: a case-control study. *Journal of Infectious Diseases*, 2011, 204(8):1274–1282.
13. Cohen CR et al. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *The Lancet*, 2002, 359(9308):765–766.
14. Haggerty CL et al. Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sexually Transmitted Infections*, 2008, 84(5):338–342.
15. Svenstrup HF et al. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility—a prospective study. *Fertility and Sterility*, 2008, 90(3):513–520.
16. Taylor-Robinson D et al. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1994, 13(12):1066–1069.
17. Manhart LE et al. High *Mycoplasma genitalium* organism burden is associated with shedding of HIV-1 DNA from the cervix. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197:733–736.
18. Mavedzenge SN et al. The association between *Mycoplasma genitalium* and HIV-1 acquisition in African women. *AIDS*, 2012, 26(5):617–624.

19. Jensen JS, Hansen HT, Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(2):286–291.
20. Walker J et al. The difference in determinants of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* in a sample of young Australian women. *BMC Infectious Diseases*, 2011, 11:35.
21. Shipitsyna E et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in East European countries. *Acta Dermatovenereologica*, 2010, 90(5):461–467.
22. Ma L et al. Genetic variation in the complete MgPa operon and its repetitive chromosomal elements in clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. *PLoS One*, 2010, 5(12):e15660.
23. Jensen JS et al. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(2):683–692.
24. Jensen JS et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(1):46–50.
25. Dutro SM et al. Development and performance of a microwell-plate-based polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma genitalium*. *Sexually Transmitted Diseases*, 2003, 30(10):756–763.
26. Wroblewski JK et al. Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(9):3306–3312.
27. Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(12):4993–4998.
28. Jensen JS et al. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 47(12):1546–1553.
29. Twin J et al. Transmission and selection of macrolide resistant *Mycoplasma genitalium* infections detected by rapid high resolution melt analysis. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35593.
30. Gesink DC et al. *Mycoplasma genitalium* presence, resistance and epidemiology in Greenland. *International Journal of Circumpolar Health*, 2012, 71:1–8.
31. Bradshaw CS, Chen MY, Fairley CK. Persistence of *Mycoplasma genitalium* following azithromycin therapy. *PLoS One*, 2008; 3(11):e3618.
32. Hamasuna R et al. P3–S7.09 mutations on *gyrA* or *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* and efficacies of treatment with fluoroquinolones against *M genitalium* related urethritis. *Sexually Transmitted Infections*, 2011, 87(Supl. 1):A302

Capítulo 4

Gonorrea

4.1 Introducción

La gonorrea es una enfermedad antigua causada por *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo) que se transmite casi exclusivamente por contacto sexual. Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 hubo 106 millones de casos nuevos de gonorrea en adultos en todo el mundo. Estas cifras indican que la gonorrea es la infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana de mayor prevalencia junto con la producida por *Chlamydia trachomatis* (también 106 millones de casos nuevos) (1). En consecuencia, la gonorrea, sin olvidar sus complicaciones graves, produce una gran morbilidad, acarrea costos económicos sustanciales y sigue siendo una de las principales preocupaciones de salud pública en el mundo. Es extremadamente preocupante que la bacteria haya desarrollado resistencia frente a casi todos los antibióticos existentes para su tratamiento, y se teme que la gonorrea pueda llegar a no tener cura en determinadas circunstancias (2, 3).

Dentro del género *Neisseria* hay dos especies particularmente patógenas para el ser humano, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, y aproximadamente 30 especies que no suelen serlo como *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. subflava* y *N. mucosa*. Estas bacterias colonizan de preferencia las vías respiratorias superiores como comensales, pero raramente se encuentran en el aparato genitourinario inferior. Los gonococos son cocos gramnegativos, aerobios, capnofílicos (prefieren concentraciones aumentadas [3% a 7%] de dióxido de carbono [CO₂]), carecen de flagelos y de esporas y son productores de oxidasa y catalasa, normalmente se presentan en parejas (diplococos) con lados adyacentes cóncavos, es decir, en microscopia presentan una forma característica de riñón o grano de café. La *N. gonorrhoeae* es delicada y para su crecimiento in vitro se necesitan medios de cultivo complejos enriquecidos con nutrientes.

N. gonorrhoeae solo infecta a los seres humanos, coloniza superficies mucosas y es el agente causal

de las infecciones del aparato genitourinario inferior: uretritis en los hombres y cervicitis en las mujeres. Produce infección urogenital asintomática en una minoría de hombres, no obstante, es más común (al menos 50%) en las mujeres. La infección del recto (proctitis) y la faringe, generalmente asintomática, puede producirse en ambos sexos dependiendo de los hábitos sexuales, pero es más frecuente en los hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres. Si pasa desapercibida y no se la trata o si se la trata de forma inadecuada, la infección puede ascender al aparato genital superior y producir una infección gonocócica complicada (por ejemplo, enfermedad pélvica inflamatoria [EPI] y secuelas relacionadas como el embarazo ectópico y la infertilidad) en mujeres y edema peneano y epididimitis en hombres. Se puede producir conjuntivitis en los adultos, pero la infección ocular se presenta, con mayor frecuencia, como oftalmía neonatal en el recién nacido. La infección gonocócica diseminada (IGD), que es una entidad morbosa diferente y no una verdadera complicación, puede producirse en ambos sexos aunque es poco frecuente. En el cuadro 4.1 se resumen las manifestaciones clínicas de la infección gonocócica.

- *N. gonorrhoeae* causa las ITS bacterianas más frecuentes en el mundo (en el 2008, exactamente igual de frecuentes que la infección por clamidias), que incluyen una serie de enfermedades de distinta localización: urogenital, faríngea, rectal y conjuntival.
- Las complicaciones y secuelas asociadas a las infecciones por *N. gonorrhoeae* sin tratar son, entre otras, la enfermedad pélvica inflamatoria, el embarazo ectópico, la infertilidad, el edema peneano, la epididimitis y la infección gonocócica diseminada.

Cuadro 4.1: Manifestaciones clínicas de la infección gonocócica^a

Gonorrea sin complicaciones ^a		Gonorrea con complicaciones ^b	
Uretra	<ul style="list-style-type: none"> • Secreción copiosa y purulenta • Secreción escasa y clara • Disuria 	Complicaciones en el hombre	<ul style="list-style-type: none"> • Edema peneano • Absceso de las glándulas de Tyson • Absceso de las glándulas de Cowper • Vesiculitis seminal • Epididimitis • Infertilidad (raro)
Cuello uterino	<ul style="list-style-type: none"> • Orificio cervical externo rojo y friable • Exudado purulento en el orificio • Disuria • Salpingitis • Dolor a la palpación, bilateral o unilateral, en el abdomen inferior. 	Complicaciones en la mujer	<ul style="list-style-type: none"> • Endometritis • Salpingitis • Absceso de la glándula Bartholin • Linfangitis • Absceso tuboovárico • Embarazo ectópico • Infertilidad
Recto	<ul style="list-style-type: none"> • Secreción copiosa y purulenta • Ardor o escozor • Tenesmo • Sangre en heces 	Infeción gonocócica diseminada (IGD)	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteriemia • Fiebre • Dermatitis (lesiones cutáneas: macular, eritematosa, pustulosa, necrótica, hemorrágica) • Tenosinovitis • Articulaciones; artritis séptica. • Endocarditis • Meningitis
Faringe	<ul style="list-style-type: none"> • Faringitis leve • Dolor de garganta leve • Eritema 		
Conjuntiva	<ul style="list-style-type: none"> • Secreción copiosa y purulenta • Queratitis y ulceración corneal; perforación, extrusión del cristalino. • Cicatrización; opacificación del cristalino. • Ceguera 		

^a Como se ha señalado, la infección gonocócica puede ser asintomática, en particular en las mujeres y en la localización faríngea o rectal.

^b Los estudios epidemiológicos y biológicos aportan pruebas fehacientes de que la gonorrea favorece significativamente la transmisión del VIH.

4.2 Aspectos generales de los métodos de diagnóstico existentes

La gonorrea suele ser asintomática, especialmente en las mujeres, y en la localización faríngea y rectal si hay síntomas, pueden ser inespecíficos (véase el cuadro 4.1). En consecuencia, se necesitan técnicas de laboratorio para el diagnóstico, la identificación de casos y comprobar la curación. El diagnóstico de la gonorrea se establece mediante la detección de *N. gonorrhoeae* en las secreciones

En el cuadro 4.2 se resumen los métodos recomendados para el diagnóstico de la gonorrea, el desempeño y otras características de estos métodos.

Una tinción de Gram del frotis bien hecha seguida del examen microscópico en busca de diplococos intracelulares gramnegativos en los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) es sensible (95%) y específica (97%) para el diagnóstico de la gonorrea en los hombres sintomáticos con secreción uretral. En las mujeres, sin embargo, el examen del frotis de la secreción cervicouterina solo detecta 40% a 60% de las muestras con cultivo positivo, lo que podría ser una indicación del menor número de gonococos en las mujeres. Además, pueden presentarse resultados positivos falsos y la especificidad (80% a 95%) dependerá de la experiencia del microscopista. El examen microscópico directo no se recomienda para el diagnóstico de las infecciones rectales y faríngeas

Cuadro 4.2: Pruebas diagnósticas de rutina (a junio del 2012) para la detección de *N. gonorrhoeae*

	Microscopia ^a	Cultivo	PAAN
Tipos de muestras			
Hisopado endocervical	Sí ^a	Sí	Sí
Hisopado vaginal	No	Sí ^b	Sí (algunas pruebas)
Orina			
Hombre	No	No	Sí ^c
Mujer	No	No	Sí
Hisopado uretral	Sí ^a	Sí	Sí
Hisopado rectal	No	Sí	No ^d
Hisopado orofaríngeo	No	Sí	No ^d
Hisopado conjuntival	Sí	Sí	No ^d
Desempeño			
Sensibilidad ^e	Baja–alta ^a	Moderada–alta	Muy alta
Especificidad ^e	Moderada–alta ^a	Muy alta	Moderada–muy alta
Otras consideraciones			
Costo	Bajo	Moderado	Alto–muy alto
Instrumental o equipo	Microscopio	Microbiología corriente	Gran superficie para los aparatos
Capacidad analítica-automatización	Moderada-nula	Moderate/no	Alta-posible
Complejidad técnica	Baja	Moderada-nula	Alta
Tipo de laboratorio	Periférico	Periférico–intermedio	Intermedio–central
Varios patógenos en una muestra	No	No	<i>C. trachomatis</i> , <i>T. vaginalis</i> , y VPH en algunas plataformas.
Otras observaciones		<ul style="list-style-type: none"> Las condiciones estrictas de recogida, transporte y conservación de la muestra son clave para mantener la viabilidad Es el único método que posibilita la realización del antibiograma. 	<ul style="list-style-type: none"> Las PAAN tienen en general mayor sensibilidad que el cultivo, especialmente en muestras faríngeas y rectales. Sin embargo, la especificidad puede ser insuficiente y es necesaria la confirmación con otra prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

VPH: virus de los papilomas humanos; PAAN: prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

^a La microscopia tiene una sensibilidad y especificidad altas en los varones sintomáticos (con uretritis), sensibilidad baja en los asintomáticos y en las infecciones endocervicales y no se recomienda para las muestras vaginales, de orina, rectales o faríngeas.

^b No es una muestra recomendada, suele utilizarse en el caso de niñas impúberes o mujeres con histerectomía.

^c La orina no es la muestra ideal por presentar una sensibilidad insuficiente para la detección de *N. gonorrhoeae* en la mujer.

^d No hay ninguna prueba de amplificación de ácidos nucleicos autorizada internacionalmente para usar con muestras extragenitales, pero hay cada vez más indicios de que las PAAN son más sensibles que el cultivo en estas localizaciones. Se recomienda que una PAAN positiva en muestras rectales y faríngeas sea confirmada por otra prueba complementaria (PAAN con otra secuencia diana) para evitar resultados positivos falsos.

^e Los porcentajes de sensibilidad y especificidad dependen en gran medida de la diferente sensibilidad y especificidad de las pruebas efectuadas con la misma metodología y de las utilizadas como referencia.

debido a la gran concentración de otros microorganismos en la muestra y a la escasa sensibilidad. Tampoco se recomienda el cribado de personas asintomáticas mediante el examen microscópico.

Durante decenios, el cultivo de *N. gonorrhoeae* se ha considerado el método de referencia para el diagnóstico tanto de la gonorrea genital como de la extragenital. El cultivo es sensible y sumamente específico en circunstancias optimizadas, tiene bajo costo y, lo que es más importante, permite la realización del antibiograma. La resistencia de los gonococos a los antibióticos es un problema grave en todo el mundo; dado que el cultivo es el único método para realizar el antibiograma, es esencial mantener y, cuando sea necesario, fortalecer la capacidad de realizar cultivos en todos los países.

A lo largo de los dos últimos decenios, se han desarrollado e introducido las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) para la detección específica de DNA o RNA de *N. gonorrhoeae*. Estas determinaciones son, en general, más sensibles que el cultivo para el diagnóstico de la gonorrea, especialmente en el caso de las muestras faríngeas y rectales (4–6).

Sin embargo, no se ha comercializado todavía una prueba de amplificación de ácidos nucleicos autorizada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA) para las muestras faríngeas o rectales. Además, la especificidad de varias de las PAAN gonocócicas ha resultado insuficiente para el diagnóstico en el caso de las muestras urogenitales y, en particular, en las extragenitales, lo que da lugar a un valor predictivo positivo bajo, concretamente, en poblaciones en las que la enfermedad no es frecuente.

Hasta la fecha no hay ninguna prueba de inmunofluorescencia directa o de enzoinmunoanálisis, ni ninguna prueba diagnóstica rápida en el punto de atención para la detección de antígenos con características de desempeño (sensibilidad y especificidad) adecuadas disponible para el diagnóstico de la gonorrea sin complicaciones o con ellas. Además, no hay ningún método comercial aprobado internacionalmente para la detección serológica de anticuerpos gonocócicos, y estos métodos no pueden diferenciar las infecciones en curso de las pasadas. Por otro lado, no deben usarse estos métodos en pacientes aislados debido a la insuficiente sensibilidad

y especificidad para el diagnóstico de la gonorrea sin complicaciones o con ellas.

Para que las características de desempeño de todos los métodos de diagnóstico sean adecuadas, es fundamental seguir rigurosamente los procedimientos normalizados de trabajo en la realización, así como las recomendaciones del fabricante relativas a la toma, el transporte y la conservación de las muestras y su análisis, sin olvidar el control de la calidad (CC) de la prueba en cuestión.

- La microscopia es sensible y específica en los hombres sintomáticos con secreción uretral.
- El cultivo es sensible y sumamente específico en circunstancias optimizadas, es de bajo costo y posibilita la realización del antibiograma.
- Las PAAN tienen en general mayor sensibilidad que el cultivo, especialmente para las muestras faríngeas y rectales. Sin embargo, la especificidad de varias de las PAAN gonocócicas es insuficiente para el diagnóstico en las muestras urogenitales y, en particular, en las extragenitales, lo que da lugar a un valor predictivo positivo bajo en poblaciones con prevalencia baja.

4.3 Recogida, transporte y conservación de las muestras

El sitio anatómico idóneo de recogida de la muestra depende del sexo, la edad y el comportamiento sexual de la persona; de las manifestaciones clínicas de la infección y del método de la prueba diagnóstica, además de las características de desempeño (sensibilidad y especificidad) de dicha prueba. En la mujer, la principal localización a fin de recoger muestras para el cultivo y la microscopia es el conducto endocervical; para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, es el conducto endocervical o la vagina. Otras localizaciones secundarias son la uretra, el recto y la orofaringe. En los hombres heterosexuales, las muestras para el cultivo y la microscopia deben recogerse de la uretra, y para la PAAN, una muestra de orina. En los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres y en las mujeres y hombres con signos clínicos indicativos o que practican el sexo oral o anal deben tomarse muestras, además, en el recto y la orofaringe. Las PAAN tienen más sensibilidad

para detectar estas infecciones que el cultivo y pueden aumentar la identificación de casos (4–6), aunque, como se ha señalado, no hay ningún equipo comercializado que esté autorizado para la realización de estas. En el cultivo, como se requieren organismos vivos, la muestra debe proceder de localizaciones con células epiteliales cilíndricas o cúbicas y debe utilizarse, de ser posible, un hisopo estéril de rayón o dacrón recubierto con partículas de carbón vegetal (si el medio de transporte no nutritivo carece de estas partículas). Siempre que se utilicen las PAAN en el diagnóstico, se deben seguir al pie de la letra las instrucciones del fabricante relativas a la recogida, el transporte y la conservación de las muestras. Se evitará el uso de antisépticos, analgésicos y lubricantes cuando se recoja la muestra ya que estos pueden inhibir los gonococos. En cualquier caso, la recogida de la muestra debe realizarse antes de iniciar el tratamiento antibiótico.

Endocérvix: Introducir el hisopo de 2 a 3 cm en el orificio cervical externo y rotar suavemente durante 5 a 10 segundos. No deben tomarse muestras endocervicales de niñas impúberes ni de mujeres con histerectomía; en su lugar, se tomarán del vestíbulo de la vagina y también se recogerá una muestra de orina (para el diagnóstico mediante PAAN).

Uretra: Tomar las muestras uretrales al menos 1 hora después de que haya orinado el paciente. Recoger la secreción directamente en un hisopo.

- Las condiciones de recogida, transporte y conservación de las muestras varían según el método analítico y pueden tener una influencia significativa en la sensibilidad de la prueba.
- La elección de la muestra y de la prueba de detección adecuadas es crucial para un diagnóstico eficaz.

Si no hay secreción, en los hombres se presiona la uretra hacia el orificio para tratar de evacuarla (maniobra de ordeño). Si no se obtiene ninguna secreción, introducir un hisopo delgado 2 o 3 cm en la uretra y rotar suavemente durante 5 a 10 segundos. En las mujeres, hacer un masaje de la uretra contra la sínfisis pubiana y usar la misma técnica que en los hombres. El cultivo de una muestra del endocérvix y una de la uretra simultáneamente puede aumentar la detección de casos en las mujeres.

Vagina (solo para la PAAN): El hisopo debe rotarse contra las paredes vaginales posteriores durante 5 segundos. Las muestras vaginales pueden ser tomadas tanto por la paciente como por el médico y el resultado será el mismo (7, 8).

Primera porción (recolección) de orina (solo para la PAAN): Sin limpiar la zona genital del paciente, recoger 10 a 20 ml de la primera parte de la micción en un recipiente estéril al menos 1 hora después de que el paciente haya orinado.

Recto: Introducir un hisopo de 2 a 3 cm en el recto y rotarlo contra las paredes rectales durante 10 segundos. Si se produce contaminación fecal, desechar ese hisopo y usar otro para obtener la muestra. En los pacientes sintomáticos, las muestras anorrectales deberían obtenerse, a ser posible, insertando un proctoscopio que proporcione visión directa.

Orofaringe: Frotar la región posterior de la faringe por encima del borde inferior del paladar blando y las criptas amigdalinas.

Conjuntiva: Retirar el párpado inferior y desplazar un hisopo delgado por la superficie de la conjuntiva palpebral inferior hacia el ángulo medio del ojo.

4.4 Diagnóstico provisional: microscopia

4.4.1 Preparación de los portaobjetos para la tinción

Preparar el frotis según se describe en el anexo 1 (Microscopia). Fijar la extensión seca calentándola en una placa eléctrica o pasando rápidamente el portaobjetos tres veces sobre la llama, con la precaución de mantener el lado de la extensión hacia arriba. Evitar el calentamiento excesivo para que las células no se deformen. Al tocar el dorso de la mano con el portaobjetos, solo debe sentirse caliente.

La observación al microscopio de la tinción con azul de metileno (fig. 4.1) es sencilla y rápida, y es un método fiable para el diagnóstico de la gonorrea en hombres con uretritis purulenta, (9) pero no permite distinguir los cocos gramnegativos y, por consiguiente, carece de la especificidad deseada. La tinción de Gram permite detectar diplococos gramnegativos intracelulares dentro de los leucocitos polimorfonucleares y es el método de elección para el diagnóstico provisional de *N. gonorrhoeae* (fig. 4.2). Se pueden observar organismos

extracelulares, pero esto solo no basta para el diagnóstico, aunque se usa a veces en combinación con los síntomas clínicos.

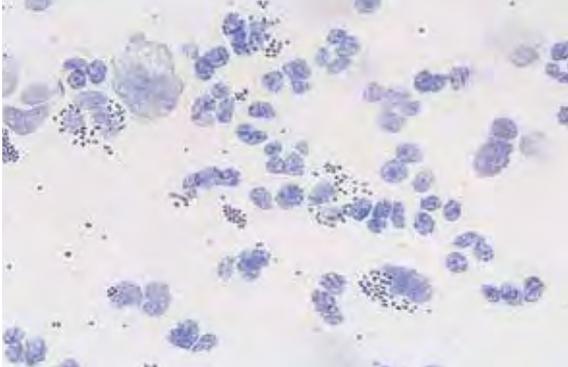


Figura 4.1
Microscopía de una tinción de azul de metileno de un exudado uretral masculino que presenta diplococos intracelulares dentro de los LPMN (1000x)
Fuente: Reproducido de Morse SA *et al.*, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4ª ed. Edimburgo, Saunders/Elsevier, 2010.

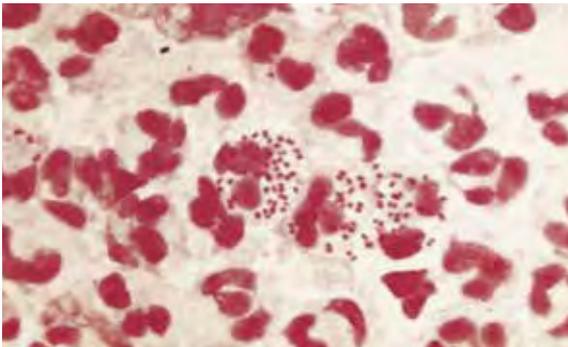


Figura 4.2
Microscopía de una tinción de Gram de un exudado uretral masculino que presenta diplococos intracelulares gramnegativos dentro de los LPMN (1000x)
Fuente: Reproducido de Morse SA *et al.*, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4ª ed. Edimburgo, Saunders/Elsevier, 2010.

4.4.2 Procedimiento para la tinción de Gram

1. Cubrir con cristal violeta durante 30 segundos una extensión fijada con calor. Lavar suavemente con agua fría del grifo.
2. Inundar el portaobjetos con solución de yodo durante 30 segundos. Lavar suavemente con agua fría del grifo.
3. Decolorar con acetona, etanol-acetona o solo etanol hasta que deje de salir colorante violeta del

frotis. Es mejor sujetar el portaobjetos con la mano, protegida con guantes, cerca del agua corriente. El tiempo de decoloración dependerá del decolorante químico utilizado y del espesor del frotis —será más corto (normalmente solo unos segundos) con acetona y más largo (hasta un minuto) con etanol. Debe evitarse la decoloración excesiva para que las bacterias grampositivas no se confundan con las gramnegativas. Hacer caso omiso de las partes gruesas que puedan teñirse de azul en un frotis que no esté bien extendido y nivelado.

4. Lavar rápidamente con agua corriente para detener la decoloración y escurrir el exceso de agua.
5. Cubrir con el colorante de contraste, safranina o fucsina, durante 1 minuto.
6. Lavar con agua corriente y secar suavemente el portaobjetos con papel de filtro.

4.4.3 Procedimiento de la tinción de azul de metileno

1. Cubrir el frotis con azul de metileno durante unos 30 a 60 segundos.
2. Enjuagar con agua corriente y secar suavemente el portaobjetos con papel de filtro.

4.4.4 Lectura del frotis e interpretación

Usar un microscopio con buena iluminación y aceite de inmersión de buena calidad, y examinar el frotis con el objetivo de 100X (ocular de 10X). Los gonococos aparecen como diplococos gramnegativos dentro de los LPMN. Describir exactamente lo que se vea en el frotis: células epiteliales, LPMN, morfotipos de bacterias y su ubicación intracelular o extracelular. El examen microscópico del portaobjetos debe durar al menos 2 minutos antes de concluir que no contiene ningún diplococo intracelular gramnegativo.

4.4.5 Control de la calidad de la microscopía usando frotis teñidos con la tinción de Gram

El control de la calidad debe realizarse a intervalos regulares usando una serie de bacterias que reaccionan (se tiñen) de forma diferente frente al Gram o empleando muestras de control. En todo caso, siempre debe realizarse cuando se empieza un nuevo lote de reactivos.

- La sensibilidad y la especificidad de la microscopia en hombres sintomáticos con secreción uretral es buena.
- Sin embargo, la microscopia tiene menor sensibilidad en hombres asintomáticos y en las infecciones endocervicales, y no proporciona un diagnóstico de certeza para estas infecciones.
- No se recomienda la microscopia para el diagnóstico de infecciones rectales y faríngeas.

4.5 Cultivo e identificación de *N. gonorrhoeae* (de sospecha y de certeza)

4.5.1 Transporte y cultivo

El cultivo sigue siendo esencial para realizar el antibiograma (véase la sección 4.8). Los gonococos son muy sensibles a las condiciones ambientales (temperatura, desecación, oxidación y sustancias tóxicas), por lo que el transporte de las muestras desde el consultorio al laboratorio (cuadro 4.3) reducirá la viabilidad de estas bacterias. La inoculación directa de las muestras en un medio de cultivo nutritivo y selectivo (ver más adelante) en la propia consulta es el método óptimo, pero si esto no fuera factible, el hisopo se insertará en un medio de transporte no nutritivo como el medio de Stuart o el Amies (véase el anexo 4), o se inoculará en un medio de transporte nutritivo (medio de crecimiento) como el Transgrow (10, 11), el Jembec (11, 12), el Gono-Pak o el sistema InTray GC. Cuando se emplea un medio de transporte no nutritivo, el porcentaje de aislamiento después de transportar las muestras a temperatura ambiente (20–25° C) es prácticamente del 100% en las 6 primeras horas y más del 90% si se alarga hasta 12 horas.

Al cabo de 48 horas, sin embargo, el número de gonococos disminuye y ya no es posible el aislamiento, especialmente en las muestras de pacientes asintomáticos que contienen una cantidad menor de estas bacterias. Cuando se prevé un tiempo de tránsito superior a 48 horas, lo ideal es emplear sistemas de transporte (crecimiento) nutritivos que incorporan un medio de cultivo y proporcionan una atmósfera rica en CO₂. La máxima supervivencia y recuperación de los gonococos a partir de un medio de transporte no nutritivo se consigue cuando estos medios, Stuart o

Amies, inoculados (véase el anexo 4) se conservan en el refrigerador entre 2 y 8° C antes de transportarlos al laboratorio. Estos medios retrasan el crecimiento de los gonococos y se evita así la pérdida de viabilidad. Por el contrario, la máxima supervivencia a partir de los medios de transporte (crecimiento) nutritivos se obtiene cuando las muestras se preincuban en el medio de transporte a 36 ± 1° C hasta el día siguiente antes de enviarlas al laboratorio; se obtienen resultados aceptables si el tiempo de transporte no excede los 2 días (11).

La fiabilidad de un cultivo para el diagnóstico de la gonorrea está condicionada por una serie de factores:

- número de sitios en los que se toma la muestra,
- técnica e hisopos usados para la recogida de las muestras,
- condiciones y duración del transporte,
- composición y calidad del medio de cultivo,
- inoculación y condiciones de incubación,
- reactivos y técnicas empleadas para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

El número de cepas gonocócicas sensibles a la concentración de antibióticos que se usa generalmente en los medios de cultivo selectivos con agar es insignificante en la mayoría de los países. En consecuencia, se recomienda el empleo de medios de cultivo selectivos nutritivos como el Thayer–Martin (13), el Agar Thayer–Martin modificado (MTM; véase el anexo 4) y el Agar New York City (NYC) (14) para el diagnóstico habitual de la gonorrea. Si los recursos son suficientes, en el caso de las muestras urogenitales lo ideal sería utilizar también una placa de cultivo no selectivo para cada muestra. En algunas zonas geográficas, hasta un 5% de los gonococos pueden ser sensibles a concentraciones de 3 a 4 mg/l de vancomicina presentes en los medios de cultivo selectivos (15); por consiguiente, se recomiendan suplementos selectivos con una concentración menor de vancomicina (2 mg/l) o con lincomicina (1 mg/l), que inhibe menos las bacterias contaminantes que la vancomicina. Si se examinan muestras rectales y faríngeas sistemáticamente, es aconsejable que el medio contenga la concentración de vancomicina más alta.

Cuadro 4.3: Obtención, transporte y conservación de las muestras

Localización anatómica	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	Microscopia	Cultivo	PAAN
Endocérvix	Hisopo plástico ^a (o cepillo endocervical o estuche para la recolección específico de las PAAN)	Usar un espéculo vaginal y limpiar el exocérvix. Introducir el hisopo 2 a 3 cm y rotar durante 5 a 10 segundos.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire (véase el anexo 1). La sensibilidad para las muestras endocervicales es insuficiente.	Debe realizarse la siembra al pie del enfermo en un medio selectivo para gonococos e incubarse de inmediato. Si no se hace así, se debe emplear un medio de transporte no nutritivo para gonococos o un medio de transporte nutritivo. ^b Una vez en el laboratorio se deben sembrar las muestras del medio de transporte no nutritivo cuanto antes o, como máximo, antes de transcurridas 48 horas (véase también la sección 4.5).	Colocar en el dispositivo de recolección del fabricante. Transportar y conservar según las instrucciones de fabricante. Si el fabricante no ha previsto un medio de transporte, utilizar uno apropiado que establezca el ácido nucleico, por ejemplo, tubos de GeneLock.
Uretra (recogida ≥ 1 hora después de haber orinado)	Hisopo de aluminio ^c (o estuche para la recolección específico de las PAAN)	Recoger la secreción directamente con un hisopo. Introducir el hisopo 2 a 3 cm en la uretra y rotar durante 5 a 10 segundos.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire (véase el anexo 1).	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para el cultivo.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN.
Vagina	Hisopo - plástico ^a (o estuche para la recolección específico de las PAAN)	La muestra puede ser recogida por el personal médico o la propia paciente. Rotar el hisopo contra las paredes vaginales posteriores durante 5 segundos.	NP	Se realiza en el caso de niñas impúberes o de mujeres a las que se les ha practicado una histerectomía. Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para el cultivo.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN. ^d

Cuadro 4.3: Obtención de muestras, transporte y almacenamiento (continuación)

Localización anatómica	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	Microscopia	Cultivo	PAAN
Orina (recogida \geq 1 hora después de haber orinado)	Recipiente estéril de orina	Sin limpiar la zona genital del paciente. Recoger la primera porción de orina (menos de 25 ml en general).	NP	NP	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN.
Recto	Hisopo plástico ^a (o estuche para la recolección específico de las PAAN)	Introducir el hisopo en el recto 2 a 3 cm y rotarlo contra las paredes durante 10 segundos.	NP	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para el cultivo.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN. ^d
Orofaringe	Hisopo plástico ^a (o estuche para la recolección específico de las PAAN)	Frotar con el hisopo la faringe posterior y las criptas amigdalinas.	NP	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para el cultivo.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN. ^d
Conjuntiva	Hisopo de aluminio ^c (o estuche para la recolección específico de las PAAN)	Debe limpiarse la secreción purulenta con un hisopo. Retirar el párpado inferior. Frotar la superficie de la conjuntiva palpebral inferior.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire (véase el anexo 1). Principalmente para los recién nacidos.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para el cultivo.	Transporte y conservación, igual que la muestra endocervical para la PAAN. ^d

NP: no procede; PAAN: prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

^a Hisopos de dracón o rayón con mango de plástico.

^b Debe utilizarse un medio de transporte no nutritivo para *N. gonorrhoeae* como el Amies o el Stuart (conservado a 4 °C antes del transporte) o un medio de transporte nutritivo (medio de crecimiento) como el Jembec, el Transgrow, el Gono-Pak o el sistema InTray GC (conservado a 36 \pm 1 °C antes del transporte).

^c Hisopos de dacrón o de rayón con mango de aluminio.

^d La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América aún no ha autorizado ninguna PAAN para la detección de gonococos que utilice muestras extragenitales; sin embargo, las PAAN realizadas con muestras rectales y orofaríngeas han resultado ser más sensibles que el cultivo (4–6) y podrían utilizarse si se contara con datos de validación adecuados.

4.5.2 Control de la calidad de los medios de cultivo

En cada lote de medio de cultivo debe controlarse la esterilidad, la capacidad de mantener el crecimiento de los gonococos y la capacidad de inhibir otros microorganismos contaminantes. Para la evaluación de la capacidad de crecimiento y el control de la calidad de todos los métodos de diagnóstico, se pueden obtener cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) de centros colaboradores de la OMS (véase la sección 4.8.3.3). Para controlar la inhibición del crecimiento de microorganismos no gonocócicos pueden usarse cepas de referencia, por ejemplo, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *N. sicca* (ATCC 9913) y *Candida albicans* (ATCC 14053).

4.5.3 Siembra e incubación del cultivo

Rodar el hisopo que contiene la muestra sobre aproximadamente un cuarto de la superficie de la placa, de preferencia placas de Petri de 90 mm de diámetro. Extender el inóculo sobre la parte restante del medio para garantizar el crecimiento de colonias aisladas con un asa de siembra bacteriológica estéril. Otra posibilidad es sembrar la muestra sobre toda la superficie de la placa dibujando una "Z" y luego hacer estrías; de este modo se obtienen colonias que quedan más aisladas. Incubar de inmediato las placas sembradas a una temperatura de $36 \pm 1^\circ \text{C}$ en una atmósfera húmeda (aproximadamente 70% a 80% de humedad) que contiene $5 \pm 1\%$ de CO_2 (jarra de anaerobiosis con vela, con una torunda de algodón hidrófilo humedecido o toallas [fig. 4.3], jarra de anaerobiosis con sobres generadores de CO_2 o incubadora de CO_2 con cámara de agua u otro artilugio para aumentar la humedad). Examinar las placas al cabo de 18 a 24 horas y, si no hay crecimiento, de nuevo a las 48 horas. Tras 24 horas de incubación, el diámetro de las colonias típicas puede variar de 0,5 a 1 mm y el aspecto varía de gris a blanco, de transparente a opaco y de convexas a aplanadas (dependiendo de la cepa gonocócica y del medio de cultivo; fig. 4.4). Después de una incubación más larga, pueden alcanzar 3 mm de diámetro y se hacen más rugosas. Con frecuencia, aparece una mezcla de diferentes tipos de colonias en una misma placa.



Figura 4.3
Jarra de anaerobiosis con vela para la incubación de placas de cultivo de *N. gonorrhoeae*



Figura 4.4
Colonias características de *N. gonorrhoeae* en medio de cultivo selectivo para gonococos (izquierda: MTM) y en medio no selectivo (derecha: MTM sin añadir antibióticos). Se observa una ligera inhibición del crecimiento debido a los antibióticos selectivos. Fuente: Reproducido de Morse SA *et al.*, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4ª ed. Edimburgo, Saunders/Elsevier, 2010.

4.5.4 Identificación de sospecha de *N. gonorrhoeae* tras el cultivo

La identificación de sospecha de las colonias con apariencia similar a las de gonococo en medios selectivos puede hacerse mediante la tinción de Gram (véase la sección 4.4.2) y la prueba de la oxidasa.

Esta prueba detecta la presencia de citocromo-*c*-oxidasa; la mejor forma de realizarla es frotando directamente algunas colonias sobre una tira de papel de filtro humedecida con el reactivo (solución acuosa al 1% de dihidrocloruro de tetrametil-*p*-fenilendiamina) preparado en el laboratorio o comercializado (por ejemplo, BACTIDROP oxidasa). En una prueba positiva se observa el cambio de incoloro a violeta en pocos segundos (30 como máximo) (fig. 4.5). Otra posibilidad es realizar la prueba de la oxidasa colocando una gota de reactivo de oxidasa sobre algunas colonias representativas de un cultivo. Se debe tener precaución dado que el reactivo es tóxico para las bacterias y, si solo hay unas pocas colonias, deberán subcultivarse antes de hacer la prueba (fig. 4.5). La observación de diplococos gramnegativos, oxidasa positiva, con colonias de morfología característica que crecen en medios selectivos sembrados a partir de muestras genitales ofrece una identificación suficiente y fiable de *N. gonorrhoeae* en el diagnóstico provisional y es sumamente predictivo de *N. gonorrhoeae* si la muestra proviene de una paciente con riesgo elevado y crece en agar selectivo para gonococos. En situaciones con recursos limitados, esto será suficiente para iniciar el tratamiento. Sin embargo, para proporcionar un diagnóstico definitivo de gonorrea, es necesario confirmar la identificación de *N. gonorrhoeae* y descartar las especies estrechamente relacionadas, como *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *N. cinerea*, que también pueden crecer en los medios principales selectivos de aislamiento para gonococos.

Es aconsejable confirmar siempre la identificación de las colonias gramnegativas, oxidasa positiva de las muestras de localizaciones extragenitales, dado que la probabilidad de aislar especies de *Neisseria* diferentes de *N. gonorrhoeae* en estos sitios es mayor, en particular en la faringe. Se debe confirmar la identificación de toda colonia gonocócica aislada a la que se le van a determinar otras características, por ejemplo, mediante un antibiograma (véase la sección 4.8), un fenotipado o un genotipado.

4.5.5 Control de la calidad de los reactivos de la prueba de la oxidasa

El control de la calidad debe realizarse a intervalos regulares y siempre que se empiece un nuevo lote de reactivos. Pueden usarse cepas de referencia oxidasa positiva, como *N. gonorrhoeae* (cepa de referencia de la OMS del 2008; 16), y oxidasa negativa, como *S. epidermidis* (ATCC 12228) o *E. coli* (ATCC 25922).

4.5.6 Confirmación de la identificación de *N. gonorrhoeae* después del cultivo

La confirmación puede enfocarse de tres formas: utilizar pruebas bioquímicas que diferencian especies de *Neisseria* distintas de otras estrechamente relacionadas y llegan a una identificación completa de la especie, utilizar reactivos inmunológicos o utilizar la detección molecular que es específica para *N. gonorrhoeae* pero solo confirma la identificación de *N. gonorrhoeae* y no sirve para identificar las colonias aisladas que



Figura 4.5
Colonias oxidasa positiva de color violeta de *N. gonorrhoeae* en una placa de cultivo (foto de la izquierda, placa de agar a la derecha) y en papel de filtro (derecha, que también presenta una reacción negativa que permanece amarilla), después de la reacción con una solución acuosa al 1% de dihidrocloruro de tetrametil-*p*-fenilendiamina.

dan reacciones negativas. La elección de uno u otro de estos enfoques dependerá del número de colonias aisladas que se van a analizar, de los conocimientos y experiencia y del costo. En los laboratorios que no se identifican colonias gonocócicas con frecuencia, es aconsejable usar un estuche comercializado que proporciona la identificación completa. En los laboratorios que se identifican muchas colonias, la identificación de *N. gonorrhoeae* se suele confirmar usando un reactivo específico y luego, si alguna es de improviso negativa, se le realizan otras pruebas bioquímicas. Ninguna prueba tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, por lo tanto si se cuenta con recursos, se recomienda actualmente que las cepas clínicas de *N. gonorrhoeae* se confirmen usando una combinación de pruebas bioquímicas e inmunológicas (o pruebas moleculares cuando se disponga de ellas). Este enfoque se recomienda especialmente para los laboratorios de referencia.

4.5.6.1 Pruebas para diferenciar las especies de *Neisseria*

Tradicionalmente, el principal método de identificación ha sido la capacidad de *N. gonorrhoeae* de producir ácido en un medio que contiene glucosa; la disminución del pH se detecta por el cambio de color de un indicador de pH, a diferencia de, por ejemplo, *N. meningitidis*, que además utiliza maltosa (cuadro 4.4). Este patrón excepcional de utilización de los hidratos de carbono se observa al inocular cultivos puros en agar tripticasa de cisteína (ATC) que contienen glucosa, maltosa y sacarosa, respectivamente, con una concentración final de 1% a 2% e incubarlos durante 24 horas (fig. 4.6; 17).

Es fundamental realizar esta prueba empleando un cultivo puro; para ello se requiere hacer al menos un subcultivo, lo que alargará el tiempo de obtención del resultado analítico para confirmar la identificación respecto a otras pruebas más rápidas descritas a continuación.

También es eficaz la prueba rápida de utilización de los hidratos de carbono (18, 19), que depende de las enzimas preformadas y no del crecimiento, y usa medios líquidos inoculados con un cultivo puro y denso. Los resultados se obtienen en 4 horas.

La detección rápida de enzimas preformadas también requiere un cultivo puro (que siempre



Figura 4.6
Producción de ácido a partir de los hidratos de carbono del medio agar tripticasa de cisteína (ATC). Los tubos empezando por la izquierda contienen medio ATC sin ningún hidrato de carbono, medio ATC con solución de glucosa al 1% y medio de ATC con maltosa al 1%. La cepa bacteriana inoculada es *N. gonorrhoeae*.

Fuente: Reproducido de Morse SA *et al.*, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4ª ed. Edimburgo, Saunders/Elsevier 2010.

debe tomarse de un medio no selectivo), pero no es necesario incubar hasta el día siguiente y proporciona los resultados antes. En todas estas pruebas es importante seguir estrictamente las instrucciones del fabricante. Básicamente estas pruebas detectan diferentes enzimas de la ruta de la aminopeptidasa y, entre otras, se incluye Gonocheck-II (Laboratorios E-Y) (17, 19) y la prueba de detección de enzimas preformadas de *Neisseria* (*Neisseria* PET; Key Scientific) (17). La prueba Gonocheck-II se usa para diferenciar las especies de *Neisseria* mediante la detección de tres enzimas preformadas (prolil iminopeptidasa [PIP], γ -glutamil-aminopeptidasa y β -galactosidasa).

El cambio de color a azul indica hidrólisis del 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosidasa por la β -galactosidasa, que es indicativo de *N. lactamica*. Un cambio de color a amarillo indica hidrólisis del γ -glutamil-p-nitroanilida por la γ -glutamilaminopeptidasa, que es una característica de *N. meningitidis*. Si no se produce cambio de color, se quita la primera tapa y se reemplaza por una segunda, que tiene un colorante diazo (revelador de color) incorporado y se invierte el tubo. Si se observa un color rojo, indica hidrólisis de L-prolina 4-metoxinaftilamida y la presencia de prolil iminopeptidasa, que da una identificación de sospecha de *N. gonorrhoeae*. El principio de la prueba de detección de enzimas preformadas de *Neisseria* es

similar con alguna que otra variación. Tras incubar a 37 °C durante 30 minutos, se produce un cambio de color como se describe en la prueba Gonochek-II. Si no aparece ningún color después de 30 minutos, se agrega una gota de reactivo de la prueba de detección de enzimas preformadas y se observa el color al cabo de otros 2 minutos.

Debe tenerse en cuenta que algunas especies saprofitas de *Neisseria*, como la *N. cinerea*, *N. polysaccharea* y *N. subflava*, crecen en medio para gonococos después de 24 a 48 horas de incubación; estas especies poseen la proil iminopeptidasa y, por consiguiente, pueden dar resultados positivos falsos engañosos cuando se utilizan los estuches de Gonochek-II y *Neisseria* PET. También se producen resultados negativos falsos con las cepas de *N. gonorrhoeae* que carecen de actividad proil iminopeptidasa; y ha habido una difusión mundial de un clon gonocócico PIP negativo (20). Algunas cepas de *N. meningitidis* procedentes de localizaciones urogenitales no poseen γ -glutamylaminopeptidasa.

No se recomienda la confirmación de las especies usando únicamente pruebas de enzimas preformadas. Sin embargo, una combinación de la prueba de utilización de los hidratos de carbono y de la prueba de detección de enzimas preformadas, que está comercializada en estuches rápidos, da una identificación más fiable.

En estas pruebas es esencial seguir estrictamente las instrucciones del fabricante. Dos ejemplos de esos sistemas son el API-NH (bioMérieux) y el RapID NH (Remel) (17), que lamentablemente resultan demasiado costosos para entornos más desfavorecidos. Los dos contienen sustratos deshidratados en una serie de cúpulas o pocillos, que se llenan de una suspensión de las

colonias a identificar; se observa el color de la reacción tras 2 a 4 horas de incubación a 37 °C. Se obtiene un número de perfil que revela la identificación cuando se compara con una base de datos (en papel o en línea). El API-NH tiene 10 pocillos (y se obtienen 13 pruebas de identificación), que incluyen una prueba de β -lactamasa, 4 pruebas de utilización de los hidratos de carbono y 8 pruebas bioquímicas correspondientes a diferentes reacciones de sustrato enzimático (fig. 4.7). El estuche RapID NH consta de 2 cavidades para los hidratos de carbono y 11 pocillos bioquímicos para diferentes reacciones de sustrato enzimático (las reacciones principales para distinguir las especies de *Neisseria* se indican en el cuadro 4.4).

4.5.6.2 Control de la calidad de las pruebas bioquímicas de confirmación de las especies

Se debe controlar la calidad de cada nuevo lote de pruebas comercializadas o de reactivos internos (preparados en el laboratorio) utilizando cepas de referencia de especies bacterianas adecuadas, como *N. gonorrhoeae* (cepa de referencia de la OMS de 2008 (16)), *N. meningitidis* (ATCC BAA-335), *N. lactamica* (ATCC 23970), *N. sicca* (ATCC 9913) y *N. cinerea* (ATCC 14685). Además, cada vez que se realiza la prueba de confirmación de las especies, se incluirán las mismas cepas de referencia como controles.

Recientemente, la espectrometría de masas acoplada al sistema de desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz con un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) ha comenzado a introducirse en los laboratorios bien abastecidos para la confirmación de la mayoría de las especies bacterianas, incluidas las de *Neisseria*



Figura 4.7
Estuche de identificación API- NH, muestra el perfil de *N. gonorrhoeae*

Table 4.4: Carbohydrate (sugar) utilization and enzyme activity of different *Neisseria* species and other oxidase-positive species such as *Moraxella catarrhalis* and *Kingella denitrificans*

Species	Actividad bioquímica							
	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa (sacarosa)	Fructosa (levulosa)	ONPG ^a	GGT ^b	PIP ^c
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	–	–	–	–	–	–	+ (–)
<i>N. meningitidis</i>	+	+	–	–	–	–	+ (–)	– (+)
<i>N. lactamica</i> ^d	+	+	+	–	–	+	–	+
<i>N. polysaccharea</i> ^d	+	+	–	+/–	–	–	–	+
<i>N. cinerea</i> ^d	– (+)	–	–	–	–	–	–	+
<i>N. subflava</i> ^{d, e}	+	+	–	+/–	+/–	–	–	+
<i>N. sicca</i>	+	+	–	+	+	–	–	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	–	+	+	–	–	+
<i>N. flavescens</i>	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>M. catarrhalis</i>	–	–	–	–	–	–	–	– (+)
<i>K. denitrificans</i>	+	–	–	–	–	–	–	+

^a ONPG, o-nitrofenil- β-galactosidasa.

^b GGT, γ-glutamylaminopeptidasa (transferasa).

^c PIP, prolil iminopeptidasa (hidroxiprolina aminopeptidasa; HPA; prolina arilamidasa; PRO).

^d *N. lactamica* crece generalmente en medio selectivo gonocócico, pero también pueden aparecer otras especies de *Neisseria* saprofitas que no son patógenas.

^e Incluye las biovariedades subflava, flava y perflava, que difieren en su actividad frente a la sacarosa y a la fructosa.

+/-, no coherente para la especie; + (-), cepas principalmente positivas pero las hay negativas; - (+), cepas principalmente negativas pero las hay positivas.

(21). El equipo necesario para este método complejo es costoso. Sin embargo, el costo por especie aislada comprobada es bajo y el método es fácil de realizar y muy rápido. La espectrometría de masas acoplada al sistema MALDI-TOF parece distinguir eficazmente entre especies comensales y patógenas de *Neisseria*, así como también distingue *N. meningitidis* de *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, es necesario hacer otras determinaciones. Cuando se usa la espectrometría de masas acoplada al sistema MALDI-TOF para la confirmación de las especies de *N. gonorrhoeae*, es importante cumplir las instrucciones del fabricante al pie de la letra.

4.5.6.3 Pruebas específicas para *N. gonorrhoeae*

Las pruebas de confirmación específicas de *N. gonorrhoeae* pueden ser inmunológicas o moleculares, y son particularmente útiles en los laboratorios que procesan un gran número de colonias aisladas para su identificación y que pueden costearse estas pruebas relativamente caras. Estas pruebas pueden realizarse directamente con las colonias de una placa de cultivo selectivo y no es necesario utilizar un subcultivo puro. Por consiguiente, una colonia aislada puede

identificarse como mínimo 24 horas antes de lo que se consigue mediante las pruebas enzima-sustrato o las pruebas rápidas de utilización de hidratos de carbono.

El más corriente de los estuches que se comercializan es el de la prueba Phadebact Monoclonal GC (Boule) (17, 19), que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína principal de la membrana externa porina PorB (Por). Estos anticuerpos se absorben por el segmento Fc sobre la proteína A de *Staphylococcus aureus* y cuando se mezclan con el antígeno gonocócico, se produce la aglutinación.

La prueba se realiza con una suspensión poco concentrada de la bacteria investigada (equivalente a una turbidez estándar aproximada de 0,5 de la escala de McFarland; véase el anexo 4) hecha en el amortiguador de pH del fabricante o en una solución salina estéril al 0,9% amortiguada con fosfato (PBS), que luego se calienta a ebullición durante 10 minutos y se deja enfriar antes de su uso. La suspensión debe llevarse a ebullición inmediatamente después de preparada, ya que si se deja se producirá la lisis de las bacterias y la liberación del DNA bacteriano, que puede causar

autoaglutinación y dificulta la lectura de la prueba. Se mezcla durante 2 minutos una gota de la suspensión con cada uno de los dos reactivos, que permite la clasificación en serogrupos WI (IA; PorB1a) y WII/III (IB; PorB1b) además de la identificación (fig. 4.8). El reactivo es de color azul para facilitar la lectura de la reacción de aglutinación. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad elevadas, pero es una mezcla de anticuerpos específicos en lugar de un único anticuerpo frente a un antígeno conservado. Los resultados negativos falsos son raros, pero pueden producirse.

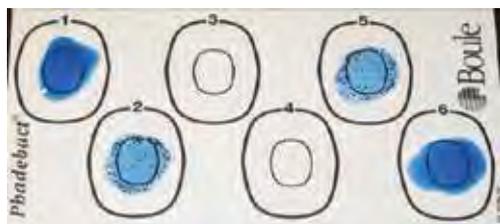


Figura 4.8
Reacción de dos cepas de *N. gonorrhoeae* (A, pocillos 1 y 2 y B, pocillos 5 y 6) con los reactivos de coaglutinación WI (pocillos 1 y 5) y WII/III (pocillos 2 y 6) de Phadebact.

Fuente: Reproducido de Morse SA *et al.*, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4^o ed. Edimburgo, Saunders/Elsevier, 2010.

El reactivo inmunofluorescente de la prueba de confirmación del cultivo de *N. gonorrhoeae* MicroTrak (Trinity Biotech) (17, 19) emplea una mezcla similar de anticuerpos monoclonales contra PorB, pero está unido a fluoresceína. Se prepara un frotis delgado con cuatro o cinco colonias emulsionadas en agua destilada sobre un portaobjetos, se fija y se cubre con el reactivo. Tras incubar a 37 °C en una cámara húmeda, se lava el portaobjetos y se deja secar; posteriormente se examina en busca de diplococos verdes fluorescentes utilizando un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 100X y aceite de inmersión. Esta prueba también era sumamente sensible y específica, y podía usarse directamente en los medios de aislamiento primario, pero lamentablemente ha dejado de comercializarse de manera reciente.

GonoGen II (17, 19) también emplea un panel similar de anticuerpos, pero en esta prueba los anticuerpos monoclonales están adsorbidos sobre partículas coloidales metálicas en suspensión. Cuando el cultivo se emulsiona en el tampón solubilizador, la

membrana exterior de la bacteria se separa, liberando el contenido de complejos PorB a la solución. Estos complejos PorB liberados son entonces captados por el anticuerpo-partículas coloidales metálicas. Se filtra a continuación la mezcla muestra-reactivo a través del dispositivo de matriz especial; los complejos PorB anticuerpo-partículas coloidales metálicas quedan retenidos por la matriz y dan lugar a una punta roja. El anticuerpo-partículas coloidales metálicas que no se han unido a PorB pasarán a través de la matriz y darán un resultado negativo (un anillo entre blanco y rosa pálido).

4.5.6.4 Control de la calidad de las pruebas inmunológicas de identificación

Se debe controlar la calidad de cada nuevo lote de pruebas comercializadas o de reactivos internos utilizando cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* (controles positivos para ambos serogrupos WI (IA, PorB1a; por ejemplo, cepa G de referencia de la OMS, 2008; 16) y WII/III (IB, PorB1b; por ejemplo, cepa K de referencia de la OMS, 2008; 16) así como una cepa de referencia negativa de otra especie estrechamente relacionada, por ejemplo, *N. lactamica* (ATCC 23970). Además, deben incluirse cepas de referencia idénticas cada vez que se realice la técnica.

La confirmación molecular de la identidad puede realizarse con las PAAN descritas en la sección 4.6, aunque es probable que esto se aplique mejor a los laboratorios de referencia.

- El cultivo es sensible y muy específico en circunstancias optimizadas, es relativamente barato y proporciona una bacteria viable para el antibiograma.
- Debido a la gran resistencia desarrollada por los gonococos en todo el mundo, es esencial mantener y, en varios entornos, reforzar la técnica de cultivo para facilitar la vigilancia de la resistencia a los antibióticos.
- Para que el cultivo sea sensible y específico, la toma de muestras, el transporte, la conservación y la técnica de cultivo deben optimizarse y estar sometidos al control de la calidad.

- Las PAAN presentan generalmente la sensibilidad más alta, en especial para las muestras faríngeas y rectales (a pesar de no estar autorizadas), son normalmente muy específicas y se pueden realizar con muestras obtenidas de forma incruenta.
- Las pruebas moleculares toleran mejor las deficiencias en la recogida, transporte y condiciones de conservación de las muestras, y son objetivas.
- La especificidad de varias de las PAAN gonocócicas es insuficiente (véanse las secciones 4.6.2 a 4.6.4), lo que da lugar a valores predictivos positivos bajos en poblaciones en las que la enfermedad no es frecuente; para la confirmación será necesario realizar otras PAAN con otra secuencia diana.
- Si no pueden usarse PAAN autorizadas internacionalmente, es muy recomendable validar la eficacia de la PAAN propuesta en los entornos locales, antes de su uso, y someterla al control de la calidad frente al menos una prueba de amplificación de ácidos nucleicos autorizada internacionalmente.

4.6 Detección molecular

4.6.1 Introducción y pruebas moleculares

La detección molecular de secuencias específicas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) de *N. gonorrhoeae* se realiza casi siempre con estuches comercializados que detectan *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* en el mismo estuche y, con frecuencia, simultáneamente sin que el costo sea mucho mayor o incluso por el mismo precio. Los primeros ensayos moleculares desarrollados fueron las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación (PHSA) como el PACE 2 (Gen-Probe) y la captura de híbridos de segunda generación (CH2) CT/NG (Digene Corporation). Los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación se basan en la unión de sondas de ácidos nucleicos complementarias específicas y posterior amplificación de la señal para detectar la unión. No obstante, las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación son sustancialmente menos sensibles que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos y no deben usarse si existen pruebas de amplificación y son asequibles.

Actualmente, se usan principalmente las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *N. gonorrhoeae*. Estas pruebas gonocócicas detectan una región del DNA o del rRNA específico de *N. gonorrhoeae*, y la región difiere de un estuche a otro (véase el cuadro 4.5). Se amplifica la secuencia diana usando diferentes métodos (cuadro 4.5) que producen múltiples copias que se pueden detectar fácilmente. La información básica relativa a las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación y las diferentes técnicas de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se encuentra en el anexo 3 y el capítulo 5 (*C. trachomatis*). Las PAAN gonocócicas son sumamente sensibles y específicas (pero la especificidad difiere sustancialmente de unas a otras) y pueden usarse con muestras obtenidas de forma incruenta (por ejemplo, orina en hombres e hisopos vaginales en mujeres). Esto facilita que se pueda ver un mayor número de pacientes en un consultorio o centro de atención primaria y también proporciona los requisitos previos para un cribado eficaz. Generalmente, las PAAN pueden realizarse en un día de trabajo, por lo que la obtención de los resultados analíticos es más rápida que con el cultivo (mínimo 2 a 3 días) y a menudo están automatizadas, lo que permite una capacidad analítica más rápida. Con frecuencia se señala que la sensibilidad de las PAAN es mayor que la del cultivo, lo que refleja la mayor tolerancia de las deficiencias en el proceso de recogida, transporte y conservación de las muestras. Entre las desventajas de usar las PAAN en la detección de *N. gonorrhoeae* se encuentran el costo del equipo y los reactivos, la ausencia actual de una PAAN comercializada que esté autorizada para las muestras extragenitales, la imposibilidad de realizar antibiogramas y la insuficiente especificidad de algunos análisis con PAAN (véanse las secciones 4.6.2 a 4.6.4). A pesar de estas desventajas, debe promoverse el uso de las PAAN idóneas además del cultivo (para el antibiograma) incluso en los entornos con recursos limitados. Una forma de facilitar dicho uso es mediante la creación y el apoyo a los laboratorios de referencia regionales que prestan servicios de diagnóstico usando estos métodos. Estos laboratorios de referencia regionales ofrecen muchas ventajas ya que analizan volúmenes más grandes, cumplen rigurosamente las prácticas correctas de laboratorio y disponen de mejores conocimientos técnicos especializados. El recurso a los laboratorios regionales puede reducir los costos al tiempo que se emplean métodos analíticos

Cuadro 4.5: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos autorizadas por la FDA para la detección de *N. gonorrhoeae* (junio del 2012)

Prueba	APTIMA Combo 2 (AC2)	Cobas Amplicor	Cobas 4800	Probetec ET	Probetec GC Qx	CT/NG en tiempo real
Fabricante	Gen-Probe	Roche	Roche	Becton, Dickinson	Becton, Dickinson	Abbott
Diana	16S rRNA	Gen DNA-citosina metiltransferasa	Región 9 de repetición directa (DR9)	PivNg (gen de la proteína homóloga de las invertasas de la pilina)	Pilin (diferente región a la de Probetec ET)	Genes Opa
Tecnología	Amplificación mediada por transcripción (TMA)	Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)	RCP en tiempo real	Amplificación por desplazamiento de la cadena	Amplificación por desplazamiento de la cadena	RCP en tiempo real
Prueba complementaria disponible	Sí (otra región diferente a 16S rRNA)	No	No	No	No	No

de sensibilidad más alta que finalmente conducen a la obtención de resultados en menos tiempo.

Están apareciendo rápidamente nuevas técnicas analíticas de amplificación de ácidos nucleicos que no pueden anticiparse en este documento. Es importante examinar la bibliografía pertinente continuamente en busca de información sobre evaluaciones de calidad de los nuevos ensayos, con el fin de determinar el más apto para cada laboratorio.

4.6.2 Tipos de muestras utilizadas para las PAAN de *N. gonorrhoeae*

Se puede usar toda una gama de diferentes tipos de muestras con las PAAN, desde las tomadas de forma cruenta como las muestras para el Papanicolaou (Pap) en base líquida, los hisopos cervicouterinos y los hisopos uretrales (hombres) hasta las tomadas de forma incruenta como las muestras vaginales con hisopo y las de orina (hombres y mujeres).

No obstante, distintos fabricantes sacan al mercado PAAN que se autorizan para diferentes tipos de muestras, de manera que es esencial comprobar las instrucciones del fabricante o llevar a cabo una validación interna exhaustiva. Hay que señalar que la orina no es la muestra óptima para la detección de *N. gonorrhoeae* en las mujeres debido a su escasa

sensibilidad (22). Es muy importante cumplir las instrucciones del fabricante, en especial en lo que se refiere a las muestras autorizadas; la recogida, el transporte y la conservación de las muestras; así como a la realización de la PAAN.

No hay ninguna PAAN autorizada que pueda realizarse con las muestras extragenitales, rectales y faríngeas, pero hay cada vez más indicios de que las PAAN son más sensibles que el cultivo para estas localizaciones (4–6). Existen datos validados que apoyan su uso, no obstante, se recomienda la confirmación de las pruebas positivas (de cualquiera de estas muestras) con pruebas complementarias (PAAN con otra secuencia diana) para evitar resultados positivos falsos (23, 24). Por otro lado, la opción de usar PAAN para las muestras faríngeas debe hacerse con cautela para evitar aquellas que se sabe de antemano que presentan reacciones cruzadas con las especies de *Neisseria* comensales o con *N. meningitidis*.

4.6.3 Especificidad de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para *N. gonorrhoeae*

Desde siempre, ha habido problemas con la especificidad de la diana elegida, ya que las especies del género *Neisseria* están muy relacionadas

genéticamente y se encuentra un gran número especies comensales de *Neisseria* en la faringe, el recto y, a veces, en el aparato genital inferior. La identificación de una secuencia diana específica de *N. gonorrhoeae* ha sido uno de los principales obstáculos y se ha informado la aparición de reacciones cruzadas con muchas especies de *Neisseria* no gonocócicas al usar algunos estuches, entre otras *N. meningitidis*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. lactamica*, *N. sicca* y *N. subflava* (22–28). La última generación de estuches que está actualmente en el mercado ha mejorado de manera notable en este aspecto, pero sigue siendo un factor de consideración a la hora de seleccionar el estuche apropiado para el tipo de muestra que se va analizar porque no todas las PAAN utilizadas en la detección de gonococia son iguales en esto (26, 28).

4.6.4 Sensibilidad, especificidad y prevalencia: efecto sobre el valor predictivo positivo

Debe tenerse en cuenta la prevalencia de la gonorrea en las poblaciones analizadas, además de la sensibilidad y la especificidad de la PAAN usada, ya que esto afectará el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba y, en consecuencia, el número de positivos falsos obtenidos (véase el cuadro 4.6). Se propone un valor predictivo positivo >90% como mínimo (utilizando una única PAAN o una PAAN de cribado más otra PAAN con una diana diferente) cuando se usen PAAN para detectar *N. gonorrhoeae*.

Debe tenerse en cuenta que, aun cuando la sensibilidad y especificidad de una PAAN esté por encima de 95%, el valor predictivo positivo en una población con prevalencia de 1% y de 5% es para la mayoría de las PAAN aún menor de 90% mientras que, si la prevalencia es de 10%, el valor predictivo positivo de la mayoría (pero no todas) de las PAAN es superior a 90%. Esto es particularmente importante para las PAAN dobles que detectan tanto *N. gonorrhoeae* como *C. trachomatis* porque la prevalencia de estas dos infecciones puede diferir notablemente. En muchos países, la infección por clamidias es mucho más frecuente que la infección por gonococos, y el algoritmo para el análisis de ambas infecciones simultáneamente puede que no necesite una prueba complementaria para la detección de *C. trachomatis*, sin embargo sí habrá que analizar los positivos de gonorrea con una segunda PAAN (otra secuencia diana) para obtener valores predictivos positivos aceptables.

4.6.5 Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos no autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América

Se han descrito PAAN internas que se dirigen, por ejemplo, al gen *cppB*, al DNA-citosina metiltransferasa, a los *opa* y al pseudogén *porA* (24, 29–32) y se usan ampliamente en algunos países. Las que tienen mayor acogida son las que se dirigen al pseudogén *porA* y a los genes *opa* ya sea por separado o en combinación. El pseudogén *porA* no está presente en las especies comensales de *Neisseria* (y el gen *porA* de *N. meningitidis* es suficientemente distinto) y, en consecuencia, esta diana ha resultado ser sumamente específica para *N. gonorrhoeae*. No obstante, varios países han informado recientemente casos de cepas de *N. gonorrhoeae* raras que contienen un *porA* meningocócico en vez de un pseudogén *porA* gonocócico, lo que da lugar a resultados negativos falsos de la PAAN (33–36). Las PAAN que se dirigen al gen *cppB* pueden variar en cuanto a la sensibilidad y la especificidad, ya que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* no tienen este gen y, al contrario, algunas cepas de *N. meningitidis* sí lo tienen y dan reacciones cruzadas. Además, las PAAN que se dirigen al gen DNA-citosina metiltransferasa pueden dar reacciones cruzadas con especies comensales de *Neisseria*. En consecuencia, no se recomiendan las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos dirigidas al gen *cppB* ni al gen DNA-citosina metiltransferasa.

Las PAAN internas pueden requerir más conocimientos técnicos especializados; sin embargo, estas pruebas pueden tener una sensibilidad y especificidad altas y pueden resultar una opción eficaz y menos costosa, en particular para un número reducido de muestras. También se han desarrollado ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa de detección múltiple, por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Trichomonas vaginalis*; sin embargo, estos necesitan evaluaciones más exhaustivas de sus características de desempeño.

En consecuencia, a nivel mundial se utilizan muchas pruebas de amplificación de ácidos nucleicos comercializadas o incluso elaboradas en el propio laboratorio para *N. gonorrhoeae*. En el caso de que se utilicen PAAN no autorizadas por la FDA, deben existir

Cuadro 4.6: Efecto de la prevalencia sobre el valor predictivo positivo en las pruebas sencillas

Pruebas		A	B	C
Sensibilidad		97,8%	96,4%	98,0%
Especificidad		99,2%	97,9%	99,7%
VPP	prevalencia de 10%	93%	84%	97%
	prevalencia de 5%	87%	73%	95%
	prevalencia de 1%	55%	35%	77%

procedimientos normativos internacionales —como los de la Unión Europea— u otros procedimientos normativos nacionales que garanticen la calidad y el desempeño de las PAAN. Se recomienda claramente que solo se usen las PAAN autorizadas a nivel internacional. Si esto no es posible, es fundamental que la PAAN propuesta haya sido estrictamente validada, antes de utilizarla, conforme a los requisitos locales frente al menos una PAAN autorizada internacionalmente y cuando se use posteriormente se añadan los controles positivo, negativo y de inhibición adecuados. Por otra parte, es muy recomendable la participación en un sistema de evaluación externa de la calidad apropiado.

4.6.6 Control de la calidad y garantía de la calidad de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

En cada serie analítica deben incluirse controles internos de la calidad. La evaluación interna de la calidad debe realizarse regularmente volviendo a analizar muestras cuyo resultado original se ha ocultado. El número y frecuencia de estas evaluaciones internas dependerá del número total de pruebas realizadas; por ejemplo 1% a 5% del total analizado cada mes.

La evaluación externa de la calidad puede realizarse usando paneles de muestras de los proveedores adecuados de la evaluación externa de la calidad, como el Servicio Nacional de Evaluación Externa de la Calidad del Reino (NEQAS de Reino Unido; www.ukneqas.org.uk), el Quality Control of Molecular Diagnostics (programa europeo de calidad en diagnóstico molecular) (QCMD; www.qcmd.org) que sirve a muchos países o mediante un intercambio más informal de muestras entre los laboratorios.

4.7 Pruebas diagnósticas en el punto de atención (“pruebas rápidas”)

No existe ninguna prueba para el diagnóstico analítico inmediato (“pruebas rápidas” o pruebas diagnósticas en el punto de atención) de detección de antígenos con características idóneas de desempeño, por ejemplo sensibilidad y especificidad; por consiguiente, no puede recomendarse ninguna para el diagnóstico de la gonorrea sin complicaciones ni para la gonorrea complicada. No obstante, se están poniendo a punto algunas pruebas rápidas nuevas basadas en los últimos adelantos tecnológicos que, con las características idóneas de desempeño, serían muy valiosas para el diagnóstico rápido en el lugar en el que se presta la asistencia sanitaria, ya sea en el consultorio o sobre el terreno. Se podría aceptar una disminución de la sensibilidad a cambio de poder diagnosticar y tratar al paciente mientras está presente, especialmente en poblaciones con recursos limitados y muy vulnerables (37, 38).

Las pruebas diagnósticas en el punto de atención podrían también usarse en dichos entornos para aumentar la especificidad de los algoritmos de manejo sindrómico, lo que reduciría el tratamiento excesivo y detectaría muchas infecciones asintomáticas, especialmente en las mujeres. El examen microscópico de la tinción Gram es un tipo de prueba rápida para el diagnóstico de la gonorrea en hombres; sin embargo, este método carece de la sensibilidad adecuada en la mujer.

- No existe ninguna prueba diagnóstica rápida en el punto de atención con la sensibilidad necesaria; por consiguiente, ninguna puede recomendarse para el diagnóstico de la gonorrea.
- No obstante, se están poniendo a punto algunas pruebas rápidas nuevas basadas en los últimos adelantos tecnológicos, que con las características idóneas de desempeño, serían muy valiosas para el diagnóstico rápido y el tratamiento inmediato del paciente.

4.8 Antibiograma

4.8.1 Introducción

Las cepas de *N. gonorrhoeae* han desarrollado resistencia a todos los antibióticos de primera línea utilizados anteriormente para el tratamiento de la gonorrea, por ejemplo, a las penicilinas, la tetraciclina y las fluoroquinolonas, dejando las cefalosporinas de espectro ampliado (ceftriaxona y cefixima) como los únicos antibióticos recomendados para el tratamiento de infecciones gonocócicas en muchos países (2). Durante el último decenio, la sensibilidad a las cefalosporinas de espectro ampliado también ha disminuido en muchas regiones del mundo y se ha comprobado el fracaso terapéutico con la cefixima en varios países (39–44). Recientemente, se ha comprobado la existencia de las primeras cepas gonocócicas extremadamente farmacorresistentes (2) con resistencia de alto grado incluso a la ceftriaxona (la última opción que quedaba para el tratamiento de elección empírico) (3, 43). Si las cepas resistentes a la ceftriaxona se propagan a nivel mundial, la gonorrea no podrá tratarse con pautas terapéuticas de un único antibiótico en ciertas circunstancias y especialmente en algunos entornos (2). En consecuencia, es crucial vigilar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antibióticos a escala local, regional y mundial. La OMS ha revisado de nuevo y actualizado el Programa de Vigilancia de la Sensibilidad de los Gonococos a los Antimicrobianos (GASP, por sus siglas en inglés). Para más información acerca de la vigilancia de la resistencia esencial a los antibióticos en todo el mundo y el programa mundial GASP de la OMS, véanse las normas de vigilancia de la resistencia gonocócica a los antibióticos de la OMS, apéndice 4. En junio del 2012, la OMS también lanzó el *WHO global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae* [plan de acción mundial de la OMS para controlar la propagación y la repercusión de la resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a los antibióticos] (se puede consultar en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/index.html>).

El método de dilución en agar es el método de referencia recomendado para realizar el antibiograma o determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM; en mg/l o µg/ml) de las cepas gonocócicas frente a los antibióticos. Sin embargo, este método puede ser laborioso y poco adecuado para las

pruebas de sensibilidad ordinarias, especialmente si se analiza un número reducido de cepas. Por consiguiente, se usa con más frecuencia el método normalizado y con garantía de la calidad Etest, estrechamente correlacionado con el método de dilución en agar. La sensibilidad a los antibióticos se puede determinar cualitativamente mediante la prueba de difusión en disco. Se usan también varios métodos de difusión en disco; sin embargo, estos requieren una gran estandarización y un control de la calidad idóneo para lograr un alto nivel de reproducibilidad y una interpretación correcta que refleje adecuadamente los valores de CIM de los diferentes antibióticos. Los métodos de difusión en disco son de bajo costo pero solo se recomienda su uso cuando la determinación de la CIM no pueda realizarse, debido a la escasez de recursos u otras razones. Si se usa un método de difusión en disco, se recomienda que cualquier tipo de resistencia nueva o rara que aparezca sea confirmada por la determinación de la CIM. La producción de β-lactamasa suele determinarse mediante la prueba de la cefalosporina cromogénica, con discos de nitrocefina o solución de nitrocefina.

- Es fundamental vigilar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antibióticos debido a la elevada resistencia de los gonococos a los antibióticos en todo el mundo y al temor de que no pueda tratarse la gonorrea en ciertas circunstancias y, especialmente, en algunos entornos.
- La determinación de la CIM se realiza por el método de dilución en agar o Etest.
- La determinación cualitativa de la sensibilidad a los antibióticos se realiza con el método de difusión en disco.
- Los métodos de difusión en disco exigen estandarización y control de la calidad idóneos y, lo que es más importante, no miden sino solo reflejan la CIM. Únicamente se recurrirá a estos métodos cuando la determinación de la CIM no pueda realizarse debido a, por ejemplo, la escasez de recursos.
- En todo antibiograma es esencial seguir el método propuesto con precisión, que deberá estar adecuadamente estandarizado, validado y sometido a la garantía de la calidad.

Todos los métodos para determinar la sensibilidad a los antibióticos deben realizarse a partir de cultivos puros y frescos (18 a 24 horas) de *N. gonorrhoeae* que han crecido en medios no selectivos. Las cepas aisladas también se habrán sometido a las pruebas necesarias de confirmación de la especie y se habrán subcultivado por lo menos una vez. En el antibiograma, es importante seguir los pasos del método propuesto con toda precisión, incluido la selección y uso del medio de agar, los reactivos (antibiótico en polvo, tiras de Etest, discos y amortiguadores del pH), la siembra, la incubación y la interpretación.

4.8.2 Elección de los antibióticos del antibiograma

La lista de antibióticos que se probarán debe incluir aquellos recomendados a escala regional o nacional y empleados para el tratamiento de las infecciones gonocócicas, así como los recomendados por el programa local de vigilancia de la sensibilidad a los antibióticos. Sin embargo, pueden probarse otros, especialmente en los laboratorios de referencia, como, por ejemplo, los antibióticos recomendados para el tratamiento en otros entornos, los antibióticos que puedan incluirse en tratamientos en el futuro y aquellos que sean útiles para estudios de cohortes o estudios longitudinales locales de *N. gonorrhoeae*.

4.8.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (dilución en agar y Etest)

4.8.3.1 Medio de agar recomendado

El medio recomendado para determinar la CIM de diferentes antibióticos, usando el método de dilución en agar o Etest, para cepas de *N. gonorrhoeae* es una base de agar para gonococos (GC), como Difco GC Medium Base, enriquecida con 1% de suplemento de crecimiento* o 1% IsovitalX-Vitox. Como ejemplo, véase el medio GCVIT descrito en el anexo 4.

* De conformidad con el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por su sigla en inglés; 45): 1,1 g de L-cisteína, 0,03 g de guanina HCl, 3 mg de tiamina HCl, 13 mg ácido p-aminobenzoico (PABA), 0,01 g de vitamina B₁₂, 0,1 g cocarboxilasa, 0,25 g NAD, 1 g adenina, 10 g L-glutamina, 100 g glucosa y 0,02 g nitrato férrico (en 1 litro de agua). En el caso de las pruebas de dilución en agar con carbapenemes y clavulanato se requiere un suplemento de crecimiento sin cisteína.

4.8.3.2 Criterios de interpretación

En el cuadro 4.7 se describen los criterios de interpretación recomendados para la sensibilidad, la sensibilidad moderada (disminuida) y la resistencia cuando se usa la determinación de la CIM. Estos criterios son los del CLSI (45), excepto los recomendados para la azitromicina (el CLSI (45) no ha enunciado ningún criterio) que son los criterios del Comité Europeo de Antibiogramas (EUCAST; www.eucast.org). EUCAST es otra organización que enuncia criterios de interpretación para el antibiograma; en el caso de *N. gonorrhoeae*, en general, sus valores críticos son algo inferiores a los recomendados por el CLSI.

4.8.3.3 Control de la calidad de la determinación de la CIM (dilución en agar y Etest)

Lo ideal es incluir una selección adecuada de las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) con cada lote de antibiograma y siempre que se use un nuevo lote de polvo antibiótico, de medio de agar o de tiras Etest.

La CIM de cada antibiótico y la cepa de referencia deben estar registradas en un gráfico de control de la calidad. Los valores aceptables para la CIM de diferentes antibióticos en el control de la calidad se indican en el cuadro 4.8. Las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) se pueden obtener también de la National Collection of Type Cultures del Reino Unido (NCTC; www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp), denominadas NCTC 13477–13484; y de la Culture Collection University of Gothenburg (Gotemburgo, Suecia) (CCUG; www.ccug.se), denominadas CCUG 57595–57602. Las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) también pueden usarse para el control de la calidad de otras pruebas de laboratorio fenotípicas y genéticas de *N. gonorrhoeae* así como para la evaluación externa de la calidad. En las normas de vigilancia de la resistencia de gonococos a los antimicrobianos de la OMS, apéndice 4, se describe detalladamente las aplicaciones de las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* (16) de la OMS del 2008 y las instrucciones para su uso. Sin embargo, no es necesario usar las ocho cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) para el control de la calidad del antibiograma. Muchos centros utilizan principalmente las cepas G, K, M, O y P de la OMS. El panel de cepas de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008, el panel original (cepas A–E) y otras cepas

Cuadro 4.7: Criterios de interpretación de la CIM para la clasificación de *N. gonorrhoeae* en categorías de sensibilidad según el CLSI, con excepción de azitromicina que se hace según el EUCAST

Antibiótico	MIC (mg/l)		
	Sensible (S)	Respuesta intermedia (I)	Resistente (R)
Ceftriaxona	≤0,25	PDD ^a	PDD ^a
Cefotaxima	≤0,5	PDD ^a	PDD ^a
Cefixima	≤0,25	PDD ^a	PDD ^a
Cefpodoxima	≤0,5	PDD ^a	PDD ^a
Bencilpenicilina	≤0,06	0,12–1	≥2
Ciprofloxacina	≤0,06	0,12–0,5	≥1
Ofloxacina	≤0,25	0,5–1	≥2
Espectinomicina	≤32	64	≥128
Azitromicina ^b	≤0,25	0,5	≥1 ^c

CIM, concentración inhibitoria mínima.

^a PDD, pendiente de determinar. Los valores críticos aún no han podido determinarse debido al número insuficiente de cepas resistentes y a la demostrada falta de correlación entre la CIM de las cepas aisladas y el resultado del tratamiento.

^b CLSI (45) no ha recomendado valores críticos para la azitromicina y, en consecuencia, se dan los valores críticos del Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST; www.eucast.org).

^c En América del Norte y del Sur, se usa con frecuencia un valor crítico de resistencia igual o superior a 2 mg/l, que ha sido recomendado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (ETS/www.cdc.gov/GISP2007/).

de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS que se obtienen también de fuentes de la OMS, como el Centro Colaborador de la OMS para ETS y VIH, Sydney (Australia) y el Centro Colaborador de la OMS para Gonorrea y otras ITS, Örebro (Suecia).

4.8.4 Determinación de la CIM por el método de dilución en agar

4.8.4.1 Introducción

La dilución en agar es el método de referencia recomendado para el antibiograma cuantitativo o determinación de la CIM de las cepas gonocócicas frente a los antibióticos. Los antibióticos se incorporan a una base de agar para GC suplementado con una solución que contiene 1% de factores de crecimiento definidos o 1% de IsovitalX o Vitox (véase la sección 4.8.3.1) en diluciones duplicadas sucesivas.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* que se van a probar se dejan crecer hasta el día siguiente en el medio no selectivo de agar para gonococos y luego se suspenden en caldo de Mueller–Hinton (MH) o solución salina

estéril (o equivalente). A continuación, se inoculan aproximadamente 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) en la superficie de los medios que contienen antibióticos y en dos placas con medio sin antibióticos con un replicador automático de Steer, inoculador de puntas múltiples, o un asa de siembra calibrada. Las placas se incuban luego hasta el día siguiente y posteriormente se examina el crecimiento. La CIM de un antibiótico es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento de una cepa aislada. Una modificación del método de dilución en agar para determinar todas las CIM es la técnica de los puntos de corte por dilución en agar, que es un método similar pero el medio de agar solo contiene una o dos concentraciones de antibiótico, que sirven para clasificar las cepas aisladas como resistentes (usando una placa de agar con una concentración de antibiótico coincidente con el punto de corte que resulta como resistencia) o moderadamente sensibles (usando una placa de agar con una concentración coincidente con el punto de corte que produce sensibilidad intermedia). Esta técnica del punto de corte es útil para el cribado de un gran número de cepas.

Cuadro 4.8: Límites aceptables de la CIM y clasificación según categorías de sensibilidad a los antibióticos (modificación a partir de la referencia 16) y algunas características de tipificación de las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 recomendadas en el control de la calidad. También se indican los límites aceptables de la CIM para *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 recomendada por el CLSI.

Antibiótico (mg/L)	Cepas de referencia de la OMS								ATCC 49226 ^a
	OMS F	OMS G	OMS K	OMS L	OMS M	OMS N	OMS O	OMS P	
Penicilina G	0,016–0,064 (S)	0,25–1,0 (I)	1,0–4,0 (R)	1,0–4,0 (R)	4,0–16,0 (R)	4,0–16,0 (R)	>32 (R)	0,125–0,5 (I)	0,25–1,0
Cefixima	<0,016 (S)	<0,016 (S)	0,25–1,0 (DS) ^b	0,125–0,5 (DS) ^b	<0,016 (S)	<0,016 (S)	<0,016–0,032 (S)	<0,016 (S)	0,004–0,032
Ceftriaxona	<0,002 (S)	0,004–0,016 (S)	0,032–0,125 (DS) ^b	0,064–0,25 (DS) ^b	0,008–0,032 (S)	0,002–0,008 (S)	0,016–0,064 (S)	0,002–0,008 (S)	0,004–0,016
Eritromicina	0,25–1,0 (S)	0,5–2,0 (I)	0,5–2,0 (I)	1,0–4,0 (I)	0,5–2,0 (I)	0,25–1,0 (S)	0,5–2,0 (I)	2,0–8,0 (R)	1,0–2,0 ^c
Azitromicina	0,064–0,25 (S)	0,125–0,5 (S)	0,125–0,5 (S)	0,25–1,0 (I)	0,125–0,5 (S)	0,064–0,25 (S)	0,125–0,5 (S)	1,0–4,0 (R)	0,5–1,0 ^c
Ciprofloxacina	0,002–0,008 (S)	0,064–0,25 (I)	>32 (R)	>32 (R)	1,0–4,0 (R)	2,0–8,0 (R)	0,004–0,016 (S)	0,002–0,008 (S)	0,001–0,008
Espectinomycina	16–64 (S)	8–32 (S)	8–32 (S)	8–32 (S)	8–32 (S)	8–32 (S)	>1024 (R)	8–32 (S)	8,0–32,0
Producción de β-lactamasa	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No
Serotipo	Arst	Arst	Bpyust	Brpyust	Bpyust	Arst	Boys	Bopt	
TSMA-NG ^d	ST3303	ST621	ST1424	ST1422	ST3304	ST556	ST495	ST3305	
Proliliminopeptidasa-negativa ^e	No	Sí	No	No	No	Sí	No	No	

Téngase en cuenta que la exactitud de las CIM indicadas deben utilizarse e interpretarse con precaución porque se han obtenido usando solo un método Etest específico y, en consecuencia, pueden variar al usar otros métodos. Sin embargo, los fenotipos de resistencia identificados (clasificación SIR) deben concordar entre los diferentes métodos.

^a Límites aceptables de las CIM (CLSI; 45).

^b SD, sensibilidad disminuida porque las cepas con estas CIM tienen los determinantes principales de la resistencia a las cefalosporinas de espectro ampliado.

^c Límite establecido por el Laboratorio Nacional de Microbiología de Canadá.

^d Tipificación de las secuencias multiantígeno de *N. gonorrhoeae*.

^e No produce la enzima prolil-iminopeptidasa (PIP), que puede dar lugar a una identificación dudosa o negativa falsa de especies de *N. gonorrhoeae* en caso de usar pruebas bioquímicas u otras basadas en la reacción entre una enzima y un sustrato (17, 20).

4.8.4.2 Preparación de las soluciones antibióticas

Deben obtenerse polvos antibióticos o comprimidos para disolver directamente de las empresas farmacéuticas u otros proveedores homologados. Dado que la mayoría de los antibióticos no tienen una pureza del 100%,

la concentración añadida a las placas de agar debe calcularse teniendo en cuenta la actividad o potencia (principio activo por mg) del antibiótico, según las especificaciones del fabricante. Además, deben seguirse estrictamente las indicaciones relativas a la

disolución del polvo antibiótico, la fecha de caducidad y las instrucciones de conservación. Los antibióticos se deben incorporar al medio de agar en diluciones duplicadas, por ejemplo, utilizando un esquema en el que se agrega 1 parte de disolución antibiótica a 9 partes de agar (véase la sección 4.8.4.3).

Por ejemplo, preparar soluciones madre disolviendo 128 mg o un peso equivalente a 128 mg de principio activo en una cantidad mínima de disolvente (generalmente 5 a 10 ml, seguir al pie de la letra las instrucciones del fabricante) y seguir diluyendo con agua destilada (u otro disolvente recomendado) hasta un volumen exacto de 25 ml. Estas soluciones madre contienen antibiótico en una concentración de 5120 mg/l, que es adecuada para preparar las soluciones de trabajo. Si no hay otra recomendación del fabricante, pueden usarse los disolventes indicados en el cuadro 4.9 para preparar las soluciones madre. A continuación, las soluciones se esterilizan pasándolas a través de una membrana filtrante (filtro de 0,22 µm). Se preparan alícuotas en frascos cerrados herméticamente que se conservan a -20 °C o, de preferencia, a -70 °C durante 6 meses. Una vez descongeladas, las soluciones tienen que usarse de inmediato y no deben congelarse nuevamente para un uso posterior.

El paso siguiente consiste en preparar una serie de diluciones de trabajo duplicadas de cada antibiótico que contengan concentraciones 10 veces superiores a las concentraciones finales de antibiótico que deben obtenerse en el agar. Un ejemplo de protocolo estandarizado para preparar estas diluciones de trabajo se muestra en el cuadro 4.10.

El intervalo de concentraciones usadas en el antibiograma debe adaptarse a cada antibiótico y a los niveles de resistencia del país o la región. Muchos antibióticos presentan grandes diferencias en los patrones de sensibilidad de las cepas gonocócicas de diferentes países. Con objeto de disminuir el número de concentraciones que tienen que probarse, debe tenerse una aproximación de la variación de la sensibilidad a los antibióticos examinados en esa zona. Si se desconoce, puede obtenerse determinando los límites inferior y superior del intervalo de sensibilidad de cada uno de los antibióticos con un número reducido de cepas. En general, es más pertinente e importante conocer el valor del límite superior que el del límite inferior de la CIM.

4.8.4.3 Preparación de las placas para el método de dilución en agar

Para cada antibiótico y concentración antibiótica que se quiera probar, se prepara un volumen de, por ejemplo, 89 ml de una base de agar para GC adecuada, como Difco GC Medium Base (3,6 g de base de agar para GC y 89 ml de agua destilada) en un frasco de vidrio, que será suficiente para la preparación de cuatro placas. Agar plates without antimicrobials incorporated to be used as negative control should also be prepared.

Cuadro 4.9: Disolventes utilizados en la preparación de las soluciones antibióticas para la determinación de la CIM por el método de dilución en agar^a

Antibiótico	Disolvente
Ceftriaxona	Agua destilada
Cefixima	Tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 7,0
Bencilpenicilina	Agua destilada
Ciprofloxacina	Agua o HCl 0,1 mol/l
Azitromicina	Etanol al 95% o ácido acético glacial ^b
Eritromicina	Etanol al 95% o ácido acético glacial ^b
Espectinomicina	Agua destilada
Gentamicina	Agua destilada
Kanamicina	Agua destilada
Tetraciclina	Agua destilada
Cloranfenicol	Etanol al 95%

^a Si el fabricante indica el disolvente y el procedimiento para la disolución del polvo antibiótico, se deben seguir sus instrucciones al pie de la letra.

^b En caso de utilizar ácido acético glacial, usar la mitad del volumen de agua destilada, a continuación agregar ácido acético glacial gota a gota hasta la disolución total, sin exceder 2,5 µl/ml.

Esterilizar en autoclave el medio de agar que está en el frasco, luego dejar que se enfríe en un baño de agua a 50 °C antes de agregar asépticamente los suplementos estériles (1 ml de enriquecimiento, IsoVitalax o Vitox) y 10 ml de solución de trabajo antibiótica, es decir, la concentración a probar (véase el cuadro 4.10). Mezclar de inmediato suavemente invirtiendo el frasco 3 veces, retirar la tapa del frasco, flamear la boca del frasco y verter aproximadamente 20 a 25 ml de medio en las placas (diámetro 90 mm), se formará una capa

de aproximadamente 3,5 a 4,5 mm. Asegurarse de que se eliminan las burbujas agitando suavemente las placas o flameando rápidamente la superficie del agar, por ejemplo, con un mechero de Bunsen. Una vez que el agar se ha solidificado a la temperatura ambiente, conservar a 4 °C las placas invertidas dentro de bolsas de plástico cerradas hasta su uso. En estas condiciones, la actividad antibiótica se mantiene prácticamente sin pérdidas hasta 2 semanas. Sin embargo, se recomienda que las placas que contienen penicilina, por ser menos estable, se usen en el plazo de una semana. También deben prepararse las placas de agar sin antibiótico que se usarán como control negativo.

4.8.4.4 Procedimiento para la determinación de la CIM por dilución en agar

Preparación del inóculo bacteriano: Usar un asa de siembra estéril o un hisopo para recoger las colonias de *N. gonorrhoeae* de un cultivo puro de 18 a 24 horas en medio de agar para gonococos no selectivo y preparar una suspensión bacteriana homogénea (turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10⁸ UFC por ml) en 1 ml de caldo de Mueller–Hinton o solución salina estéril (la suspensión debe usarse antes de transcurridos 15 minutos).

Preparar una dilución 1:10 de la suspensión con el caldo de Mueller–Hinton o con la solución salina estéril de forma que se obtenga una concentración de 10⁷ UFC/ml.

Cuadro 4.10: Preparación de las diluciones de los antibióticos para la determinación de la CIM por el método de dilución en agar

Etapa	Solución antibiótica				Volumen (ml) agua destilada	=	Concentración (mg/l) de la dilución de trabajo	Concentración final (mg/l) a la dilución 1:10 en agar
	Concentración (mg/l)	Fuente	Volumen (ml)	+				
1	5120	Madre	1					
2	5120	Madre	1		1		2560	256
3	5120	Madre	1		3		1280	128
4	5120	Madre	1		7		640	64
5	640	Etapa 4	1		1		320	32
6	640	Etapa 4	1		3		160	16
7	640	Etapa 4	1		7		80	8
8	80	Etapa 7	1		1		40	4
9	80	Etapa 7	1		3		20	2
10	80	Etapa 7	1		7		10	1
11	10	Etapa 10	1		1		5	0,5
12	10	Etapa 10	1		3		2,5	0,25
13	10	Etapa 10	1		7		1,25	0,125
14	1.25	Etapa 13	1		1		0,625	0,06
15	1.25	Etapa 13	1		3		0,3125	0,03
16	1.25	Etapa 13	1		7		0,156	0,016
17	0.156	Etapa 16	1		1		0,08	0,008
18	0.156	Etapa 16	1		3		0,04	0,004
19	0.156	Etapa 16	1		7		0,02	0,002

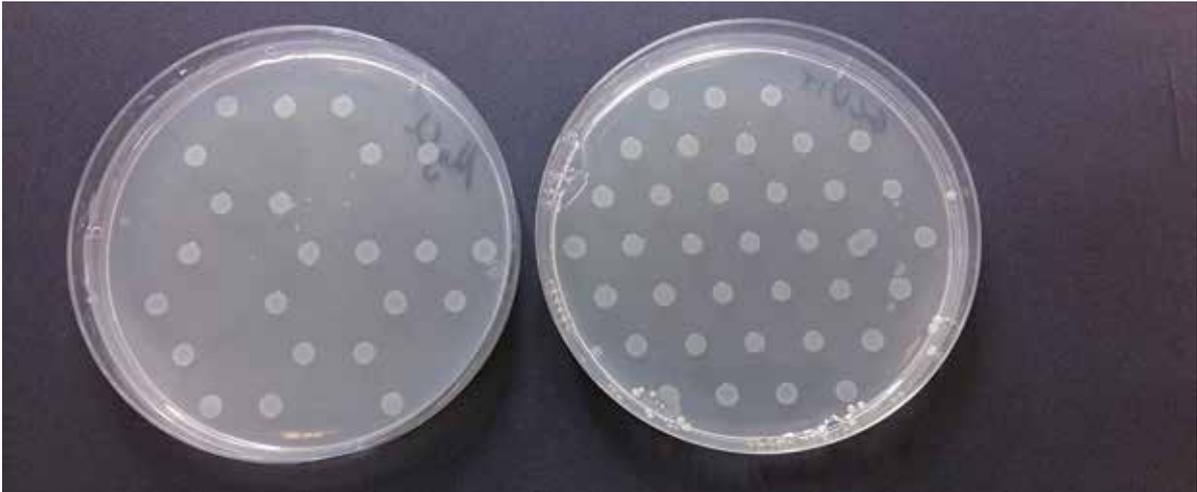


Figura 4.9

Resultados de la determinación de la CIM para *N. gonorrhoeae* usando el método de dilución en agar. El medio que contenía 0,5 mg/l de penicilina (placa izquierda) presenta inhibición de varias cepas gonocócicas, mientras que todas las cepas crecen bien en el medio de control (placa derecha).

Transferir cuidadosamente 0,5 ml de cada suspensión al pocillo correspondiente de un replicador o inoculador de puntas múltiples.

Inoculación de las placas: Las placas de agar deben secarse antes de la inoculación, es decir, colocarse en una incubadora en posición invertida con la tapa entreabierta. Con el replicador o inoculador de puntas múltiples se transferirá aproximadamente de 1 a 2 μL de cada suspensión a la superficie del agar en áreas circulares de 5 a 7 mm de diámetro, de forma que se obtenga un inóculo bacteriano final de aproximadamente 10^4 UFC por punto de aplicación. Si el replicador o el inoculador de puntas múltiples transfiere un volumen más pequeño o más grande de suspensión, la dilución del inóculo tiene que ajustarse, es decir, conseguir que el inóculo final sea de aproximadamente 10^4 UFC por punto de aplicación. Cuando se pruebe un número reducido de cepas, puede usarse un asa de siembra de plástico estéril de 1 μL . Sembrar primero una placa con el control negativo (que no contenga ningún antibiótico), y a continuación la serie de placas que contienen las diferentes concentraciones del antibiótico, comenzando con la concentración más baja de cada antibiótico.

Por último, sembrar una segunda placa con el control negativo para asegurarse de que no ha habido contaminación durante la siembra. Para el control de la calidad se recomienda sembrar las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008 (16) (véase el cuadro 4.8). Dejar que los inóculos se sequen e incubar

las placas invertidas durante 20 a 24 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con $5 \pm 1\%$ de CO_2 y una humedad alta (70% a 80%). Esterilizar las puntas de las pipetas y los pocillos envueltos en papel de aluminio en el autoclave, en una estufa caliente a 160 °C durante 2 horas o sumergiéndolos en etanol al 70% y posterior flameado.

Lectura de los resultados: Los resultados de las cepas de referencia de la OMS de 2008 (véase el cuadro 4.8 sobre las CIM aceptables de diferentes antibióticos) y las placas de control negativo (debe haber crecimiento puro confluyente de gonococos en ambas placas) deben examinarse y aprobarse antes de leer los otros resultados. Si no se aprueban, localizar el problema y repetir la prueba. En el caso de las cepas probadas, se anota la CIM como la mínima concentración de antibiótico que inhibe completamente el crecimiento (fig. 4.9).

Interpretación de los resultados: Interpretar los resultados de las cepas probadas de acuerdo con la categoría de sensibilidad (cuadro 4.7).

4.8.5 Determinación de la CIM por el método Etest

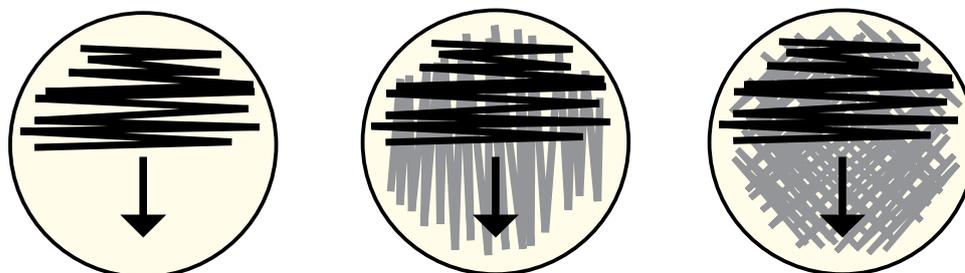
4.8.5.1 Introducción

Etest es una técnica cuantitativa para determinar la CIM de los antibióticos frente a los microorganismos. Etest utiliza tiras plásticas calibradas con una escala de CIM en $\mu\text{g/ml}$ (mg/l) y un código para identificar el antibiótico. La otra cara de la tira está impregnada

de un gradiente de concentraciones de antibiótico predefinido. Una vez aplicada la tira a la superficie de una placa de agar, el antibiótico se difunde en el medio. Se producirá una zona elíptica de inhibición del crecimiento de *N. gonorrhoeae* sembrada en el medio (antes de aplicar la tira) e incubada hasta el día siguiente si es sensible al antibiótico que se prueba. La CIM debe leerse en la intersección de la elipse y la escala de gradiente marcada en la tira. En lo que se refiere a la conservación de las tiras, el desempeño y la lectura de los resultados de Etest, se deben seguir al pie de la letra las instrucciones del fabricante.

4.8.5.2 Protocolo para la determinación de la CIM por Etest

1. Secar (deben estar sin humedad visible, pero no se deben secar en exceso) el número de placas de agar de GCVIT (véase el anexo 4) necesarias. Dejar que las tiras de Etest se atemperen durante aproximadamente 30 minutos. Una vez abierto un empaque de Etest, se conservará en un recipiente hermético con un secante.
2. Dejar que las tiras de Etest se atemperen durante aproximadamente 30 minutos. Una vez abierto un empaque de Etest, se conservará en un recipiente hermético con un secante.
3. Recoger con un asa de siembra o un hisopo estériles colonias de *N. gonorrhoeae* de un cultivo puro tras incubación de 18 a 24 horas en un medio de agar para gonococos no selectivo y preparar una suspensión bacteriana homogénea (con una turbidez de 0,5 en la escala nefelométrica de McFarland, aproximadamente 108 UFC por ml) en 1 ml de solución salina estéril o PBS (la suspensión debe usarse en un plazo de 15 minutos). No emplear nunca un caldo nutritivo para preparar la suspensión.
4. Sumergir un hisopo estéril nuevo en la suspensión y eliminar el líquido excesivo apretando y rotando el hisopo contra la pared del tubo.
5. Sembrar toda la superficie de agar de la placa de GCVIT por igual en tres direcciones (fig. 4.10) de forma que se obtenga un crecimiento confluyente.
6. Volver a colocar la tapa de la placa y dejar que la superficie del agar se seque durante aproximadamente 10 minutos.
7. Presionar el aplicador Etest sobre una tira Etest para sacarla (o usar unas pinzas estériles), colocar la tira sobre la superficie de agar y empujar el émbolo hacia abajo para liberar la tira.
8. Comprobar que la tira está totalmente en contacto con el agar y eliminar las posibles burbujas de aire con cuidado pasando rápidamente un asa de siembra desde la parte de menor a mayor concentración de antibiótico.
9. Colocar cuatro tiras de Etest como máximo por placa de 140 a 150 mm de diámetro y una tira por placa de 90 mm.
10. Una vez colocada la tira Etest en el agar, no debe moverse ya que el antibiótico se libera rápidamente.
11. Incubar inmediatamente las placas invertidas durante 20 a 24 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con $5 \pm 1\%$ de CO₂ y una humedad elevada (70% a 80%) (en incubadora de CO₂ o si no está al alcance, en una jarra de anaerobiosis con vela y algo más de humedad).



1. Sembrar en una dirección hacia abajo toda la superficie de agar.

2. Girar la placa 90° y sembrar en una dirección hacia abajo toda la superficie de agar.

3. Girar la placa 45° y nuevamente sembrar en una dirección hacia abajo toda la superficie de agar.

Figura 4.10
Siembra con hisopo de las placas de cultivo para Etest

4.8.5.3 Lectura e interpretación de los resultados del Etest después de la incubación

1. Los resultados de las cepas de referencia de la OMS del 2008 (véase el cuadro 4.8 sobre las CIM aceptables de diferentes antibióticos), cuando estén incluidas como control de la calidad, deben examinarse y aprobarse antes de leer los otros resultados. Si no se aprueban, localizar el problema y repetir la prueba. En el caso de las cepas probadas, leer las placas solo cuando se vea crecimiento suficiente y la elipse de inhibición esté claramente visible. De lo contrario, la prueba tendrá que repetirse con más crecimiento.
2. Leer la CIM exacta en la zona de intersección de la elipse y la escala de CIM de la tira Etest (fig. 4.11). Si la intersección de la elipse de inhibición con la tira Etest está entre dos valores de CIM, leer siempre el valor más alto. Se debe leer el punto extremo de completa inhibición de todo crecimiento, incluidos los velos de crecimiento, la microcolonias y las macrocolonias aisladas.
3. El crecimiento a lo largo de toda la tira implica que no hay inhibición, es decir, la CIM es mayor que (" $>$ ") la concentración más alta de la tira. Si la elipse de inhibición está por debajo de la tira y no se cruza con la misma significa que la CIM es inferior (" $<$ ") a la concentración más baja de la tira.
4. Interpretar los resultados de las cepas probadas atendiendo a la categoría de sensibilidad (véase el cuadro 4.7).



Figura 4.11
Resultados de la determinación de la CIM para *N. gonorrhoeae* usando Etest. La CIM de penicilina G (PG) se determina en el punto de intersección de la elipse con la tira (0,094 mg/l).

4.8.6 Método de difusión en disco

4.8.6.1 Introducción

Las pruebas de difusión en disco son técnicas cualitativas para clasificar las cepas aisladas en sensibles, moderadamente sensibles (o sensibilidad disminuida) o resistentes a diferentes antibióticos. En consecuencia, estos métodos no determinan la CIM exacta del antibiótico frente a los microorganismos; sin embargo, deben reflejar las CIM. En el método de difusión en disco se emplean discos comercializados que están impregnados con una concentración conocida de antibiótico. Este se difunde en la superficie de agar sembrada con la cepa bacteriana y produce un gradiente de concentración que es más alto cerca del disco y disminuye proporcionalmente al alejarse. Tras la incubación, se observa una zona de inhibición que se mide y posteriormente se interpreta atendiendo a la categoría de sensibilidad. Hay varios métodos de difusión en disco usados internacionalmente; sin embargo, todos requieren una buena estandarización y un control de la calidad adecuado para lograr un alto nivel de reproducibilidad y que reflejen bien la CIM de los antibióticos probados. Las diferencias principales entre estos métodos residen en la diferente potencia de los discos (contenido de antibiótico) y en el agar empleado, que da lugar a distintos valores críticos de la clasificación en categorías de sensibilidad. El método de difusión en disco del CLSI (45) y de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy [sociedad británica de quimioterapia antimicrobiana] (BSAC; www.bsac.org.uk) son métodos que se han usado y recomendado en varias regiones (46). En el presente manual de la OMS se describe la prueba de difusión en disco por el método calibrado para el análisis dicotómico de la sensibilidad (antibiograma dicotómico calibrado) (47, 48). Este método se usa para el antibiograma y la vigilancia gonocócica en, por ejemplo, la Región del Pacífico Occidental y la Región de Asia Sudoriental de la OMS. NOTA: El medio de agar, el protocolo y los criterios de interpretación del método de antibiograma dicotómico calibrado difieren de los utilizados en los otros métodos de difusión en disco. Si se utilizan estos métodos, deben seguirse estrictamente las instrucciones que correspondan.

Cuadro 4.11: Criterios de interpretación para la clasificación de *N. gonorrhoeae* en la categoría de sensibilidad correspondiente usando el método de antibiograma dicotómico calibrado; debe medirse el radio anular en mm y no el diámetro del halo.

Categoría de sensibilidad				
Antibiótico	Contenido del disco	Resistencia	Sensibilidad reducida	Sensibilidad
Bencilpenicilina	0.5 IU	<3 mm	3–9 mm	>9 mm
Azitromicina	15 µg	<8 mm	—	≥8 mm
Ciprofloxacina probado ^a				
– Ácido nalidíxico	30 µg	0 mm	0 mm	>6 mm
– Ciprofloxacina	1 µg	≤6 mm	>6 mm	>6 mm
Ceftriaxone testing ^b				
– Ceftriaxona	0.5 µg	TBD ^c	5–9 mm	>9 mm
– Cefpodoxima	10 µg	TBD ^c	≤12 mm	>12 mm
Espectinomicina	100 µg	<6 mm	—	≥6 mm

^a Para probar la sensibilidad a la fluoroquinolona (ciprofloxacino), deben usarse discos de ácido nalidíxico y de ciprofloxacino, y leerse simultáneamente.

^b Para probar la sensibilidad a la ceftriaxona, deben usarse discos de ceftriaxona y de cefpodoxima, y leerse simultáneamente.

^c PDD, pendiente de determinar. Debido a un número insuficiente de cepas resistentes y a la falta de correlación demostrada entre la CIM de las cepas aisladas y el resultado del tratamiento, los valores críticos no pueden determinarse todavía. Las cepas con una sensibilidad/resistencia reducida a la ceftriaxona deben confirmarse con la prueba de la CIM (dilución en agar o Etest) en un laboratorio local o idealmente en un laboratorio de referencia de la OMS.

4.8.6.2 Medio de agar recomendado en el método de antibiograma dicotómico calibrado

El medio utilizado con este método para las cepas de *N. gonorrhoeae* es agar chocolate que incluye una base de agar Columbia (Oxoid, es adecuado; si se usan otras marcas comerciales, se evaluará la calidad) con 8% de sangre “chocolatada” de caballo a 70 °C durante 30 minutos (véase el anexo 4).

Los otros medios no se han validado y no deben usarse sin que se lleve a cabo una evaluación estricta y probablemente un ajuste de los criterios de interpretación.

4.8.6.3 Criterios de interpretación del método de antibiograma dicotómico calibrado

En el cuadro 4.11 se indican los criterios de interpretación de la sensibilidad, sensibilidad disminuida y resistencia que se recomiendan con el método de antibiograma dicotómico calibrado (48).

4.8.6.4 Control de la calidad del método de antibiograma dicotómico calibrado

Se deben incluir las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* OMS C, OMS K y OMS P (si se prueba la azitromicina) con cada lote de antibiograma y siempre que se utilice un nuevo lote de medio de agar o de discos. El radio anular de cada antibiótico y la cepa de referencia deben registrarse en un gráfico de control de la calidad. Los radios anulares aceptados en el control de la calidad se indican en el cuadro 4.12.

4.8.6.5 Protocolo del método de antibiograma dicotómico calibrado

1. Secar (placas sin humedad visible, pero no secar en exceso) el número necesario de placas de agar chocolate (véase el anexo 4). Secar las placas invertidas, con la tapa quitada, a 36 ± 1 °C durante 1 hora.
2. Tomar un muestra de la mayor parte de las colonias de *N. gonorrhoeae* (incubadas desde el día anterior, de al menos 1 a 2 mm de diámetro) en medio de

Cuadro 4.12: Antibióticos, potencia de los discos y radios anulares de inhibición aceptables para las cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS recomendadas para el control de la calidad

Cepa/antibiótico	Potencia del disco	Radios anulares (mm)
<i>N. gonorrhoeae</i> ACM 5239 (OMS C)		
Azitromicina	15 µg	8,9–12,5
Bencilpenicilina	0,5 IU	2,1–4,1
Cefpodoxima	10 µg	10,9–14,5
Ceftriaxona	0,5 µg	8,2–11,0
Ciprofloxacina	1 µg	12,7–16,3
Ácido nalidíxico	30 µg	11,3–14,5
Espectinomicina	100 µg	6,9–8,9
<i>N. gonorrhoeae</i> OMS K		
Cefpodoxima	10 µg	7,6–11,1
Ceftriaxona	0,5 µg	7,3–9,3
<i>N. gonorrhoeae</i> OMS P		
Azitromicina	15 µg	3,8–7,4

- agar para gonococos no selectivo con un asa de siembra de plástico (1 µ) o con un alambre de cromoníquel recto (después de flamear y dejar que se enfríe). Si solo hay colonias pequeñas (<1 mm), puede ser necesario recoger de 3 a 5 colonias para que se vean en la punta del alambre recto.
- Preparar una suspensión en 2,5 ml de solución salina estéril (aproximadamente 107 UFC por ml) rotando el alambre recto al menos 10 veces y tocando con la punta el fondo del tubo de ensayo. Asegurarse de que el material se ha desprendido de la punta, mezclar el inóculo al menos 10 veces usando una pipeta de Pasteur estéril y comprobar que la solución es homogénea. Un inóculo demasiado denso causará una ligera disminución del tamaño de los halos. Un inóculo liviano causará un aumento marcado del tamaño de los halos.
 - Usar la misma pipeta para transferir toda la suspensión a la superficie de la placa de agar chocolate que se ha secado antes.
 - Distribuir el inóculo meciendo la placa y comprobar que la suspensión cubre toda la superficie de agar.
 - Eliminar el exceso de inóculo con una pipeta de Pasteur estéril.
 - Dejar que se seque la placa durante aproximadamente 10 a 15 minutos a temperatura ambiente (las placas no deben dejarse más de 15 minutos después de que el inóculo se haya secado).
 - Poner los discos de antibiótico (atemperados con el ambiente) en la placa inoculada usando pinzas estériles o un dispensador de discos. En una placa de 90 mm pueden ponerse hasta seis discos. Los discos se colocarán bien nivelados y no deben retirarse una vez que han tocado el agar.
 - Incubar las placas durante 18 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con un $5 \pm 1\%$ de CO₂ (70% - 80% de humedad). Puede usarse una incubadora de CO₂ o una jarra de anaerobiosis con vela y algo más de humedad.
 - Medir los radios anulares con una regla de plástico graduada en mm o un compás nonio (fig. 4.12). Los resultados de las cepas de referencia de la OMS, usadas como control de la calidad, deben leerse y aprobarse antes de seguir leyendo los otros resultados (véase el cuadro 4.12). Si no se

aprueban, buscar el problema y solucionarlo antes de repetir el antibiograma.

11. Interpretar el tamaño de los halos de acuerdo con la categoría de sensibilidad (véase el cuadro 4.11).

4.8.7 Detección de la resistencia conferida por plásmidos a la penicilina

N. gonorrhoeae puede tener plásmidos productores de una enzima (β -lactamasa [penicilinasas]) que inactiva algunos compuestos penicilínicos como la bencilpenicilina, penicilina genérica, ampicilina y amoxicilina. Se han empleado varios métodos cualitativos para detectar la producción de β -lactamasa por los microorganismos.

El método de la cefalosporina cromogénica es sencillo, sensible, específico y muy usado para detectar la producción de β -lactamasa por los gonococos. Cuando el anillo β -lactámico de la cefalosporina cromogénica, nitrocefina, es hidrolizado por la β -lactamasa, se produce un cambio de color de amarillo a rojo. Esta prueba está comercializada en diferentes formatos, y también puede adquirirse la nitrocefina liofilizada para realizar la prueba en el propio laboratorio (49). Hay también otros métodos menos estandarizados y que no han sido sometidos al control de la calidad para la detección de β -lactamasa, como el método acidométrico y la prueba yodométrica.

4.8.7.1 Método del disco de nitrocefina

1. Hidratar con agua destilada estéril un disco de nitrocefina sobre un portaobjetos de vidrio o en una placa vacía y limpia.

2. Recoger con un asa estéril varias colonias del cultivo gonocócico puro sembrado el día anterior y estriarlas sobre la superficie del disco.
3. Si la reacción es positiva se produce un color rojo en el plazo de 1 minuto, generalmente. Sin embargo, las reacciones positivas débiles pueden tardar más tiempo, pero esto es muy raro. Un resultado negativo se ve cuando no hay cambio de color (permanece amarillo).

4.8.7.2 Método de la solución de nitrocefina

El método de la solución de nitrocefina se realiza ya sea dejando gotear el reactivo directamente sobre las colonias crecidas en medios selectivos o no selectivos o inoculando la solución en un portaobjetos de vidrio o un papel de filtro con colonias.

Se puede usar una solución comercializada de nitrocefina o una preparada en el propio laboratorio con nitrocefina en polvo.

Prueba directa en placa:

1. Agregar una gota de solución de nitrocefina directamente sobre las colonias gonocócicas aisladas en agar. Se pueden usar las mismas placas de agar del método de dilución en agar o Etest después de leer las CIM de los antibióticos probados.
2. Un cambio de color de la solución de nitrocefina de amarillo a rojo en 1 minuto indica un resultado positivo. Sin embargo, aunque es raro, a veces se producen reacciones positivas débiles que tardan

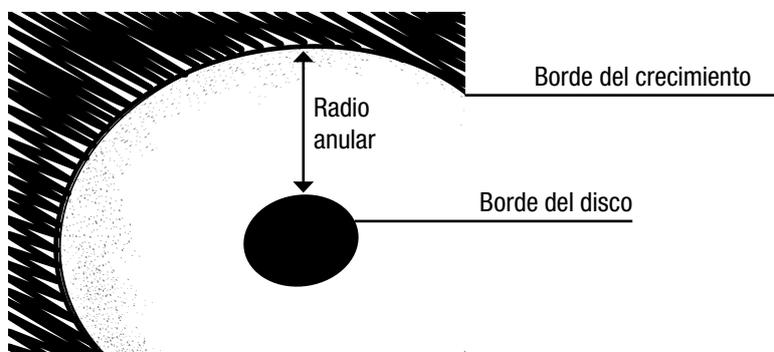


Figura 4.12

El radio anular (mm) es la distancia más corta medida desde borde del disco al borde del crecimiento confluyente. El borde del crecimiento confluyente corresponde generalmente al borde más nítido del halo de inhibición.

Fuente: Reproducido a partir de CDS Antibiotic Susceptibility Test (<http://web.med.unsw.edu.au/cdstest/>).

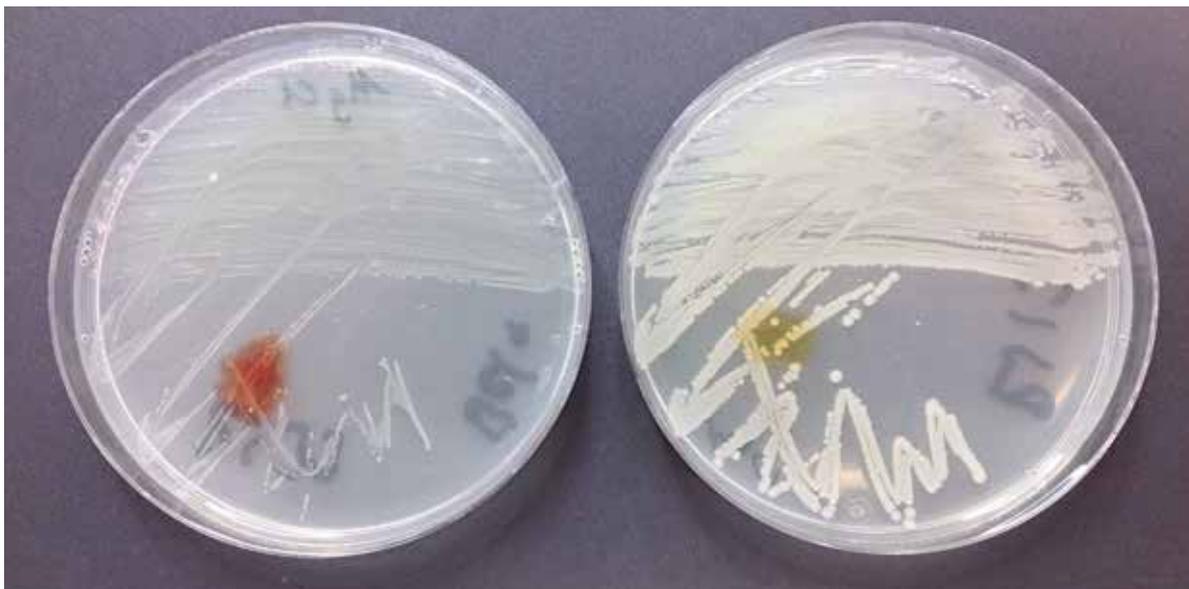


Figura 4.13

Actividad de la β -lactamasa de *N. gonorrhoeae* determinada en una placa de cultivo por el método de la cefalosporina cromogénica, nitrocefina. El medio de la izquierda presenta una reacción positiva (rojo) y el de la derecha presenta una reacción negativa (permanece amarillo).

algo más de tiempo en desarrollarse. El resultado negativo se observa cuando no se produce cambio de color (permanece amarillo) (fig. 4.13).

Prueba en portaobjetos o en papel de filtro:

1. Agregar una gota de solución de nitrocefina sobre un portaobjetos de vidrio limpio o un papel de filtro.
2. Recoger con un asa de siembra estéril varias colonias del cultivo gonocócico puro sembrado el día anterior y emulsionar en la gota de nitrocefina.
3. Un cambio de color de amarillo a rojo en el plazo de 1 minuto indica un resultado positivo. Raramente se producen reacciones positivas débiles que tardan algo más de tiempo en desarrollarse. El resultado negativo se observa cuando no se produce cambio de color (permanece amarillo).

4.8.7.3 Método acidométrico

Colocar una tira del papel de filtro en una placa de Petri vacía y limpia. Impregnar el papel con solución de penicilina (tampón fosfato 0,05 mol/l, pH 8,0; 0,2 g/l de púrpura de bromocresol y 50 g/l bencilpenicilina sin amortiguador de pH [conservar congelada]). Con un asa de siembra bacteriológica, extender de 10 a 20 colonias en un área de aproximadamente 5 mm del

papel de filtro. Incubar el papel de filtro inoculado a temperatura ambiente durante 30 minutos en la placa de Petri tapada. La actividad de la β -lactamasa dará lugar a un cambio de color de azul a amarillo, generalmente visible en menos de 10 minutos.

4.8.7.4 Prueba yodométrica

Preparar en el momento una mezcla de penicilina y yodo agregando 1,1 ml de una solución de yodo (1,5 mg de yoduro de potasio y 0,3 g de yodo en 100 ml de tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 6,4 y conservada en un frasco ámbar a 4 °C) a un vial que contiene 0,15 ml de solución de bencilpenicilina (1 millón de unidades internacionales por ml, conservada a -20 °C).

La mezcla de los reactivos debe usarse antes de que transcurra 1 hora. Tomar con un asa las colonias a examinar de un cultivo en una placa de agar y emulsionar con 1 gota de la mezcla de penicilina y yodo en una placa de vidrio. La adición de una gota de una solución de almidón (4 g/l en agua destilada, esterilizada en autoclave y conservada a 4 °C) dará un color violeta oscuro o morado a la mezcla. Un resultado negativo se constata cuando este color se mantiene durante 5 minutos. Un cambio de color a incoloro antes de 5 minutos (normalmente en 1 minuto) indica una prueba positiva.

4.9 Conservación de las cepas de *N. gonorrhoeae*

Para mantener la viabilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae* en el medio de agar para gonococos, es necesario subcultivar al menos cada 48 horas. En consecuencia, es fundamental disponer de métodos eficaces para la conservación a largo plazo de las cepas gonocócicas.

4.9.1 Conservación en agar chocolate inclinado (50, 51)

Conservación hasta 9 meses (las cepas se mantienen viables durante el transporte hasta 5 días):

- A partir de un cultivo puro sembrado el día anterior en un medio de agar para gonococos hacer un inóculo denso en un volumen de 3 ml de agar chocolate inclinado en un frasco Bijou de policarbonato con tapa de rosca (debe ser un frasco de plástico de 5 ml de volumen) e incubar con la tapa de rosca aflojada durante un mínimo de 24 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con $5 \pm 1\%$ de CO₂ o hasta que se observe crecimiento en la superficie del agar. A continuación, añadir parafina líquida estéril hasta llenar completamente la pendiente de agar, enroscar la tapa bien apretada y conservar el frasco Bijou de agar inclinado a 37 °C. Cuando se necesite hacer una prueba con los gonococos, se introduce un asa de siembra bacteriológica estéril a través de la cubierta de parafina para sacar algunas colonias de *N. gonorrhoeae* que se inoculan en un medio de cultivo selectivo para gonococos. Después de incubar 48 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con $5 \pm 1\%$ de CO₂, las colonias gonocócicas son fácilmente discernibles y puede subcultivarse para realizar las pruebas correspondientes (también habrá burbujas de parafina que se distinguen fácilmente de las colonias gonocócicas). La parafina original que cubre la pendiente puede volver a almacenarse para otro uso.

4.9.2 Conservación por congelación o liofilización

Conservación de 1 a 3 meses:

- Todo el crecimiento de una placa de un cultivo puro que se había sembrado el día anterior en medio de agar para gonococos se inocula en un vial pequeño que contiene 0,5 ml de un caldo nutritivo estéril (por ejemplo, caldo nutritivo, caldo de tripticasa de soja, caldo de infusión de cerebro-corazón) con

15% a 20% de glicerol, se suspende con una pipeta estéril y se congela de inmediato a -20 °C o -25 °C.

- No es aconsejable la conservación prolongada a esta temperatura ya que los gonococos perderán su viabilidad.

Conservación a largo plazo:

- Todo el crecimiento de una placa de cultivo puro que se había sembrado el día anterior en medio de agar para gonococos se inocula en un vial pequeño que contiene aproximadamente de 0,5 ml a 1,0 ml de un caldo nutritivo crioprotector estéril con 15% a 20% de glicerol, se suspende con una pipeta estéril y se congela de inmediato a -70 °C.
- Todo el crecimiento de una placa de cultivo puro que se había sembrado el día anterior en medio de agar para gonococos se inocula en un criovial pequeño que contiene medio crioprotector estéril (por ejemplo, caldo nutritivo con 15% a 20% de glicerol), se suspende con una pipeta estéril y se congela de inmediato en nitrógeno líquido.
- Todo el crecimiento de una placa de cultivo puro que se había sembrado el día anterior en medio de agar para gonococos se inocula en un vial pequeño que contiene aproximadamente de 0,5 a 1,0 ml de un líquido criogénico estéril con perlas congeladas (comercializado), se suspende invirtiéndolo cinco veces y, posteriormente, se elimina tanto líquido como sea posible y se congela el vial de inmediato a -70 °C.
- Todo el crecimiento de una placa de cultivo puro que se había sembrado el día anterior en medio de agar para gonococos se inocula en un caldo nutritivo estéril (por ejemplo, caldo nutritivo, caldo de tripticasa de soja, caldo de infusión de cerebro-corazón) con 15% a 20% de glicerol (otra opción, si no hay ningún caldo nutritivo al alcance, es usar leche desnatada estéril) y se conserva liofilizado.

4.10 Extracción de las cepas de *N. gonorrhoeae* congeladas

Sacar el criotubo que contiene las cepas del congelador o del nitrógeno líquido y no dejar que se descongele. Recoger suavemente con la punta de una pipeta de Pasteur estéril una muestra pequeña de la suspensión bacteriana congelada (o una perla congelada) y transferirla a un medio de cultivo de agar

para gonococos. A partir del inóculo hacer estrías con un asa de siembra para obtener colonias aisladas tras la incubación de la placa de cultivo durante 24 horas a 36 ± 1 °C en una atmósfera enriquecida con $5 \pm 1\%$ de CO_2 . Guardar inmediatamente el criotubo en el congelador.

4.11 Referencias

1. *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008*. Ginebra, OMS, 2012 (<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html>, consultada el 2 de abril del 2013).
2. Tapsall JW et al. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2009, 7(7):821–834.
3. Ohnishi M et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(7):3538–3545.
4. Bachmann LH et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(5):1827–1832.
5. Mimiaga MJ et al. Gonococcal, chlamydia, and syphilis infection positivity among MSM attending a large primary care clinic, Boston, 2003 to 2004. *Sexually Transmitted Diseases*, 2009, 36(8):507–511.
6. Schachter J et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(7):637–642.
7. Masek BJ et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internet-based screening program. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(6):1663–1667.
8. Hobbs MM et al. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(1):8–13.
9. Taylor SN, DiCarlo RP, Martin DH. Comparison of methylene blue/gentian violet stain to Gram's stain for the rapid diagnosis of gonococcal urethritis in men. *Sexually Transmitted Diseases*, 2011, 38(11):995–996.
10. Martin JE, Lester A. Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *HSMHA Health Reports*, 1971, 86(1):30–33.
11. Taylor E, Phillips I. Assessment of transport and isolation methods for gonococci. *British Journal of Venereal Disease*, 1980, 56(6):390–393.
12. Jephcott AE, Bhattacharyya MN, Jackson DH. Improved transport and culture system for the rapid diagnosis of gonorrhoea. *British Journal of Venereal Disease*, 1976, 52(4):250–252.
13. Thayer JD, Martin JE. An improved selective medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Reports*, 1966, 81:559–562.
14. Faur YC et al. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). Formulation and comparisons with standard media. *Health Laboratory Science*, 1973, 10:44–52.
15. Mirrett S, Reller LB, Knapp JS. *Neisseria gonorrhoeae* strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 1981, 14(1):94–99.
16. Unemo M et al. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63(6):1142–1151.
17. Alexander S, Ison C. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54(9):827–831.
18. Tapsall JW, Cheng JK. Rapid identification of pathogenic species of *Neisseria* by carbohydrate degradation tests. Importance of glucose in media used for preparation of inocula. *British Journal of Venereal Disease*, 1981, 57(4):249–252.
19. Dillon JR, Carballo M, Pauzé M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: *Neisseria*-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitek, Gonocheck II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva MicroTrak Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(3):493–497.
20. Unemo M et al. Global transmission of prolyliminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains: implications for changes in diagnostic strategies. *Sexually Transmitted Infections*, 2007, 83(1):47–51.
21. Ilina EN et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2009, 11(1):75–86.
22. Cook RL et al. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Annals of Internal Medicine*, 2005, 142(11):914–925.
23. Alexander S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? *Sexually Transmitted Infections*, 2009, 85(3):159–160.
24. Whiley DM et al. Exploring 'best practice' for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexual Health*, 2008, 5(1):17–23.
25. Palmer HM et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of

- Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2):835–837.
26. Tabrizi SN et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(10):3610–3615.
 27. McNally LP et al. Low positive predictive value of a nucleic acid amplification test for nongenital *Neisseria gonorrhoeae* infection in homosexual men. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 47(2):e25–27.
 28. Golparian D, Tabrizi SN, Unemo M. Analytical specificity and sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC assays for detection of commensal *Neisseria* species and *Neisseria gonorrhoeae* on the Gen-Probe Panther instrument. *Sexually Transmitted Diseases*, 2013, 40(2):175–178.
 29. Whiley DM et al. A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in genital and extragenital specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 2005, 52(1):1–5.
 30. Hjelmevoll SO et al. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* *porA* pseudogene. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2006, 8(5):574–581.
 31. Tabrizi SN et al. Evaluation of *opa*-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, 2005, 32(3):199–202.
 32. Goire N et al. A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal *porA* pseudogene and multicopy *opa* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, 61(1):6–12.
 33. Whiley DM et al. False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae* *porA* pseudogene PCR—a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitidis* *porA* sequence, Australia, March 2011. *Eurosurveillance*, 2011, 16(21):pii:19874.
 34. Eastick K, Winter A, Jamdar S. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with a recombinant *porA* gene in Scotland, United Kingdom, 2010 to 2011. *Eurosurveillance*, 2012, 17(9):pii:20101.
 35. Golparian D, Johansson E, Unemo M. Clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolate with a *N. meningitidis* *porA* gene and no prolyliminopeptidase activity, Sweden, 2011—danger of false-negative genetic and culture diagnostic results. *Eurosurveillance*, 2012, 17(9):pii:20102.
 36. Ison CA et al. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false-negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally. *Sexually Transmitted Infections*, 2013, 89(3):197–201.
 37. Huppert J, Hesse E, Gaydos CA. What's the point? How point-of-care STI tests can impact infected patients. *Point of Care*, 2010, 9(1):36–46.
 38. Gift TL et al. The rapid test paradox: when fewer cases detected lead to more cases treated: a decision analysis of tests for *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Diseases*, 1999, 26(4):232–240.
 39. Yokoi S et al. Threat to cefixime treatment of gonorrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(8):1275–1277.
 40. Unemo M et al. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Eurosurveillance*, 2010, 15(47):pii:19721.
 41. Ison CA et al. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Eurosurveillance*, 2011, 16(14):pii:19833.
 42. Unemo M et al. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Eurosurveillance*, 2011, 16(43):pii:19998.
 43. Unemo M et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(3):1273–1280.
 44. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiology*, 2012, 7(12):1401–1422.
 45. Cockerill F et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement, M100-S21 and Vol. 31, No. 1. Wayne, PA, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2011 (www.clsi.org).
 46. Dillon J-A R, Starnino S. *Manual de laboratorio: identificación y evaluación de la susceptibilidad de Neisseria gonorrhoeae a los antibióticos para el programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antibióticos en América Latina y el Caribe* (GASP-LAC) (segunda edición). Canadá, University of Saskatchewan, 2011 (<http://www.gasp-lac.net>).
 47. Bell SM. The CDS disc method of antibiotic sensitivity testing (calibrated dichotomous sensitivity test). *Pathology*, 1975, 7(4 Suppl):Suppl 1–48.
 48. The CDS antibiotic susceptibility test (<http://web.med.unsw.edu.au/cdstest>).
 49. O'Callaghan CH et al. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1972, 1(4):283–288.
 50. Cody RM. Preservation and storage of pathogenic *Neisseria*. *Health Laboratory Science*, 1978, 15(4):206–209.
 51. Tapsall JW, Phillips EA, Morris LM. Chromosomally mediated intrinsic resistance to penicillin in penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney: guide to treatment with Augmentin. *Genitourinary Medicine*, 1987, 63(5):305–308

Capítulo 5

Infecciones por clamidias

5.1 Introducción

Chlamydia trachomatis es el agente etiológico de la clamidiosis y causa una gran morbilidad y costo económico en todo el mundo. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2008 se produjeron 106 millones de casos nuevos de clamidiosis urogenital en adultos en el mundo. Se deduce, por consiguiente, que la clamidiosis es la infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana con mayor prevalencia junto con la gonorrea (también 106 millones de casos nuevos).

En la clasificación de *C. trachomatis* hay tres biovariedades, que contienen cada una de ellas varios serotipos o genotipos (dependiendo del método usado para la clasificación). Las biovariedades se definieron sobre la base del tipo de infección, la localización más frecuente (tropismo tisular) y la virulencia relativa de la enfermedad (cuadro 5.1) en: las que producen tracoma (la principal causa de ceguera prevenible en el mundo y endémica en muchos países en desarrollo), las que causan infección genital (una de las principales ITS bacterianas a escala mundial) y las que producen linfogranuloma venéreo (enfermedad ulcerosa genital que afecta el tejido linfático) (véase el capítulo 11).

La biovariedad ocular está integrada por los serotipos A–C, que se encuentran predominantemente en las infecciones conjuntivales. El tropismo tisular no es absoluto ya que estos microorganismos, especialmente el serotipo B, también pueden aislarse de infecciones genitales, aunque son casos infrecuentes.

La biovariedad predominante está integrada por los serotipos D–K, que se transmiten sexualmente e infectan el epitelio genital, causan uretritis en el hombre y cervicitis (y uretritis) en la mujer (cuadro 5.2). La infección urogenital asintomática llega a afectar hasta el 50% de los hombres y el 90% de las mujeres. Si pasa desapercibida y no se la trata, la infección alcanza el aparato genital superior y produce epididimitis en el hombre y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) con las secuelas correspondientes (embarazo ectópico e infertilidad de causa tubárica) en la mujer. Estos

serotipos también pueden aislarse de la infección ocular en los recién nacidos, contraída al pasar por el conducto del parto infectado, pero no son en esencia los causantes del tracoma. Los recién nacidos también pueden contraer una neumonía por clamidias debido a la exposición a estos serotipos durante el parto vaginal (no debe confundirse con la infección por *C. pneumoniae*).

Por último, los serotipos L1–L3 de la biovariedad LGV son también de transmisión sexual, pero con una preferencia tisular por las células linfoides y una evolución de la enfermedad más activa. Las infecciones por LGV son pues más invasoras y tienen mayor probabilidad de causar una infección sistémica que las otras biovariedades. El LGV es endémico en muchos países en desarrollo. Desde el 2003, se han registrado brotes de proctitis y proctocolitis por LGV en hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres en Europa y América del Norte, donde anteriormente solo presentaban casos esporádicos (véase el capítulo 11).

- *C. trachomatis* causa la ITS bacteriana más frecuente a escala mundial, que incluye una serie de enfermedades en diversas localizaciones (genital, ocular, ganglios linfáticos y bronquial).
- Las consecuencias negativas de las infecciones por *C. trachomatis* sin tratar son la enfermedad pélvica inflamatoria, el embarazo ectópico, la infertilidad de causa tubárica, la epididimitis, la prostatitis y otras.

5.2 Aspectos generales de los métodos de diagnóstico existentes

Aunque la prevalencia de las infecciones por clamidias es muy alta, el conocimiento de esta infección de transmisión sexual era muy limitado en los entornos de salud pública hasta los años ochenta debido a las deficiencias de los métodos de diagnóstico. Las técnicas de diagnóstico

Cuadro 5.1: Características e infecciones relacionadas con diferentes serotipos de *C. trachomatis*

Serotipo	Características	Tropismo tisular - Biovariedad	Infección
A–C (Incl. Ba)	No invasor	Células epiteliales - Tracoma	Tracoma endémico causante de ceguera
D–K (Incl. Da, Ia, Ja)	No invasor	Células epiteliales - Tracoma	Urogenital, conjuntivitis, neumonía neonatal
L1, L2, L3 (Incl. L2a, L2b)	Invasor	Células linfáticas - LGV	LGV

LGV, linfogranuloma venéreo.

Cuadro 5.2: Manifestaciones clínicas de la infección por *C. trachomatis*

Infección genital	Primarias	Secuelas
Mujer	Cervicitis, leucorrea abundante, cuello uterino friable, disuria, dolor pelviano, dolor a la palpación y con la movilización del cuello uterino	Enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico, salpingitis, infertilidad de causa tubárica
Hombre	Secreción uretral, disuria, dolor testicular	Epididimitis, prostatitis
Infecciones extragenitales	Primarias	Secuelas
Rectal	Secreción, dolor rectal, sangre en heces	Proctitis
Orofaringea	Faringitis, dolor de garganta leve	
Ganglios linfáticos	Inflamación linfática	
Ocular	Conjuntivitis	Cicatrización tracomatosa conjuntival, tracoma que causa ceguera
Neumonía neonatal	Neumonía	

Nota: Los estudios demuestran que la infección por *C. trachomatis* facilita la transmisión del VIH; sin embargo, la razón de posibilidades ha sido relativamente baja.

temprano se desarrollaron a raíz de las iniciativas de control del tracoma más que de las iniciativas de control de las ITS. La serología se usó para diferenciar las infecciones agudas de las crónicas, pero carece de la sensibilidad y especificidad adecuadas para el diagnóstico de la infección aguda y la obtención de estimaciones de la exposición a lo largo de la vida de la población. El cultivo se estandarizó en los años setenta, de esta forma el aislamiento de la bacteria se convirtió en un instrumento de diagnóstico útil.

Sin embargo, la necesidad de que la bacteria se mantenga viva exige condiciones estrictas de transporte y conservación que limitan la utilización de esta prueba a los consultorios que colaboran con laboratorios más avanzados técnicamente. Los ensayos de detección

de antígenos, la inmunofluorescencia directa (IFD) y los enzimoanálisis de absorción en fase sólida (ELISA) se desarrollaron a comienzos de los años ochenta, lo que facilitó mucho más el diagnóstico de las infecciones por clamidias. A medida que se fueron desarrollando otros ELISA, se pudo disponer de numerosos análisis de diagnóstico inmediato, es decir, pruebas diagnósticas realizadas en el punto de atención. La IFD, el ELISA realizado en el laboratorio y las pruebas diagnósticas en el punto de atención presentaban una sensibilidad baja en relación con el cultivo y una especificidad insuficiente. Sin embargo, el menor tiempo de obtención de un resultado analítico y las exigencias menos restrictivas para el transporte de las muestras los

convertía en una opción atractiva, en particular en los entornos de prevalencia elevada.

El siguiente adelanto importante en cuanto al diagnóstico de la clamidiosis fue la utilización de secuencias de ácidos nucleicos en lugar de antígenos como objetivo de la detección. La sensibilidad de las primeras pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación (PHSA) era similar a la del cultivo, pero de nuevo había problemas con respecto a la especificidad. No obstante, la posibilidad de detectar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* con este ensayo lo convirtió en extremadamente útil. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) constituyeron el siguiente avance en el diagnóstico. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos usan métodos enzimáticos para amplificar el DNA o el RNA diana exponencialmente a miles de millones de copias. El producto amplificado se detecta por diversos medios, lo que da a cada ensayo características de desempeño únicas. Al igual que ocurre en la hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación, la prueba de amplificación de ácidos nucleicos combina la detección de clamidias y gonococos en una única muestra. Debido a las mejores características de desempeño, por ejemplo, sensibilidad, especificidad, distintos tipos de muestra, automatización e independencia respecto a mantener la viabilidad del microorganismo, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se recomiendan sin la menor duda para el diagnóstico y el cribado de las infecciones por clamidias.

Se puede encontrar más información respecto a las características de desempeño de los diferentes métodos de diagnóstico de la clamidiosis en el sitio web: www.chlamydiae.com.

Las cuestiones relacionadas con la evaluación del ensayo y la variabilidad de desempeño (1, 2) subrayan la necesidad de confirmar los ensayos y llevar a cabo una garantía de la calidad estricta en cada laboratorio, no solo antes de la adopción de un método, sino también de manera periódica. Para más información sobre este tema, véase el capítulo 2 y el anexo 3. Para lograr características de desempeño adecuadas con cualquiera de los métodos de diagnóstico, es fundamental seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante en cuanto a la recogida, el transporte y la conservación de las muestras, así como para la realización de los ensayos específicos, sin olvidar los controles de calidad.

- Se sigue avanzando en las técnicas de diagnóstico de la clamidiosis, que proporcionan mayor sensibilidad.
- Debido a que las características de desempeño son superiores, se recomiendan las PAAN para el diagnóstico y el cribado de las infecciones por clamidias. Sin embargo, la elección de las pruebas depende de los recursos y del nivel de apoyo prestado por el laboratorio.

5.3 Toma, transporte y condiciones de conservación de las muestras

La recogida, el transporte y las condiciones de conservación de las muestras (cuadro 5.3) dependen en muchos casos del tipo de ensayo que se vaya a realizar. En esta sección se presentarán algunas pautas generales, pero los detalles de cualquiera de las pruebas diagnósticas específicas se encontrarán en las instrucciones de uso correspondientes.

El lugar anatómico de muestreo variará según el cuadro clínico, los antecedentes del paciente y la sensibilidad general del método analítico. Para el cultivo, que requiere microorganismos vivos, la muestra debe tomarse de sitios con células epiteliales cilíndricas o cúbicas, cuya probabilidad de tener una infección activa es mayor. Por lo tanto, se tomarán muestras del orificio endocervical externo en la mujer y del epitelio uretral en el hombre y, si fuera necesario, también en la mujer. Los estudios han puesto de manifiesto infecciones repetidas aisladas del endocérvix o de la uretra femenina. El cultivo de muestras procedentes de estas dos localizaciones en la mujer aumentará la identificación de casos.

Las muestras endocervicales se obtienen introduciendo el dispositivo de toma de muestras 2 o 3 cm en el orificio y rotando 360°. En niñas impúberes no se toman muestras endocervicales; en cambio, se tomarán muestras del vestíbulo de la vagina y también se recogerá una muestra de orina. Las muestras uretrales se toman insertando el hisopo 2 o 3 cm en la uretra, seguido de una rotación completa para obtener material celular. Se han descrito casos en los que la toma de muestra inadecuada representa un problema frecuente que afecta negativamente a la sensibilidad del cultivo.

Aunque en otras pruebas que no implican cultivo ni amplificación de ácidos nucleicos no se requieren

microorganismos vivos, la sensibilidad limitada de esas pruebas exige que se recoja un número suficiente de microorganismos para obtener un resultado positivo. Además, los métodos de detección de antígeno suelen requerir que estén en su mayoría intactos.

Por lo tanto, en general, se aplican a estos métodos de diagnóstico las mismas restricciones de muestreo que las exigidas para el cultivo. Se ha autorizado la utilización de algunos ELISA con muestras de orina de hombres ya que este método de muestreo arrastra los microorganismos de la uretra. Si se controla bien la recogida del volumen emitido en la primera parte de la micción (menos de 25 ml en general) y el paciente no había orinado en la hora anterior, la concentración de microorganismos puede que ser suficientemente elevada como para que se detecten realizando estos análisis. Sin embargo, esto no es válido en el caso de orina de la mujer ya que la frecuencia de las infecciones uretrales es menor y la orina no es una muestra representativa del tejido cervicouterino.

La prueba de amplificación de ácidos nucleicos tiene la ventaja de depender de material con ácidos nucleicos que no necesita microorganismos viables o intactos. En consecuencia, estos procedimientos analíticos han ampliado la capacidad de tomar muestras menos traumáticas que exigían entornos clínicos. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son muy sensibles cuando se usan muestras obtenidas por el propio paciente (por ejemplo, hisopos vaginales u orina de los hombres). Estas pruebas de amplificación también son útiles para el análisis de la muestra residual de la citología en medio líquido, que permite hacer un cribado de las mujeres a las que se les realiza una prueba de Papanicolaou (Pap). La toma de muestra con un hisopo vaginal la puede hacer la paciente o el médico (3, 4). Introducir el hisopo en la vagina y rotar con el fin de obtener una muestra de toda la superficie de las paredes vaginales.

En algunos casos se necesitan muestras que no sean de origen genital, dependiendo de los signos clínicos y los hábitos sexuales. Mediante el cultivo se pueden detectar infecciones rectales y orofaríngeas, pero la sensibilidad es muy baja debido a la microflora contaminante. Sin embargo, la prueba de amplificación

de ácidos nucleicos presenta mayor sensibilidad en el caso de estas infecciones a pesar de que no haya especificaciones de ningún fabricante sobre este tipo de muestras. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos con muestras extragenitales de hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres aumentan la identificación de casos sustancialmente (5–8). Se toman muestras rectales, obtenidas por el médico o por el propio paciente, introduciendo un hisopo de dacrón sin producir molestias (2–3 cm) en el recto y girándolo 360°. Actualmente no hay necesidad de visualizar el recto para tomar una muestra adecuada debido a la mayor sensibilidad de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Para alguien que declare haber practicado el coito anal receptivo, la muestra rectal está justificada. La recogida de muestras por el propio paciente para la PAAN hará que aumente la aceptación del cribado y reducirá la carga del tiempo asistencial (9, 10). Deben recogerse muestras orofaríngeas de la faringe posterior y las criptas amigdalinas cuando se diagnostican infecciones transmitidas durante las relaciones sexuales orales. Las muestras de los recién nacidos con sospecha de haber contraído neumonía por clamidias durante el parto deben proceder de la nasofaringe. Estas muestras se destinarán al cultivo o la inmunofluorescencia directa pero aún no se han evaluado rigurosamente en ningún otro sistema. Sin embargo, debido a la reducida concentración de bacterias, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son posiblemente más eficaces; es necesario investigar más en este campo. Introducir el hisopo a través del orificio nasal hasta que pueda tomarse una muestra de la pared faríngea. Tomar una *muestra conjuntival* retirando el párpado inferior y desplazando el hisopo por la superficie de la conjuntiva palpebral inferior hacia el ángulo medio del ojo. En caso de sospecha de LGV, véase el capítulo 11.

Dada la rigurosa evaluación requerida antes de que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA) autorice una prueba diagnóstica, que incluye ensayos clínicos multicéntricos comparados con patrones, el desempeño de las pruebas autorizadas por la FDA debe estar bien probado. Por consiguiente, usamos este nivel de la

Cuadro 5.3: Obtención, transporte y conservación de las muestras

Localización	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Endocérnix	Hisopo - plástico ^a , espátula o cepillo para citología en medio líquido.	Usar una torunda de algodón para eliminar el exceso de moco antes de tomar la muestra. La toma con espátula solo es válida para la PAAN. Introducir el dispositivo de toma de muestras 2 o 3 cm y rotar el hisopo 360° en el orificio endocervical. La recogida de células endocervicales es esencial para la IFD.	Colocar en el dispositivo de recogida del fabricante o utilizar el medio líquido para citología. Conservar y transportar según las indicaciones de uso.	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos). Mantener a 4°C hasta la inoculación antes de 24 h o a -70 °C si se conserva más tiempo.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire.	Colocar en el tampón de extracción del estuche y seguir las indicaciones de uso.
Uretra	Hisopo - aluminio ^b	Introducir el hisopo 2 o 3 cm en la uretra y rotar 360°. La recogida de células epiteliales cúbicas es esencial para la IFD.	Colocar en el dispositivo de recogida del fabricante. Conservar y transportar según las indicaciones de uso.	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos). Mantener a 4 °C hasta la inoculación antes de 24 h o a -70°C si se conserva más tiempo.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire.	Colocar en el tampón de extracción del estuche y seguir las indicaciones de uso
Orina	Recipiente estéril para orina.	Sin limpiar la zona genital del paciente, recoger la primera porción de la micción (menos de 25 ml en general).	Colocar en el dispositivo de recogida del fabricante. Conservar y transportar según las indicaciones de uso.	NP	NP	NP

Cuadro 5.3: Obtención, transporte y conservación de las muestras (continuación)

Localización	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Vagina	Hisopo-plástico ^a	Tanto el médico como el paciente pueden obtener la muestra. Girar el hisopo de modo que toque las paredes vaginales por todas partes.	Colocar en el dispositivo de recogida del fabricante. Conservar y transportar según las indicaciones de uso. Muchos procedimientos permiten el uso de “hisopos secos” que vienen sin ningún medio.	NP	NP	Seguir las indicaciones de uso. ^c
Rectum	Hisopo-plástico ^a	Introducir el hisopo 2 o 3 cm en el recto y rotar 360°.	Ningún fabricante da especificaciones actualmente para este tipo de muestra. ^d Proceder como con la muestra endocervical. Las muestras pueden enviarse sin ningún medio si la prueba utilizada permite este tipo de recogida para las muestras endocervicales.	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos). Mantener a 4 °C hasta la inoculación antes de 24 h o a -70 °C si se conserva más tiempo.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire.	NP

Cuadro 5.3: Obtención, transporte y conservación de las muestras (continuación)

Localización	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Orofaringe	Hisopo-plástico ^a	Frotar con el hisopo la parte posterior de la faringe y la cripta amigdalina.	Ningún fabricante da especificaciones actualmente para este tipo de muestra. ^d Proceder como con la muestra endocervical. Las muestras pueden enviarse sin ningún medio si la prueba utilizada permite este tipo de recogida para las muestras endocervicales.	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos).	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire.	NA
Nasofaringe (en caso de sospecha de neumonía neonatal)	Hisopo-aluminio ^b	Frotar con el hisopo la nasofaringe o recoger el aspirado traqueobronquial.	NP	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos). Mantener a 4 °C hasta la inoculación antes de 24 h o a -70 °C si se conserva más tiempo.	NP	NP

Cuadro 5.3: Obtención, transporte y conservación de las muestras (continuación)

Localización	Dispositivo de recogida	Procedimiento de muestreo	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Conjuntiva	Hisopo-aluminio ^b	Frotar con el hisopo la superficie de la conjuntiva palpebral inferior.	NP	Colocar directamente en un medio de transporte adecuado para clamidias (por ejemplo, tampón sacarosa-fosfato-glutamato con inhibidores antimicrobianos). Mantener a 4 °C hasta la inoculación antes de 24 h o a -70 °C si se conserva más tiempo.	Extender en un portaobjetos (una capa fina) y secar al aire.	NP

IFD: ensayo de inmunofluorescencia directa; NP: no procede; PAAN: prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

^a Hisopos de dracón o rayón con mango de plástico.

^b Hisopos de dracón o rayón con mango de aluminio.

^c Solo están autorizados algunas pruebas diagnósticas en el punto de atención para las muestras vaginales.

^d Los datos indican que las PAAN adecuadas dan resultados satisfactorios para este tipo de muestras, pero ningún fabricante indica especificaciones para las muestras extragenitales.

evaluación como norma para la determinación de las pruebas de alta calidad. En el cuadro 5.4 se resumen las características de desempeño de diferentes pruebas diagnósticas autorizadas por la FDA para la detección de *C. trachomatis*.

- La recogida, el transporte y las condiciones de conservación de las muestras varían según el ensayo de detección utilizado y pueden tener una influencia significativa en la sensibilidad del método analítico.
- La elección de la muestra adecuada y de la prueba de detección son fundamentales para el diagnóstico eficaz.

Cuadro 5.4: Pruebas diagnósticas evaluadas* (a fecha de junio de 2012) para la detección de *C. trachomatis*

	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Tipos de muestras				
Hisopado endocervical	Sí	Sí	Sí	Sí
Medio líquido para citología	Sí (algunas pruebas)	No	No	No
Hisopado vaginal obtenido por el paciente o el médico	Sí (algunas pruebas)	No	No	Sí (algunas pruebas)
	Sí (algunas pruebas)	No	No	Sí (some tests)
Orina				
	Mujer	No	No	No
Hombre	Sí	No	No	No
Hisopado uretral masculino	Sí	Sí	Sí	Sí
Hisopado rectal	No ^a	Sí ^b	Sí ^b	No
Hisopado orofaríngeo	No ^a	Sí ^b	Sí ^b	No
Hisopado conjuntival	No ^a	Sí	Sí	No
Desempeño				
Sensibilidad ^c	Muy alta	Moderada–alta	Baja–moderada	Baja–moderada
Especificidad	Muy alta	Muy alta	Moderada	Muy alta
Otras consideraciones				
Costo	Muy alto	Moderado	Bajo	Bajo
Transporte y conservación	Condiciones ambiente hasta 60 días (comprobar las instrucciones)	4 °C durante 24 h – 70 °C después de 24 h	Condiciones ambiente	NP
Instrumental	Gran superficie (para los aparatos)	Microbiología o virología corriente	Microscopio de fluorescencia	Pequeño o ninguno
Capacidad analítica/ automatización	Alta - sí	Baja - nula	Baja - nula	Baja - nula
Complejidad técnica	Alta	Alta	Moderada (experiencia en microscopia)	Baja
Tipo de laboratorio	Referencia	Referencia	Central	Local

Cuadro 5.4: Pruebas diagnósticas evaluadas* (a fecha de junio de 2012) para la detección de *C. trachomatis* (continuación)

	PAAN	Cultivo	IFD	Pruebas diagnósticas en el punto de atención
Varios patógenos en una muestra	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> y PVH en algunos sistemas analíticos.	No	No	No
Otras observaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Debido a las mejores características de desempeño, las PAAN se recomiendan mucho para el diagnóstico y la detección sistemática. • La posibilidad de contaminación del laboratorio requiere un cumplimiento estricto de los protocolos. • Algunas requieren lotes de gran tamaño, lo que puede alargar el tiempo de obtención de resultados analíticos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las condiciones estrictas de toma y transporte son esenciales para mantener la viabilidad, este es el principal obstáculo en la sensibilidad de esta prueba. • La posibilidad de obtener cepas viables es útil para otras pruebas tales como la determinación del genotipo y el antibiograma. 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy recomendada para la identificación inmediata de infecciones conjuntivales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las infecciones detectadas pueden tratarse antes de que el paciente salga del consultorio.

IFD: ensayo de inmunofluorescencia directa; VPH: virus de los papilomas humanos; PAAN: prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

* Evaluado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América.

^a Los datos indican que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos apropiadas funcionan satisfactoriamente para este tipo de muestras, pero ningún fabricante da especificaciones para muestras extragenitales.

^b Comparado con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos modernas, la sensibilidad del cultivo y de la inmunofluorescencia directa es probablemente aun menor para estos tipos de muestra.

^c Los cálculos de sensibilidad dependen en gran medida de la diferente sensibilidad de las pruebas efectuadas con la misma metodología y de las utilizadas como referencia. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son superiores al resto en cuanto a la sensibilidad y tienen una especificidad excelente.

Fuente: Adaptado de Unemo M, Papp JR. Infections caused by *Chlamydia trachomatis*. En: Morse SA et al., eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4ª ed. Edinburgh, Saunders/Elsevier, 2010:40–63.

5.4 Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

La detección molecular de secuencias específicas de ácidos nucleicos y la posterior validación y comercialización de este tipo de pruebas ha mejorado enormemente la detección en el laboratorio de *C. trachomatis*. Las primeras pruebas de hibridación de ácidos nucleicos sin amplificación desarrolladas, como Gen-Probe PACE 2 y PACE 2C (Gen-Probe, EUA), estaban basadas en la unión de sondas de ácidos nucleicos específicas complementarias y posterior amplificación de la señal para detectar la unión. La sensibilidad de estas pruebas es aproximadamente un 10% a 15% menor que la de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, y no deben usarse si existen pruebas de amplificación y son asequibles. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos tienen características de desempeño superiores a cualquier otro tipo de prueba para detectar las infecciones por clamidias (11–14) y, como tal, son el tipo de ensayo recomendado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América (y otros organismos de orientación y regulación) tanto para el diagnóstico de localizaciones genitales y extragenitales como para el cribado de las infecciones por clamidias (15).

Las pruebas de confirmación de las muestras positivas de *C. trachomatis* ya no se recomiendan. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos que son eficaces y están validadas tienen varias ventajas independientemente de quien sea el fabricante. Son sin duda las más sensibles de todas las pruebas existentes, además presentan la posibilidad de agrupar las muestras en aquellos entornos con recursos limitados; no dependen de la viabilidad de los microorganismos; la mayoría de las pruebas comercializadas detectan tanto clamidias como gonococos; y pueden realizarse a partir de una gran variedad de tipos de muestras cuya toma es menos traumática, como las de orina o las de flujo vaginal además de las ya utilizadas antes, es decir, las endocervicales y uretrales recogidas con hisopo. Por otro lado, estos ensayos se adaptan bien a la automatización, lo que da lugar a una mayor estandarización y garantía de la calidad de la extracción y la detección, así como a una capacidad analítica ultrarrápida. No obstante, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos también tienen

algunos problemas en común. Estas técnicas son exigentes en cuanto al instrumental y no son apropiadas para muchos laboratorios situados en países con recursos limitados. Por otro lado, también se puede producir contaminación ambiental fácilmente debido a la amplificación exponencial de las secuencias diana. La manipulación de una muestra ya amplificada abierta es una fuente potencial de contaminación ambiental por formación de aerosoles. Una vez que las instalaciones y el equipo de laboratorio (por ejemplo, los pipeteadores) se contaminan, desprenderse de la contaminación remanente puede resultar extremadamente difícil.

Otro problema es la posible obtención de resultados negativos falsos. El proceso de extracción de ácidos nucleicos es una etapa fundamental pero es difícil garantizar para cada muestra. La amplificación requiere concentraciones precisas de sal, nucleótido y enzima para proceder con eficacia, lo que exige una gran precisión de pipeteado. La enzima que promueve la amplificación podrá también ser sensible a los componentes de la sangre, el moco y la orina. Por consiguiente, un resultado negativo puede indicar, en realidad, una falta de ácido nucleico diana debido a que la toma o extracción de la muestra fue inadecuada o a que no hubo amplificación en vez de a una verdadera falta de secuencia diana. La proporción de muestras que son inhibitorias puede variar según el método de la prueba y, con algunos de ellos, llegará hasta 7,5% en ciertos segmentos de la población (16). Sin embargo, el desempeño de estas pruebas se sigue prefiriendo al del cultivo, que tiene el riesgo de proporcionar resultados negativos falsos debido a la pérdida de viabilidad de las bacterias, y al de los métodos sin cultivo, que tienen una sensibilidad inferior (o como mucho igual) a la del cultivo pero cuya especificidad es también insuficiente. Por consiguiente, a pesar de tener que tomar las correspondientes precauciones en el laboratorio, las ventajas de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos sobrepasan con creces los inconvenientes. Debe promoverse el uso de estas pruebas aun en entornos con recursos limitados mediante la creación de laboratorios de referencia regionales que presten servicios de diagnóstico con estos métodos. Los laboratorios de referencia regionales proporcionan muchas ventajas como consecuencia del gran volumen de muestras analizadas, el cumplimiento riguroso de las prácticas correctas de laboratorio y la mayor experiencia del

personal. Recurrir a laboratorios regionales reduce los costos, al tiempo que se utilizan pruebas de mayor sensibilidad. A pesar de que haya que enviar las muestras a un establecimiento regional externo, el gran volumen de estas y la automatización analítica ultrarrápida hace que el tiempo de obtención de los resultados analíticos sea equivalente o inferior. Por esta razón, los laboratorios que no pueden permitirse el lujo de realizar las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos más sensibles deben plantearse la posibilidad de recurrir a los servicios de un laboratorio de referencia regional en lugar de utilizar otro medio de diagnóstico menos sensible. Actualmente hay cuatro empresas que han comercializado la prueba de amplificación de ácidos nucleicos autorizada por la FDA para la detección de *C. trachomatis*. A continuación se describen los ensayos que estos fabricantes tienen en el mercado. Todas las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos autorizadas y comercializadas detectan el LGV como *C. trachomatis* positiva; sin embargo, no se distinguen los resultados como L1–L3 positivo. Para esto, es necesario el genotipado (véase el capítulo 11). Es importante señalar que a escala mundial se usan muchas otras PAAN para la detección de *C. trachomatis* que están comercializadas o incluso desarrolladas en el propio laboratorio (17, 18). En el caso de que se utilicen PAAN no autorizadas por la FDA, deben existir procedimientos normativos internacionales —como los de la Unión Europea— u otros procedimientos normativos nacionales que garanticen la calidad y el desempeño de las PAAN. Se insiste en recomendar el uso de pruebas autorizadas internacionalmente. Si esto no fuera posible, se recomienda que se valide la eficacia de la PAAN propuesta en los entornos locales y se evalúe estrictamente la garantía de la calidad antes de usarla frente al menos una PAAN autorizada internacionalmente y cuando se use posteriormente se añadan los debidos controles positivos, negativos y de inhibición; también se recomienda la participación en un sistema de evaluación externa de la calidad apropiado (véase el capítulo 2 y el anexo 3).

(La información elemental relativa a las diferentes técnicas de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos se encuentra en el anexo 3).

- Las técnicas moleculares son las que tienen mejor sensibilidad con una especificidad excelente.
- Los ensayos moleculares disminuyen la necesidad de condiciones de transporte y conservación estrictas y se suprime el análisis subjetivo (como en el caso de la microscopia).
- Si no pueden usarse las PAAN autorizadas internacionalmente, se recomienda que se valide la eficacia de la prueba propuesta para los entornos locales y se evalúe estrictamente la garantía de la calidad antes de usarla frente, al menos, una prueba de amplificación de ácidos nucleicos autorizada internacionalmente.
- Están apareciendo rápidamente nuevas técnicas analíticas que no pueden anticiparse en este documento. Es importante examinar la bibliografía pertinente continuamente en busca de información sobre evaluaciones de la calidad de los nuevos ensayos, con el fin de determinar el más apto para cada laboratorio.

5.4.1 Ensayos moleculares de Abbott

Los ensayos de Abbott en tiempo real para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (RealTime CT/NG) y solo para *C. trachomatis* se realizan en el sistema automatizado m2000 (Abbott Molecular, EUA). Este ensayo ha reemplazado el LCx autorizado por la FDA, que fue uno de los primeros de amplificación de ácidos nucleicos comercializados. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real se hace en el m2000sp, un instrumento para la preparación automatizada de las muestras que extrae el DNA usando un sistema de captura con partículas magnéticas. Después de la extracción, el m2000sp carga la mezcla de componentes de la RCP en la bandeja de RCP, agrega las muestras purificadas y están listas para la amplificación y detección en tiempo real en el m2000rt (19). Este termociclador en tiempo real detecta la amplificación mediante la fluorescencia emitida cuando las sondas se unen específicamente a las secuencias diana amplificadas durante cada ciclo de amplificación. La prueba incluye ahora dianas dobles, es decir, dos secuencias en el plásmido críptico (7 a 10 copias por microorganismo), de forma que en el caso de *C. trachomatis* se garantice la detección de la nueva

variante sueca de *C. trachomatis* (nvCT), que causó miles de informes negativos falsos en Suecia y algunos otros países nórdicos cuando se usaba la prueba de amplificación de ácidos nucleicos comercializada en ese momento por Roche y Abbott (20–22). El sistema puede detectar señales múltiples que facilitan la detección de clamidias y gonococos, y un control interno no competitivo para controlar la posible inhibición en cada muestra. La secuencia del control interno está basada en el DNA vegetal que se agrega durante el paso de extracción de DNA para proporcionar una medida de la eficacia de extracción y la posible inhibición de la RCP. Esta es la única prueba que proporciona una indicación apropiada de que el aislamiento de DNA se ha realizado con éxito. El sistema es capaz de procesar 96 muestras de una vez, incluidos 3 controles, en definitiva pueden analizarse 186 muestras y 6 controles en aproximadamente 8 horas.

Entre las muestras autorizadas están las de orina y los hisopos de muestras vaginales, endocervicales y uretrales. Todas estas muestras se recogen con un multicolector proporcionado por el fabricante y son estables 14 días si se conservan entre 2 °C y 30 °C antes del análisis. El multicolector es un dispositivo único para todos los tipos de muestras que pueden analizarse simultáneamente en el sistema m2000. El prolongado tiempo de estabilidad a temperatura ambiente de las muestras de orina y las tomadas con hisopo hace que este ensayo sea muy solicitado por los centros de salud pública que envían muestras a los laboratorios de referencia.

El ensayo RealTime CT/NG tiene una sensibilidad analítica excelente y ventaja incluso al ensayo APTIMA Combo 2 (23). El proceso de purificación del DNA está diseñado para eliminar los inhibidores potenciales al tiempo que el control interno proporciona una señal de alerta si existe inhibición. También está diseñado para eliminar fluoróforos naturales que podrían dificultar la realización de la prueba. Al utilizar tecnología de detección de fluorescencia homogénea con cebadores específicos de la RCP se combina la amplificación y la detección en un sistema cerrado de una etapa. La naturaleza cerrada del sistema reduce la posibilidad de contaminación remanente y el uso del control negativo proporciona al usuario un método para identificar rápidamente la contaminación ambiental.

5.4.2 Ensayos diagnósticos de Becton Dickinson (BD)

El ensayo BD ProbeTec ET para clamidias y gonococos (Becton, Dickinson and Company, EUA), autorizado por la FDA, fue el primer ensayo en tiempo real comercializado. Esta prueba emplea amplificación isotérmica por desplazamiento de cadenas (SDA) para amplificar y detectar simultáneamente secuencias diana a 52,5 °C. La amplificación de una secuencia del plásmido críptico de clamidia tiene lugar en una placa sellada con una lectura de transferencia de energía fluorescente. Este esquema se diseñó para reducir al mínimo la posible contaminación ambiental remanente ya que las muestras amplificadas nunca se abren.

Las muestras autorizadas para las pruebas ProbeTec son las de orina y las endocervicales y uretrales tomadas con hisopo. Nuevamente, los datos probatorios indican que los hisopos vaginales son un tipo de muestra útil y están en marcha estudios de investigación sobre el desempeño de la prueba con otros tipos distintos de muestra. Las muestras tomadas con hisopo se toman usando el dispositivo proporcionado por el fabricante y son estables a temperatura ambiente hasta 6 días antes de analizarlas. La primera porción de orina es estable a 4 °C hasta 24 horas más tarde. Si se añade un conservante a la muestra, la estabilidad de la orina se prolonga hasta 2 días a temperatura ambiente o de 4 a 6 días a 4 °C.

Este ensayo puede detectar tanto clamidias como gonococos y tienen un control de amplificación externo optativo (14). La elección de las pruebas solicitadas es específica de la tira (es decir, cada tira de ocho muestras debe analizarse con la misma combinación de microorganismos) para clamidias y gonococos.

Sin embargo, el uso del control de amplificación es específico de la placa de tal manera que si se elige esta opción, se aplica a todas las muestras en esa placa. La prueba se presenta en un formato de 96 pocillos que están separados para cada secuencia diana. Por consiguiente, si se solicitan clamidias, gonococos y control de amplificación, se usan los pocillos de cada una de las 3 columnas y se pueden analizar 32 muestras y controles en una placa. En cambio, si solo se solicitan clamidias, se podrán analizar 96 muestras de una vez en 1 placa.

Dado que el ensayo se diseñó para ser un sistema cerrado, no se incluyó ningún método enzimático para degradar los contaminantes remanentes de amplificaciones anteriores. Lamentablemente, han ocurrido numerosos incidentes de importante contaminación ambiental. Limpiar y recuperar el estado inicial en estos casos puede llevar semanas, lo que da lugar a retrasos muy costosos y, a menudo, exige la reubicación en una zona que no ha estado expuesta anteriormente al ensayo. Los laboratorios que realizan este ensayo deben adherirse rigurosamente a un plan de vigilancia ambiental para detectar oportunamente estos casos de contaminación. Se está evaluando una segunda generación de ensayos que parecen ser más resistentes a este tipo de contaminación.

Becton Dickinson también ha desarrollado un ensayo de nueva generación, el ProbeTec ET CTQx/GCQX en el Sistema Viper con tecnología XTR (Viper) autorizado por la FDA. Este ensayo está también totalmente automatizado y puede generar 278 resultados en un solo turno de trabajo de 8 horas. El nuevo ensayo usa una química doble que incluye una amplificación con cada reacción de detección de clamidias o gonococos. El sistema es de una gran solidez con excelentes características de eficacia (24).

5.4.3 Ensayos diagnósticos de Gen-Probe

El ensayo APTIMA Combo 2 (Gen-Probe, EUA), autorizado por la FDA, se basa en el principio de captura de rRNA diana (destinado a reducir o eliminar la inhibición de la amplificación), es decir, aislamiento de secuencias de rRNA diana usando oligonucleótidos de captura y perlas magnéticas de DNA, seguido de amplificación usando una técnica de amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés) de una secuencia del 23S rRNA de *C. trachomatis*. La amplificación se detecta utilizando la cinética de emisión de luz por sondas de DNA marcadas que son complementarias de la región diana. Los datos que confirman la falta de inhibición cuando se usa este ensayo se han obtenido principalmente mediante el análisis de muestras negativas de pacientes a las que se les ha añadido cepas de laboratorio de *C. trachomatis*.

Las muestras autorizadas son las de orina y las vaginales, endocervicales y uretrales tomadas con hisopo, así como las muestras tomadas en el medio líquido para citología (12, 26). Las muestras tomadas con hisopo se introducen en el medio de transporte del

fabricante y son estables hasta 60 días a temperatura ambiente, lo que las hace idóneas para el transporte a laboratorios distantes. Una muestra de orina de la primera parte de la micción es estable hasta 24 horas después de su recogida y, una vez que se pone en el medio del fabricante, es estable a temperatura ambiente hasta 30 días. La prueba APTIMA Combo 2 también detecta *N. gonorrhoeae* (16S rRNA) y, en total, se pueden procesar aproximadamente 500 muestras en un período de 8 horas usando un sistema automatizado (el sistema TIGRIS). La aceptación de este ensayo está aumentando a pasos agigantados en muchos países debido a la gran sensibilidad y especificidad, la prolongación del período de estabilidad y la automatización del proceso.

Dado que las muestras permanecen selladas después de la amplificación, se espera que la posible contaminación ambiental remanente sea muy baja. Sin embargo, es muy recomendable la vigilancia ambiental si no existen medidas de control de la degradación de los productos amplificados ya sean enzimáticas o de otro tipo. Según indicaciones del fabricante es muy recomendable que se cumplan estrictamente los procedimientos de limpieza y descontaminación.

Debe vigilarse la reproducibilidad. Además, para una especificidad ideal, hay ensayos de confirmación que detectan 16S rRNA específico de *C. trachomatis* (APTIMA CT) y 16S rRNA específico de *N. gonorrhoeae* (APTIMA GC; otra secuencia del 16S rRNA respecto a la empleada en APTIMA Combo 2) y estos ensayos son ideales para la confirmación de los resultados positivos así como para la repetición de pruebas (26).

5.4.4 Ensayos de Roche Diagnostics

El ensayo Cobas Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics, EUA), autorizado por la FDA, emplea tecnología basada en la RCP para amplificar secuencias de DNA diana usando pares de cebadores biotinilados específicos para detectar el microorganismo. La diana se encuentra en el plásmido críptico de *C. trachomatis*. Después de un proceso de amplificación de tres temperaturas, los productos son hibridados en perlas magnéticas recubiertas de secuencias de sondas específicas para la especie y que están dentro de las secuencias del cebador.

El proceso de detección se basa en las interacciones biotina-avidina. Un analizador Cobas puede analizar aproximadamente 96 muestras, incluidas muestras y

controles, en 8 horas. Las muestras se recogen en un medio de transporte comercializado. La orina y las muestras tomadas con hisopo son estables hasta 7 días conservadas a 4 °C. Los tipos de muestras autorizadas incluyen las endocervicales y uretrales tomadas con hisopo, el medio líquido para citología y la primera parte de la micción, aunque la orina de mujer no debe usarse para la detección de la gonorrea. Se ha demostrado que los resultados obtenidos a partir de hisopos vaginales son aceptables con este sistema analítico (27, 28).

Este ensayo incluye una medida de la inhibición basada en una secuencia de DNA inaplicable precargada en cada tubo de reacción. Esto tiene por objeto poder comprobar que un resultado negativo es verdaderamente negativo y no meramente afectado por el contenido de la muestra. El ensayo también utiliza una enzima (uracilo N-glicosilasa) en la mezcla de amplificación que degrada las secuencias previamente amplificadas basándose en la presencia de dUTP en lugar de dTTP en el producto amplificado. Se proporciona de este modo al usuario una red de seguridad que protege frente a salpicaduras menores y la formación de aerosoles que se producen normalmente al manipular un gran número de muestras y mejora la reproducibilidad de los resultados.

El Cobas TaqMan CT v2,0, con marca CE en Europa, es el ensayo de segunda generación fabricado por Roche. Este sistema analítico está basado en la RCP en tiempo real y puede acoplarse con un sistema de procesamiento automatizado para reducir al mínimo el tiempo de trabajo de los técnicos. Este ensayo puede servir para detectar únicamente clamidias sin combinar con el análisis de gonococos. El ensayo de última generación de Roche (Cobas 4800 CT/NG), que también detecta *N. gonorrhoeae*, ya está autorizado por la FDA. Este ensayo se basa en la RCP en tiempo real en una plataforma totalmente automatizada. Las dianas del cebador usadas en ambos, Cobas TaqMan CT v2.0 y Cobas 4800 CT/NG, se han diseñado de nuevo y se han incluido dianas dobles para la detección de clamidias con objeto de garantizar la detección de la variante sueca nvCT (20–22). La segunda diana no está ubicada en el plásmido sino en las regiones conservadas del gen *ompA* de CT que codifica la proteína principal de la membrana externa. Las características de desempeño son similares a las otras pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Este ensayo proporciona un control de

amplificación y un proceso de prevención de contaminación remanente junto con un sistema de automatización sólido que permite analizar hasta 278 muestras durante un turno de 8 horas. Por otro lado, da buenos resultados con muestras obtenidas de forma cruenta e incruenta, como las vaginales obtenidas con hisopo y las de orina en el caso de los hombres. Actualmente se está evaluando para las muestras tomadas en el medio líquido para citología.

5.4.5 Otros ensayos de amplificación de ácidos nucleicos

Los ensayos descritos anteriormente se basan en la información disponible al momento de redactarse este manual. Actualmente se están poniendo a punto y evaluando varias pruebas de amplificación de ácidos nucleicos nuevas y, dada la naturaleza cambiante en este ámbito, podemos esperar una proliferación de pruebas nuevas. Los laboratorios deben revisar la bibliografía a medida que las descripciones de estos ensayos nuevos se encuentren publicadas. Por otro lado, en muchos entornos, los ensayos autorizados por la FDA no se encuentran fácilmente en el mercado o no pueden realizarse debido a las exigencias de instrumental especializado o al costo elevado. En consecuencia, los ensayos que están comercializados y que no han sido examinados por la FDA y otros que han desarrollado los propios laboratorios se usan como métodos que proporcionan una mayor sensibilidad con respecto a otras técnicas de análisis (por ejemplo, IFD, ELISA). En el caso de que se utilicen PAAN no autorizadas por la FDA, deben existir procedimientos normativos internacionales —como los de la Unión Europea— u otros procedimientos normativos nacionales que garanticen la calidad y el desempeño de esas PAAN. (17, 18). En estos casos también es fundamental que los laboratorios se comprometan a hacer una validación rigurosa del desempeño de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos antes de usarlas para la obtención de resultados de pacientes; véase también el capítulo 2 y el anexo 3 con respecto a las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos y su validación y control de la calidad.

5.5 Métodos de detección que no están basados en ácidos nucleicos

5.5.1 Ensayo de inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia directa utiliza un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína para permitir la visualización al microscopio de cuerpos elementales de *C. trachomatis* en los frotis celulares recogidos de la conjuntiva, la uretra o el endocérvix. Es el único tipo de prueba que mantiene la capacidad de evaluar la calidad de la muestra directamente; sin embargo, la inmunofluorescencia directa adolece de sensibilidad suficiente incluso en relación con el cultivo.

Dos ensayos directos con anticuerpo fluorescente, la tinción directa de MicroTrak (Trinity Biotech, Irlanda) y la tinción directa de Pathfinder (BioRad Laboratories, EUA), se comercializan para la tinción de los frotis recogidos de la uretra, el endocérvix, el recto, la orofaringe y la conjuntiva destinados a la visualización de los cuerpos elementales de las clamidias. El ensayo MicroTrak usa un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína específico de la proteína principal de la membrana externa de *C. trachomatis* y no presenta reacción cruzada con *C. pneumoniae*.

Por el contrario, el reactivo de Pathfinder usa un anticuerpo policlonal específico frente al lipopolisacárido (LPS) que es más reactivo y teñirá *C. pneumoniae* así como *C. trachomatis*. La inmunofluorescencia directa se usa con mayor frecuencia para la tinción de frotis conjuntivales, predominantemente en los recién nacidos de países desarrollados. Estos ensayos ofrecen la ventaja de la rapidez en la obtención de los resultados, la elevada especificidad y la detección de microorganismos no viables. Además, ningún otro ensayo comercializado tiene especificaciones reglamentarias para las muestras conjuntivales ni tiene la capacidad de evaluar la calidad de la muestra directamente. Sin embargo, la sensibilidad de la inmunofluorescencia directa es sustancialmente inferior a la de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos, es difícil e inadecuada para un diagnóstico que precise una capacidad analítica ultrarrápida y exige microscopistas con gran experiencia. Los resultados negativos deben interpretarse con cautela debido al escaso desempeño de estas pruebas que pueden pasar por alto algunas infecciones.

5.5.2 Pruebas diagnósticas en el punto de atención

Los enzoinmunoanálisis tienen una sensibilidad baja y la especificidad es insuficiente (especialmente los ELISA que detectan el lipopolisacárido) en comparación con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, que pueden requerir confirmación de los resultados positivos. Los resultados negativos deben interpretarse con precaución debido al bajo desempeño de estas pruebas que pueden pasar por alto algunas infecciones sin detectarlas. Debido a esta limitación de los ELISA existentes, dichas pruebas no deberían usarse cuando haya otras opciones al alcance.

Sin embargo, a diferencia del ELISA, las pruebas diagnósticas en el punto de atención (“pruebas rápidas”) que utilizan la técnica de ELISA tienen ventajas que las hacen aconsejables en entornos específicos. Se han desarrollado varias pruebas diagnósticas en el punto de atención, generalmente basadas en formatos de flujo lateral y captación del antígeno de membrana en tiras inmunocromatográficas, para el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis*. Muchos de estas se han puesto a punto y comercializado, pero la mayoría no se han sometido a una evaluación adecuada e integral. Sin embargo, cuando se comparan con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, estas pruebas rápidas presentan una sensibilidad claramente insuficiente y solo deben usarse si no existen los laboratorios idóneos. En el anexo 2 se trata el fundamento de las pruebas diagnósticas en el punto de atención. A pesar de la baja sensibilidad de estas pruebas analíticas, en las poblaciones con recursos limitados y muy vulnerables, una disminución de la sensibilidad puede ser aceptable a cambio de poder realizar los análisis y administrar un tratamiento al paciente mientras aún está en el lugar en el que se presta la asistencia sanitaria (29).

En un estudio de análisis de decisiones realizado por Gift *et al.*, cuando el porcentaje de pacientes que regresaban para recibir tratamiento era del 65% o menos, el diagnóstico inmediato con pruebas en el punto de atención proporcionaba un aumento del número de pacientes tratados aunque se identificaran menos infecciones (30). Las pruebas diagnósticas en el punto de atención también podrían usarse en estos entornos para aumentar la especificidad de los algoritmos de manejo sindrómico, que reducirán el

tratamiento excesivo y detectarán las infecciones asintomáticas.

Las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención brindan una mayor oportunidad para llegar a las poblaciones sin acceso a ambulatorios y les proporcionan un tratamiento inmediato. En algunas circunstancias, las consecuencias del aumento de tratamientos administrados a los pacientes puede compensar la menor sensibilidad de estas pruebas comparadas con las de amplificación de ácidos nucleicos.

- Las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención brindan una mayor oportunidad para llegar a las poblaciones sin acceso a servicios ambulatorios y les proporcionan un tratamiento inmediato. En algunas situaciones, las consecuencias del aumento del tratamiento administrado a los pacientes pueden compensar la menor sensibilidad de estas pruebas comparadas con las PAAN.

5.6 Métodos de uso únicamente en los laboratorios de referencia

5.6.1 Cultivo

Hasta principios de los años ochenta, el principal método de referencia para el diagnóstico de la infección por *C. trachomatis* consistía en centrifugar muestras clínicas que se inoculaban después a células viables susceptibles de cultivo tisular, seguido de visualización de las inclusiones clamidiales características tras la incubación. En resumen, la muestra se recogía con hisopos de dacrón o citocepillos y se introducía en un tubo con medio de transporte tamponado que contenía, por ejemplo, sacarosa, fosfato y glutamato (véase el anexo 4) y suero fetal bovino con antibióticos (vancomicina, gentamicina) y antifúngicos (nistatina) para inhibir el crecimiento de otras bacterias y hongos. Aunque actualmente este método debe reservarse para los laboratorios de referencia, es importante mantener la capacidad de obtener de vez en cuando cepas aisladas de pacientes, y para ello hay que recurrir a los cultivos tisulares.

5.6.1.1 Cultivo de *C. trachomatis* en la línea celular McCoy

- Separación de matraces
 - Comprobar la esterilidad de los medios antes del uso.
 - Comprobar visualmente las monocapas confluentes y la ausencia de contaminación microbiana.
 - Proseguir con una técnica estéril y trabajando en una cabina de bioseguridad. Aspirar los medios del matraz confluyente con una pipeta estéril y un matraz de vacío.
 - Lavar la monocapa con 10 ml de solución de glucosa-potasio-sodio-fosfato (GKNP) (véase anexo 4) y aspirar.
 - Agregar 4 ml de tripsina e incubar las células a temperatura ambiente hasta separar la monocapa del matraz (aproximadamente 3 a 7 minutos). Golpear levemente los lados del matraz para despegar las células.
 - Agregar 4 ml de medio Dulbecco con modificación de Iscove (IMDM-VGA) (véase anexo 4) para inactivar la tripsina y mezclar bien. Usar el líquido para arrastrar posibles restos de células de la parte posterior del matraz.
 - Agregar 1 ml de esta suspensión de células a cada uno de los nuevos matraces de 175 cm² y completar hasta 75 ml con IMDM-VGA. Cuando se siembre un matraz de 75 cm², agregar 0,5 ml y completar hasta 35 ml.
 - Incubar los matraces a 37 °C durante 48 a 96 horas herméticamente cerrados.
- Siembra de las placas de microtitulación y los viales
 - Seguir los pasos anteriores de 1 a 6.
 - Para sembrar cada placa se necesitan 15 ml de una suspensión celular diluida. Calcular el volumen total necesario teniendo en cuenta el número de placas. Por ejemplo, para 10 placas se necesitan 150 ml de IMDM-VGA. Para cada vial se necesita 1 ml de medio de Eagle modificado (MEM-VG) (véase el anexo 4); calcular

el volumen total necesario teniendo en cuenta el número de viales.

- Para cada 50 ml de IMDM-VGA de las placas de microtitulación, agregar 1 ml de la suspensión de células del matraz tripsinizado. Por ejemplo, para 150 ml de IMDM-VGA se necesitan 3 ml de células. Para cada 100 ml de IMDM-VGA de los viales, agregar 1 ml de células.
 - Cargar un hemacitómetro con la suspensión de células diluida. Hacer el recuento en 5 cuadrados (las 4 esquinas y el centro); el número medio de células contadas por cuadrado se multiplica por 10^5 para obtener el número de células por mililitro. Las placas de microtitulación requieren de 1 a $1,4 \times 10^6$ células/ml (10–14 células por cuadrado); los viales requieren de 7 a 10×10^5 células/ml para que la capa sea confluyente en 48 horas. Si el número de células contado está fuera del intervalo, se ajusta la concentración agregando más IMDM-VGA o más células del matraz según convenga. Volver a hacer el recuento y ajustar hasta lograr la concentración correcta.
 - Agregar 200 μ l a cada pocillo. Tapar las placas con una película de sellado. Agregar 1 ml a cada vial y cerrar herméticamente.
 - Incubar a 37 °C hasta su uso (entre 48 y 96 horas).
 - Inoculación de las placas de microtitulación
 - Comprobar que la monocapa de células de la línea McCoy sea confluyente. Las células deben tocarse y estar ligeramente aglomeradas. El medio debe estar transparente.
 - Las muestras de origen cervicouterino, uretral, vaginal, rectal, orofaríngeo y conjuntival deben analizarse en placas microtitulación.
 - Agitar con una agitadora vorticial durante 5 segundos y luego homogeneizar, si es posible, durante 20 segundos. Se deben proteger oídos y ojos durante la homogeneización.
 - Las muestras que presentan gran contaminación bacteriana (por ejemplo, medio de transporte turbio o cambio de pH del medio) pueden causar toxicidad en el cultivo tisular. Estas
- muestras deben analizarse sin diluir y diluidas en proporción de 1:2 y 1:10 (en medio de sacarosa-fosfato-glutamato).
- Trabajar en una cabina de bioseguridad. Colocar la mitad de cada muestra en el criovial con el mismo número de la muestra.
 - Aspirar las placas que contienen monocapas confluentes.
 - Agregar 100 μ l de cada muestra y distribuirlos en capas sobre la monocapa de células. Cada muestra se inocula sobre tres monocapas consecutivas. Una vez finalizada la inoculación de cada placa, agregar 200 μ l de IMDM-VGA en cada pocillo.
 - Tapar las placas con una película de sellado y centrifugar a 1400 *g* durante 1 hora a 30 °C. Incubar a 37 °C durante 48 horas.
 - Conservar las muestras a –70 °C hasta que se obtengan los resultados. Todas las muestras positivas se conservan más de 2 semanas.
 - Eliminar el medio de las placas. Fijar las monocapas cubriéndolas con metanol durante 10 minutos. Eliminar el metanol.
- Inoculación de los viales
 - Solo algunas muestras excepcionales se cultivan en viales. Por ejemplo las biopsias de endometrio, las de trompas de Falopio y las de tejido de los ganglios linfáticos.
 - Comprobar en los viales que las células de McCoy sean confluentes; las células deben tocarse y estar levemente alargadas. El medio debe estar transparente.
 - Agitar las muestras con una agitadora vorticial durante 5 segundos y luego homogeneizar con ultrasonidos durante 20 segundos. Durante la homogeneización se deben proteger los oídos y los ojos.
 - Las muestras que presentan gran contaminación bacteriana (por ejemplo, medio de transporte turbio o cambio de pH del medio) pueden causar toxicidad en el cultivo tisular. Estas

en proporción de 1:2 y 1:10 (en medio de sacarosa-fosfato-glutamato).

- Etiquetar y aspirar tres viales por muestra en la cabina de bioseguridad. Agregar 0,2 ml de la muestra a cada vial. Cubrir con 1 ml de IMDM-VGA.
- Centrifugar a 2500 *g* durante 1 hora a 30 °C. Incubar a 37 °C durante 72 horas.
- Conservar todas las muestras a –70°C hasta que se obtengan los resultados. Todas las muestras positivas se conservan indefinidamente.
- Aspirar el medio de 1 vial por muestra y fijar cubriendo la monocapa con metanol durante 10 minutos.
- Teñir con anticuerpos fluorescentes.
- Seguir las instrucciones del prospecto relativas al anticuerpo específico anticlamidia que se use. En general:
 - Distribuir en capas el antisuero en la monocapa fijada (después de la extracción del metanol). En los pocillos de microtitulación se ponen 40 µl de antisuero en cada uno con un pipeteador multicanal.
 - Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - Enjuagar suavemente tres veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) (véase el anexo 4).
 - Las placas se leen de la siguiente manera, retirar el cubreobjetos redondo de 13 mm de los viales y, utilizando líquido de montaje, colocar en portas de vidrio con cubreobjetos de 22 × 50 mm. Mantener los cultivos teñidos en la oscuridad hasta que se lean. Los cultivos deben leerse el mismo día que se tiñen.

En la mayoría de los laboratorios, el cultivo ya no es una prueba diagnóstica idónea dado que es mucho menos sensible que la prueba de amplificación de ácidos nucleicos, el tiempo de obtención del resultado es significativamente más largo, la toma de muestra es traumática, requiere condiciones de manipulación más exigentes para preservar la viabilidad de *C.*

trachomatis, es técnicamente compleja y carece de métodos internacionalmente estandarizados y con garantía de la calidad. El cultivo se solicita hoy en día predominantemente en casos médico-forenses, debido a la supuesta especificidad del 100% (aunque se produce contaminación cruzada entre las muestras) y para las analíticas de las pruebas de curación que se solicitan algo antes de 14 días del inicio el tratamiento. De hecho, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos tienen la suficiente especificidad como para que sean aceptables en los casos médico-forenses, pero la confianza en el cultivo refleja la lentitud en el cambio de las normas legales.

Las pruebas de curación rara vez se realizan debido a la eficacia de los tratamientos con dosis única que existen actualmente; sin embargo, algunos estudios recientes han señalado que la eficacia de la azitromicina 1 g era insuficiente para la erradicación. Cuando se realizan estas pruebas, se suelen hacer 2 a 3 semanas después del tratamiento, momento en el que, en la mayoría de los casos, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son adecuadas ya que la eliminación del DNA de la infección inicial debe estar terminada en ese momento. Sin embargo, el momento ideal para la prueba de curación puede ser distinto en el caso de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos con RNA.

Por consiguiente, a menos que las cepas aisladas se quieran utilizar con fines de investigación, hoy en día ya no hay una justificación válida para que el cultivo sea el método habitual de diagnóstico. Esto concuerda con las recomendaciones de las guías actuales de laboratorio sobre enfermedades de transmisión sexual de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (15).

Las cepas obtenidas en entornos en los que se mantiene el cultivo deben preservarse en un depósito de muestras para los estudios epidemiológicos. Estos estudios pueden incluir el antibiograma (véase más adelante) y el genotipado. El genotipado puede realizarse con técnicas moleculares y no requiere microorganismos vivos (31–33). Por consiguiente, deben mantenerse también en las diferentes regiones del mundo los depósitos de muestras que dan positiva la PAAN.

- La sensibilidad del cultivo es insuficiente comparada con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos comercializadas y autorizadas internacionalmente, y no debe recomendarse para el diagnóstico si existen PAAN idóneas y asequibles.
- La posibilidad de hacer cultivos debe mantenerse en algunos laboratorios de referencia y deben conservarse los depósitos de cepas para posibles estudios futuros fenotípicos o genéticos.

5.6.2 Antibiograma

No se dispone de pruebas inequívocas sobre la aparición de resistencia adquirida homotípica (fenotípica y genéticamente) y estable a los antibióticos recomendados para las cepas clínicas de *C. trachomatis*, aunque las observaciones clínicas han sugerido que la resistencia bacteriana es una causa del fracaso terapéutico. Además, el antibiograma *in vitro* de *C. trachomatis* nunca se ha realizado sistemáticamente, y hace falta un método con garantía de la calidad, reproducible, estandarizado y aceptado universalmente, así como una correlación fiable y con datos probados entre la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* (respuesta clínica al tratamiento) (34).

El antibiograma de *C. trachomatis* requiere mucha mano de obra especializada y práctica en la realización de cultivos tisulares, y solo es factible en los laboratorios de referencia. Sin embargo, no debería descartarse la aparición y propagación en el futuro de resistencias de importancia clínica a los antibióticos de *C. trachomatis*. Esto pone de relieve la necesidad de evaluar adecuadamente los métodos de realización del antibiograma actuales y el desarrollo de un método con garantía de la calidad y, objetivo, estandarizado y eficaz, así como la correlación entre la actividad *in vitro* y la respuesta al tratamiento. Este método puede ser útil en el futuro para vigilar la posible resistencia a los antibióticos, los estudios de tratamiento clínico y la evaluación de la actividad *in vitro* de los antibióticos nuevos. En caso de propagación de la resistencia a los antibióticos de importancia clínica de *C. trachomatis*, los depósitos de las cepas serán útiles para evaluaciones retrospectivas en los centros de investigación.

5.6.3 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por clamidias fueron las primeras técnicas utilizadas.

Estas pruebas identifican y, en algunos casos, valoran el grado de respuesta de los anticuerpos frente a los antígenos de clamidia. Aunque las primeras pruebas, fijación de complemento y microinmunofluorescencia, dependían de microorganismos enteros, se desarrollaron pruebas posteriores que son específicas para proteínas individuales o determinadas clases de anticuerpo. Estas pruebas pueden ayudar al diagnóstico o cribado de infecciones complicadas por *C. trachomatis* (artritis reactiva, EPI, embarazo ectópico, infertilidad de causa tubéutica), servir para el diagnóstico de la neumonía neonatal y el linfogranuloma venéreo (véase el capítulo 11) y ser valiosas en investigación y estudios epidemiológicos, por ejemplo, para los antecedentes de exposición acumulada a la infección por clamidias de una muestra de población. No obstante, es importante interpretar siempre con cautela los resultados serológicos y nunca fuera de contexto.

En las infecciones agudas primarias por clamidias se detectará IgM específica, pero también IgG e IgA. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos sistémica puede estar retardada o no ser cuantificable tras la infección urogenital sin complicaciones.

Por el contrario, concentraciones elevadas de anticuerpos frente a *C. trachomatis* pueden persistir mucho tiempo después de que haya desaparecido la infección. En consecuencia, debido a la sensibilidad y especificidad bajas, la determinación de los anticuerpos anticlamidia tienen un valor limitado para el diagnóstico de las infecciones agudas por *C. trachomatis* y no debe usarse en el diagnóstico habitual de las infecciones sin complicaciones causadas por esta especie.

- No usar las pruebas serológicas en el diagnóstico de las infecciones sin complicaciones por *C. trachomatis*.
- Usar las pruebas serológicas solo como una posible ayuda en el diagnóstico o cribado de las infecciones complicadas por *C. trachomatis*, la neumonía neonatal y el linfogranuloma venéreo, así como en los estudios epidemiológicos.

5.7 Referencias

- Schachter J et al. Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: all NAATs are not created equal. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(3):1372–1373.
- Martin DH et al. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient “gold standard” in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(10):4749–4758.
- Masek BJ et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internet-based screening program. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(6):1663–1667.
- Hobbs MM et al. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(1):8–13.
- Bachmann LH et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(5):1827–1832.
- Mimiaga MJ et al. Gonococcal, chlamydia, and syphilis infection positivity among MSM attending a large primary care clinic, Boston, 2003 to 2004. *Sexually Transmitted Diseases*, 2009, 36(8):507–511.
- Annan NT et al. Rectal chlamydia—a reservoir of undiagnosed infection in men who have sex with men. *Sexually Transmitted Infections*, 2009, 85(3):176–179.
- Schachter J et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(7):637–642.
- Rosenberger JG et al. Reactions to self-sampling for ano-rectal sexually transmitted infections among men who have sex with men: a qualitative study. *Archives of Sexual Behavior*, 2011, 40(2):281–288.
- Dodge B et al. Field collection of rectal samples for sexually transmitted infection diagnostics among men who have sex with men. *International Journal of STD and AIDS*, 2010, 21(4):260–264.
- Black CM et al. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(10):3757–3763.
- Gaydos CA et al. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(1):304–309.
- Horner P et al. Enhanced enzyme immunoassay with negative-gray-zone testing compared to a single nucleic acid amplification technique for community-based chlamydial screening of men. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(5):2065–2069.
- Van Der Pol B et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(3):1008–1016.
- Association of Public Health Laboratories (APHL). Laboratory diagnostic testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Expert consultation meeting summary report, 13–15 January 2009 Atlanta, GA. Silver Spring, MD, APHL, 2009 (http://www.aphl.org/aphlprograms/infectious/std/Documents/ID_2009Jan_CTGLab-Guidelines-Meeting-Report.pdf).
- Mahony J et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(11):3122–3126.
- Unemo M et al. Can the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) be detected by UK NEQAS participants from seventeen European countries and five additional countries/regions in 2009? *Eurosurveillance*, 2009, 14(19). pii:19206.
- Reischl U, Straube E, Unemo M. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organised by INSTAND e.V., Germany. *Eurosurveillance*, 2009, 14(32):pii:19302.
- Marshall R et al., eds. New automated real time PCR technology for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. 11th International Symposium on Human Chlamydial Infections. Niagara-on-the-Lake, Ontario, 2006.
- Unemo M et al. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 5):1394–1404.
- Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Eurosurveillance*, 2006, 11(11):E061109.2.
- Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2011, 24(1):62–69.

23. Gaydos CA et al. Performance of the Abbott RealTime CT/ NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(9):3236–3243.
24. Felder RA et al. Process evaluation of a fully automated molecular diagnostics system. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2009, 14(5):262–268.
25. Chong S et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2):778–782.
26. Boyadzhyan B et al. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA Combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(7):3089–3093.
27. Schachter J et al. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(8):3784–3789.
28. Gaydos CA et al. Evaluation of dry and wet transported intravaginal swabs in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in female soldiers by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(3):758–761.
29. Huppert J, Hesse E, Gaydos CA. What's the point? How point-of-care STI tests can impact infected patients. *Point of Care*, 2010, 9(1):36–46.
30. Gift TL et al. The rapid test paradox: when fewer cases detected lead to more cases treated: a decision analysis of tests for *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Diseases*, 1999, 26(4):232–240.
31. Bandea CI et al. *Chlamydia trachomatis* serovars among strains isolated from members of rural indigenous communities and urban populations in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(1):355–356.
32. Lima HE et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens in Brazil. *Sexually Transmitted Diseases*, 2007, 34(9):709–717.
33. Pedersen LN, Herrmann B, Møller JK. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2009, 55(2):120–130.
34. Wang SA et al. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *Journal of Infectious Diseases*, 2005, 191(6):917–923.

Capítulo 6

Tricomoniasis

6.1 Introducción

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la infección de transmisión sexual (ITS) no viral más prevalente a escala mundial. En el 2008, la Organización Mundial de la Salud calculó que se habían producido 276,4 millones de nuevos casos de infección por *T. vaginalis* a nivel mundial en adultos de 15 a 49 años, lo que representó sustancialmente más casos de ITS que los causados por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* conjuntamente (1). A pesar de esta alta prevalencia de la infección por *T. vaginalis*, en las iniciativas de control de las ITS se ha restado históricamente importancia a este microorganismo patógeno. Aunque *T. vaginalis* puede causar un flujo o exudado vaginal anormal (tricomoniasis) en las mujeres y puede ser responsable de hasta 10 a 12% de los casos de uretritis no gonocócica en hombres (2), la infección puede ser asintomática en al menos 50% de las mujeres y en 70% a 80% de los hombres (3). Por lo tanto, el diagnóstico de laboratorio es esencial para complementar las estrategias de manejo sindrómico dirigidas al tratamiento de esta infección.

T. vaginalis es un protozoo móvil, ovoideo, con forma de pera y flagelado (de 10 a 20 µm de longitud). El organismo presenta cuatro flagelos libres anteriores y un quinto flagelo incrustado en una membrana ondulante que se extiende alrededor de los dos tercios anteriores de la célula. Los flagelos confieren al protozoo un movimiento entrecortado.

Las características epidemiológicas de la infección por *T. vaginalis* difieren en dos aspectos importantes de las de otras infecciones que también cursan con exudado genital. En primer lugar, la distribución por edades de esta infección se diferencia de la de la infección por clamidias o la gonorrea en que las tasas de prevalencia de las infecciones por clamidias, y en menor grado de las gonocócicas, alcanzan su punto máximo en las mujeres de edades comprendidas entre los 15 y 25 años, mientras que las infecciones por *T. vaginalis* parecen llegar a su prevalencia máxima en etapas

sustancialmente más tardías de la vida (entre los 40 y 50 años de edad) (4, 5). Esta diferencia en cuanto a distribución es pertinente para suministrar datos de apoyo a los programas de control de las ITS y establecer el objetivo apropiado de las actividades de tamizaje. No se ha estudiado adecuadamente la distribución específica por edades de la infección en hombres.

La segunda diferencia reside en que, a pesar de que depende de la transmisión sexual mediante el paso de huésped a huésped, la distribución por sexos de las infecciones por *T. vaginalis* diagnosticadas en laboratorio es muy asimétrica, con un cociente mujeres/hombres de hasta 4:1 (6–8). Esta distribución queda demostrada por las tasas de infección en los compañeros sexuales de las mujeres infectadas, que varían de 22% a 72% (9), y por los pocos estudios llevados a cabo en hombres y mujeres conjuntamente. Es probable que esto se deba a que la infección en hombres tiene un carácter más transitorio, a la brevedad del periodo en que el organismo se puede detectar, y al tamizaje y el diagnóstico deficientes en hombres. *T. vaginalis* se adhiere a las membranas mucosas revestidas por epitelio escamoso y no invade la mucosa. Como consecuencia del ambiente de la uretra masculina, este organismo tiene menor probabilidad de mantenerse en esa ubicación que en el medio vaginal. Existen escasos datos con respecto a la patogenia de la infección por *T. vaginalis* en hombres (8). En hombres y mujeres, este organismo a menudo produce una intensa respuesta inflamatoria que da lugar a un exudado grisáceo, signo inequívoco de enfermedad. Véase el cuadro 6.1, donde se describen las manifestaciones clínicas de la infección por *T. vaginalis*.

El diagnóstico de la tricomoniasis se basa en el olor, la calidad y la cantidad del exudado vaginal, el pH vaginal, y la posible presencia de friabilidad del cuello uterino. El pH vaginal, habitualmente superior a 6,0, el exudado grisáceo o blanco espumoso, y el cuello uterino friable y punteado (“cuello uterino de fresa”) son indicativos de una infección por *T. vaginalis*. Sin embargo, la ausencia de estos signos clínicos no constituye un dato probatorio suficiente para

Cuadro 6.1: Manifestaciones clínicas de la infección por *Trichomonas vaginalis*

Infección genital	Primarias	Secuelas
Mujeres	Exudado grisáceo, purulento, o blanco a amarillento y espumoso, disuria, dolor pelviano, prurito	Resultados adversos del embarazo, mayor riesgo de transmisión y adquisición del VIH
Hombres	Exudado uretral, disuria, dolor testicular	Posibles epididimitis y prostatitis

descartar esta infección, especialmente si se tiene en cuenta que es asintomática en casi 50% de las mujeres y 70% a 80% de los hombres (5, 6). En consecuencia, para aumentar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico, se requieren técnicas de laboratorio.

La respuesta inflamatoria de la tricomoniasis en mujeres y de la uretritis por *T. vaginalis* en hombres es significativa, y aumenta sustancialmente el riesgo de transmisión y adquisición del VIH, así como la probabilidad de resultados adversos del embarazo. En hombres, el tratamiento de la uretritis por *T. vaginalis* logra una disminución de 0,5 a 2 log de la carga viral del VIH en el líquido seminal (10, 11). Se han observado resultados similares en mujeres tratadas por la presencia de exudado vaginal (12, 13). En vista de que la carga viral en el compartimiento genital constituye uno de los factores de riesgo más significativos de transmisión a una pareja no infectada, el diagnóstico y el tratamiento apropiado de las infecciones por *T. vaginalis* deben ser una prioridad de salud pública como estrategia de reducción de la infección por el VIH. De manera análoga, desde hace muchos años se dispone de datos indicativos de que la presencia de ITS que cursan con exudado aumenta el riesgo de adquisición del VIH. En estudios realizados en el África subsahariana se ha calculado que en mujeres con tricomoniasis el riesgo de seroconversión del VIH es de 1,5 a 3,0 veces superior (9). Estos estudios se han llevado a cabo en poblaciones de mujeres con alto riesgo de infección por el VIH (profesionales del sexo) y en poblaciones más generales (mujeres que acuden a los consultorios de planificación familiar). En el análisis de supervivencia realizado durante un amplio estudio llevado a cabo en consultorios se calculó que el riesgo relativo de infección por el VIH a lo largo de un período de 30 meses en mujeres con tricomoniasis se incrementa el doble (14). Por otra parte, las mujeres con infección por el VIH presentaron un incremento del riesgo de contraer tricomonas de 2,1 veces durante los 30

meses de seguimiento (14). Ello indica un mayor riesgo de transmisión a las parejas no infectadas por el VIH. Ante el mayor riesgo de incremento de la transmisión del VIH, similar al observado en las personas con gonorrea, y las tasas de prevalencia, que son casi tres veces mayores, el diagnóstico y el tratamiento apropiados de la infección por *T. vaginalis* merecen una mayor prioridad.

- Las infecciones por *T. vaginalis* son las ITS no virales más frecuentes, favorecen la transmisión y la adquisición del VIH, y aumentan la probabilidad de resultados adversos del embarazo.

6.2 Descripción de los métodos de diagnóstico disponibles

Existen cuatro tipos principales de pruebas de diagnóstico de laboratorio: el estudio microscópico en fresco, la detección antigénica, el cultivo y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN). El estudio microscópico en fresco puede llevarse a cabo en los entornos clínicos y en combinación con las pruebas diagnósticas de la vaginosis bacteriana, y es un método ideal de diagnóstico de primera línea. Esto significa que, si se lo lleva a cabo y se lo interpreta adecuadamente y el resultado es positivo, proporciona un diagnóstico definitivo con una alta especificidad. Sin embargo, es preciso proceder con cautela al descartar la infección con base exclusivamente en un estudio microscópico negativo, principalmente por tres razones. En primer lugar, las tricomonas son muy sensibles a la temperatura y pierden su motilidad en tan sólo diez minutos tras la obtención de la muestra. Dado que la motilidad constituye una característica distintiva, la pérdida de motilidad puede dar lugar a resultados negativos falsos. En segundo lugar, el tamaño de las tricomonas es similar al de los leucocitos (linfocitos o pequeños granulocitos

neutrófilos), a menudo presentes como resultado del proceso inflamatorio. Por lo tanto, las tricomonas pueden encontrarse ocultas o confundirse con estas células. Por último, en muchas mujeres y en la mayor parte de los hombres, la carga de organismos puede estar por debajo del límite a partir del cual pueden ser detectados al microscopio. Además de las muestras de hisopado vaginal, el estudio microscópico también puede llevarse a cabo con el exudado uretral o el sedimento de orina de los hombres, pero es una técnica de baja sensibilidad, probablemente como consecuencia de la baja carga de organismos (15).

Actualmente, en muchos entornos se dispone de pruebas de detección antigénica en el punto de atención (PA). Únicamente han sido aprobadas para el estudio de muestras de hisopado vaginal. La última generación de este tipo de pruebas, por ejemplo, la Prueba Rápida de Tricomonas de OSOM (Genzyme Diagnostics, EUA), presenta una sensibilidad superior a la del estudio microscópico (16, 17) y puede proporcionar resultados en aproximadamente 30 minutos, es decir, mientras la paciente espera. Del mismo modo que ocurre con otras pruebas en el PA, la oportunidad de tratar las infecciones de inmediato constituye una ventaja de este tipo de pruebas en comparación con las pruebas que requieren la derivación a un laboratorio central.

Hace muchos años que se dispone de técnicas de cultivo basadas en el laboratorio y, en el último decenio, también se dispone de estuches comerciales para el cultivo como el sistema de cultivo InPouch TV (BioMed Diagnostics, EUA). Los hisopados vaginales, los hisopados uretrales y el sedimento de orina en hombres constituyen los tipos de muestra autorizados para el cultivo (véase el cuadro 6.2). Este método requiere un periodo de hasta 5 a 7 días tras la obtención de la muestra y es necesario el estudio microscópico para determinar los resultados. Sin embargo, el cultivo muestra una sensibilidad muy superior a la del estudio microscópico en fresco (15–17).

Por último, se dispone de las PAAN para la detección del DNA o el RNA específicos de *T. vaginalis*. En los programas que emplean las PAAN para la detección de las infecciones por clamidias y la gonorrea, la inclusión de las pruebas diagnósticas de *T. vaginalis* puede ser una estrategia razonable. Al momento de redactarse este documento, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA)

había aprobado únicamente una prueba, pero se están evaluando otras, que es posible que ya estén disponibles en algunos entornos. La sensibilidad y la especificidad de la prueba aprobada por la FDA (APTIMA TV, Gen-Probe, EUA) son muy altas (5, 16, 18). Es preciso evaluar con rigor las características de desempeño de las otras PAAN, idealmente comparándolas con la prueba aprobada por la FDA, en el entorno donde se van a emplear y antes de la ejecución de medios de diagnóstico corrientes en el laboratorio.

Se han descrito varios métodos para la detección de anticuerpos contra *T. vaginalis*. Sin embargo, las pruebas de anticuerpos tienen una sensibilidad baja y una especificidad subóptima para la detección de una infección activa por *T. vaginalis*, y no deben utilizarse para el diagnóstico corriente de la tricomoniasis.

El cuadro 6.3 resume las características de desempeño de las pruebas diagnósticas disponibles para la detección de *T. vaginalis*. Para un desempeño apropiado de todos los métodos de diagnóstico, es crucial seguir minuciosamente los procedimientos normalizados de trabajo y las recomendaciones del fabricante en cuanto a la toma, el transporte y el almacenamiento de las muestras, así como el desempeño de la prueba específica, incluidos los controles de calidad.

- Las pruebas en el PA y el cultivo, si son apropiados, muestran una sensibilidad mayor que el estudio microscópico.
- Las PAAN, si son apropiadas y están validadas, muestran una sensibilidad mayor que otros métodos de diagnóstico.

6.3 Toma, transporte y conservación de las muestras (véase el cuadro 6.2)

Mujeres

Las muestras vaginales son óptimas para la detección de *T. vaginalis*. La toma de una muestra del fondo de saco vaginal posterior debe llevarse a cabo mediante el empleo de un hisopo de Dacrón o rayón con mango de plástico. Los hisopos de algodón con mango de madera son aceptables para el estudio microscópico o la siembra de cultivo, pero no se recomiendan para las pruebas en el PA o las PAAN. Por consiguiente, para evitar confusión, en la práctica conviene evitar

Cuadro 6.2: Toma, transporte y conservación de las muestras

Origen	Dispositivo de toma de muestra	Procedimiento de toma de la muestra	Estudio microscópico	PA	Cultivo	PAAN
Vagina (obtenida por el médico)	Hisopo con mango de plástico ^a	Tome una muestra del fondo de saco vaginal posterior antes de la inserción del espéculo.	Elúya en ≤ 0,5 ml de solución salina, vierta una gota de solución salina en el portaobjetos y cubra con el cubreobjetos.	Deposítela en el amortiguador de extracción del estuche y siga las instrucciones incluidas en el paquete.	Deposítela directamente en el medio de cultivo (por ejemplo, de Diamond o InPouch). ^b	Deposítela en el dispositivo de recolección del fabricante. Se puede enviar en seco al laboratorio. Almacénela y transpórtela según las instrucciones incluidas en el paquete.
Vagina (obtenida por la paciente)	Hisopo con mango de plástico ^a	Haga rotar el hisopo 360°, tocando todas las paredes de la vagina.	Entréguela al proveedor para su elución y la preparación del frote o extendido.	Entréguela al laboratorio para su procesamiento según la descripción previa.	Entréguela al laboratorio para su siembra en un medio de cultivo.	Deposítela en el dispositivo de recolección del fabricante. Se puede enviar en seco al laboratorio. Almacénela y transpórtela según las instrucciones.
Uretra (únicamente en hombres sintomáticos)	Hisopo con mango de aluminio ^c	Obtenga los exudados uretrales >1 hora después de la micción anterior.	Elúya en ≤ 0,5 ml de solución salina, vierta una gota de solución salina en el portaobjetos y cubra con el cubreobjetos.	NP	Deposítela directamente en el medio de cultivo (por ejemplo, de Diamond o InPouch). ^b Incube a 37° C.	Deposítela en el dispositivo de recolección del fabricante. Almacénela y transpórtela según las instrucciones incluidas en el paquete.
Orina	Recipiente estéril de orina	No es necesario que el paciente limpie su zona genital. Obtenga la primera porción de la micción (en general menos de 25 ml), >1 hora después de la micción anterior.	Centrifugue a 500 g durante 5 min. Deposite el sedimento en ≤ 0,5 ml de solución salina, vierta una gota de solución salina en el portaobjetos y cubra con el cubreobjetos.	NP	Centrifugue a 500 g durante 5 min. Deposite el sedimento en el medio de cultivo (por ejemplo, de Diamond o InPouch). ^b Incube a 37° C.	Deposítela en el dispositivo de recolección del fabricante. Almacénela y transpórtela según las instrucciones incluidas en el paquete.

NP: no procede; PAAN: pruebas de amplificación del ácido nucleico; PA: en el punto de atención.

^a Hisopos de Dacrón o rayón con mango de plástico.

^b En los sitios en que no se tiene acceso a un medio de cultivo, los hisopados se pueden colocar en tubos que contengan medio Amies y almacenarse a 4 °C para su transporte, de manera que lleguen al laboratorio central en un plazo de 24 horas.

^c Hisopos de Dacrón o rayón con mango de aluminio.

Cuadro 6.3: Características de desempeño de las pruebas diagnósticas para la detección de *T. vaginalis*

	Estudio microscópico	PA	Cultivo	PAAN
Tipos de muestra				
Hisopado endocervical	No	No	No	Sí
Citología en medio líquido	No	No	No	Sí
Hisopado vaginal	Sí	Sí	Sí	Sí
Autorrecolectado	Sí	Sí	Sí	Sí
Obtenido por el médico	Sí	Sí	Sí	Sí
Orina				
Mujeres	No	No	No	Sí
Hombres	Sí	No	Sí	Sí
Hisopado uretral masculino	Sí	No	Sí	Sí
Desempeño				
Sensibilidad	Baja	Alta ^a	De moderada a alta	Muy alta
Especificidad	Muy alta	Muy alta	Muy alta	Muy alta
Otras consideraciones				
Costo	Bajo	Moderado	Moderado	Alto
Transporte y almacenamiento	NP	NP	En condiciones ambientales	En condiciones ambientales
Instrumental	Microscopio	Ninguno	Incubadora, microscopio	Requiere mucho espacio
Rendimiento/ automatización	Bajo/no	Bajo/no	Bajo/no	Alto/posible
Complejidad técnica	Moderada (aptitudes para el examen microscópico)	Baja	Moderada (aptitudes para el examen microscópico)	Alta
Nivel de infraestructura de laboratorio	Periférico	Periférico	Intermedio o central	Central
Otras observaciones	<ul style="list-style-type: none"> Son más probables los resultados negativos falsos que los resultados negativos reales; por lo tanto, el contexto clínico es fundamental. 	<ul style="list-style-type: none"> Las infecciones detectadas se pueden tratar antes de que la paciente salga del consultorio. 	<ul style="list-style-type: none"> Se requiere prestar una estricta atención a la realización de un estudio microscópico minucioso. La posibilidad de obtener cepas viables resulta útil para llevar a cabo pruebas diagnósticas adicionales, tales como la genotipificación y el antibiograma. 	<ul style="list-style-type: none"> Ante la posible contaminación de laboratorio, se requiere una estricta adherencia a los protocolos. Algunas requieren un lote de gran tamaño y ello puede retrasar la entrega de resultados.

NP, no procede; PAAN, pruebas de amplificación del ácido nucleico; PA, en el punto de atención.

^a Se refiere a la Prueba Rápida de Tricomonas de OSOM (Genzyme Diagnostics, EUA).

el uso de hisopos de algodón. Las muestras pueden ser obtenidas por el médico antes de la inserción de un espéculo durante la exploración ginecológica o por la propia paciente. El médico debe proporcionar instrucciones para garantizar que la paciente comprenda cómo obtener sus propias muestras. Se ha comprobado que la provisión de instrucciones apropiadas constituye un factor determinante de la aceptabilidad de la autorrecolección de muestras por parte de las pacientes. Las muestras residuales (vaginales, de cuello uterino u orina) obtenidas para llevar a cabo pruebas diagnósticas de las infecciones por clamidias o la gonorrea pueden emplearse para las PAAN de *T. vaginalis*.

Hombres

Se pueden obtener exudados uretrales mediante el empleo de un hisopo de Dacrón o rayón con mango de aluminio. Estas muestras se pueden emplear para el estudio microscópico en fresco, el cultivo o las PAAN. La primera orina del día puede ser centrifugada para obtener un sedimento apropiado para el cultivo. La orina no centrifugada es adecuada para llevar a cabo las PAAN.

6.4 Métodos de diagnóstico

6.4.1 Estudio microscópico

Inmediatamente después de la obtención de la muestra, los hisopados deben eluirse en $\leq 0,5$ ml de una solución salina estéril a temperatura ambiente. Se debe depositar en el portaobjetos una gota de la muestra eluída y cubrir con un cubreobjetos. La extensión debe examinarse a 100 aumentos durante los diez minutos posteriores a la recolección en busca de tricomonas móviles. La confirmación de la característica forma de pera, al igual que la visualización de los flagelos, debe llevarse a cabo a 400 aumentos (fig. 6.1). Las células no móviles no pueden diagnosticarse como tricomonas y, por ello, es crucial la inmediatez del estudio microscópico, dado que las tricomonas pierden rápidamente su motilidad (19). La sensibilidad de la microscopia es limitada (sólo de 40% a 65% para muestras de mujeres en algunos entornos y aun menor para muestras de hombres) (6, 15, 16). En consecuencia, los resultados negativos deben interpretarse con cautela.

En algunos entornos, el estudio microscópico constituye el método de diagnóstico y tamizaje de primera línea. Las muestras negativas se remiten a un laboratorio

central para una evaluación adicional, en particular en casos de personas sintomáticas. Sin embargo, cuando se detectan la motilidad (estrictamente necesaria) y la morfología características, la especificidad de este método es excelente y todos los pacientes cuyos resultados del estudio microscópico son positivos se consideran infectados.

Para obtener resultados óptimos, el estudio microscópico, que presenta la mayor sensibilidad en mujeres sintomáticas, se debe llevar a cabo e interpretarse durante los 10 minutos posteriores a la obtención de la muestra.

- Para obtener resultados óptimos, el estudio microscópico, que presenta la mayor sensibilidad en mujeres sintomáticas, se debe llevar a cabo e interpretarse durante los 10 minutos posteriores a la obtención de la muestra.

6.4.2 Pruebas de detección de antígenos en el punto de atención (PA)

Se han elaborado diversas pruebas de detección de antígenos para el diagnóstico de *T. vaginalis* (16, 17, 20). Los requisitos en cuanto a equipo y los costos de los reactivos varían, y el desempeño de las pruebas también es variable. Algunas de estas pruebas van destinadas a su uso exclusivo en mujeres sintomáticas, lo que las hace menos útiles que las otras opciones. La última generación de este tipo de pruebas, por ejemplo, la Prueba Rápida de Tricomonas de OSOM (Genzyme

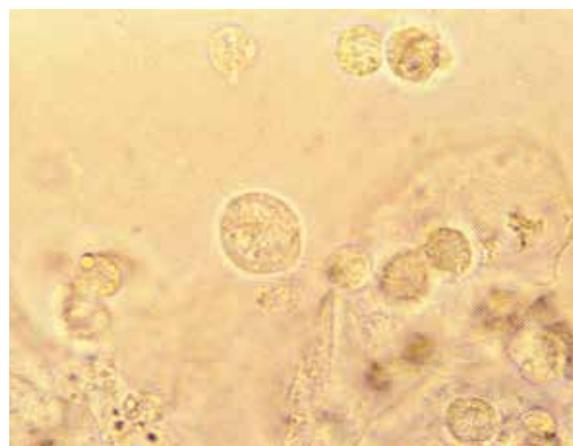


Figura 6.1
Trichomonas vaginalis al estudio microscópico en fresco

Diagnosics, EUA), muestra una sensibilidad superior al estudio microscópico (16, 17). Los procedimientos variarán de acuerdo con el fabricante y deben seguirse minuciosamente las instrucciones incluidas en el paquete para cada prueba específica.

Las pruebas en el PA, si son apropiadas, muestran una sensibilidad sustancialmente mayor que el estudio microscópico, proporcionan resultados rápidos y solo requieren mínimos conocimientos técnicos especializados.

- Las pruebas en el PA, si son apropiadas, muestran una sensibilidad sustancialmente mayor que el estudio microscópico, proporcionan resultados rápidos y solo requieren conocimientos técnicos especializados mínimos.

6.4.3 Cultivo

Durante muchos años, el cultivo ha sido la piedra angular del diagnóstico de *T. vaginalis*. *T. vaginalis* es un organismo anaerobio que crece más lentamente en condiciones aeróbicas. En la actualidad, el cultivo se lleva a cabo habitualmente mediante el empleo del medio de Diamond modificado o del sistema de cultivo comercial InPouch TV (BioMed Diagnostics, EUA) (fig. 6.2). El tiempo de incubación debe ser de hasta 5 a 7 días. Es importante señalar que *T. vaginalis* debe crecer en el fondo del tubo o la bolsa de cultivo y, en consecuencia, el tubo o los tubos deben incubarse en una posición vertical. Además, el medio de cultivo se



Figura 6.2
Sistema de cultivo InPouch TV

debe reducir previamente y los tubos de cultivo se deben dejar algo abiertos antes de disponerlos en un recipiente anaerobio para su incubación a 37 °C.

El medio de Diamond original (21, 22) (véase el anexo 4) ha sido modificado posteriormente según el método de Fouts y Kraus, en que la estreptomycin es reemplazada por netilmicina (22, 23). El medio modificado mejora la sensibilidad hasta aproximadamente 75% en relación con las PAAN. Sin embargo, el cultivo de *T. vaginalis* presenta también desventajas: la sensibilidad del cultivo es baja en comparación con los resultados obtenidos por las PAAN (especialmente en hombres), se trata de un procedimiento lento y requiere que el paciente vuelva para recoger los resultados. También se han descrito otros medios de cultivo (22, 24–26) (véase el anexo 4). Los hisopados deben eluirse o el sedimento de orina debe ser inoculado, directamente en el medio de cultivo, en el punto donde se presta la atención médica. En los sitios en que no se tiene acceso a un medio de cultivo debido a que el período máximo de almacenamiento es breve o por otras razones, los hisopados se pueden colocar en tubos que contengan medio Amies y almacenarse a 4 °C para su transporte, de manera que lleguen al laboratorio central en un plazo de 24 horas. Se debe mezclar suavemente el cultivo y obtener una gota del fondo del tubo (donde la concentración de tricomonas es más alta) para el estudio microscópico en fresco, cada día durante hasta 7 días. Si no es posible realizar este estudio diariamente, el examen al cabo de 3 o 4 días y nuevamente a los 7 días será suficiente para detectar casi todas las muestras positivas.

A mediados de los años noventa, se comercializó un sistema de cultivo que incrementó el empleo del cultivo como método diagnóstico (22, 27–30). Este sistema de cultivo, denominado InPouch TV, utiliza una bolsa independiente de dos cámaras (fig. 6.2). Las muestras de hisopado se eluyen o el sedimento de orina se inocula en el medio de la primera cámara, se fuerza el desplazamiento del medio a la segunda cámara y la bolsa se cierra herméticamente. Las bolsas son transportadas al laboratorio para su incubación a 37 °C durante hasta 5 días.

El cultivo en bolsa puede concluirse antes que el cultivo estándar ya que cada vez se evalúa todo el volumen. Las bolsas selladas se leen mediante la colocación de toda la bolsa en la platina del microscopio a 100 aumentos. La bolsa posee unos soportes que encajan en las pinzas del portaobjetos y sirven para ayudar a desplazar la bolsa

durante el estudio microscópico. Se examina el cultivo explorando minuciosamente toda su extensión de extremo a extremo. Es importante señalar que el espesor de la bolsa requiere que se evalúen todos los planos de foco, lo que requiere un movimiento de arriba abajo y de lado a lado. Las extensiones deben leerse diariamente hasta el quinto día. Si el último día no se observa ninguna tricomonas, se notifica que el cultivo es negativo.

- El cultivo tiene una sensibilidad similar a las pruebas en el PA, si son apropiadas, pero también se puede utilizar para llevar a cabo pruebas diagnósticas en hombres.

6.4.4 Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN)

Las PAAN ofrecen la mayor flexibilidad en cuanto a métodos de obtención de muestras, así como la sensibilidad más alta de todos los métodos de diagnóstico existentes. Las muestras genitales residuales usadas para el diagnóstico de las infecciones por clamidias y la gonorrea mediante PAAN son apropiadas para detección de ácidos nucleicos de *T. vaginalis*. Los laboratorios que realizan de manera sistemática PAAN para el diagnóstico de las infecciones por clamidias y la gonorrea deben considerar la posibilidad de llevar a cabo pruebas diagnósticas de las infecciones por tricomonas. A pesar de la diferencia en la prevalencia específica por edades, en muchos entornos la prevalencia poblacional de la infección por *T. vaginalis* es suficiente como para justificar la inclusión de su estudio como parte de las pruebas diagnósticas de las infecciones que cursan con exudado vaginal o uretral. Existen descripciones de las pruebas de laboratorio que utilizan muchas de las plataformas diagnósticas actuales de las infecciones por clamidias y la gonorrea mediante PAAN (6, 15, 31–42). Todas estas pruebas incluyen el procesamiento para el aislamiento de los ácidos nucleicos, la amplificación de las secuencias diana y la detección del material amplificado. Estas pruebas muestran una sensibilidad y una especificidad excelentes, pero se pueden ver afectadas por la contaminación ambiental y, por lo tanto, requieren una estricta adherencia a las buenas prácticas de laboratorio. También se recomienda encarecidamente que, antes de su uso con fines diagnósticos, se valide de forma minuciosa la efectividad de las PAAN de *T. vaginalis* propuestas para entornos locales frente como mínimo a una de las PAAN validadas internacionalmente, idealmente la APTIMA TV

aprobada por la FDA (véase a continuación), y que posteriormente se utilicen con un sistema de garantía de calidad apropiado (véanse el capítulo 2 y el anexo 3).

Como ya se ha mencionado, la FDA ha aprobado una prueba, la APTIMA TV (Gen-Probe, EUA). Esta prueba se ha mostrado altamente sensible y específica (16, 18, 43, 44), y puede ser ejecutada en una plataforma semiautomatizada o totalmente automatizada. Como todas las PAAN, requiere una atención minuciosa a las pautas de manipulación de líquidos para reducir al mínimo los casos de contaminación. Las necesidades de esta prueba tanto de espacio para el equipo como de energía son sustanciales. Su empleo se debe restringir a laboratorios de referencia con una elevada capacidad técnica.

- Las PAAN, si son eficaces y han sido validadas, muestran una sensibilidad muy alta y son especialmente útiles en entornos donde ya se emplean las PAAN en el diagnóstico de las infecciones por clamidias y la gonorrea.
- El diagnóstico mediante las PAAN requiere equipo, reactivos y conocimientos técnicos especializados.

6.5 Antibiograma

Se han descrito cepas de *T. vaginalis* que muestran resistencia y reducción de la sensibilidad al metronidazol (generalmente, tratamiento de primera línea) y al tinidazol (generalmente, tratamiento de segunda línea), pero ello ocurre rara vez (45, 46). No obstante, en ciertos entornos se han detectado niveles bajos de resistencia al metronidazol en 2% a 5% de los casos de tricomoniasis en mujeres. El origen de la resistencia a los antibióticos está poco claro, pero muchas de las cepas de *T. vaginalis* resistentes parecen ser tolerantes a un medio aeróbico. Los organismos facultativos generalmente son resistentes al metronidazol. Sin embargo, los datos de resistencia son escasos y se requieren estudios adicionales en esta área para determinar los mecanismos, la prevalencia y las características epidemiológicas de esta resistencia. Sin embargo, dado que la mayor parte de los organismos son sensibles, el antibiograma no se realiza sistemáticamente (47, 48). No obstante, es preciso que algunos laboratorios de referencia mantengan su capacidad de realizar el antibiograma de cepas de *T. vaginalis*, en particular en los casos de pacientes en que fracasa el tratamiento con

metronidazol. Los pacientes que regresan con persistencia de los síntomas deben ser evaluados en cuanto a posibles conductas que favorezcan la exposición y en cuanto a la adherencia a las pautas de tratamiento.

- Los médicos deben ser conscientes de que se ha registrado resistencia a los antibióticos y tenerlo en cuenta en las personas en las que persisten los síntomas.

6.6 Bibliografía

1. *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2012 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf, consultada el 2 de abril del 2013).
2. Wetmore CM, Manhart LE, Golden MR. Idiopathic urethritis in young men in the United States: prevalence and comparison to infections with known sexually transmitted pathogens. *Journal of Adolescent Health*, 2009, 45(5):463–472.
3. Seña AC et al. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44(1):13–22.
4. Zhang ZF et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. *Annals of Epidemiology*, 1995, 5(4):325–332.
5. Van Der Pol B. *Trichomonas vaginalis* infections. In: Kumar B, Gupta S, eds. *Sexually transmitted infections*, 2nd ed. New Delhi, Elsevier, 2012:602–609.
6. Van Der Pol B, Kraft CS, Williams JA. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhea to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(2):366–373.
7. Miller WC et al. The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 2005, 32(10):593–598.
8. Krieger JN. Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sexually Transmitted Diseases*, 1995, 22(2):83–96.
9. Shafir SC, Sorvillo FJ, Smith L. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, 22(1):37–45.
10. Price MA et al. Addition of treatment for trichomoniasis to syndromic management of urethritis in Malawi: a randomized clinical trial. *Sexually Transmitted Diseases*, 2003, 30(6):516–522.
11. Hobbs MM et al. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sexually Transmitted Diseases*, 1999, 26(7):381–387.
12. Tanton C et al. Correlates of HIV-1 genital shedding in Tanzanian women. *PloS One*, 2011, 6(3):e17480.
13. Wang CC et al. The effect of treatment of vaginal infections on shedding of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(7):1017–1022.
14. Mavedzenge SN et al. Epidemiological synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African Women. *Sexually Transmitted Diseases*, 2010, 37(7):460–466.
15. Hobbs MM et al. Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: implications for control of trichomoniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(11):3994–3999.
16. Huppert JS et al. Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 45(2):194–198.
17. Huppert JS et al. Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(2):684–687.
18. 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. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2009, 200(2):188.e1–188. e7.
19. Kingston MA, Bansal D, Carlin EM. “Shelf life” of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of STD and AIDS*, 2003, 14(1):28–29.
20. Adu–Sarkodi Y et al. Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, 2004, 80(3):201–203.
21. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology*, 1957, 43(4):488–490.
22. Schmid GP et al. Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(6):1230–1233.
23. Fouts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *Journal of Infectious Diseases*, 1980, 141(2):137–143.
24. Kupferberg AB et al. Nutritional requirements of *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1948, 67(3):304–308.
25. Kupferberg AB. *Trichomonas vaginalis*: nutritional requirements and diagnostic procedures. *International Record of Medicine and General Practice Clinics*, 1955, 168(11):709–717. Feinberg JG, Whittington MJ. A

- culture medium for *Trichomonas vaginalis* donné and species of *Candida*. *Journal of Clinical Pathology*, 1957, 10(4):327–329.
26. Borchardt KA et al. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourinary Medicine*, 1997, 73(4):297–298.
 27. Borchardt KA. Trichomoniasis: its clinical significance and diagnostic challenges. *American Clinical Laboratory*, 1994, 13(9):20–21.
 28. el Naga IF, Khalifa AM, el Azzouni MZ. In-pouch TV culture system in diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2001, 31(3):647–656.
 29. Levi MH et al. Comparison of the InPouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(12):3308–3310.
 30. Smith KS et al. Comparison of conventional testing to polymerase chain reaction in detection of *Trichomonas vaginalis* in indigenous women living in remote areas. *International Journal of STD and AIDS*, 2005, 16(12):811–815.
 31. Wendel KA et al. Use of urine polymerase chain reaction to define the prevalence and clinical presentation of *Trichomonas vaginalis* in men attending an STD clinic. *Sexually Transmitted Infections*, 2003, 79(2):151–153.
 32. Kaydos-Daniels SC et al. Validation of a urine-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for use in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in men. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(1):318–323.
 33. Schwebke JR, Lawing LF. Improved detection by DNA amplification of *Trichomonas vaginalis* in males. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(10):3681–3683.
 34. Kaydos SC et al. Development and validation of a PCR-based enzyme-linked immunosorbent assay with urine for use in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in women. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(1):89–95.
 35. Jordan JA, Lowery D, Trucco M. TaqMan-based detection of *Trichomonas vaginalis* DNA from female genital specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11):3819–3822.
 36. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(10):3585–3588.
 37. Crucitti T et al. Comparison of culture and different PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in self collected vaginal swab specimens. *Sexually Transmitted Infections*, 2003, 79(5):393–398.
 38. Pillay A et al. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, 2007, 83(2):126–129.
 39. Schirm J et al. *Trichomonas vaginalis* detection using real-time TaqMan PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2):243–247.
 40. Simpson P et al. Real-time PCRs for detection of *Trichomonas vaginalis* beta-tubulin and 18S rRNA genes in female genital specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(Pt 6):772–777.
 41. Shipitsyna E et al. Evaluation of polymerase chain reaction assays for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection in Russia. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2013, 27(2):e217–223.
 42. Hardick A et al. Comparison between the Gen-Probe transcription-mediated amplification *Trichomonas vaginalis* research assay and real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* detection using a Roche LightCycler instrument with female self-obtained vaginal swab samples and male urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(11):4197–4199.
 43. Munson E et al. Impact of *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification-based analyte-specific reagent testing in a metropolitan setting of high sexually transmitted disease prevalence. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(10):3368–3374.
 44. Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(8):1341–1346.
 45. Schmid G et al. Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic. *Journal of Reproductive Medicine*, 2001, 46(6):545–549.
 46. Upcroft JA, Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(6):1810–1814.
 47. Meri T et al. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(2):763–767.

Capítulo 7

Vaginosis bacteriana

7.1 Introducción

La vaginosis bacteriana (VB) es la causa más frecuente de aumento del flujo vaginal en las mujeres en edad fecunda. Aunque no se considera una enfermedad de transmisión sexual, se ha demostrado que la actividad sexual es un factor de riesgo (1), ya que su incidencia aumenta al aumentar el número de parejas sexuales recientes a lo largo de la vida y al tener una nueva pareja. Los signos clínicos de la vaginosis bacteriana observados también en mujeres vírgenes descartan que su transmisión sea exclusivamente sexual. El cuadro clínico está probablemente mucho más relacionado con alteraciones de la flora vaginal (debido a mecanismos y factores del hospedador desconocidos hasta la fecha) que causan un aumento del pH, como resultado de la disminución de los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno. Los lactobacilos ayudan a mantener el pH ácido propio de la vagina de las mujeres sanas e inhiben el crecimiento de otros microorganismos anaerobios. Normalmente, la vagina de una mujer sana tiene una concentración elevada de lactobacilos. En caso de vaginosis bacteriana, la población de lactobacilos se reduce considerablemente, mientras que aumenta la de anaerobios y *Gardnerella vaginalis*. Entre los anaerobios implicados en la vaginosis bacteriana se puede citar *Mobiluncus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* y *Eubacterium spp.*; también se ha observado la presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. Con técnicas actuales independientes del cultivo, se ha identificado un mayor número de microorganismos formando parte de la flora encontrada en las mujeres con vaginosis bacteriana, incluido *Atopobium vaginae* (2). Muchas de las bacterias asociadas a la vaginosis bacteriana se encuentran también en las mujeres normales, aunque en menor cantidad; en consecuencia, el diagnóstico de laboratorio de la vaginosis bacteriana presenta gran dificultad, con los múltiples métodos descritos en la literatura científica. Se propone a menudo el aislamiento e identificación individual de bacterias como *G. vaginalis*, pero no es adecuado y no tiene ninguna utilidad clínica en el diagnóstico de la vaginosis bacteriana (3), además, podría conducir al exceso de tratamiento. En realidad, se diagnostica mejor mediante los criterios clínicos de Amsel (4) o mediante la evaluación (5)

o la calificación (6) de las bacterias de un frotis vaginal teñido con la tinción de Gram.

- La vaginosis bacteriana es la causa más frecuente de aumento del flujo vaginal y se relaciona con la alteración de la flora vaginal, la reducción del número de lactobacilos vaginales y la proliferación de anaerobios y *G. vaginalis*.

7.2 Diagnóstico

La vaginosis bacteriana es una entidad clínica caracterizada por el aumento de la cantidad de flujo vaginal maloliente. El diagnóstico se basa en la presencia de por lo menos tres de los cuatro criterios a continuación (criterios de Amsel) (4):

- flujo homogéneo pegajoso de color blanco a grisáceo;
- pH de la secreción vaginal >4,5;
- desprendimiento de “olor a pescado” causado por la producción de aminas cuando se mezcla la secreción vaginal con una solución de hidróxido de potasio al 10% (KOH);
- observación de células clave de la vaginosis en el examen microscópico.

Flujo vaginal. La evaluación de este signo clínico es subjetiva. La cantidad de flujo vaginal en las mujeres con vaginosis bacteriana no suele ser mucho mayor que en las mujeres sanas. Por otro lado, la aplicación de duchas vaginales puede reducir la cantidad.

pH vaginal. El pH de la secreción vaginal debe medirse usando tiras de papel indicador de pH con un intervalo adecuado (3,8 a 6,0) como el papel de pH Whatman de rango reducido. La muestra se recoge con un hisopo de los fondos de saco laterales y posterior de la vagina y luego se toca directamente con el hisopo en la tira de papel. Otra posibilidad es tocar el papel de pH con la punta del espéculo una vez retirado de la vagina (fig. 7.1). Se debe evitar el contacto con el moco cervical ya que tiene un pH >7,0. La vagina madura normal tiene un pH ácido de 4,0. En la vaginosis bacteriana, el pH se eleva por regla general por encima de 4,5.

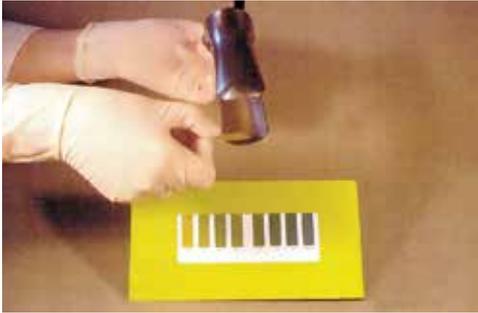
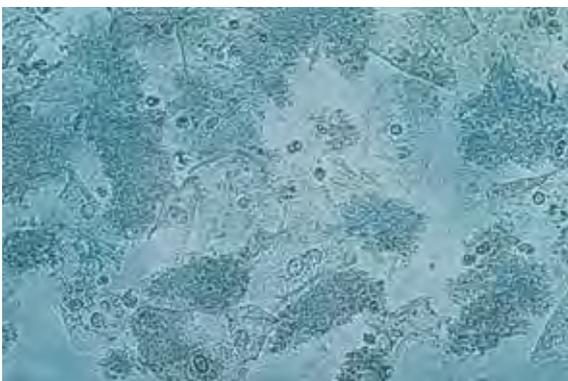


Figura 7.1
Prueba del pH realizada en la secreción vaginal, comparación con una escala de color estandarizada.

De las cuatro características, la prueba del pH vaginal es la que tiene la mayor sensibilidad, pero la especificidad más baja; un pH elevado también se observa si la secreción vaginal está contaminada con sangre menstrual, moco cervical o semen, y en las mujeres con infección por *T. vaginalis*.

Olor. Las mujeres con vaginosis bacteriana a menudo se quejan del olor vaginal nauseabundo. Este olor se debe a la liberación de aminas, producidas por la descarboxilación de los aminoácidos lisina (para dar cadaverina) y arginina (para dar putrescina) por las bacterias anaerobias. Cuando se agrega KOH a la secreción vaginal, las aminas se volatilizan inmediatamente y producen el “olor a pescado” característico. Colocar una gota de secreción vaginal en un portaobjetos de vidrio y agregar una gota de KOH al 10%. Sostener el portaobjetos cerca de la nariz para detectar el olor a aminas. Después de dar una reacción positiva, la muestra se vuelve rápidamente inodora al dejarla en reposo porque las aminas se volatilizan por completo con rapidez. En algunas partes del



A. Células clave en una preparación en fresco observada al microscopio (400X)

Figura 7.2
Microscopia de frotis vaginales

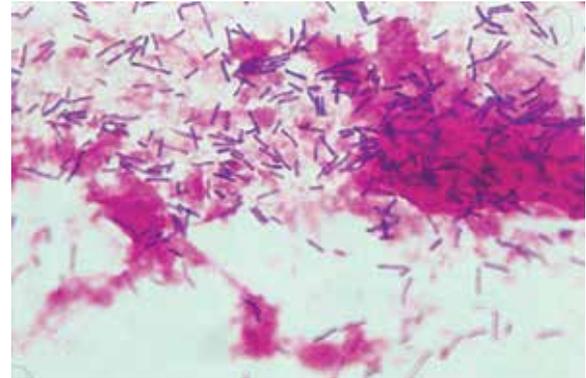
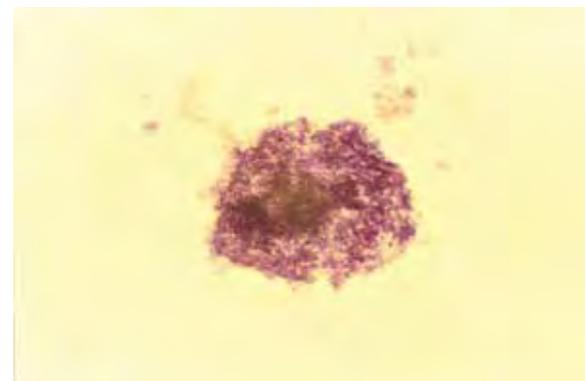


Figura 7.3
Tinción de Gram de un frotis vaginal normal que muestra lactobacilos (1000x)

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH.

mundo, el KOH no se encuentra en el mercado debido a su naturaleza cáustica y, por consiguiente, solo se comprueban tres de los cuatro criterios, esto hace que se pierda la sensibilidad.

Células clave de la vaginosis. Mezclar una gota de secreción vaginal con una gota de solución salina en un portaobjetos de vidrio. Colocar un cubreobjetos sobre la suspensión y examinar al microscopio con un aumento total de 400X. Las células clave son células epiteliales escamosas recubiertas de muchos microorganismos pequeños coccobacilares, que le dan un aspecto granular, deshilachado; los bordes de estas células epiteliales no están claramente definidos debido al gran número de bacterias presentes y a la desintegración evidente de las células (figs. 7.2A y 7.2B). En la mayoría de las pacientes con vaginosis bacteriana se observará una mezcla de células epiteliales vaginales exfoliadas



B. Célula clave en una tinción de Gram del frotis vaginal

normales y 20% o más de células clave. Las bacterias adheridas a las células son de *G. vaginalis* mezcladas con anaerobios.

La vaginosis bacteriana es reconocible en un frotis vaginal teñido con tinción de Gram. Los portaobjetos pueden examinarse en el consultorio, cuando se disponga de los medios, o guardarse para examinarlos en el laboratorio y hacer una comprobación independiente posterior. En el frotis se pueden apreciar diferentes grados de la flora vaginal que va de normal (fig. 7.3) a morfotipos intermedios de vaginosis bacteriana. En el frotis de una mujer con vaginosis bacteriana, los lactobacilos han desaparecido o el número es reducido y en su lugar hay una flora microbiana mixta. Para leer los frotis se siguen generalmente dos métodos: criterios de Ison y Hay (5), que evalúan la flora y son muy adecuados en la práctica clínica corriente; puntuación de Nugent (6), que califica las bacterias individuales y proporciona un análisis cuantitativo que es particularmente útil a fines de investigación pero apenas ofrece ventajas desde el punto de vista clínico. La variabilidad entre los observadores en el caso de los criterios de Nugent y los de Ison y Hay es la misma según se desprende de lo informado (7).

7.4 Puntuación de Nugent

Este método se basa en la calificación o atribución de puntos a tipos individuales de microorganismos; una puntuación de 0 a 10 resulta de una suma ponderada de los siguientes morfotipos: bacilos largos grampositivos (lactobacilos), bacilos cortos grampositivos o Gram variable (*G. vaginalis* o anaerobios de otro tipo) y bacilos curvos gramnegativos o Gram variable (*Mobiluncus spp.*). Cada uno de estos tres grupos se pondera cuantitativamente con una puntuación de 0 a 4 en un frotis, de la siguiente manera:

0 = ningún morfotipo por campo (con aceite de inmersión)

1+ = menos de 1 morfotipo por campo (con aceite de inmersión)

2+ = 1 a 4 morfotipos por campo (con aceite de inmersión)

3+ = 5 a 30 morfotipos por campo (con aceite de inmersión)

4+ = más de 30 morfotipos por campo (con aceite de inmersión)

La abundancia de morfotipos de lactobacilos en un frotis se considera normal; por lo tanto, las puntuaciones de lactobacilos se relacionan inversamente con su número: 4+ lactobacilos representan 0, 3+ representan 1, etc. Las puntuaciones de morfotipos de Gardnerella y Mobiluncus se correlacionan con el número de organismos: 4+ Gardnerella representan 4 puntos, etc. Mobiluncus se pondera menos; por lo tanto, 1+ y 2+ organismos ponderados representan 1, y 3+ y 2+ puntúan 2.

Un diagnóstico de “vaginosis bacteriana grave” representa 10 puntos (4 por la ausencia de morfotipos de lactobacilos, 4 por 4+ morfotipos de Gardnerella y 2 por 4+ morfotipos de Mobiluncus). Una tinción de Gram de un frotis vaginal “normal” representa 0 (0 por 4+ morfotipos de lactobacilos, 0 por 0 morfotipos de Gardnerella y 0 por 0 morfotipos de Mobiluncus).

En la puntuación de Nugent, una puntuación total de 7 a 10 (la suma de las puntuaciones de los 3 grupos descritos anteriormente) es indicativa de vaginosis bacteriana, una puntuación de 4 a 6 indica flora intermedia y de 0 a 3 indica flora normal.

7.5 Otras pruebas de la vaginosis bacteriana

El examen microscópico de una tinción de Gram de un frotis vaginal sigue siendo actualmente el método de laboratorio preferido para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana. Se han descrito algunas otras pruebas, que pueden ser útiles si no se dispone de un microscopio. Entre otras las siguientes:

1. Affirm VP III (8): Esta prueba usa hibridación de DNA para detectar concentraciones elevadas de Gardnerella.
2. BV Blue (9): Esta es una prueba diagnóstica en el punto de atención que está comercializada. Mide la sialidasa, una enzima que produce algunas de las aminas liberadas en la vaginosis bacteriana. Comparada con los criterios de Nugent y de Amsel, tiene una sensibilidad de 88% y una especificidad de 95% y 91%, respectivamente.
3. FemExam (10): Esta prueba consta de dos tarjetas con indicadores que miden el pH vaginal, aminas y actividad enzimática. Los indicadores de la tarjeta FemExam 1 miden valores de pH superior o igual a 4,7 y aminas con concentración mayor de 0,5 mmol. La tarjeta 2 mide la actividad de

7.3 Criterios de Ison y Hay

Este método evalúa la proporción relativa de los diferentes morfotipos bacterianos y los clasifica de la siguiente manera:

Grado I (flora normal): solo morfotipos de lactobacilos o preponderancia de estos (fig. 7.4).

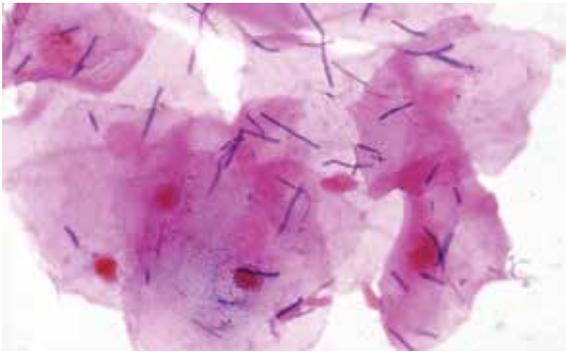


Figura 7.4
Grado I

Grado II (flora intermedia): disminución del número de morfotipos de lactobacilos con una mezcla de morfotipos bacterianos (fig. 7.5).

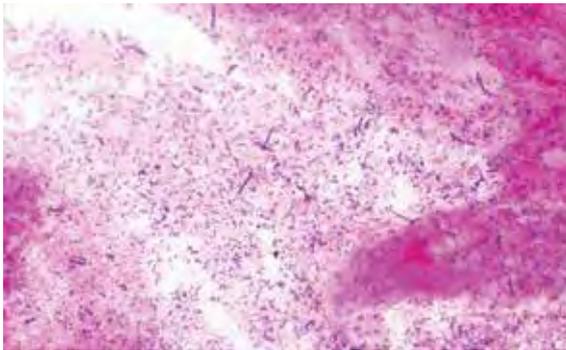


Figura 7.5
Grado II

Grado III (vaginosis bacteriana): flora bacteriana mixta con escaso número de lactobacilos o sin ellos (fig. 7.6).

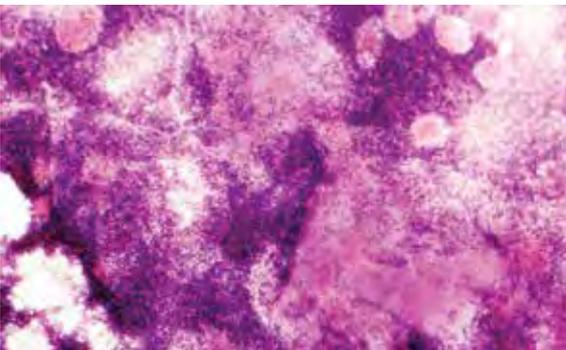


Figura 7.6
Grado III

En el sistema de Ison y Hay se incluyen dos grados más: grado 0, presencia de células epiteliales y ausencia de bacterias (fig. 7.7) y el grado IV, células epiteliales recubiertas solamente con cocos grampositivos (fig. 7.8).

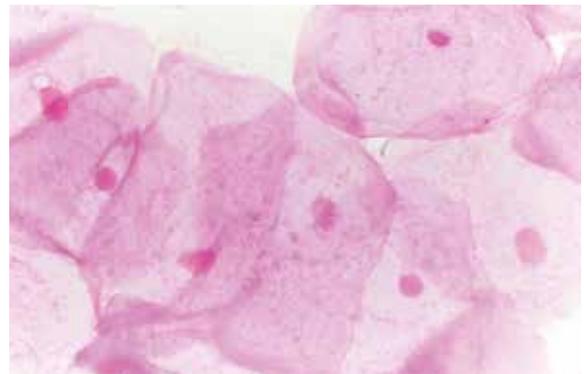


Figura 7.7
Grado 0

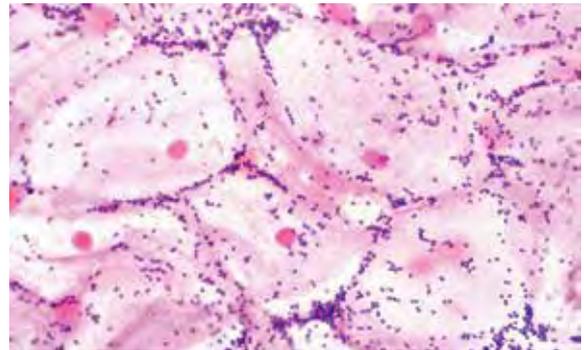


Figura 7.8
Grado IV

Tanto el grado 0 como el grado IV se encuentran en mujeres normales. El grado 0 se observa predominantemente tras un tratamiento antibiótico intravaginal y el grado IV se encuentra en un número reducido de mujeres que están colonizadas longitudinalmente por cocos grampositivos, generalmente estreptococos, a menudo sin lactobacilos o en número reducido.

Fuente (figs. 7.4–7.8): Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH.

la prolina aminopeptidasa. Comparado con la puntuación de Nugent, la tarjeta FemExam 1 tiene una sensibilidad y especificidad de 71,4% y 72,8%, respectivamente, y la tarjeta FemExam 2 tiene una sensibilidad y especificidad de 70% y 81%, respectivamente.

Los métodos moleculares se han usado recientemente también para detectar bacterias en vaginosis bacterianas que no se podían reconocer antes y proporcionan la posibilidad de dar un diagnóstico sensible y específico de la vaginosis bacteriana (11, 12).

- El diagnóstico puede hacerse mediante los criterios de Amsel demostrando la presencia de por lo menos tres de estos cuatro criterios: flujo vaginal homogéneo pegajoso de color blanco a grisáceo, pH>4,5, olor a aminas y células clave de la vaginosis.
- El cultivo de los microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana no tiene valor diagnóstico.
- Si se dispone de las instalaciones necesarias, una tinción de Gram del flujo vaginal que pone de manifiesto grados de la flora vaginal, que van de normal pasando por intermedio y hasta morfotipos de vaginosis bacteriana, puede calificarse según los criterios de Ison y Hay y los de Nugent para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana.

7.6 Referencias

1. Bradshaw CS et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193(11):1478–1486.
2. Tabrizi SN et al. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in virginal women. *Sexually Transmitted Diseases*, 2006, 33(11):663–665.
3. Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(6):1266–1271.
4. Amsel R et al. Non specific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *American Journal of Medicine*, 1983, 74(1):14–22.
5. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sexually Transmitted Infections*, 2002, 78(6):413–415.
6. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(2):297–301.
7. Forsum U et al. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS*, 2002, 110(11):811–818.
8. Gazi H et al. Use of DNA hybridization test for diagnosing bacterial vaginosis in women with symptoms suggestive of infection. *APMIS*, 2006, 114(11):784–787.
9. Bradshaw CS et al. Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(3):1304–1308.
10. West B et al. Evaluation of a new rapid diagnostic kit (FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in the Gambia. *Sexually Transmitted Diseases*, 2003, 30(6):483–489.
11. Fredricks DN et al. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(10):3270–3276.
12. Shipitsyna E et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age – sensitive and specific genetic diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS ONE*, 2013, 8(4):e60670.

Capítulo 8

Candidiasis

8.1 Introducción

La candidiasis vulvovaginal está causada por el hongo *Candida albicans* (1) en aproximadamente 85% de los casos y por *C. glabrata* en el 15% restante (2). Otras especies, como *C. krusei* y *C. tropicalis*, causan vaginitis en raras ocasiones (3). El género *Candida* suele ser de origen endógeno y puede aislarse en el aparato genital de hasta 25% de las mujeres en edad fecunda sanas asintomáticas. Para que la *Candida* colonice la vagina, primero tiene que adherirse a las células epiteliales vaginales y posteriormente debe crecer, proliferar y germinar, antes de causar una inflamación sintomática. Antes de que este microorganismo pueda provocar efectos patológicos, generalmente es preciso que se produzcan cambios en el medio vaginal. Probablemente la defensa más importante contra la colonización y la inflamación es la flora bacteriana natural. Todavía no se ha dilucidado cuál es el mecanismo por el que la *Candida* induce la inflamación, pero existen algunos factores importantes que predisponen a la colonización y la inflamación:

- cambios de la concentración de las hormonas sexuales asociados al periodo premenstrual, el embarazo y los anticonceptivos orales;
- uso de antibióticos;
- diabetes sacarina;
- inmunodepresión.

La candidiasis suele ser de origen endógeno y no una enfermedad de transmisión sexual. La candidiasis vulvovaginal crónica o recidivante afecta a un escaso número de mujeres, causa síntomas persistentes y puede asociarse a los factores de riesgo ya descritos (4, 5). Los productos químicos, la alergia y la hipersensibilidad retardada locales también pueden influir en la inducción de la vaginitis y la vulvitis sintomáticas.

En los hombres, no se sabe a ciencia cierta qué importancia tiene el género *Candida*, aunque puede transmitirse entre parejas sexuales y causar balanitis

o balanopostitis y, en raras ocasiones, uretritis.

Normalmente los hombres desarrollan una respuesta alérgica al antígeno candidiásico, aunque se puede observar una infección fulminante con mayor frecuencia en los pacientes que presentan los factores de riesgo ya mencionados (6).

8.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal suele establecerse basándose en la combinación de las manifestaciones clínicas y los signos observados en una preparación en fresco. Entre los síntomas y signos clásicos de la candidiasis vulvovaginal se encuentran el prurito vaginal, un flujo vaginal blanquecino, inodoro y grumoso (similar al requesón), sensación de escozor en la vulva, disuria y eritema de los labios vulvares y la vulva. No obstante, los síntomas y signos suelen ser más equívocos. La detección de las células de levadura en gemación mediante examen microscópico de la preparación en fresco o con hidróxido de potasio (KOH) puede realizarse en el laboratorio o en el consultorio, y tiene un gran valor predictivo en el diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal. Aunque esta combinación se usa generalmente, en las mujeres que presentan los signos clásicos a menudo es razonable administrar tratamiento basándose en el diagnóstico clínico de sospecha sin necesidad de confirmación adicional mediante microscopía. En algunos centros se prefiere el examen del frotis con tinción de Gram y la detección de las células de levadura en gemación y de las pseudohifas para el diagnóstico de la candidiasis.

En el caso de mujeres con flujo vaginal anormal, y si no se dispone de microscopio, la detección de un pH <4,5 es un buen indicador de la candidiasis vulvovaginal y puede ayudar a diferenciarla de la vaginosis bacteriana y de la tricomoniasis, que suelen dar lugar a un pH >4,5. Se puede usar una tira de papel indicadora de pH de intervalo reducido (Whatman), que es un método barato, sensible y sencillo, disponible en la mayoría de las situaciones.

El cultivo es el método más sensible del que actualmente se dispone para detectar *Candida spp.*, pero debe usarse con cuidado, ya que la candida también se encuentra en las mujeres sin candidiasis vulvovaginal. Por consiguiente, el cultivo debe considerarse solo cuando clínicamente se sospeche una candidiasis vulvovaginal pero los resultados del examen microscópico sean negativos (aunque en este caso el tratamiento empírico puede ser apropiado, resulta más barato y consume menos recursos) o cuando sea preciso realizar un antibiograma.

Se ha descrito la detección molecular de *Candida spp.* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), pero no ofrece ninguna ventaja respecto a las pruebas actualmente disponibles, pues debido a la gran sensibilidad de la RCP, esta detectará levaduras del género *Candida* en las mujeres sin candidiasis vulvovaginal, lo que conllevará un diagnóstico indebido y la instauración de un tratamiento innecesario.

8.3 Recogida de muestras

Se obtiene una muestra de exudado de la pared vaginal lateral con un hisopo (no es importante el tipo de fibra). En las pacientes que tienen solo una secreción vaginal leve y afectación amplia de la vulva o los labios vulvares, es mejor recoger una muestra de la mucosa irritada. Esta puede examinarse de inmediato al microscopio en el consultorio, o bien puede enviarse al laboratorio. Si deben identificarse levaduras, no es necesario usar un medio de transporte, como el Amies, aunque es preferible emplearlo para mantener la viabilidad y la motilidad de las tricomonas.

En los hombres que presentan balanitis, se utiliza un hisopo prehumedecido en solución salina para tomar la muestra del glande.

8.4 Microscopia directa

Se coloca la muestra en un portaobjetos de vidrio y, si fuera preciso, dependiendo de su fluidez, se mezcla con una gota de solución salina. La preparación se cubre con un cubreobjetos y se examina al microscopio con un aumento de 400×, no solo para detectar células de levadura, sino también para evaluar la presencia de tricomonas y de células clave. Las levaduras son células redondeadas u ovoideas, de 4 μm de diámetro, que muestran la gemación característica (blastoconidios) (figs. 8.1A y 8.1B). La adición de KOH al 10% a la preparación aumenta la sensibilidad de detección



Figura 8.1A
Preparación del exudado vaginal con hidróxido de potasio (KOH) que muestra las levaduras en gemación y las pseudohifas (400×)



Figura 8.1B
Preparación en fresco de levaduras sin pseudohifas
Fuente (A y B): Reimpreso con permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH.

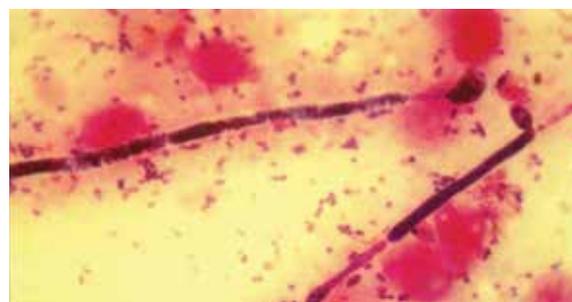


Figura 8.2A
Frotis del flujo vaginal con tinción de Gram que muestra levaduras grampositivas y pseudohifas (1000×)

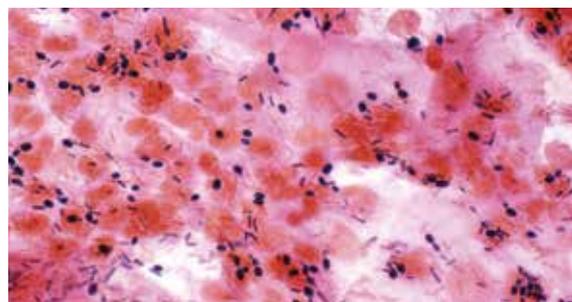


Figura 8.2B
Levaduras en gemación sin pseudohifas
Fuente (A y B): Reimpreso con permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH.

de las levaduras, haciendo que sea mucho más fácil identificar los micelios (seudohifas). Las levaduras pueden reconocerse fácilmente en un frotis con tinción de Gram, ya que son células grampositivas (figs. 8.2A y 8.2B).

8.5 Cultivo

El agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol es un medio de crecimiento excelente para el aislamiento de *Candida spp.* Después de sembrar la muestra clínica, las placas se incuban a 36 °C durante 2 días. Las colonias de células de levadura son opacas y de color blanco a crema. La única identificación importante en lo que al diagnóstico ordinario se refiere es la diferenciación de las bacterias. Se puede usar la microscopía para confirmar la presencia de la levadura.

Para el diagnóstico corriente de la candidiasis vulvovaginal sin complicaciones no es necesaria la identificación posterior de las levaduras. Sin embargo, la prueba de germinación es una prueba sencilla para la identificación preliminar de *C. albicans*. Se emulsiona una colonia en 0,5 ml de suero bovino o equino y se incuba a 36 °C durante 4 horas. *C. albicans* mostrará hifas laterales cortas sin ninguna constricción. Puede hacerse una identificación completa de las levaduras en el nivel de la especie por medio de métodos auxanográficos para la asimilación de carbohidratos y nitratos, o mediante pruebas de fermentación de carbohidratos. Se comercializan estuches para la identificación de levaduras en el nivel de la especie.

- El diagnóstico de la candidiasis se establece basándose tanto en las características clínicas como en los signos observados en el análisis microscópico de una muestra apropiada.
- Cuando los resultados del examen microscópico son negativos y el paciente presenta síntomas clínicos, se planteará la posibilidad de hacer un cultivo del exudado genital.
- En ocasiones está justificado hacer el antibiograma de *Candida spp.*, que debe realizarse en centros especializados.

8.6 Referencias

1. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*, 2007, 369(9577):1961-1971.
2. Sobel JD. Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*. An emerging problem. *Mycoses*, 1998, 41(Suppl 2):18-22.
3. Horowitz BJ, Giaquinta D, Ito S. Evolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: implications for patient care. *Journal of Clinical Pharmacology*, 1992, 32(3):248-255.
4. Morton RS, Rashid S. Candidal vaginitis: natural history, predisposing factors and prevention. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1997, 70(Suppl 4):3-6.
5. Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 1992, 14(Suppl 1):S148-S153.
6. Marrazzo J, Hillier S, Sobel J. Vaginal infections. In: Morse SA et al., eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4th ed. Edinburgh, Saunders/Elsevier, 2010:76-93.

Capítulo 9

Infecciones por el virus del herpes simple

9.1 Introducción

El virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y de tipo 2 (VHS-2) son virus grandes conformados por DNA bicatenario. Ambas formas comparten una estructura similar del genoma, con una homología de 40% en la secuencia y de 83% en las regiones que codifican proteínas, lo cual explica las numerosas semejanzas biológicas y la reactividad antigénica cruzada entre ambos serotipos.

Durante la primoinfección, el virus del herpes entra a través de las soluciones de continuidad de la piel o la mucosa, se adhiere y penetra en las células epiteliales, y se multiplica. Luego es captado por las terminaciones libres de los nervios sensoriales y migra hacia el ganglio sensorial que corresponde a esa zona de la piel. Las manifestaciones cutáneas consisten en lesiones vesiculares que evolucionan hacia ulceraciones planas que forman costra y curan de manera espontánea en 2 a 3 semanas sin dejar cicatriz. Las lesiones provocan una destrucción focal de la capa epitelial y una infiltración por células inflamatorias en el borde circundante y en la capa dérmica subyacente. Sin embargo, solo 10% a 30% de las nuevas infecciones son sintomáticas (fig. 9.1).

Después de la recuperación de la infección inicial, el virus permanece latente en el ganglio sensorial durante la vida del huésped. Periódicamente, se puede reactivar y migrar de nuevo por los nervios sensoriales hasta la superficie cutánea o mucosa. Puede ocurrir una excreción intermitente de virus, ya sea cuando aparecen lesiones (reactivación clínica) o con síntomas muy leves o inexistentes (reactivación asintomática). La excreción de virus a partir de las superficies mucosas da origen a su transmisión a los compañeros sexuales.

Los episodios sintomáticos recurrentes tienden a ser más leves que el episodio primario y suelen curarse en 10 días, pero también pueden ser graves, sobre todo en las personas inmunodeprimidas. En el cuadro 9.1 se resumen los principales síntomas, las manifestaciones clínicas y las complicaciones de las infecciones genitales por el virus del herpes. Cerca de 70% a 90% de las personas con infección genital sintomática por el VHS-2 y entre 20% y 50% de las personas con infección genital por VHS-1 presentarán una recidiva en el primer año. Las personas inmunocompetentes con herpes genital pueden presentar lesiones genitales frecuentes, dolorosas y recurrentes que coinciden con períodos de gran estrés psicosocial.

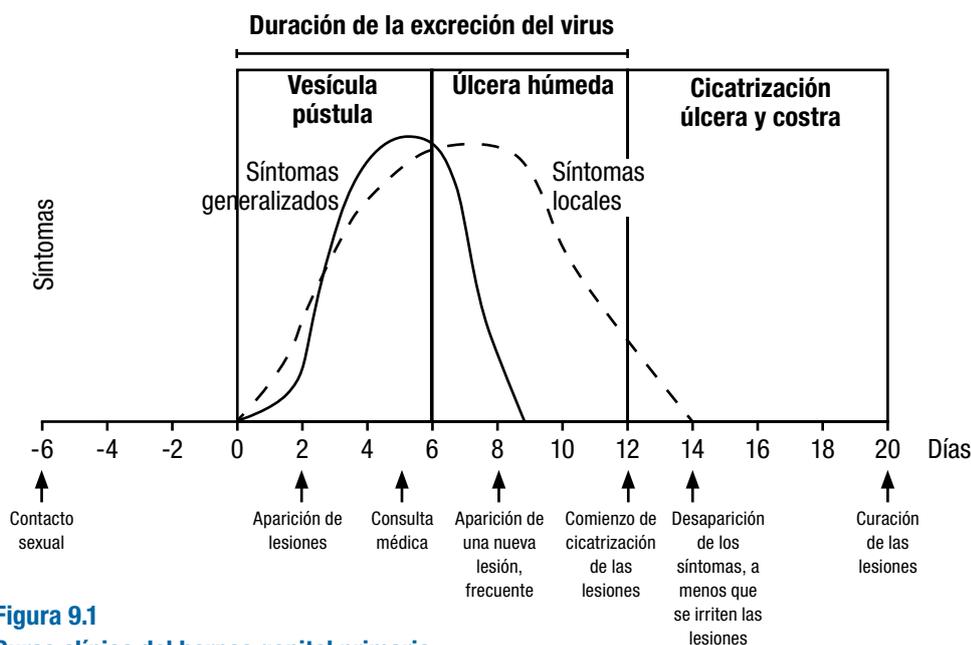


Figura 9.1
Curso clínico del herpes genital primario

El modelo clásico de las infecciones por el VHS-1 y el VHS-2 que se asocian con enfermedades bucodentales o genitales, respectivamente, sigue siendo la regla en ciertas regiones del mundo como en África subsahariana, donde la infección por el VHS-1 es una enfermedad frecuente de la niñez y la infección por VHS-2 es de transmisión sexual. Por el contrario, la diferenciación del VHS-1 y el VHS-2 basada exclusivamente en la localización anatómica de la infección no es de ninguna manera absoluta en los países desarrollados, ya que el VHS-1 con frecuencia puede ser causa de herpes genital. El retraso en la adquisición de la infección bucal por el VHS-1 durante la niñez en los países desarrollados hace que una proporción notable de adultos jóvenes sean susceptibles a la infección genital por el VHS-1 cuando inician su actividad sexual y los contactos sexuales bucogenitales, que se consideran más seguros que el coito con penetración y además un medio de evitar el embarazo. Las tasas de seropositividad al VHS-1 en las sociedades en desarrollo suelen alcanzar 100% en los

adultos, pero en los países desarrollados solo llegan a 50% o 70% y, en estos últimos, se ha notificado un gran incremento de las infecciones genitales por VHS-1 en el último decenio.

En la actualidad, las infecciones genitales por el VHS-1 representan al menos la mitad de todos los episodios primarios de herpes genital en los adultos jóvenes de las sociedades occidentales. Además, la seropositividad frente al VHS-2 comienza a partir del inicio de la vida sexual y aumenta en forma sostenida con la edad. La seroprevalencia frente al VHS-2 varía según la región del mundo y oscila entre cerca de 10% a 40% en los adultos y puede alcanzar de 60% a 95% en las personas infectadas por el VIH y las profesionales del sexo. La infección por el VHS-2 comparte factores de riesgo con las demás infecciones de transmisión sexual, a saber, un alto número de compañeros sexuales, antecedentes de infecciones de transmisión sexual y el inicio temprano de la vida sexual activa. El período de

Cuadro 9.1: Síntomas, signos clínicos y complicaciones durante las infecciones genitales sintomáticas por el virus del herpes

	Síntomas	Signos clínicos	Complicaciones
Hombres	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones papulares o vesiculares en los genitales, las zonas perigenitales o en localizaciones extragenitales (muslo, ojo, nalga, dedo) • Lesiones pustulosas • Ulceración genital • Dolor perineal • Disuria • Malestar o dolor inguinal (periadenitis) • Infección faríngea (contacto bucogenital) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones papulares, vesiculares y pustulosas seguidas de ulceraciones en el pene, el perineo o el muslo • Exudado uretral • Uretritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Meningitis aséptica • Erupción vesicular extensa • Retención urinaria • Radiculopatía sensitiva por afectación de los nervios sacros • Mielitis transversa • Mayor riesgo de contraer el VIH por exposición sexual
Mujeres	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones papulares o vesiculares en los genitales, las zonas perigenitales o en localizaciones extragenitales (muslo, ojo, nalga, dedo) • Lesiones pustulosas • Ulceración genital • Flujo vaginal o exudado cervicouterino • Dolor perineal • Disuria • Malestar o dolor inguinal (periadenitis) • Dispareunia • Infección faríngea (contacto bucogenital) • La primoinfección suele ser de mayor intensidad y duración y más prolongada en las mujeres que en los hombres 	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones papulares, vesiculares y pustulosas seguidas de ulceraciones en la vulva, el perineo o el muslo • Flujo vaginal o exudado cervicouterino • Cervicitis • Hiperemia de las mucosas vulvar y vaginal • Exudado uretral • Uretritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor riesgo de transmisión sexual del VIH en las personas coinfectadas por el VIH y el VHS • Herpes neonatal después de parto vaginal

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

incubación de las infecciones por el virus del herpes de ambos tipos suele ser de 2 días a 10 días (hasta 4 semanas). En los hombres y las mujeres con herpes genital primario, las lesiones comienzan como pápulas o vesículas y evolucionan hacia lesiones pustulosas que se ulceran. Estas lesiones ulcerosas persisten entre 4 días y 15 días, hasta que se forma una costra y al final se reepitelizan.

La consecuencia más grave de la infección genital herpética es la posibilidad de transmisión vertical de la madre infectada al recién nacido durante el parto vaginal. Esta situación puede dar lugar a una infección generalizada, con afectación del sistema nervioso central y posible muerte neonatal. Además, durante los dos últimos decenios, la infección por el VHS-2 también se ha vinculado con un riesgo tres veces mayor de contracción de la infección por el VIH. La destrucción de la mucosa que causan las úlceras genitales favorece la adquisición del VIH al proporcionar un punto permeable de entrada. Asimismo, la reactivación de la infección por VHS-2 da lugar a una infiltración de la mucosa por linfocitos activados que expresan CD4, que son las células selectivas de la adhesión del VIH-1. Estos mismos factores facilitan la transmisión de la infección por el VIH de una persona coinfectada por el VIH y el VHS a un compañero sexual sin infección.

9.2 Aspectos generales de los procedimientos diagnósticos

La infección genital herpética a menudo se diagnostica con base en criterios clínicos, por la presencia de un conglomerado de lesiones vesiculares. Sin embargo, puesto que otras causas de ulceración genital pueden presentar un cuadro clínico semejante, sobre todo cuando solo se observan ulceraciones, es necesario confirmar el diagnóstico por medios de laboratorio. Los métodos de laboratorio usados en el diagnóstico de la infección por el VHS comprenden la detección directa del virus en el material de las lesiones y los métodos serológicos indirectos (cuadros 9.2 y 9.3). Las pruebas diagnósticas del VHS existentes consisten en la detección de antígenos, el cultivo del virus y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) que ponen en evidencia el ácido desoxirribonucleico (DNA) del virus, además de las pruebas serológicas de tamizaje de la exposición al VHS que detectan anticuerpos específicos de cada serotipo. El cultivo seguido del tipado del virus ha constituido la piedra angular del diagnóstico de la

infección por el VHS durante los dos últimos decenios. Sin embargo, la detección de DNA viral en las muestras clínicas mediante amplificación molecular surge hoy como una nueva opción diagnóstica, pues su sensibilidad es hasta cuatro veces superior, es menos vulnerable a las condiciones de toma de muestras y transporte, y es más rápida que el cultivo. La elección de la prueba y la forma de interpretar los resultados son consideraciones importantes para los microbiólogos y sus colegas médicos.

9.3 Toma y transporte de las muestras

El VHS-1 y el VHS-2 se pueden recuperar en un frotis de las lesiones genitales mucocutáneas y, en los pacientes con infección asintomática, de las localizaciones de lesiones mucocutáneas anteriores. Las muestras destinadas al cultivo o a las pruebas de biología molecular se obtienen mediante un hisopo pequeño con punta de algodón o dacrón, montado en un mango de alambre. Los hisopos de alginato de calcio disminuyen la recuperación de virus e inhiben los métodos de detección por amplificación de ácidos nucleicos. Dado que la excreción genital del virus es intermitente, no se recomienda la prueba del hisopo en el diagnóstico corriente de los pacientes asintomáticos pues es poco probable que este método aporte la confirmación de la situación de portador.

En el caso de lesiones recientes, el método preferido es la obtención del fluido vesicular o del exudado de las vesículas pequeñas. El líquido de las vesículas grandes que contiene una alta concentración de virus se puede aspirar con una jeringa de tuberculina. Después de la aspiración, se elimina la superficie de la vesícula y se frota vigorosamente la base de la lesión a fin de recuperar las células epiteliales infectadas. En las lesiones más antiguas, el rendimiento diagnóstico puede ser inadmisiblemente bajo. Sin embargo, se debe recomendar a las personas con estas lesiones que regresen cuando aparezcan lesiones frescas con el objeto de tomar la muestra. En ocasiones se pueden tomar muestras con un hisopo de otras localizaciones anatómicas, por ejemplo, la uretra, la vagina o el cuello uterino.

Es preciso prestar especial atención a las condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras clínicas. Después de tomarla, la muestra destinada a la detección del virus debe colocarse de inmediato en viales que contengan 1 ml de medio de transporte

Cuadro 9.2: Recomendaciones sobre la toma de las muestras de diagnóstico de las infecciones genitales por el VHS, adaptadas de Domeika y colegas (7)

Punto de obtención de la muestra	Instrumentos para tomar las muestras	Método de obtención de la muestra
Lesiones cutáneas o mucosas en el hombre (incluida la región perianal)	<ul style="list-style-type: none"> • Agujas estériles • Hisopo estéril con punta de algodón, dacrón o conglomerado de nailon en un mango de madera, plástico o aluminio • Portaobjetos para microscopio 	<ul style="list-style-type: none"> • Abrir las vesículas con una aguja estéril • Obtener el contenido de las vesículas con un hisopo estéril y: <ul style="list-style-type: none"> – extender sobre un portaobjetos (para tinción por inmunofluorescencia) o – incluir en un medio de transporte para cultivo del virus o PAAN.
Uretra masculina	<ul style="list-style-type: none"> • Hisopo estéril con punta de algodón hidrófilo, dacrón o conglomerado de nailon en un mango de madera, plástico o aluminio 	<ul style="list-style-type: none"> • Limpiar la parte externa del meato uretral con un hisopo humedecido en solución salina • Retraer el prepucio a fin de evitar la contaminación de la muestra • Insertar con cuidado un hisopo estéril en el meato uretral externo (a una profundidad de 0,5 a 2 cm) y obtener el exudado uretral destinado al examen
Lesiones cutáneas o mucosas en la mujer (incluida la región perianal)	<ul style="list-style-type: none"> • Gasa e hisopos de algodón • Portaobjetos para microscopio 	<ul style="list-style-type: none"> • De igual manera que en las muestras de lesiones cutáneas o mucosas en el hombre
Uretra femenina	<ul style="list-style-type: none"> • Hisopo estéril de gasa (a fin de retirar el exceso de exudados) • Hisopo estéril con punta de algodón hidrófilo, dacrón o conglomerado de nailon en un mango de aluminio 	<ul style="list-style-type: none"> • Limpiar el introito con un hisopo estéril de gasa • Introducir con cuidado el hisopo estéril con un mango de aluminio en la uretra (a una profundidad de 0,5 cm) a fin de obtener el exudado destinado al examen
Cuello uterino	<ul style="list-style-type: none"> • Espéculo vaginal • Hisopo estéril de gasa • Hisopo estéril con punta de algodón hidrófilo, dacrón o conglomerado de nailon en un mango de madera o plástico 	<ul style="list-style-type: none"> • Introducir el espéculo vaginal, que se puede humedecer previamente con agua caliente y limpiar a fondo el orificio del cuello con un hisopo estéril de gasa • Introducir con cuidado un hisopo de algodón hidrófilo o dacrón en el cuello uterino (a una profundidad de 2 cm) y obtener el material de las lesiones

PAAN: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

Nota: Se obtiene material del recto cuando el paciente ha tenido contactos sexuales anales, cuando existe inflamación anorrectal o cuando se observa engrosamiento de la piel perianal o de los pliegues del ano.

Cuadro 9.3: Métodos directos de laboratorio en el diagnóstico del VHS

Método	Principio	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Desventajas
Examen citológico	Frotis de Tzanck, frotis de Papanicolaou o tinción de Romanovsky	<ul style="list-style-type: none"> Lesiones cutáneas o mucosas Biopsias Frotis de la conjuntiva o la córnea 	Baja	Baja	<ul style="list-style-type: none"> De bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> Lesiones frescas Sensibilidad y especificidad insuficientes
	Detección de las células infectadas por inmunofluorescencia directa	<ul style="list-style-type: none"> Frotis, corte histológico Frotis de la base de la vesícula 	Intermedia (úlceras genitales: 70% a 90%; asintomático: <40% a 50%)	Alta (>95%)	<ul style="list-style-type: none"> De bajo costo Rápido (posible en menos de 4 horas) El tipado es posible 	<ul style="list-style-type: none"> Vesículas frescas Sensibilidad insuficiente Lento Mano de obra intensa Falta de normalización
Detección de antígenos virales	Tinción de la inmunoperoxidasa	<ul style="list-style-type: none"> Hisopo Frotis de las lesiones Frotis del exudado de la base de la vesícula o el fluido vesicular 	Intermedia (80%)	Alta (90%)	<ul style="list-style-type: none"> El costo de los reactivos Rápida (posible en menos de 4 horas) No exige la integridad de la muestra El tipado es posible 	<ul style="list-style-type: none"> Vesículas frescas Sensibilidad insuficiente
	ELISA de captación	<ul style="list-style-type: none"> Hisopo Líquido vesicular o exudado de la base de la vesícula 	Alta (úlceras genitales: >95%)	Alta (62% a 100%)		<ul style="list-style-type: none"> Vesículas frescas No permite el tipado del virus
	Dispositivo de prueba inmediata	<ul style="list-style-type: none"> Hisopo Líquido vesicular o exudado de la base de la vesícula 	Desconocida	Desconocida	<ul style="list-style-type: none"> Prueba diagnóstica inmediata en el punto de atención 	<ul style="list-style-type: none"> Aun no se ha evaluado

Cuadro 9.3: Métodos directos de laboratorio en el diagnóstico del VHS (continuación)

Método	Principio	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Desventajas
Cultivo del virus	Aislamiento del VHS de células susceptibles	<ul style="list-style-type: none"> • Hisopo • Lesiones cutáneas • Líquido vesicular o exudado de la base de la vesícula • Muestra de mucosa sin lesiones • Biopsias • Frotis de la conjuntiva o la córnea • Recién nacidos 	<ul style="list-style-type: none"> • De baja a alta en función del contexto clínico • Contenido vesicular: >90% • Úlcera: 95% • Hisopo: 70% a 80% • Mucosa sin lesión: 30% 	Alta (~100%)	<ul style="list-style-type: none"> • Pone en evidencia el virus • Ha sido clásicamente el “método de referencia” • Actualmente es la “prueba preferida” (2) • Sencillez de la toma de la muestra • Tipado posible del virus • Prueba del fenotipo de resistenciaa 	<ul style="list-style-type: none"> • Menos sensible que la RCP • Las condiciones de almacenamiento y transporte influyen sobre la sensibilidad (transporte rápido, refrigerado, protegido de la luz en medio de transporte para virus) • Mano de obra intensa • Costoso • Laboratorios especializados • Resultados en 2 días a 7 días • Exige concertación con el laboratorio

Cuadro 9.3: Métodos directos de laboratorio en el diagnóstico del VHS (continuación)

Método	Principio	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Desventajas
Biología molecular	Detección del DNA del VHS y cuantificación mediante PAAN, incluidas la RCP clásica y la RCP en tiempo real internas del laboratorio y pruebas RCP comerciales	<ul style="list-style-type: none"> • Hisopo • Lesiones cutáneas • Líquido vesicular o exudado de la base de la vesícula • Muestras de mucosas sin lesiones • Humor acuoso o vítreo • Líquido cefalorraquídeo • Sangre 	La más alta (98%)	Alta (~100%) Es importante limitar las posibles contaminaciones cruzadas	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad alta • Actualmente la prueba “preferida” (2) • Permite la detección y el tipado del virus en la misma prueba • Rápida • Se puede automatizar • Mano de obra eficiente • Resultado en 24 horas a 48 horas y posiblemente en menos de 3 horas. • Genotipado de la resistencia • Método preferido con el LCR • RCP en tiempo real: <ul style="list-style-type: none"> – Amplificación rápida – Análisis cuantitativo – Riesgo reducido de contaminación – Método preferido en las lesiones cutáneas 	<ul style="list-style-type: none"> • Solo en laboratorios especializados • No se ha normalizado • No se ha validado con todos los tipos de muestras • Riesgo de contaminación (RCP) • Puede ser relativamente costoso (RCP en tiempo real) • No se cuenta con el genotipado corriente de la resistencia

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción; LCR: líquido cefalorraquídeo; PAAN: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos; RCP: reacción en cadena de la polimerasa.

^a La detección de las mutaciones que codifican la resistencia a los medicamentos contra el herpes (aciclovir) por genotipado de la farmacorresistencia del VHS podría reemplazar en un futuro próximo a las pruebas fenotípicas.

de virus apto para el cultivo de células, un medio de transporte universal (para cultivo o PAAN) o enviarse en un hisopo seco (solo las destinadas a las PAAN). El cultivo se recomienda en las situaciones donde es posible enviar las muestras clínicas al laboratorio en menos de 4 horas. De no ser posible, se pueden conservar las muestras a 4 °C y enviarlas al día siguiente. El tiempo de transporte, entre la toma de la muestra y la recepción en el laboratorio, no debe ser superior a 48 horas y, en estas situaciones, es esencial enviar las muestras al laboratorio sobre hielo en una nevera portátil. Es importante señalar que la recuperación de virus disminuye considerablemente con un ciclo de congelación y descongelación, y no se recomienda la congelación a -20 °C durante el transporte. En los cuadros 9.2 a 9.4 se señalan los tipos de muestras, las zonas de obtención y los métodos de toma de muestras que se recomiendan en el diagnóstico de la infección genital por herpes. En el cuadro 9.3 se indican recomendaciones sobre el transporte y el almacenamiento de las muestras destinadas a la microscopia, el cultivo y las PAAN.

9.4 Diagnóstico directo del VHS a partir de las muestras clínicas

9.4.1 Examen citológico

Se ha observado que el examen directo de las muestras y el examen citológico mediante los procedimientos de tinción convencionales (frotis de Tzanck o las tinciones de Papanicolaou y Romanovsky) ofrecen baja sensibilidad y especificidad, por lo que no deben constituir el fundamento del diagnóstico de la infección por el virus del herpes. Sin embargo, el diagnóstico de cervicitis herpética puede ser un hallazgo incidental durante el examen de los frotis de Papanicolaou corrientes que se realizan con la citología del cuello uterino.

9.4.2 Detección de los antígenos virales

Cuando existen lesiones mucocutáneas se puede detectar el antígeno viral en el material de las lesiones mediante la inmunofluorescencia directa, la tinción de la inmunoperoxidasa o el enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

La inmunofluorescencia directa se puede clasificar como una prueba rápida de diagnóstico, que permite diferenciar los serotipos del virus del herpes genital en los frotis preparados en el consultorio o en el laboratorio

cuando se transportan allí los hisopos. Cuando las muestras se transportan es preciso concentrar las células antes de realizar los frotis. Los antígenos del VHS-1 y el VHS-2 se detectan mediante anticuerpos monoclonales específicos de cada tipo, marcados con fluoresceína (fig. 9.2). Las principales limitaciones de la inmunofluorescencia directa son el tiempo prolongado de realización, el costo relativamente alto debido a los reactivos y equipamiento (un microscopio de fluorescencia), y una sensibilidad inferior a la sensibilidad de los métodos moleculares modernos. La inmunofluorescencia directa ofrece una sensibilidad de 70% a 90% al compararla con el cultivo en los casos de enfermedad sintomática; la sensibilidad es mucho más baja en los casos asintomáticos, lo cual excluye su uso en ausencia de lesiones.

La tinción indirecta con inmunoperoxidasa ofrece la ventaja de utilizar un microscopio de luz normal, con lo cual es más apropiada en los laboratorios de nivel intermedio. Las muestras se preparan de igual manera que las destinadas a la inmunofluorescencia directa, y se incuban con anticuerpos policlonales de conejo o de ratón específicos del VHS o con anticuerpos monoclonales específicos del VHS-1 o el VHS-2. La fijación se pone en evidencia con un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano, dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón o de conejo, mediante los métodos corrientes de la inmunoperoxidasa. Los métodos de inmunofluorescencia directa y de la peroxidasa ofrecen una sensibilidad equivalente.

Las proteínas herpéticas también se pueden detectar en las muestras clínicas mediante una prueba clásica de ELISA de captación, que emplea un anticuerpo policlonal o monoclonal específico del VHS. En comparación

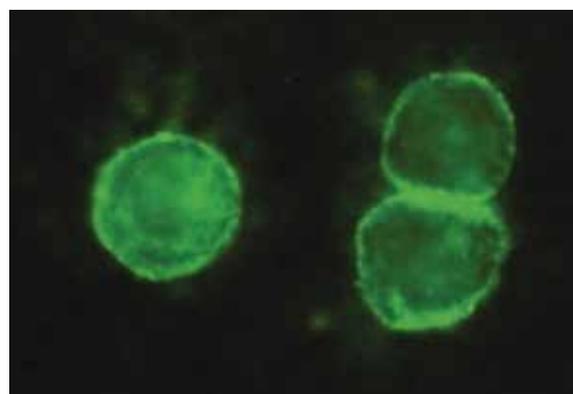


Figura 9.2
Inmunofluorescencia intracelular del virus del herpes en una muestra clínica (400x)

con el cultivo del virus, la sensibilidad de las pruebas comerciales de ELISA de captación es igual o superior a 95% con especificidades que fluctúan entre 62% y 100% en los pacientes sintomáticos. La sensibilidad de ELISA de captación de antígenos puede ser mayor que la sensibilidad del cultivo del virus en las presentaciones características, pero es inferior en los frotis de cuello uterino y de uretra. Con todo, la mayoría de las pruebas comerciales no permiten diferenciar entre el VHS-1 y el VHS-2.

Existen pruebas inmediatas en el punto de atención que detectan los antígenos del VHS, pero su rendimiento no se ha evaluado en forma amplia.

9.4.3 Aislamiento y tipado del virus en el cultivo de células

Las células que se utilizan con mayor frecuencia en el aislamiento del VHS a partir de muestras clínicas son los fibroblastos diploides primarios humanos y las líneas celulares como las células MRC-5 (fibroblastos humanos), las células Vero (riñón de monos), las células Hep-2 (carcinoma escamocelular laríngeo), las células de riñón de cría de hámster y las células renales de conejo.

Se permite la proliferación de las células en cultivo hasta que forman una monocapa confluyente en un tubo de cultivo hístico con un lado aplanado. Se retira el medio de cultivo de crecimiento y se siembran dos tubos de cultivo con alícuotas de 0,25 ml de muestras mezcladas en agitadora vorticial. Los tubos se colocan en posición horizontal en una incubadora durante una hora a 36 °C, con el fin de mejorar absorción de las partículas virales por las células. Después de la absorción, se agregan 2

ml de medio de mantenimiento de células herpéticas y se incuban los tubos de cultivo a 36 °C en una atmósfera que contenga 5% CO₂ durante un período de 7 días. Los tubos se deben examinar diariamente en un microscopio estereoscópico, a fin de verificar la aparición del efecto citopático característico del VHS, el cual suele ocurrir entre 24 y 72 horas después de la siembra.

El efecto citopático causado por el VHS se caracteriza por la transformación de las células alargadas y dispersas (fig. 9.3 izquierda) en células agrandadas, refringentes, redondeadas, “en balón”, cuyo número aumenta y adquieren una apariencia granular (fig. 9.3 derecha). Se puede observar necrosis focal de las células y sincicios, y células gigantes multinucleadas en el borde de los conglomerados de células infectadas por el virus.

Se recomienda confirmar la presencia del VHS en los cultivos de células que exhiben un efecto citopático, ya que otros virus pueden causar un efecto semejante al que se observa en los cultivos herpéticos. Esta confirmación puede ser directa en los cultivos celulares infectados, mediante anticuerpos monoclonales específicos, marcados con isotiocianato de fluoresceína o inmunoperoxidasa, en un frotis de material de cultivo o en el sobrenadante del cultivo mediante PAAN. La estrategia más práctica es la detección y el tipado por inmunofluorescencia directa. Se retira el medio de cultivo de la monocapa infectada y se agrega 1 ml del suero fetal de ternera al 5% en solución salina tamponada con fosfato. Luego se despegan las células en monocapa del cubreobjetos del lado llano, se homogeneizan, se centrifugan a 500 *g* durante 5 minutos y se deposita una gota del sedimento

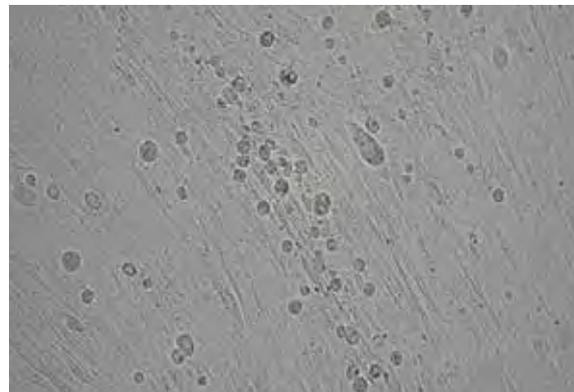


Figura 9.3
Aislamiento del virus del herpes en el cultivo de celular (50x). A la izquierda, una monocapa confluyente de fibroblastos diploides humanos MRC-5 sin infección; a la derecha, el efecto citopático característico del VHS en las células MRC-5, obtenido después de 24 a 48 horas de cultivo del virus.

una vez mezclado en agitadora vorticial sobre cada uno de los dos pocillos de un portaobjetos en vidrio recubierto con politetrafluoroetileno, se seca al aire y se fija con acetona en frío (2 °C a 8 °C) durante 10 minutos. Luego, se tiñe un pocillo con un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína, específico del VHS-1 y el otro pocillo con un anticuerpo específico del VHS-2. Se incuba el portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda y luego se lava tres veces durante 5 minutos con la solución salina tamponada con fosfato, usando un agitador mecánico. Luego se colocan los cubreobjetos sobre portaobjetos con una solución de glicerol y solución salina (50%:50%) y se examinan en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 400x. Cuando solo una de las manchas muestra partículas fluorescentes de color verde manzana, se confirma la detección del VHS del tipo específico. Los aislados del VHS cultivados se pueden almacenar en sacarosa 0,2 M y solución salina tamponada con fosfato 0,02 M de pH 7,2 (medio 2SP) a -80 °C o en nitrógeno líquido.

El aislamiento del virus en frascos redondos para cultivo celular es lento y exige intensa mano de obra, pero ofrece la ventaja de demostrar la infección activa en una lesión clínica, y facilita además el tipado del virus y la realización de las pruebas fenotípicas de sensibilidad a los medicamentos antivirales. Un cultivo más rápido del VHS se puede lograr en frascos ampolla con un cubreobjetos circular al fondo (*shell vial*) o en placas multipocillos y centrifugando la muestra sobre monocapas de células en cubreobjetos, de una manera análoga a los cultivos de clamidia.

El diagnóstico de la infección por el VHS en el cultivo tisular ofrece una baja sensibilidad, pues el virus se aísla de las lesiones en aproximadamente 80% de las primoinfecciones pero solo en 25% a 50% de las lesiones recurrentes y en una proporción aun menor en las personas cuyas lesiones están en vía de curación.

Por lo tanto, el líquido obtenido de las ampollas intactas (lesiones vesiculares o pustulosas) ofrecerá un resultado positivo en cultivo en más de 90% de los casos. Cuando las lesiones han formado costra, solo cerca de 25% de los cultivos serán positivos. La imposibilidad de detectar el VHS en cultivo no significa que no exista una infección herpética.

El aislamiento del VHS en cultivo celular ha constituido la piedra angular del diagnóstico de la infección, pero solo es factible en los laboratorios especializados.

Las ventajas del cultivo del VHS consisten en su alta especificidad y la recuperación de cepas virales que se pueden tipar y someter a la prueba fenotípica de sensibilidad a los medicamentos antivirales. El cultivo es costoso, exige una gran intensidad de mano de obra, es lento y su sensibilidad diagnóstica es menor que la sensibilidad de la PAAN. El retraso en la preparación y la falta de cadena de frío después de la toma de la muestra disminuyen de manera considerable el rendimiento diagnóstico.

9.5 Detección y cuantificación del virus mediante técnicas moleculares

Se han propuesto diversos procedimientos moleculares con el objeto de detectar o cuantificar el genoma del VHS en las muestras clínicas, entre ellos las reacciones en cadena de la polimerasa (RCP) competitivas, internas de cada laboratorio (3), la detección por RCP seguida de inmunoensayo enzimático e hibridación con DNA (4), la RCP en tiempo real (5–8) y varios estuches comercializados. Las PAAN en tiempo real permiten la detección y también la cuantificación del DNA del VHS en las muestras clínicas. En comparación con las pruebas convencionales de amplificación de ácidos nucleicos, la RCP en tiempo real hace posible la reacción de amplificación del DNA del virus en un solo tubo, es más rápida, facilita las condiciones de realización y disminuye el riesgo de contaminación cruzada. Los cebadores de las secuencias de DNA del VHS que son comunes al VHS-1 y el VHS-2 (gen de la polimerasa del DNA [gen *pol F*], de la quinasa de timidina o del dominio B de la glucoproteína del virus del herpes) pueden detectar el DNA del VHS (6–8). Los cebadores y las sondas de secuencias de DNA, específicas del VHS-1 o el VHS-2, como los genes gG, gD, o gI, permiten la amplificación de uno de los serotipos del virus herpético. En cada extracción de DNA y su análisis posterior es necesario contar con un testigo negativo y también con un testigo interno positivo que ponga en evidencia la presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras y verifique la calidad de preparación de las mismas. En condiciones ideales, se deberían usar grupos certificados y registrados de muestras de referencia que comporten testigos codificados y controlen la calidad de cada laboratorio y de los diferentes laboratorios (véase el capítulo 2).

Las PAAN representan el método más sensible actualmente al alcance de detección del VHS a partir de muestras genitales. Se ha demostrado que las pruebas

por RCP ofrecen tasas de detección de 11% a 71% superiores al cultivo del virus. Además, la PAAN permite detectar la excreción asintomática de VHS. Sin embargo, un resultado negativo de la RCP no indica la ausencia de infección, pues la excreción del virus es intermitente. La utilización de PAAN en el diagnóstico del VHS exige condiciones de transporte de las muestras menos estrictas que las necesarias en el diagnóstico por cultivo. La RCP en tiempo real ofrece además otras ventajas como son la rapidez de detección, la cuantificación y el tipado del DNA del virus sin riesgo de contaminación, gracias a la realización de los procedimientos en un solo tubo.

Aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos todavía no ha autorizado ninguna PAAN para uso en los Estados Unidos, en las guías de tratamiento de las enfermedades de transmisión sexual del 2010, de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades se sostiene que se puede realizar la RCP con el fin de diagnosticar el herpes, en los laboratorios clínicos que han elaborado sus propias pruebas y han realizado un estudio de verificación de las enmiendas para el mejoramiento del laboratorio clínico y que el cultivo de células y la RCP son las pruebas preferidas de diagnóstico del VHS en las personas que buscan tratamiento médico por úlceras genitales u otras lesiones mucocutáneas (2). Es importante una validación estricta de las RCP internas y de las PAAN comerciales en cada entorno.

9.6 Diagnóstico serológico indirecto de las infecciones herpéticas

La prueba serológica se recomienda como una ayuda al diagnóstico del herpes genital en los pacientes con síntomas recurrentes, lesiones atípicas o lesiones en curso de cicatrización que presentan cultivos negativos para el VHS. Cuando no existen lesiones o las pruebas de detección del virus son negativas, la prueba serológica puede ser útil en el manejo de los compañeros sexuales de las personas con herpes genital y en la detección de la infección por VHS en las personas en riesgo de contraer la infección, como los pacientes infectados por el VIH o con otras infecciones de transmisión sexual y en las personas con múltiples compañeros sexuales. El método de tamizaje serológico del VHS-1 y el VHS-2 no está indicado en la población general.

Aunque la exactitud de las pruebas serológicas del VHS no iguala la exactitud de las pruebas de anticuerpos dirigidos contra el VIH, estas pruebas representan un

progreso evidente con respecto al diagnóstico clínico del herpes genital, el cual ofrece una sensibilidad de 39% en el mejor de los casos y establece un diagnóstico positivo falso en cerca de 20% de los pacientes.

Los inmunoensayos enzimáticos comerciales mejoran continuamente y se han propuesto algunos algoritmos encaminados a resolver los casos cuyas pruebas no son conclusivas. Al decidir cuándo utilizar una prueba, los médicos deben tener presente que las personas sin diagnóstico son quienes ocasionan la mayoría de las nuevas transmisiones y que los estudios en muchos entornos muestran que la mayoría de los pacientes acogen favorablemente la oportunidad de conocer su situación serológica.

Los anticuerpos de tipo IgG suelen ser negativos en el herpes genital primario, pues solo se detectan de 2 semanas a 3 meses después de la aparición de los síntomas y persisten indefinidamente. Por lo tanto, inmediatamente después de la infección existe un “intervalo” durante el cual la búsqueda de anticuerpos dará un resultado negativo. En consecuencia, las primoinfecciones por VHS se pueden documentar con cualquier método serológico que ponga en evidencia la seroconversión en sueros apareados. Dado que la prueba con IgM también puede ser positiva durante la reactivación de la enfermedad, este método no permite diferenciar entre una primoinfección y una infección recurrente y, por consiguiente, su uso con fines diagnósticos es limitado en la práctica corriente.

Cuando existen lesiones genitales, la prueba serológica específica de serotipo y la prueba directa del virus pueden ayudar a establecer si el episodio corresponde a una adquisición reciente de la infección por el VHS o a una reactivación (cuadro 9.4). La aparición de anticuerpos específicos del tipo de VHS puede tardar entre 2 semanas y 3 meses. Por lo tanto, en una persona con infección herpética recién contraída, la ausencia inicial de anticuerpos contra la glucoproteína G2 (gG2) y la aparición de estos anticuerpos después de 12 semanas confirma la primoinfección por el VHS-2. La distinción entre la infección herpética recién adquirida y la reactivación es útil en los estudios epidemiológicos, y en ocasiones es de ayuda clínica para el manejo de los aspectos psicosociales.

Dado que casi todas las infecciones por el VHS-2 se contraen sexualmente, la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra este tipo de virus del herpes corresponde a una infección genitoanal, y se

debe ofrecer educación y orientación apropiadas a las personas que la padecen. La presencia exclusiva de anticuerpos contra el VHS-1 es más difícil de interpretar. La mayoría de las personas con anticuerpos contra el VHS-1 han contraído una infección bucal durante la niñez, que quizá sea asintomática. Sin embargo, la adquisición de la infección genital por el VHS-1 está aumentando y esta forma también puede ser asintomática. La falta de síntomas en una persona seropositiva al VHS-1 no permite diferenciar entre la infección genitoanal y la infección bucolabial. Las personas que presentan una infección por el VHS-1, independientemente de la localización de la infección, siguen siendo susceptibles a contraer el VHS-2.

Las pruebas serológicas basadas en la glucoproteína G (gG) específica de serotipo viral pueden distinguir la infección por VHS-1 de la infección por el VHS-2 y siempre se debe solicitar específicamente cuando se practica el examen serológico. Las pruebas serológicas específicas del tipo de VHS pueden resultar útiles en las siguientes situaciones: síntomas genitales recurrentes o síntomas atípicos con cultivo negativo para el virus del herpes; diagnóstico clínico de herpes genital sin confirmación de laboratorio; en los compañeros sexuales de los pacientes con herpes genital confirmado, con el fin de verificar la concordancia o discordancia serológica antes de proveer la orientación. Además, la prueba serológica del VHS se debe incluir en la evaluación integral de las infecciones de transmisión sexual en las personas con múltiples compañeros sexuales o infectadas por el VIH, y en los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, quienes presentan un mayor riesgo de contraer el VIH.

Los genomas del VHS-1 y el VHS-2 codifican cada uno como mínimo 80 polipéptidos estructurales y no estructurales diferentes, entre ellos al menos diez proteínas glucosiladas, denominadas de la glucoproteína A hasta la glucoproteína I (gA–gI). La mayoría de los anticuerpos contra la infección por el VHS se dirigen contra estas glucoproteínas de superficie. Las glucoproteínas gB, gC, gD y gE desencadenan respuestas inmunitarias intensas. Ambos tipos de VHS comparten algunos epítomos que están presentes en estas glucoproteínas y, por consiguiente, presentan un grado considerable de reactividad cruzada cuando se utilizan ciertas pruebas comerciales. Sin embargo, no se ha detectado ninguna reactividad cruzada entre la gG1 del VHS-1 y la gG2 del VHS-2 (10). Las pruebas

serológicas exactas y específicas del tipo de virus del herpes se basan en la detección de anticuerpos específicos contra la gG1 (del VHS-1) y gG2 (del VHS-2) y utilizan como antígenos gG1 o gG2 nativos, purificados o recombinados.

Las pruebas ELISA basadas en la gG específica del serotipo de VHS se empezaron a comercializar en 1999, pero aun se encuentran en el mercado pruebas más antiguas que no establecían esta diferencia (aunque se afirme lo contrario). Las pruebas diagnósticas inmediatas también pueden aportar resultados con los anticuerpos del VHS-2 a partir de sangre capilar o suero, durante una cita en el consultorio. La sensibilidad en la detección de anticuerpos del VHS-2 de las pruebas de gG específicas de serotipo varían entre 80% y 98% y los resultados negativos falsos quizá sean más frecuentes en fases iniciales de la infección. Las especificidades de estas pruebas son iguales o superiores a 96%. Las pruebas cuyo uso está aprobado en los Estados Unidos tienen una sensibilidad entre 97% y 100%, y una especificidad entre 94% y 98% respectivamente, al compararlas con la transferencia de Western. Pueden ocurrir resultados positivos falsos, sobre todo en los pacientes con un bajo riesgo de infección por el virus del herpes. La repetición de la prueba o una evaluación confirmatoria podría estar indicada en algunos entornos, en especial cuando se sospecha una adquisición reciente del herpes genital.

Las infecciones sexualmente transmisibles concurrentes pueden aumentar los resultados positivos falsos por ELISA del VHS-2 (11). Además, al comparar las pruebas de ELISA con las transferencias de Western en África subsahariana se puso en evidencia una menor especificidad a la observada previamente, sobre todo en las personas infectadas por el VIH (12). De manera más general, se ha comunicado una especificidad deficiente de ciertas pruebas herpéticas basadas en las gG específicas de serotipo en muestras de África subsahariana (12–14). La causa de este bajo rendimiento no se conoce bien, pero puede ser consecuencia de problemas del laboratorio o dificultades técnicas o de la reactividad cruzada con infecciones aun no diagnosticadas, que son más frecuentes en África subsahariana (13, 15–16).

También se han elaborado pruebas serológicas inmediatas en el punto de atención que detectan anticuerpos específicos del VHS-2. Estos ensayos inmunocromatográficos utilizan muestras de sangre

capilar por punción digital (o suero) y de manera característica aplican un flujo lateral de suero a través de una membrana que contiene un punto de antígeno gG1 o gG2. Cuando al pasar el suero por el dispositivo ocurre un cambio de coloración (punto rosado), esto significa que existen anticuerpos del VHS. Pese a una variabilidad entre operadores de 5% a 10% en la interpretación, estas pruebas inmediatas ofrecen un buen rendimiento diagnóstico con sensibilidades iguales o superiores a 91% y especificidades iguales o superiores a 94% (17). De igual manera que los sistemas basados en ELISA, el desempeño de las pruebas inmediatas en el punto de atención depende en parte de la prevalencia del VHS en la población. La principal ventaja de estas pruebas inmediatas es que proporcionan rápidamente un resultado (incluso mientras el paciente está todavía en el centro de atención), lo cual favorece la educación y la orientación oportunas de los pacientes. El principal inconveniente de las pruebas inmediatas es su alto costo, en comparación con los sistemas basados en ELISA.

Los anticuerpos IgG e IgM específicos del VHS se detectan mediante diversos métodos inmunológicos (18–19). En los laboratorios especializados de referencia se han desarrollado varias pruebas de transferencia de Western no comerciales, pero no están al alcance con fines de aplicación diagnóstica en la mayoría de los entornos (20). En el cuadro 9.4 se resume el diagnóstico serológico de las infecciones por el VHS y las pruebas de anticuerpos específicos del serotipo.

La prueba serológica del VHS no se recomienda de manera sistemática en los pacientes asintomáticos, pero está indicada en los siguientes grupos:

- Antecedentes de enfermedad genital recurrente o atípica cuando los métodos de detección directa del virus han sido negativos. La presencia de anticuerpos dirigidos contra el VHS-2 respaldan el diagnóstico de herpes genital; los anticuerpos dirigidos contra el VHS-1 no diferencian entre la infección genital y la infección bucofaríngea. Se ofrece orientación a los pacientes con resultados negativos de la IgG del

Cuadro 9.4: Estrategia de diagnóstico virológico y serológico del VHS-2 en presencia o ausencia de lesiones genitales, adaptada de Gupta y colegas (9)

	Detección del VHS-2 por el método directo	IgG específica del VHS-1	IgG específica del VHS-2	Interpretación
Primera evaluación de las lesiones genitales	Positiva	Positiva o negativa	Negativa	<ul style="list-style-type: none"> • Infección aguda por VHS-2 • Repetir la serología específica del VHS-2 en 15 días a 30 días
	Positiva	Positiva o negativa	Positiva	<ul style="list-style-type: none"> • Infección recurrente VHS-2 contraída, como mínimo, 6 semanas antes
Ninguna lesión	NA	Negativa	Negativa	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes en riesgo de contraer infecciones bucolabiales o genitales por el VHS-1 y el VHS-2
	NA	Positiva	Negativa	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes en riesgo de contraer infecciones bucolabiales o genitales por el VHS-2
	NA	Positiva	Positiva	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones antiguas por el VHS de tipo 1 y de tipo 2
Lesiones genitales recurrentes	Positiva	Positiva o negativa	Positiva	<ul style="list-style-type: none"> • Infección recurrente por el VHS-2
	Negativa	Negativa	Positiva	<ul style="list-style-type: none"> • Posible infección recurrente por el VHS-2 • Se deben considerar otras causas posibles de enfermedad genital ulcerosa

NA: no se aplica.

VHS-2; en los pacientes con resultados positivos de la IgG del VHS-1 se debe tener en cuenta que este tipo de herpes es una causa relativamente infrecuente de enfermedad genital recurrente.

- Primer episodio de herpes genital, cuya orientación y tratamiento dependen de la diferenciación entre las primoinfecciones y las infecciones establecidas. En el momento de la aparición de los síntomas, la ausencia de la IgG contra el VHS del tipo detectado en la lesión genital es indicativo de una infección primaria. La seroconversión se debe demostrar durante el seguimiento.
- Compañeros sexuales de pacientes con herpes genital, cuando existen inquietudes acerca de la transmisión. Las parejas serodiscordantes se pueden aconsejar sobre las estrategias que disminuyen el riesgo de contraer la infección y padecer la enfermedad.

Serología del VHS y embarazo:

- No se recomienda la práctica sistemática de la prueba a las embarazadas asintomáticas, pero está indicada cuando existen antecedentes de herpes genital en la pareja.
- Se debe orientar a las mujeres seronegativas frente al VHS-1 o el VHS-2 sobre las estrategias de prevención de una nueva infección por cualquiera de los serotipos virales durante el embarazo.

Serología del VHS en el contexto de la infección por el VIH:

- No se recomienda la práctica sistemática de la prueba a los pacientes infectados por el VIH. Aunque la seropositividad al VHS-2 aumenta el riesgo de transmisión del VIH y las recurrencias frecuentes de la infección por el VHS-2 aumentan la replicación del VIH, existen pocos datos fidedignos que documenten el manejo de la coinfección por el VHS-2 en pacientes infectados por el VIH sin síntomas de herpes genital.
- Unos pocos datos indican un riesgo aumentado de transmisión del VIH perinatal en las mujeres infectadas por el VIH y seropositivas frente al VHS-2. Dado que los resultados de los estudios no son homogéneos, no se recomienda la práctica

sistemática de la prueba en las embarazadas seropositivas al VIH.

- Las personas portadoras del VHS-2 que incurren en comportamientos sexuales de alto riesgo deben recibir orientación sobre el mayor riesgo que presentan de contraer la infección por el VIH.

9.7 Vigilancia terapéutica: Pruebas de farmacorresistencia

La profilaxis a largo plazo y el tratamiento con medicamentos antiherpéticos como el aciclovir o el valaciclovir pueden dar lugar a la aparición de resistencia, sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos (27). La prevalencia relativa de cepas del VHS resistentes a aciclovir difiere entre las personas inmunocompetentes e inmunodeprimidas debido a la replicación prolongada del virus y al deterioro de la respuesta del huésped, que puede favorecer la supervivencia de las cepas del VHS resistentes menos adaptadas. La persistencia de las lesiones durante más de una semana después del comienzo del tratamiento sin una disminución apreciable del tamaño, una presentación atípica de las lesiones o la aparición de nuevas lesiones satélites a pesar de la administración de medicamentos antivirales son indicativas de fracaso terapéutico. Es preciso contar con un diagnóstico de laboratorio de la resistencia a aciclovir a fin de guiar a los médicos hacia opciones diferentes de tratamiento en los casos de fracaso. La resistencia a aciclovir se puede diagnosticar al poner en contacto el virus con los productos antivirales (pruebas fenotípicas) o mediante la detección de mutaciones génicas específicas de la quinasa de timidina (UL23) y la DNA-polimerasa (UL30), que confieren resistencia a los medicamentos antivirales (pruebas genotípicas). La utilidad de los métodos genotípicos en la práctica clínica depende de la posibilidad de diferenciar entre las variaciones aleatorias (polimorfismos) y las mutaciones verdaderas que confieren farmacorresistencia.

9.8 Referencias

1. Domeika M et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries. *Eurosurveillance*, 2010, 15(44):pii:19703.
2. Centers for Diseases Control, Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2010, 59(RR-12) (<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/STD-Treatment-2010-RR5912.pdf>, consultado el 4 de abril del 2013).

3. Hobson A et al. Evaluation of a quantitative competitive PCR assay for measuring herpes simplex virus DNA content in genital tract secretions. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(3):548–552.
4. Mbopi-Kéou FX et al. Interactions between herpes simplex virus type 2 and human immunodeficiency virus type 1 infection in African women: opportunities for intervention. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 182(4):1090–1096.
5. Ryncarz AJ et al. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(6):1941–1947.
6. Espy MJ et al. Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(2):795–799.
7. Burrows J et al. Detection and subtyping of herpes simplex virus in clinical samples by LightCycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. *BMC Microbiology*, 2002, 2(1):12.
8. Legoff J et al. Real-time PCR quantification of genital shedding of herpes simplex virus (HSV) and human immunodeficiency virus (HIV) in women coinfecting with HSV and HIV. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(2):423–432.
9. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *The Lancet*, 2007, 370(9605):2127–2137.
10. Görander S, Svennerholm B, Liljeqvist JA. Secreted portion of glycoprotein g of herpes simplex virus type 2 is a novel antigen for type-discriminating serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(8):3681–3686.
11. Summerton J et al. Effect of sexually transmitted disease (STD) coinfections on performance of three commercially available immunosorbent assays used for detection of herpes simplex virus type 2-specific antibody in men attending Baltimore, Maryland, STD clinics. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(12):1545–1549.
12. Biraro S et al. Performance of commercial herpes simplex virus type-2 antibody tests using serum samples from sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Sexually Transmitted Diseases*, 2011, 38(2):140–147.
13. van Dyck E et al. Performance of commercially available enzyme immunoassays for detection of antibodies against herpes simplex virus type 2 in African populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(7):2961–2965.
14. LeGoff J et al. Performance of HerpeSelect and Kalon assays in detection of antibodies to herpes simplex virus type 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(6):1914–1918.
15. Ashley-Morrow R et al. Performance of focus ELISA tests for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 antibodies among women in ten diverse geographical locations. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10(6):530–536.
16. Golden MR et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) western blot confirmatory testing among men testing positive for HSV-2 using the focus enzyme-linked immunosorbent assay in a sexually transmitted disease clinic. *Sexually Transmitted Diseases*, 2005, 32(12):771–777.
17. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2002, 35(Suppl 2):S173–S182.
18. Ashley RL et al. Premarket evaluation of a commercial glycoprotein G-based enzyme immunoassay for herpes simplex virus type-specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(1):294–295.
19. Morrow RA, Friedrich D, Krantz E. Performance of the Focus and Kalon enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to herpes simplex virus type 2 glycoprotein G in culture-documented cases of genital herpes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(11):5212–5214.
20. Ashley RL. Sorting out the new HSV type specific antibody tests. *Sexually Transmitted Infections*, 2001, 77(4):232–237.
21. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(2):459–472.

Capítulo 10

Sífilis

10.1 Introducción

La sífilis es una enfermedad crónica de transmisión sexual caracterizada por manifestaciones floridas y largos periodos de latencia. Está causada por *Treponema pallidum subsp. pallidum*, un microorganismo fino y de forma espiral que se relaciona estrechamente con los microorganismos que causan las treponematosis no venéreas: *T. pallidum subsp. pertenue* (pian o frambesia), *T. pallidum subsp. endemicum* (sífilis endémica) y *T. carateum* (mal de pinto). Estos cuatro microorganismos patógenos son morfológica y antigénicamente idénticos, y solo pueden distinguirse por su modo de transmisión, sus características epidemiológicas, sus manifestaciones clínicas y, más recientemente, gracias a la secuenciación genética (1).

La sífilis venérea suele transmitirse como resultado del contacto sexual con una lesión infecciosa de las mucosas o de la piel abrasionada, o bien por vía trasplacentaria, de la madre al feto. La multiplicación bacteriana tiene lugar preferentemente en el punto de inoculación, dando lugar a una úlcera genital primaria tras un periodo de incubación de 9 a 90 días. Sin embargo, la sífilis debe considerarse una enfermedad

general, ya que la bacteria causal entra en el torrente sanguíneo poco después de la infección.

En la figura 10.1 se muestra el curso de la sífilis sin tratar. La primera manifestación de la enfermedad en los adultos es una macula pequeña, que se convierte en una pápula que a su vez se ulcera. La úlcera característica (chancro primario) suele ser una lesión única, indolora, que tiene una base limpia y es relativamente avascular. La lesión se encuentra frecuentemente en el surco coronal, en el glande o en el cuerpo del pene en los hombres, y en la vulva, las paredes vaginales o el cuello uterino en las mujeres. Las lesiones extragenitales son raras, pero pueden producirse chancros bucales como resultado de la felación, y frecuentemente se observan lesiones perianales y rectales en hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres o en mujeres que han practicado el coito anal (en ambos casos, adoptando un papel pasivo). Con frecuencia las lesiones primarias son indoloras, por lo que pueden pasar desapercibidas. Si no se instaura tratamiento, la úlcera desaparecerá espontáneamente en 3 a 8 semanas sin dejar cicatriz. Los chancros genitales primarios generalmente se

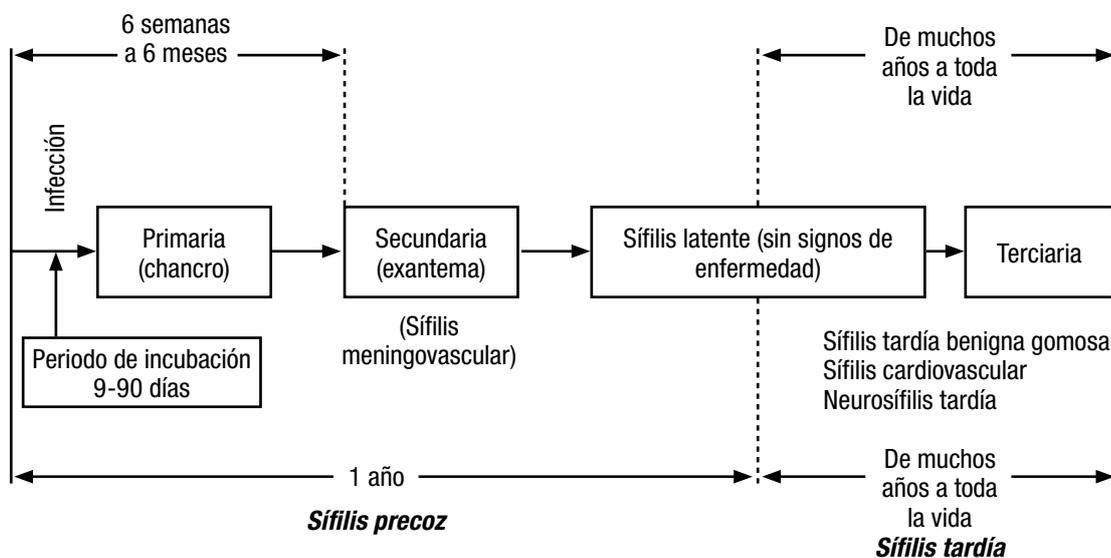


Figura 10.1
Representación esquemática del curso de la sífilis sin tratar

asocian a una linfadenopatía inguinal bilateral, que suele ser discreta y no es dolorosa a la palpación.

En los pacientes que no han recibido tratamiento, el inicio de la sífilis secundaria puede producirse entre 6 semanas y 6 meses después de la infección inicial. El chancro primario todavía puede estar presente cuando aparecen lesiones secundarias clínicamente evidentes.

La característica principal de la sífilis secundaria es un exantema cutáneo distribuido uniformemente, no irritante, que puede ser macular, papular o papuloescamoso; a menudo se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies. El exantema puede ir acompañado de linfadenopatías generalizadas y fiebre, cefalea y malestar general. En zonas cálidas y húmedas, como la vulva o la región perianal, el exantema puede agrandarse y formar lesiones sobrelevadas, similares a verrugas, denominadas condilomas planos; en superficies mucosas se forman lesiones serpiginosas superficiales de color blanco grisáceo.

Si no se diagnostica la sífilis secundaria y, por tanto, no se la trata, todas las manifestaciones visibles de la enfermedad desaparecen espontáneamente y el paciente pasa a un periodo de latencia que puede durar muchos años. La sífilis latente se divide en dos etapas: la sífilis latente precoz y la sífilis latente tardía; la línea divisoria entre ambas se fija en el año posterior a la fecha en que se contrajo la enfermedad (fig. 10.1). No obstante, hay que tener en cuenta que a menudo es imposible determinar la duración exacta de la infección sin tratar y que tales casos deben clasificarse en principio como sífilis latente tardía. Durante los periodos de latencia de la enfermedad, no hay ninguna lesión cutánea o mucosa de la que se puedan obtener muestras, por lo que el diagnóstico debe basarse en los resultados de las pruebas serológicas y en la ausencia de signos y síntomas de sífilis terciaria.

En general se considera que la sífilis terciaria es la etapa destructiva de la enfermedad. Normalmente sus signos y síntomas suelen aparecer muchos años después de la infección inicial, aunque el curso puede ser mucho más rápido en pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las diversas manifestaciones de la sífilis terciaria se han clasificado como sífilis tardía benigna gomosa, sífilis cardiovascular y neurosífilis, aunque estas características clínicas pueden coexistir. Los gomas son

las lesiones destructivas de la sífilis terciaria y pueden afectar a cualquier órgano, aunque se encuentran con mayor frecuencia en la piel, el cartílago y el hueso (sífilis tardía benigna), en las paredes de la aorta (sífilis cardiovascular), en los vasos cerebrales (sífilis meningovascular) o en el cerebro y la médula espinal (neurosífilis).

En general, estas manifestaciones tardías se diagnostican considerando los datos clínicos así como los resultados de las radiografías de tórax o de otras pruebas de diagnóstico por imágenes (en el caso de la sífilis cardiovascular), de la exploración radiográfica de los huesos afectados para detectar gomas óseas, y de las pruebas serológicas, incluido el análisis del líquido cefalorraquídeo para diagnosticar la neurosífilis. En textos autorizados puede encontrarse una descripción más exhaustiva de las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad (2).

10.2 Métodos de detección directos para el diagnóstico de la sífilis

T. pallidum no puede cultivarse en medios artificiales, por lo que los métodos de elección para el diagnóstico de la sífilis precoz son métodos de detección directa, como la microscopia de campo oscuro, la inmunofluorescencia (IF) directa y pruebas para detectar secuencias de DNA específicas de *T. pallidum* en muestras obtenidas de lesiones cutáneas o de tejidos. Durante mucho tiempo se ha considerado que la prueba de la infectividad en el conejo era la prueba de referencia para la detección directa de *T. pallidum* en muestras clínicas (3). Este método tiene una sensibilidad de casi un solo microorganismo cuando se usan pases repetidos en conejos; sin embargo, rara vez se realiza, salvo en los laboratorios de investigación, ya que es lento (hacen falta de 1 a 2 meses para concluirlo) y exige tener acceso a una instalación apropiada para animales.

10.2.1 Microscopia de campo oscuro

La microscopia de campo oscuro es el único método en el punto de atención que permite hacer el diagnóstico directo de la sífilis en casos de sífilis primaria o secundaria del adulto o de sífilis congénita precoz; por esta razón, se recomienda usarla en consultorios de infecciones de transmisión sexual y en laboratorios hospitalarios cercanos al centro clínico. Esta prueba debe limitarse a laboratorios especializados, dado que se requiere un microscopio especializado equipado

con un condensador de campo oscuro, además del cumplimiento de estrictas condiciones técnicas para obtener resultados fiables.

En la microscopía de campo oscuro, solo los rayos luminosos que inciden en los microorganismos o las partículas en ángulo oblicuo entran en el objetivo del microscopio, dando lugar a cuerpos luminiscentes blancos brillantes sobre fondo negro. La microscopía de campo oscuro debe ser realizada por personal adecuadamente capacitado y con experiencia que pueda ajustar el microscopio correctamente y distinguir *T. pallidum* de treponemas no patógenos y de otros microorganismos espiralados que suelen encontrarse en la mucosa genital y la anal. La cavidad bucal a menudo es colonizada por espiroquetas diferentes de los treponemas, por lo que no se recomienda examinar mediante microscopía de campo oscuro las lesiones bucales.

Tanto las lesiones sifilíticas primarias como las secundarias pueden examinarse mediante microscopía de campo oscuro. La muestra ideal es un exudado seroso de las lesiones activas, que carezca de hemáties. Las lesiones activas deben limpiarse cuidadosamente con una torunda de gasa estéril y solución salina estéril. Luego se frota suavemente la lesión con una torunda de gasa seca estéril para producir un exudado seroso. En caso de hemorragia, las gotas de sangre se limpian y el líquido seroso que aparece se coloca en un portaobjetos de vidrio usando una espátula fina de acero inoxidable o de platino o un asa de siembra bacteriológica, o bien presionando el portaobjetos directamente en el líquido. El material puede mezclarse con una gota de solución salina para elaborar una suspensión homogénea sobre la que pueda colocarse el cubreobjetos. La preparación debe examinarse de inmediato, pues la motilidad característica de estos microorganismos es un factor importante para identificarlos y cualquier retraso en el examen la reduce rápidamente; la probabilidad de visualizar los treponemas también disminuye si la lesión está seca o está cicatrizando.

Es fundamental la alineación óptica correcta del microscopio de campo oscuro para que el examen sea satisfactorio. Primero se colocan unas cuantas gotas de aceite de inmersión sobre el condensador de un microscopio previamente alineado. Después se baja ligeramente el condensador de modo que el aceite esté por debajo del nivel de la platina. A continuación se

coloca la muestra que debe examinarse en la platina y se eleva el condensador hasta que haya un buen contacto entre el aceite y la parte inferior de la preparación. Es importante evitar que queden burbujas de aire atrapadas en el aceite. La muestra se examinará primero usando un objetivo de baja potencia (10×).

Después de enfocar el objetivo, hay que centrar la luz en el medio del campo ajustando los tornillos de centrado situados en el condensador; el condensador se enfoca subiéndolo y bajándolo hasta que se obtiene el diámetro de luz más pequeño posible. Posteriormente, se centra de nuevo la luz si fuera necesario. Usando el objetivo de observación en seco de 40×, se enfoca la muestra y se examina minuciosamente la preparación. El examen por microscopía de campo oscuro se realiza mejor en una habitación oscura.

T. pallidum aparece como cuerpos espirales, brillantes y blancos, iluminados contra un fondo negro. El microorganismo se identifica por su morfología, tamaño y movimiento característicos. Es un microorganismo fino (0,10-0,18 µm de ancho), 6-20 µm de largo, con 8-14 espiras regulares y próximas (fig. 10.2). Presenta movimientos rápidos y bastante abruptos, con una rotación relativamente lenta en torno a su eje longitudinal. Esta rotación se acompaña de una flexión o un giro sincopado en el centro del microorganismo. Puede observarse cómo se alarga y acorta (como un muelle). En ocasiones se producen distorsiones en espirales tortuosas. Pueden observarse otras espiroquetas, normalmente saprofitas. Sin embargo, a menudo las espirales son más laxas o más gruesas, con diferentes



Figura 10.2
Treponema pallidum, microscopía de campo oscuro
Fuente: Por cortesía de David Cox, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

movimientos, incluido un movimiento de retorcimiento con flexión y relajación marcadas de las espirales.

Evidenciar la presencia de treponemas con la morfología y la motilidad que caracterizan a *T. pallidum* constituye un diagnóstico positivo de sífilis primaria y secundaria (4). Los pacientes con un chancro primario que es positivo en el examen en el microscopio de campo oscuro pueden presentar resultados negativos en las pruebas serológicas, pero normalmente cabe esperar la seroconversión en unos cuantos días. Sin embargo, el hecho de que no se logre observar el microorganismo en el microscopio de campo oscuro no descarta el diagnóstico de sífilis. Los resultados negativos pueden significar:

- que el número de microorganismos presentes en la muestra es insuficiente (un solo examen con el microscopio de campo oscuro tiene una sensibilidad inferior a 50%);
- que el paciente ya ha sido tratado o que se ha aplicado en la lesión un preparado antibacteriano;
- que la resolución natural de la lesión está próxima;
- que la lesión no es sífilítica.

Cualquiera sea el resultado del examen con el microscopio de campo oscuro, siempre debe extraerse sangre para hacer pruebas serológicas.

NOTA: Se puede realizar la técnica de campo oscuro y optimizar la óptica del microscopio examinando muestras obtenidas en el margen gingival en el interior de la boca. Las células epiteliales gingivales y las bacterias bucales, incluidos los microorganismos espirales, se ven como cuerpos blancos y brillantes sobre un fondo negro.

10.2.2 Prueba de inmunofluorescencia directa (DFA)

El método que se usa para recoger material de la lesión para la prueba de inmunofluorescencia directa (DFA) es idéntico al que se emplea para la microscopía de campo oscuro. Las muestras se extienden en una superficie de 1 cm² de un portaobjetos, se deja que se sequen al aire, y se fijan con acetona o metanol, después de lo cual pueden envasarse para transportarlas al laboratorio. Después de añadir una globulina contra *T. pallidum* marcada con fluoresceína comercializada y de hacer la incubación y el lavado, los portaobjetos se examinan

con el microscopio de fluorescencia. *T. pallidum* aparece en la muestra como un microorganismo de color verde manzana, con su característica morfología sobre un fondo negro (fig. 10.3). La especificidad y la sensibilidad de la inmunofluorescencia directa son superiores a las de la microscopía de campo oscuro, sobre todo si el anticuerpo monoclonal se usa para hacer el conjugado de fluoresceína, dado que la técnica de inmunofluorescencia directa elimina la confusión con otros microorganismos espiralados, y un número reducido de treponemas teñidos por la fluoresceína se detectan más fácilmente en el frotis teñido que en la preparación sin teñir (5).

Lamentablemente, el conjugado de fluoresceína específico no se comercializa en muchos países.

NOTA: El conjugado de fluoresceína puede titularse convenientemente aplicando diluciones al doble del conjugado en portaobjetos comercializados que pueden adquirirse para realizar la prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos fluorescentes (FTA-Abs), incubando, lavando y examinando la muestra como en el procedimiento de inmunofluorescencia directa antes descrito. La dilución que debe usarse para la prueba de inmunofluorescencia directa es la mayor dilución del conjugado que muestre una fluorescencia evidente y específica en ausencia de tinción de fondo.

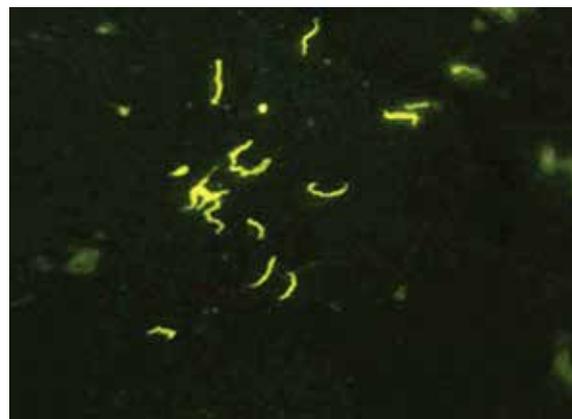


Figura 10.3
Prueba de inmunofluorescencia directa positiva de *T. pallidum*

Fuente: Por cortesía de David Cox, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

10.2.3 Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos de *T. pallidum*

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) puede detectar equivalentes de DNA de menos de 10 microorganismos en una muestra, mediante amplificación de segmentos génicos específicos del DNA genómico de *T. pallidum*. Puede usarse para examinar muestras de cualquier lesión, exudado, tejido o humor orgánico, y la muestra puede ser fresca, o se puede congelar o fijar e incluir en parafina. Dado que no se dispone de pruebas de RCP comercializadas para *T. pallidum* que hayan sido autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, algunos laboratorios han empleado pruebas de RCP desarrolladas en el laboratorio.

Se han desarrollado varios ensayos de RCP, que se han utilizado con éxito para detectar secuencias diana de DNA específicas de *T. pallidum* en lesiones primarias y secundarias (6-8). La sensibilidad analítica de estos ensayos es aproximadamente de 10 microorganismos. El uso de cebadores marcados con fluoresceína y de un analizador genético ABI 310 para detectar los amplicones ha mejorado la sensibilidad analítica de una RCP para *polA* hasta aproximadamente un microorganismo por reacción de RCP. Estos métodos teóricamente pueden aplicarse al diagnóstico de la sífilis congénita y también de la neurosífilis, en las que el número de microorganismos probablemente es bajo; sin embargo, no pueden recomendarse estas pruebas para la detección corriente de *T. pallidum* en la sangre, ni siquiera en la sífilis primaria y la secundaria, dada la presencia de inhibidores de la RCP. No obstante, se utilizó una RCP semicuantitativa en tiempo real para indicar que el número de espiroquetas en la sangre de los pacientes varía según la etapa de la sífilis, desde 200 hasta 10⁵ microorganismos por mililitro de sangre (9).

Se han desarrollado pruebas de RCP múltiple para la detección simultánea de los microorganismos que con mayor frecuencia causan enfermedades ulcerosas genitales de transmisión sexual, esto es, *T. pallidum*, *Haemophilus ducreyi* y el virus del herpes simple (10). La diana de *T. pallidum* en la RCP múltiple es el gen de 47 kDa, y se usa un ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA) para detectar amplicones específicos. Este ensayo se ha adaptado a un formato múltiple en tiempo real que se ha utilizado para determinar las causas de las úlceras genitales en diversos entornos de distintos países y, posteriormente, para determinar los algoritmos

sindrómicos apropiados para el manejo de la enfermedad ulcerosa genital.

10.3 Pruebas serológicas luéticas

Las pruebas serológicas luéticas pueden dividirse en dos grupos: pruebas no treponémicas o reagínicas, como la reacción de Wasserman, la prueba de la reagina plasmática rápida (RPR), la prueba VDRL (del inglés *Venereal Disease Research Laboratory*) y la prueba del rojo de toluidina en suero no calentado (TRUST); y pruebas treponémicas, como la FTA-Abs, el ensayo de hemaglutinación de *T. pallidum* (TPHA), la prueba de aglutinación pasiva de partículas de *T. pallidum* (TPPA), el ELISA, la quimioluminiscencia y la gran mayoría de pruebas diagnósticas en el punto de atención o pruebas rápidas que se comercializan hoy en día.

10.3.1 Pruebas serológicas no treponémicas

Actualmente, todas las pruebas serológicas no treponémicas para la sífilis detectan la reagina (una mezcla de anticuerpos de tipo IgG e IgM presentes en el suero de pacientes con sífilis), que puede reaccionar con un antígeno complejo (una mezcla de cardiolipina, lecitina y colesterol) en las pruebas. La prueba serológica no treponémica que antes empleó este antígeno fue la prueba de Wasserman, que se basa en el principio de la fijación del complemento. Sin embargo, las pruebas que se usan con mayor frecuencia se basan en reacciones de floculación que pueden incluir o no partículas indicadoras. Se considera que los anticuerpos antilípidos de tipo IgG e IgM se forman como parte de la respuesta del huésped al material que se libera de las células hospederas dañadas al principio de la infección, así como a lípidos de la superficie celular del microorganismo causal (11, 12). Las pruebas no treponémicas, aunque son muy sensibles y pueden cuantificarse, carecen de especificidad respecto a la sífilis; se calcula que en 0,2% a 0,8% de las pruebas se obtienen resultados positivos falsos, que se asocian a diversas afecciones médicas no relacionadas con la sífilis (11, 12). Generalmente se ha observado que las reacciones positivas falsas agudas (que persisten durante menos de 6 meses) se asocian a otras enfermedades infecciosas, como la malaria, la hepatitis, la varicela o el sarampión, así como a la vacunación reciente. Por el contrario, las reacciones positivas falsas crónicas (que persisten durante más de 6 meses) se han asociado a conectivopatías, neoplasias malignas, infecciones crónicas como la lepra, a la toxicomanía

por vía intravenosa y a la edad avanzada. Así pues, teóricamente los resultados positivos en muestras de suero sometidas a pruebas no treponémicas deben confirmarse con una prueba treponémica más específica.

Cabe señalar que, si bien durante mucho tiempo se consideró que el embarazo era una situación posiblemente asociada a resultados positivos falsos en las pruebas no treponémicas, la tasa de resultados positivos erróneos en embarazadas no parece ser superior a la observada en mujeres que no están embarazadas, y es posible que se relacione exclusivamente con el gran número de embarazadas sometidas a la detección de la sífilis, sobre todo en entornos con baja prevalencia (13). Generalmente, la gran mayoría de los sueros con resultados positivos falsos tienen un título de anticuerpos $\leq 1:4$. Para excluir los resultados positivos falsos de las pruebas no treponémicas, todos los sueros con resultados positivos en una prueba no treponémica deben someterse a una prueba treponémica para confirmar el resultado.

Sin embargo, los títulos bajos no descartan la sífilis y a menudo se encuentran en la sífilis latente tardía y en la sífilis terciaria.

La determinación de los títulos séricos no treponémicos mediante un procedimiento cuantitativo puede ser útil para hacer una interpretación más correcta de los resultados y para evaluar a los pacientes después del tratamiento.

Las pruebas treponémicas, cuando se usan como pruebas de detección inicial, pueden arrojar resultados positivos unas 6 semanas después de la infección; en consecuencia, hasta 40% de las lesiones primarias que se detectan en la microscopía de campo oscuro o son positivas en la RCP pueden ser inicialmente seronegativas. Después de la seroconversión, suben los títulos de anticuerpos no treponémicos hasta alcanzar un valor máximo entre 1 y 2 años después de la infección, en el caso de que no se instaure un tratamiento eficaz. Más tarde, en la sífilis latente tardía y la sífilis terciaria, el título desciende lentamente, y con frecuencia se hace negativo en los casos de sífilis tardía muy prolongada. La gran ventaja de las pruebas no treponémicas es que pueden usarse para evaluar la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, después del tratamiento satisfactorio de la sífilis precoz (es decir, la sífilis primaria, la sífilis secundaria o la sífilis latente precoz), el título de anticuerpos no

treponémicos debe disminuir significativamente (es decir, al menos una disminución del título de 25%) y hacerse finalmente negativo. Sin embargo, si se administra tratamiento adecuado durante las últimas fases de la enfermedad se puede producir una seropositividad persistente aunque a un título bajo (fig. 10.4). Cabe señalar que cualquier ascenso posterior del título (≥ 4 veces) podría indicar una recaída o una reinfección.

10.3.1.1 Prueba VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)

En la prueba VDRL, no se estabiliza el antígeno y se debe utilizar una suspensión fresca, elaborada el mismo día en que se vaya a utilizar. La prueba se realiza en suero calentado (56 °C) y los resultados se leen con un microscopio con un aumento 100×. La VDRL sigue siendo la prueba de elección para detectar la reagina en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas de pacientes con presunta neurosífilis. A continuación se describe detalladamente esta prueba. La prueba de la reagina en suero sin calentar es una versión mejorada de la VDRL que se realiza en suero sin calentar y usando un antígeno estabilizado.

Procedimiento de la prueba VDRL (adaptado de Larsen et al., 1998; 3).

Reactivos y equipo necesarios

1. Antígeno VDRL. Solución alcohólica incolora que contenga cardiolipina (0,03%), colesterol (0,9%) y lecitina (0,21% + 0,01%). El antígeno debe almacenarse en la oscuridad a temperatura ambiente (23 °C a 29 °C) o bien refrigerarse a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, pero sin congelarlo. A estas temperaturas, los componentes del antígeno se mantienen en solución. Se deben desechar los frascos o los viales que contengan un precipitado.
2. Antígeno VDRL con solución salina (NaCl al 1,0%) amortiguada, a pH $6,0 \pm 0,1$. El antígeno VDRL en solución salina amortiguada puede comprarse o elaborarse en el laboratorio.

VDRL-buffered saline comprises:

Formaldehído, neutro (ACS)	0,5 ml
NA ₂ HPO ₄ , anhidro	0,037 g
KH ₂ PO ₄	0,170 g
NaCl	10,00 g
Agua destilada	1000,0 ml

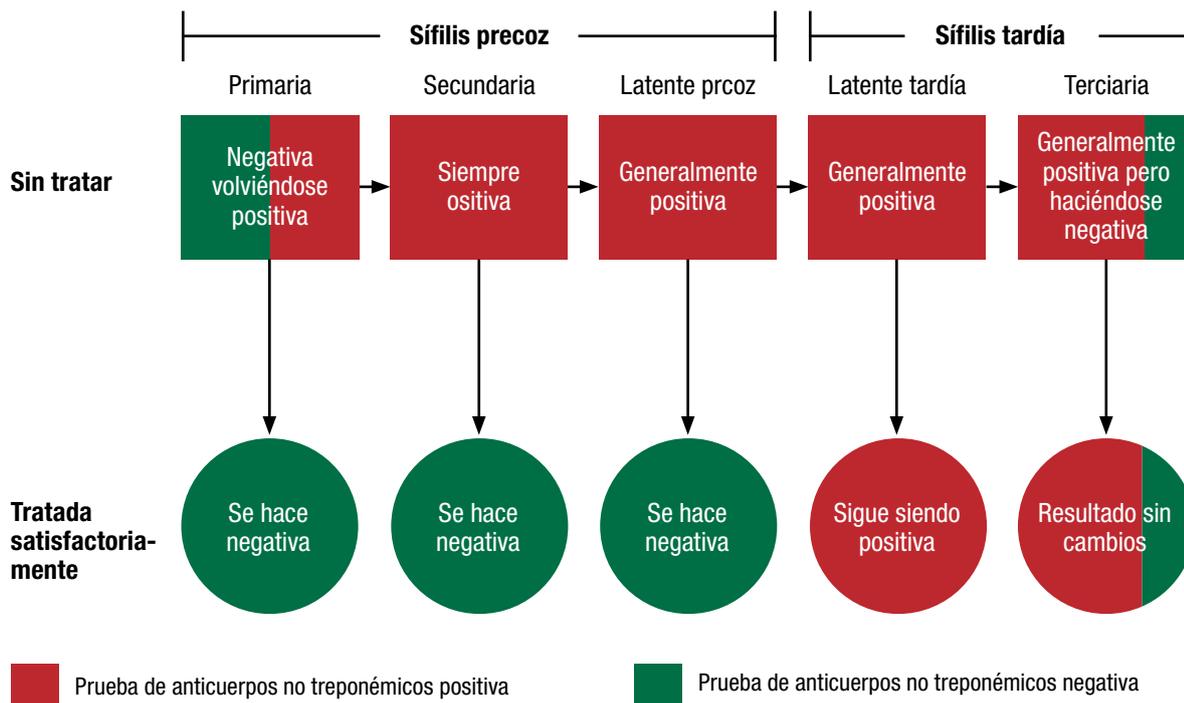


Figura 10.4
 Reactividad en las pruebas serológicas no treponémicas en el curso de la sífilis sin tratar (cajas) y después del tratamiento eficaz (círculos), por etapa de la enfermedad

Se mide el pH de la solución, que se almacena en frascos con tapa de rosca.

Nota: Cuando se produzca un cambio inexplicable de la reactividad de los sueros de referencia (controles), se medirá el pH de la solución salina amortiguada para determinar si puede ser un factor causal. Se desechará la solución salina amortiguada cuyo pH esté fuera del intervalo de $6,0 \pm 0,1$.

- Muestras de suero de referencia. En la prueba se usan como referencia (controles) sueros reactivos, débilmente reactivos y no reactivos, ya sea en forma liofilizada o líquida. Si deben realizarse pruebas cuantitativas, se utilizará un suero de referencia que pueda titularse hasta al menos una dilución 1:4.
- Acetona
- Alcohol, etanol al 95%
- Parafina
- Solución salina al 0,9%. Se agregan 0,9 g de cloruro de sodio seco por cada 100 ml de agua destilada.

- Solución salina al 10,0%. Se agregan 10 g de cloruro de sodio seco por cada 100 ml de agua destilada.

Equipo

- Agujas calibradas no desechables sin bisel
 - Para la prueba serológica: calibre 18
 - Para el análisis del LCR: calibre 21 o 22
- Frascos de 30 ml con base plana.
- Dispositivo de seguridad para pipetear, con puntas desechables de 50 μ l.
- Pipetas de 1,0 ml, 5,0 ml y 10,0 ml.
- Portaobjetos de $5 \times 7,5$ cm, con 12 anillos de parafina o cerámica de aproximadamente 14 mm de diámetro. Nota: Los anillos deben ser suficientemente altos para evitar que el suero se derrame durante la rotación.
- Soporte para portaobjetos de $5 \times 7,5$ cm.
- Molde para hacer anillos de parafina de aproximadamente 14 mm de diámetro (n.º cat. 2600, Eberbach Corp., Ann Arbor, Michigan, EUA).

8. Agitador rotativo mecánico ajustable a 180 ± 2 rpm, que circunscriba un círculo 19 mm de diámetro en el plano horizontal.
9. Microscopio binocular con oculares 10× y objetivo 10×.
10. Recipientes para residuos; desinfectantes.
11. Guantes de látex desechables, gafas de seguridad y ropa protectora.
12. Los portaobjetos deben cubrirse mientras estén en el agitador rotativo a fin de mantener la humedad e impedir que se sequen.
13. Jeringas de 2 ml o 5 ml.

Procedimientos de análisis de las muestras séricas

Preparación de la suspensión de antígeno

1. Cada día se elabora una suspensión fresca de antígeno VDRL. Cuando se prepara la suspensión de antígeno, la temperatura de la solución salina amortiguada, el antígeno y el equipo debe mantenerse entre 23 °C y 29 °C.
2. Se vierten 0,4 ml de la solución salina amortiguada con antígeno VDRL en el fondo de un frasco redondo de 30 ml, de base plana y con tapón, o bien en un matraz de 25 ml con tapa.
3. Se agregan 0,5 ml de la suspensión de antígeno VDRL directamente en la solución salina, mientras se hace girar el frasco continua, pero suavemente, sobre una superficie plana. El antígeno debe añadirse gota a gota, a una velocidad de aproximadamente 6 segundos por cada 0,5 ml de antígeno.
4. La última gota de antígeno se verterá sin que la pipeta toque la solución salina; la rotación del frasco debe mantenerse durante 10 segundos.
5. Se agregan 4,1 ml de solución salina amortiguada.
6. Se tapa el frasco y se agita aproximadamente 30 veces en 10 segundos. Tras esto, la suspensión de antígeno ya está lista para usarse, y puede utilizarse durante el día en que se ha elaborado.
7. Cada vez que se vaya a usar la suspensión de antígeno VDRL, hay que mezclarla, agitándola suavemente en círculos. (La suspensión no debe mezclarse extrayéndola e introduciéndola mediante una jeringa y una aguja, ya que esto puede

conllevar la ruptura de partículas y la pérdida de reactividad.)

Prueba cualitativa (suero)

1. La temperatura ambiente influye en las pruebas de floculación en portaobjetos para la sífilis. Para que los resultados de la prueba sean fiables y reproducibles, la suspensión de antígeno VDRL, los controles y las muestras que deben analizarse han de mantenerse a temperatura ambiente (23 °C a 29 °C) cuando se lleven a cabo las pruebas.
2. Se añaden 50 µl de los sueros que se van a analizar a cada anillo de parafina o cerámica del portaobjetos.
3. Se mantienen la jeringa y la aguja de dispensación de la suspensión de antígeno VDRL en posición vertical, y se dejan salir varias gotas para eliminar el aire de la aguja. Luego se agrega una gota (17 µl) de la suspensión de antígeno que caiga libremente en cada uno de los anillos que contienen suero.
4. Se coloca el portaobjetos en el agitador rotativo mecánico y se hace rotar durante 4 minutos a 180 ± 2 rpm bajo una cubierta para mantener una atmósfera húmeda e impedir que se produzca una evaporación excesiva.
5. Inmediatamente después de concluir la rotación, se leen los resultados del portaobjetos y se registran los resultados de la prueba.
6. Todas las muestras séricas cuyos resultados sean reactivo, débilmente reactivo o no reactivo “rugoso” en la prueba VDRL cualitativa en portaobjetos deben analizarse cuantitativamente; se registrará el título final.

Lectura y notificación de los resultados

1. Se leen los portaobjetos en el microscopio con oculares 10× y un objetivo 10×.
2. Los resultados se notifican de la siguiente manera:

Lectura

- Flóculos medianos o grandes
- Flóculos pequeños reactivo (D)
- Sin floculación o ligeramente rugoso

Informe

- Reactivo (R)
- Débilmente reactivo (D)
- No reactivo (N)

Prueba cuantitativa (suero)

1. Se realizan diluciones al doble del suero que debe titularse. En un portaobjetos pueden hacerse pruebas cuantitativas de tres muestras de suero hasta la dilución 1:8.
2. Se realiza la prueba en las diluciones al doble del suero, exactamente igual que en la prueba cualitativa.
3. Se leen los resultados en el microscopio usando oculares 10× y un objetivo 10× como en la prueba cualitativa.
4. Se registran los títulos con la mayor dilución que dé un resultado reactivo (no débilmente reactivo).
5. Tras concluir las pruebas del día, se desecha la suspensión de antígeno, se limpian la aguja y la jeringa dispensadoras aclarándolas con agua, alcohol y acetona, en este orden. Se quita la aguja de la jeringa después de la limpieza.

NOTA: La prueba VDRL es la prueba preferida para analizar el LCR en el diagnóstico de la neurosífilis. Se realiza de manera idéntica a como se lleva a cabo en el suero; sin embargo, la muestra de LCR no tiene que calentarse hasta 56 °C antes de realizar la prueba.

10.3.1.2 Prueba de reagina plasmática rápida (RPR)

Las ventajas principales de la prueba de reagina plasmática rápida (RPR) respecto a la prueba VDRL son el uso de un antígeno estabilizado, el uso de tarjetas en lugar de portaobjetos y la adición al antígeno de partículas de carbón como indicador de la floculación. El antígeno no recubre estas partículas, sino que el carbón queda atrapado en la retícula que forma el complejo antígeno-anticuerpo en las muestras reactivas, haciendo que la reacción se haga visible a simple vista. La prueba puede realizarse en suero o plasma no calentado, en círculos de 18 mm en tarjetas plastificadas. La RPR es la prueba no treponémica macroscópica más disponible, y se utiliza en todo el mundo. En la figura 10.5 se muestra cómo se lleva a cabo.

Una modificación de la RPR, la prueba del rojo de toluidina en suero no calentado [TRUST], utiliza rojo de toluidina en lugar de carbón para visualizar la reacción

de floculación. A diferencia de los reactivos usados en la RPR, los de la prueba TRUST no requieren la conservación en condiciones de refrigeración.

10.3.2 Pruebas serológicas treponémicas

A diferencia de las pruebas no treponémicas, se considera que las pruebas treponémicas son más específicas. Sin embargo, en raros casos se han registrado resultados positivos falsos en las pruebas treponémicas, que pueden ser pasajeros y de causa desconocida o pueden asociarse a conectivopatías (77). Tiene poco valor la vigilancia de las respuestas al tratamiento mediante pruebas treponémicas, dado que después de la seroconversión suelen mantenerse positivas de por vida, incluso tras administrar un tratamiento eficaz (fig. 10.6). Así pues, no tiene sentido realizar pruebas treponémicas cuantitativas como parte de los algoritmos diagnósticos. Algunas pruebas treponémicas pueden hacerse reactivas antes que las pruebas no treponémicas (la prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos fluorescentes [FTA-Abs] puede hacerse reactiva aproximadamente 3 semanas después de la infección), y algunos pacientes con infección primaria muy precoz pueden ser seronegativos en las pruebas no treponémicas y seropositivos en las treponémicas. Sin embargo, se debe tener mucha precaución al interpretar los resultados de estas pruebas, pues encontrar un resultado negativo en una prueba no treponémica y un resultado positivo en una prueba treponémica indica la mayoría de las veces que se trata de una sífilis precoz previamente tratada, a no ser que haya signos obvios de una infección primaria actual (véanse y compárense las figuras 10.4 y 10.6).

Todas las pruebas treponémicas actuales usan lisados celulares completos de *T. pallidum* o antígenos treponémicos recombinantes únicos (o una mezcla de ellos) para detectar los anticuerpos contra componentes celulares treponémicos específicos. Se usan diferentes plataformas analíticas para realizar las pruebas serológicas treponémicas, como la inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación usando eritrocitos sensibilizados o partículas de gelatina, los ELISA, incluidas variantes que usan tecnología de quimioluminiscencia y pruebas inmunocromatográficas (flujo lateral) o pruebas de flujo directo en el punto de atención. Todos estos ensayos son muy específicos y se diseñaron inicialmente para usarlos como pruebas confirmatorias. Sin embargo, las pruebas que pudieron automatizarse, en concreto

(A)

-
1. Se deben utilizar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad cuando se manipulen las muestras y los reactivos.
 2. Antes de usar el estuche y todos los reactivos necesarios se dejará que alcancen la temperatura ambiente.
 3. Preparación del equipo. Se humedece la esponja y se coloca en la cubierta del agitador rotativo.
 4. Se prepara la hoja de trabajo y la tarjeta de la prueba marcada con el número de identificación (ID) de la muestra.
 5. Se extraen 50 µl de la muestra de suero en la punta de la pipeta de precisión o "dispenstir".
 6. Se vierten 50 µl (1 gota) del suero problema y los sueros de referencia en cada círculo marcado en la tarjeta.
 7. Se extienden las muestras y los controles suavemente dentro del círculo mediante el extremo plano del "dispenstir".
 8. Se fija la aguja gotero al frasco con el antígeno de la RPR. Se comprueba que el antígeno está adecuadamente mezclado. Se añade 1 gota de antígeno a cada círculo.
 9. Se coloca la tarjeta en un agitador rotativo, y se hace rotar a 100 rpm durante 8 minutos.
 10. Manualmente se hace rotar la tarjeta con suavidad unas cuantas veces.
 11. Se debe disponer de una buena iluminación para interpretar los resultados.
 12. Los resultados se registran en los formularios apropiados.]

Figura 10.5

Procedimientos para realizar (A) e interpretar (B) la prueba de reagina plasmática rápida (RPR)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

algunos ELISA y ensayos de quimioluminiscencia, han recibido en algunos países la autorización de uso como pruebas de tamizaje inicial; las pruebas treponémicas en el punto de atención se emplean a menudo como único indicador de la infección, en particular en entornos con pocos recursos.

10.3.2.1 Prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos fluorescentes (FTA-Abs)

Durante mucho tiempo se ha considerado que la prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos

fluorescentes (FTA-Abs) era la prueba treponémica de referencia, pero recientemente ha sido reemplazada por pruebas que son más sensibles, menos exigentes desde el punto de vista técnico y mucho menos subjetivas. Es preciso comprobar a fondo tanto el rendimiento de la prueba como la lectura de los resultados. Para que la prueba sea fiable es crucial contar con un microscopio de fluorescencia de buena calidad, experiencia en la lectura de los resultados, reactivos de calidad y una dilución apropiada del conjugado (fig. 10.7). Lamentablemente, tanto los resultados positivos falsos

(B) Resultados cualitativos



Se considera que las muestras con el mismo grado de reactividad o un grado mayor de reactividad que el suero de referencia mínimamente reactivo (Rm) son reactivas (R). Los 3 círculos de la parte inferior derecha de la tarjeta son los controles: reactivo (R), mínimamente reactivo (Rm) y no reactivo (N).

Reactivo
(Aparecen grumos o aglutinación)



Todas las muestras reactivas deben analizarse mediante RPR cuantitativa para obtener un título.

Mínimamente reactivo
(Leve formación de grumos o aglutinación)



Todas las muestras reactivas deben analizarse mediante RPR cuantitativa para obtener un título.

No reactivo
(Aspecto gris homogéneo)



Se notifica el resultado como "no reactivo".

Procedimiento de la RPR cuantitativa



1. Se marca una tarjeta de la prueba con los números de identificación de las muestras y se hacen diluciones seriadas al doble. Cada muestra se analizará sin diluir (1:1) y diluida (1:2, 1:4, etcétera).
2. Se añaden 50 µl de solución salina al 0,9% a cada círculo, que contendrá una muestra diluida o un control. NO debe añadirse solución salina al primer círculo de cada muestra (pocillo 1:1).

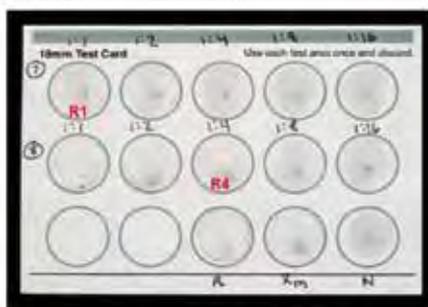


3. Se añaden 50 µl de la muestra al primer círculo (1:1) y al segundo (1:2).
4. Usando una pipeta, se mezcla la muestra con la gota de solución salina aspirando y expulsando la mezcla 5-8 veces en la pipeta.



5. Se transfieren 50 µl de esta mezcla (círculo 2) al siguiente círculo (3) y se repite la etapa de mezcla hasta que se realiza la última dilución. Se eliminan los últimos 50 µl.
6. Se siguen los pasos 7-12 de la página 1 (RPR cualitativa) y se anotan los resultados de tal manera que se registre el nivel de dilución (es decir, la mayor dilución reactiva a 1:4 se notificaría como R4).

Resultados cuantitativos



Se notifica la mayor dilución reactiva. En este caso, la muestra 7 (primera fila) muestra reactividad a la dilución 1:1 y se registra como R1. La muestra 8 (segunda fila) se notifica como R4. Los 3 círculos situados en la fila inferior a la derecha son los controles: reactivo (R), mínimamente reactivo (Rm) y no reactivo (N).



En este caso, la muestra es reactiva hasta la dilución 1:64 y se notificaría como R64. Si la muestra sigue siendo reactiva a la mayor dilución, se debe diluir aún más. Se prepara una nueva tarjeta de la prueba y se extienden las diluciones hasta que la mezcla del círculo no sea reactiva.

Figura 10.5 (continúa)

Procedimientos para realizar (A) e interpretar (B) la prueba de reagina plasmática rápida (RPR)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

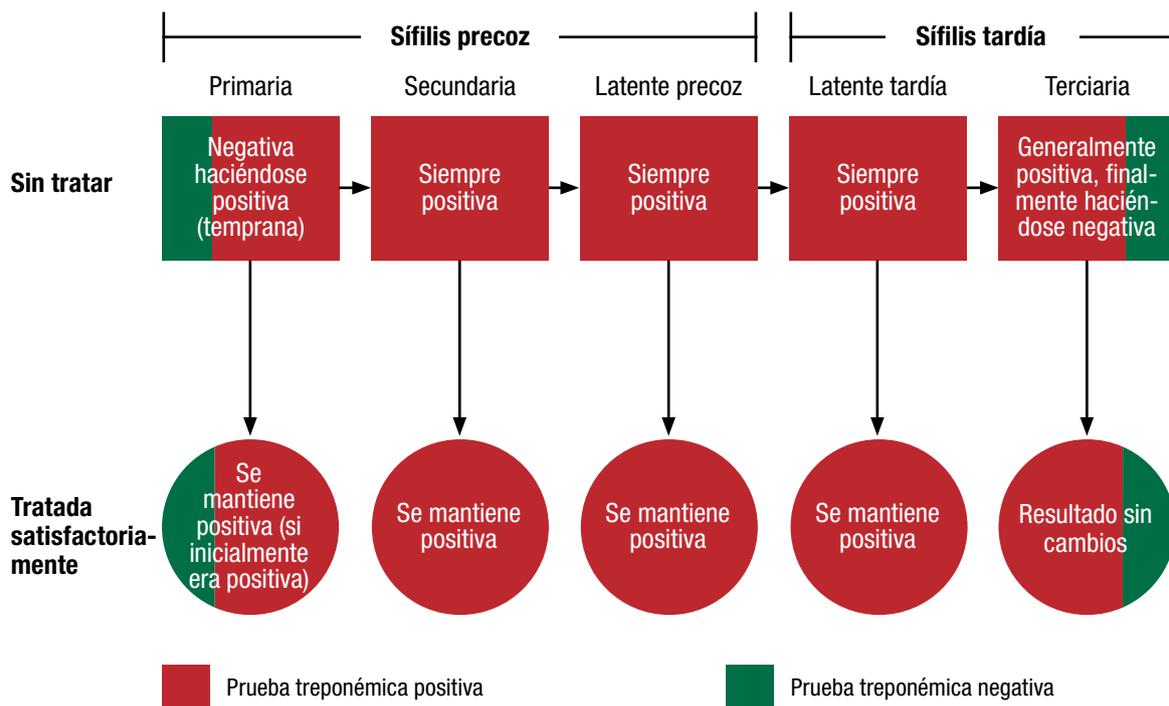


Figura 10.6
Reactividad de las pruebas serológicas treponémicas en el curso de la sífilis sin tratar (cajas) y respuesta después del tratamiento eficaz (círculos), por etapa de la enfermedad

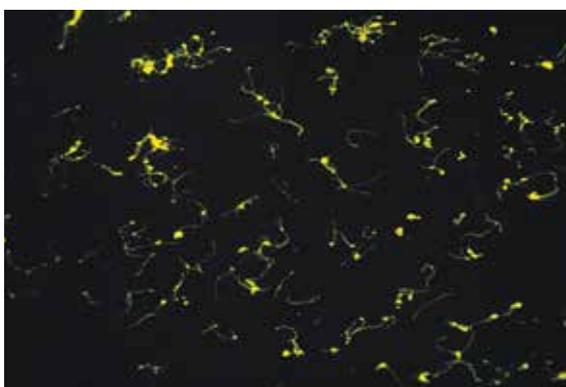


Figura 10.7
Prueba FTA-Abs positiva. Se observan espiroquetas (*T. pallidum*) fluorescentes

Fuente: Adaptado de Larsen et al., 1998 (3).

como los resultados negativos falsos en la FTA-Abs son comunes, debido a errores de laboratorio y al carácter subjetivo de la lectura de los resultados de la prueba (14, 15). A continuación se describe detalladamente este método.

Reactivos

1. Los portaobjetos con antígeno de *T. pallidum* se pueden adquirir en el mercado. Otra alternativa es comprar el antígeno en suspensión o prepararlo a partir de *T. pallidum* (cepa de Nichols) extraído de tejido testicular de conejos y lavado con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) para eliminar las globulinas de conejo. Los viales se conservan, sin abrirlos, a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
2. Inmunoglobulina antihumana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
3. El sorbente se elabora a partir de cultivos de treponemas de Reiter no patógenos, generalmente sin añadir conservantes. A menudo se dispensa fraccionado en cantidades de 5 ml y liofilizado o como suspensión.
4. Suero de control reactivo. Se obtiene una mezcla de muestras de suero humano de donantes seropositivos que son reactivos 4+. Se dispensa la mezcla de sueros en alícuotas y se conserva

congelada, a ser posible a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a una temperatura inferior. El suero sumamente reactivo puede diluirse apropiadamente con sueros no reactivos para conseguir un suero de referencia mínimamente reactivo 1+. El suero de referencia 1+ muestra el mínimo grado de fluorescencia que se notifica como reactivo, y se usa como patrón de lectura.

5. Suero de referencia inespecífico. El suero de referencia inespecífico es una mezcla de sueros obtenidos de individuos que no padecen la sífilis. No se añade ningún conservante. Este suero de referencia muestra una reactividad inespecífica $>2+$ a una dilución 1:5 en solución salina tamponada con fosfato, y esencialmente no muestra tinción alguna cuando se diluye en una proporción 1:5 en el sorbente.
6. Aceite de inmersión de baja fluorescencia, no secante.
7. Acetona.

Reactivos que deben prepararse

1. Solución salina tamponada con fosfato (SSTF). Debe elaborarse mediante la siguiente formulación en agua destilada y almacenarse en grandes volúmenes:

NaCl	7,65 g
Na_2HPO_4	0,724 g
KH_2PO_4	0,21 g
Agua destilada	1000 ml

Se determinará el pH y se ajustará a un valor de $7,2 \pm 0,1$ con NaOH 1 N.

2. Tween 80 al 2,0% en SSTF. Se calientan los reactivos en un baño María a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añade 1 ml de Tween 80 a 49 ml de SSTF estéril. Se ajusta el pH a 7,2 con NaOH 1 N. Se desecha el reactivo en caso de que aparezca un precipitado o si cambia el pH.
3. Medio de montaje. Se agrega una parte de SSTF (pH 7,2) a nueve partes de glicerina (de grado analítico).

Equipo

1. Estufa de incubación de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. Baño de agua, ajustable a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$

3. Centrifugadora
4. Dispositivos de seguridad para pipetear
5. Micropipetas graduables de $10\text{ }\mu\text{}$ a $200\text{ }\mu\text{l}$
6. Asa de siembra bacteriológica convencional de platino, de 2 mm de diámetro y calibre 26
7. Papel absorbente
8. Soporte para portaobjetos con cámara húmeda y toallas de papel
9. Placas de coloración, de vidrio o plástico, con soportes para portaobjetos desmontables
10. Portaobjetos para microscopio de $2,5 \times 7,5\text{ cm}$, con un extremo mate, de 1 mm de grosor, con 2 círculos, con un diámetro interno de 1 cm
11. Cubreobjetos, n.º 1, de 22 mm^2
12. Tubos de ensayo ($12 \times 75\text{ mm}$) y gradillas
13. Recipientes para residuos y desinfectantes
14. Guantes de látex desechables, gafas de seguridad y ropa protectora
15. Microscopio de fluorescencia con oculares $10\times$ y objetivos $10\times$ y $40\times$
16. Agitador vorticial

Si los portaobjetos de antígeno no se adquieren en el mercado, se pueden elaborar a partir de suspensiones treponémicas, tal como se indica a continuación.

1. Los portaobjetos, que se conservan limpios en alcohol, se secan con una gasa limpia.
2. Si fuera necesario, se rehidrata el antígeno según las instrucciones del fabricante. Los viales abiertos se conservan a una temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, y deben ser estables durante una semana.
3. Se mezclan completamente las suspensiones de antígeno en un agitador vorticial durante 10 segundos y se examinan las muestras mediante microscopía de campo oscuro para comprobar que los treponemas se dispersaron adecuadamente (microorganismos individualizados en lugar de grumos) antes de preparar los portaobjetos para la FTA-Abs.

4. Se preparan frotis muy delgados de antígeno de *T. pallidum* en cada círculo, usando para ello un asa de alambre de 2 mm. Se coloca el antígeno contenido en un asa dentro de los dos círculos de 1 cm y se deja secar al aire durante al menos 15 minutos.
5. Los portaobjetos se fijan en acetona durante 10 minutos y se dejan secar al aire. Se conservan los frotis fijados en acetona a -20 °C. Los frotis no deben descongelarse y congelarse de nuevo.

Sorbente

Se rehidrata el sorbente liofilizado con agua estéril destilada o según las instrucciones del fabricante. El sorbente rehidratado se conserva a 2 °C-8 °C o a -20 °C. Puede utilizarse siempre que la reactividad sea aceptable y que el producto no esté contaminado.

Inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína (conjugada)

1. Se rehidrata el conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) según las instrucciones del fabricante. Si está turbio, se centrifuga a 500 g durante 10 minutos. Se fracciona en alícuotas pequeñas y se conserva a -20 °C. El conjugado descongelado no se debe congelar de nuevo, sino que se conservará a y una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
2. Se preparan diluciones al doble seriadas del nuevo conjugado en SSTF, a pH 7,2, que contenga Tween 80 al 2%, de modo que las diluciones incluyan el título indicado por el fabricante.
3. Se analiza cada dilución del conjugado con el suero de referencia reactivo 4+ diluido en una proporción 1:5 en SSTF, y con la dilución de referencia mínimamente reactiva 1+ apropiada usando el procedimiento de FTA-Abs que se describe a continuación.
4. Se incluye un suero de referencia de tinción inespecífica con cada dilución del conjugado.
5. Se prepara un conjugado previamente analizado a su dilución de trabajo y se hacen pruebas con un suero de referencia reactivo 4+, un suero de referencia mínimamente reactivo 1+ y un control de tinción inespecífica con SSTF para que actúen como controles cuando se haga el primer análisis de un lote del nuevo conjugado.

6. Los portaobjetos se leen en el siguiente orden:
 - a. Se examinan los tres portaobjetos de referencia (punto 5) para comprobar que los reactivos y las condiciones de análisis son satisfactorios.
 - b. Se examinan los portaobjetos del nuevo conjugado, comenzando con la menor dilución del conjugado; los resultados se registran como 1+, 2+, 3+ o 4+.
 - c. El punto final de la titulación es la dilución más alta, que da una fluorescencia máxima 4+ con el suero de referencia reactivo y un resultado 1+ con la dilución 1+. El título de trabajo del nuevo conjugado es uno que duplique la dilución por debajo del punto final, y debe ser el punto final del control mínimamente reactivo.
 - d. El nuevo conjugado no debe teñirse inespecíficamente a tres diluciones al doble por debajo del título de trabajo del conjugado.
 - e. El conjugado se conserva según indica el fabricante y se dispensa en cantidades no inferiores a alícuotas de 0,3 ml a menos de -20 °C. Antes de la congelación, un conjugado con una dilución de trabajo de 1:1000 o superior puede diluirse 1:10 con SSTF estéril que contenga albúmina sérica bovina al 0,5% y azida de sodio al 0,1%.
 - f. Se debe comprobar el título del conjugado después de conservarlo varios días en el congelador.

Procedimiento de ensayo

1. Se identifican los portaobjetos de antígeno previamente preparados numerándolos en el extremo esmerilado.
2. Se numera cada tubo y cada portaobjetos de modo que se correspondan con el suero problema y el suero de referencia que deben analizarse.
3. Se preparan diluciones de suero de referencia reactivo (4+), mínimamente reactivo (1+) e inespecífico en sorbente o en SSTF conforme a las instrucciones.
4. Se pipetea 200 µl de sorbente en un tubo de ensayo para cada suero problema.

5. Se agregan 50 µl de suero problema calentado al tubo apropiado y se mezcla.
6. Se cubren los frotis de antígeno apropiados con 30 µl de diluciones de suero reactivo (4+), mínimamente reactivo (1+) e inespecífico.
7. Se cubren los frotis de antígeno apropiados con 30 µl de SSTF y 30 µl del sorbente para los sueros de referencia de tinción inespecífica.
8. Se cubren los frotis de antígeno apropiados con 30 µl de las diluciones del suero problema.
9. Se impide la evaporación colocando los portaobjetos en una cámara húmeda y se incuba a una temperatura entre 35 °C y 37 °C durante 30 minutos.
10. Se colocan los portaobjetos en los soportes y se enjuagan durante 5 segundos con SSTF corriente. Luego se colocan los portaobjetos durante 5 minutos en cubetas de tinción que contengan SSTF y se agitan los portaobjetos sumergiéndolos y retirándolos del SSTF al menos 20 veces. Se utiliza SSTF nuevo y se repite el procedimiento de enjuague una vez más. Por último, se enjuagan los portaobjetos durante 5 segundos en agua destilada corriente y se seca con suavidad con papel absorbente.
11. Se diluye IgG antihumana marcada con FITC hasta su título de trabajo en SSTF que contenga Tween 80 al 2%, y se colocan aproximadamente 30 µl del conjugado diluido sobre cada frotis.
12. Se repiten los pasos 9 y 10.
13. Se montan los portaobjetos inmediatamente colocando una gota pequeña de medio de montaje en cada frotis y aplicando un cubreobjetos.
14. Se colocan los portaobjetos en una habitación oscura y se hace la lectura en un plazo máximo de 4 horas.
15. Se examina el frotis mediante microscopia de campo oscuro, usando primero la lámpara de tungsteno, para comprobar la presencia de treponemas en el frotis; luego se hace la lectura mediante el microscopio de fluorescencia, usando los filtros de FITC apropiados.

10.3.2.2 Pruebas de aglutinación treponémicas

La TPHA y la TPPA son más fáciles de realizar que la FTA-Abs, y su sensibilidad es similar a la de esta. Estas pruebas de aglutinación también son más prácticas que la FTA-Abs para procesar por lotes un gran número de muestras. La TPHA, y más recientemente la TPPA, se ha convertido en la prueba treponémica confirmatoria de elección en muchos laboratorios. En la figura 10.8 se muestra cómo se realiza la TPPA. El método para llevar a cabo la TPHA es similar.

10.3.2.3 Enzimoimmunoanálisis (EIA) treponémicos y ensayos de quimioluminiscencia (CIA)

Más recientemente aún se han desarrollado enzimoimmunoanálisis (EIA) y ensayos de quimioluminiscencia (CIA) para detectar anticuerpos contra *T. pallidum*. Su sensibilidad y su especificidad son equivalentes a las de la FTA-Abs y los ensayos de aglutinación.

La mayoría de los enzimoimmunoanálisis treponémicos emplean antígeno de *T. pallidum* sonificado, un solo antígeno treponémico recombinante, o una mezcla de antígenos recombinantes que recubren los pocillos de placas de microtitulación. Se añade una dilución del suero del paciente a cada pocillo. Si el suero contiene anticuerpos específicos contra *T. pallidum*, se unirán a los antígenos treponémicos. Tras eliminar mediante lavado cualquier exceso de anticuerpo, se añade un conjugado compuesto por IgG antihumana biotinilada de cabra y marcada con estreptavidina-peroxidasa para detectar el anticuerpo específico. Después de una etapa de lavado adicional para eliminar cualquier exceso de conjugado, se añade un sustrato de la enzima para detectar el complejo antígeno-anticuerpo-conjugado. Se produce una reacción de color si el paciente tiene anticuerpos contra el antígeno o los antígenos de *T. pallidum*. La intensidad de desarrollo del color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente. Para leer el cambio de color se usa un lector de placas.

En algunos enzimoimmunoanálisis se adopta una estrategia diferente para detectar anticuerpos específicos. Se inmovilizan antígenos treponémicos recombinantes de 15 kDa, 17 kDa, 44,5 kDa y 47 kDa específicos en pocillos de microplacas. Luego se añade suero del paciente a los pocillos; si hay anticuerpos antitreponémicos, se unirán específicamente a los

antígenos inmovilizados. Todas las proteínas no unidas se eliminan luego durante una fase de lavado. Los mismos antígenos recombinantes que se han conjugado con peroxidasa de rábano se agregan después a los pocillos de la placa. Tras un paso de lavado adicional para eliminar todo el conjugado no unido, se añade un sustrato cromógeno para la peroxidasa. El cambio de color resultante se mide espectrofotométricamente después de añadir una solución de parada. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero del paciente. Como resultado de esta configuración, la especificidad y la sensibilidad de la prueba son superiores a las de los ELISA treponémicos de primera generación.

Los ensayos de quimioluminiscencia para detectar anticuerpos antitreponémicos se usan casi exclusivamente en grandes laboratorios clínicos de países industrializados donde los costos de mano de obra son elevados y se prevé un gran volumen de muestras. Estos ensayos usan el principio de unión de un anticuerpo específico a esferas recubiertas de antígeno, y la posterior detección de las esferas que han sido marcadas con ficoeritrina conjugada con una IgG antihumana de cabra, o bien la detección de anticuerpos usando un conjugado de isoluminol y antígeno para generar destellos de quimioluminiscencia que se detectan mediante un sistema fotomultiplicador sofisticado (16).

Dado el gran número de enzimoanálisis y de ensayos de quimioluminiscencia disponibles en el mercado en todo el mundo, la descripción detallada de los procedimientos de análisis de las pruebas de cada fabricante supera el alcance de este capítulo. Así pues, el lector deberá seguir las instrucciones con la información sobre el producto que incluye el fabricante en cada estuche.

10.3.2.4 Ensayos de inmunoelectrotransferencia para treponemas

El ensayo de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) para treponemas se ha usado como prueba confirmatoria para detectar anticuerpos antitreponémicos en el suero de pacientes con sífilis. Los antígenos individuales de *T. pallidum* se fraccionan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de lisados de células enteras. Las bandas de polipéptidos de diversas masas moleculares se transfieren luego a hojas de membrana

de nitrocelulosa. Las hojas se secan posteriormente y se cortan en tiras para usarlas con muestras de suero individuales. Se diluye el suero de un paciente y se incuba con cada tira. Si en la muestra hay anticuerpos de tipo IgG o IgM específicos de *T. pallidum*, se unirán a uno o más de los antígenos de 15 kDa, 17 kDa, 44,5 kDa y 47 kDa que se encuentran en la tira. Los anticuerpos que no estén unidos se eliminan mediante lavado.

Los anticuerpos unidos se detectan con fosfatasa alcalina conjugada con una IgG o IgM antihumana. Luego se lava la tira para eliminar el exceso de conjugado y por último se hace reaccionar con una solución de precipitación que forma bandas de antígeno de color violeta. La reactividad en zonas de la banda específicas de los antígenos de 15 kDa, 17 kDa y 47 kDa se considera significativa (fig. 10.9). Por el contrario, la reactividad en otras zonas de la tira no se considera significativa. Los ensayos de inmunoelectrotransferencia se utilizaron en el pasado para estudiar la respuesta inmunitaria a la sífilis (17, 18) y posteriormente para seleccionar los antígenos apropiados que deben incluirse en los inmunoensayos en línea.

10.3.2.5 Inmunoensayos en línea

Los inmunoensayos en línea para la sífilis se han diseñado para que sean pruebas treponémicas confirmatorias y para usarlas como pruebas suplementarias cuando los resultados de las pruebas treponémicas habituales son dudosos. Cuatro proteínas recombinadas (TpN47, TpN17, TpN15 y TmpA) son recubiertas como líneas en tiras de membrana de nitrocelulosa con soporte de plástico rígido. Se añade el suero del paciente a estas tiras. Si en la muestra hay anticuerpos específicos contra *T. pallidum*, se unirán a las líneas de cada antígeno (19). Después de eliminar mediante lavado el exceso de suero, se añade una IgG o una IgM antihumana de cabra marcada con fosfatasa alcalina, que se unirá a cualquier complejo antígeno-anticuerpo treponémico que se haya formado. La adición posterior de un sustrato para la enzima da lugar a bandas de color marrón oscuro, cuya densidad es proporcional a la concentración de los anticuerpos específicos presentes en la muestra. Cuando no hay anticuerpos contra *T. pallidum*, solo se desarrollará en el fondo un color débil.

(A)

- Se verifica el estuche antes de usarlo. Se deja que todas las muestras y los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Se registra el número de lote y la fecha de caducidad.
- Siempre deben adoptarse medidas de seguridad cuando se manipulen las muestras.
- Tiempo de la prueba: aproximadamente 1 hora; el número máximo de muestras por placa es de 21.

Este esquema gráfico no pretende sustituir a la información sobre el producto o los procedimientos normalizados de trabajo.

- 

1. Se deben usar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad cuando se manipulen las muestras y los reactivos.
- 

2. Se prepararán los elementos necesarios (estuche, placa, agitador, pipeta, placa de microtitulación en U).
- 

3. Antes de empezar la prueba, se deja que el estuche y todos los reactivos necesarios alcancen la temperatura ambiente.
- 

4. Se marca la hoja de trabajo y la placa de microtitulación con los números de identificación (ID) de la muestra. Se divide la muestra de manera que cada una ocupe un conjunto de 4 pocillos consecutivos. Los controles positivos ocuparán toda la primera fila (8 pocillos). Los controles negativos ocuparán 4 pocillos.
- 

5. Se añaden 100 ml del diluyente de muestras de la TPPA al primer pocillo de cada conjunto de muestras y controles. Se añaden 25 ml del diluyente de muestras de la TPPA a los pocillos restantes de la placa.
- 

6. Se invierte la muestra de suero para mezclarla. Se añaden 25 ml de la muestra al primer pocillo de cada conjunto de muestras. Se mezcla pipeteando 5-6 veces. Se transfieren 25 ml al segundo pocillo y se mezcla 5-6 veces. Se repite hasta el pocillo #4, descartando 25 ml, a partir del pocillo #4 de cada muestra.
- 

7. Se reconstituyen los reactivos de partículas sin sensibilizar y sensibilizadas. Se mezcla suavemente para lograr una resuspensión completa.
- 

8. Se añade 1 gota (25 ml) de las partículas sin sensibilizar (tapón gris) al tercer pocillo de cada muestra y control.
- 

9. Se añade 1 gota (25 ml) de las partículas sensibilizadas (tapón rojo) al cuarto pocillo de cada muestra y a los pocillos del 5-8 del control positivo.
- 

10. Se tapa con un cubreplacas y se agita durante 30 segundos.
- 

11. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 

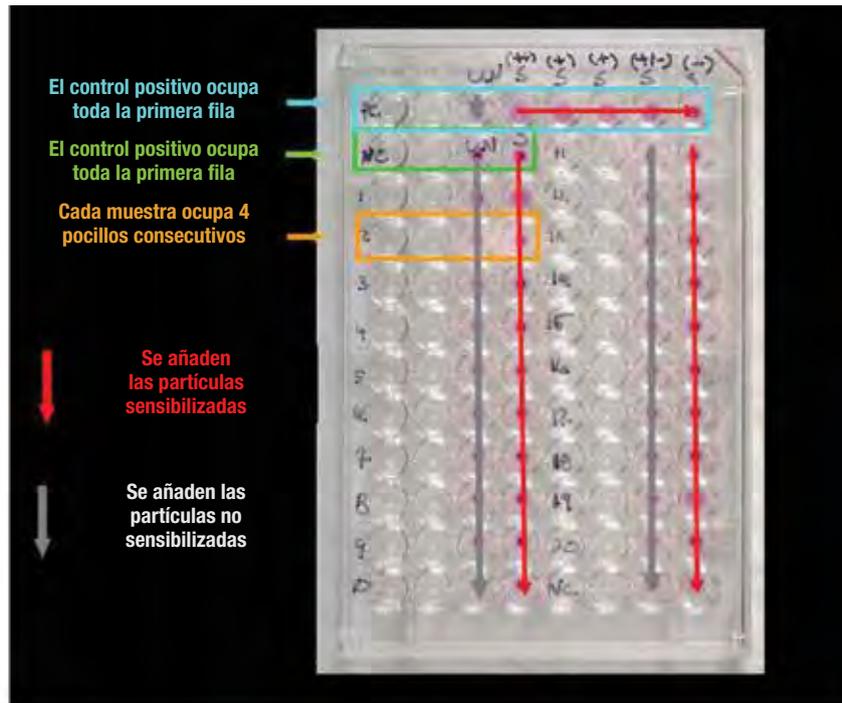
12. Se leen, interpretan y registran los resultados en los formularios apropiados.

Figura 10.8

Procedimientos para realizar (A) e interpretar los resultados (B) de la prueba de aglutinación pasiva de partículas de *T. pallidum* (TPPA)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

(B)



El control positivo ocupa toda la primera fila

El control positivo ocupa toda la primera fila

Cada muestra ocupa 4 pocillos consecutivos

Se añaden las partículas sensibilizadas

Se añaden las partículas no sensibilizadas

Interpretación de los resultados de la TPPA

Dilución del control positivo						
	(++)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)

Interpretación	Celdas de análisis	Celdas control	Patrón de disposición
Positivo			Gran círculo definido con un margen externo multiforme rugoso y aglutinación periférica o partículas aglutinadas dispersas que cubren el fondo del pocillo uniformemente.
Negativo			Las partículas se concentran en forma de botón en el centro del pocillo, con un margen exterior redondo poco definido.
Inespecífico			Las partículas se concentran en forma de anillo compacto con un margen exterior redondo poco definido.

Figura 10.8 (continuación)

Procedimientos para realizar (A) e interpretar los resultados (B) de la prueba de aglutinación pasiva de partículas de *T. pallidum* (TPPA)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

10.3.2.6 Pruebas diagnósticas de la sífilis en el punto de atención

En todo el mundo hay una variedad grande de fabricantes de pruebas diagnósticas de la sífilis para el punto de atención. Estas pruebas suelen tener el formato de pruebas en tiras con flujo lateral o de flujo a través del dispositivo. En el formato de flujo lateral, uno o más antígenos recombinantes se disponen en franjas en una tira inmunocromatográfica de nitrocelulosa para captar anticuerpos treponémicos específicos, y se produce una línea de color tras la unión de una inmunoglobulina antihumana unida a una enzima, oro coloidal, o partículas de látex coloreadas.

Se incorpora también una línea de control separada, que actúa como control de la prueba (en algunas pruebas) o señala si la muestra es adecuada (indicando la presencia de inmunoglobulina humana inespecífica en la muestra del paciente) (20-22). En el formato de flujo directo, puntos de antígenos sustituyen a las líneas, y la unión del anticuerpo específico a los antígenos tiene lugar durante el paso a través de la membrana y no cuando se produce el paso lateral a lo largo de una tira de membrana. Todas estas pruebas indican rápidamente si ha existido una exposición anterior a la infección treponémica, y se han usado convenientemente para el tamizaje de las embarazadas en los países en desarrollo para la prevención de la sífilis congénita. Se ha demostrado que el uso de estas pruebas para detectar la sífilis en el embarazo es sumamente eficaz en función de los costos (23), y su utilización se ha convertido en un componente

clave de la estrategia de la Organización Mundial de la Salud para la eliminación mundial de la sífilis congénita (24). El uso de estas pruebas simples permite realizar el mismo día el tamizaje y el tratamiento en consultorios periféricos que están lejos de los laboratorios. Estas pruebas pueden llevarse a cabo usando sangre entera (obtenida mediante punción del dedo), plasma o suero, y no requieren un equipo especial (que incluya un refrigerador o una centrifugadora). Aunque las pruebas son fáciles de realizar, es necesario seguir estrictamente las instrucciones del fabricante para garantizar su exactitud permanente. Para adoptar el uso de pruebas en el punto de atención en centros clínicos se precisa la supervisión continua de un laboratorio de referencia, que incluya un programa de garantía de calidad externa.

Aparte de su aplicación en el tamizaje, estas pruebas pueden usarse para confirmar la especificidad de las pruebas no treponémicas reactivas en lugar de ensayos treponémicos de laboratorio más complicados. Es importante señalar que la utilización exclusiva de estas pruebas treponémicas rápidas (es decir, sin la posterior confirmación no treponémica de las pruebas rápidas reactivas) inevitablemente implicará un gran número de casos de tratamiento innecesario, dado que, al igual que ocurre con todas las pruebas treponémicas, probablemente se mantendrá la reactividad de por vida, incluso después de aplicar un tratamiento eficaz. Lo ideal es que la prueba no treponémica cuantitativa se realice antes para aumentar la especificidad del diagnóstico de la infección activa y para que sirva como valor inicial

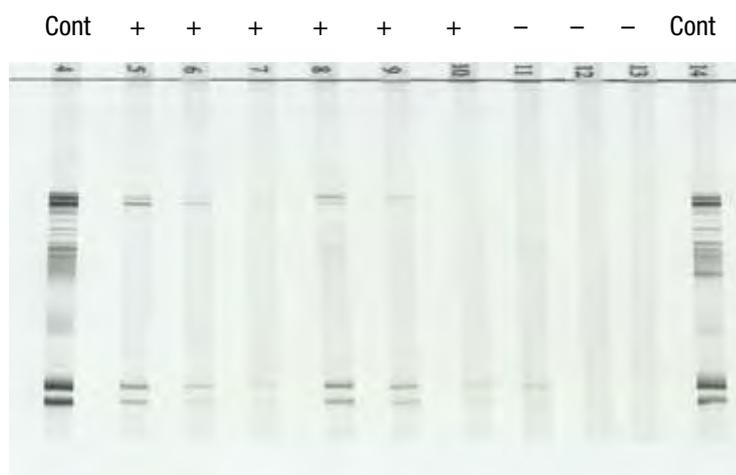


Figura 10.9

Detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum* mediante inmunoelectrotransferencia (Western blot)

Fuente: Por cortesía de Arnold Castro, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

de referencia para vigilar el tratamiento. Por la misma razón, estas pruebas treponémicas rápidas no pueden usarse solas para la serovigilancia de la sífilis, a no ser que se realice una prueba no treponémica en todos los casos con resultados positivos en la prueba de detección rápida y que solo se cuenten como casos aquellos que sean doblemente reactivos.

En la figura 10.10 se muestra un ejemplo del procedimiento que puede seguirse y los resultados que pueden obtenerse en un ejemplo de dispositivo de análisis rápido de flujo lateral. En lo que respecta a otros dispositivos, se seguirán estrictamente las instrucciones del fabricante. Tanto con el formato de flujo directo como con el formato de flujo lateral puede realizarse el multiplexado. Como resultado, hoy en día se están desarrollando pruebas inmunocromatográficas dobles para el análisis de treponemas y del VIH en el punto de atención.

Cabe señalar que actualmente existe en el mercado, en algunas regiones del mundo, al menos una prueba doble (no treponémica y treponémica) para realizar en el punto de atención (25, 26). Como detectan tanto anticuerpos no treponémicos como treponémicos (fig. 10.11), se prevé que estas pruebas reducirán considerablemente las tasas de tratamiento innecesario inherentes a las actuales pruebas rápidas, y que permitirán utilizar un solo dispositivo de análisis en el punto de atención para la serovigilancia de la sífilis.

10.3.3 Utilización apropiada de las pruebas serológicas luéticas

En el cuadro 10.1 se muestra la sensibilidad y la especificidad de las pruebas no treponémicas y las pruebas treponémicas en las diferentes fases de la sífilis.

El método convencional para realizar pruebas serológicas luéticas incluye el tamizaje de sueros con una prueba no treponémica, relativamente barata y sensible, pero relativamente menos específica y con menor carga de trabajo y, si el suero es reactivo, la confirmación con una prueba treponémica, más específica pero más cara. Con el paso de los años, se ha demostrado que este método es eficaz, en particular en los entornos donde la enfermedad se encontraba frecuentemente. La posterior titulación de los sueros reactivos confirmados mediante

una prueba no treponémica cuantitativa también permite interpretar de forma más precisa estos resultados, junto con una medida inicial (título) que puede utilizarse como referencia para evaluar la eficacia del tratamiento.

El desarrollo reciente de pruebas de ELISA y de quimioluminiscencia treponémicas que pueden automatizarse ha hecho que esta estrategia cambie, en particular en muchos laboratorios de países industrializados con un gran volumen de trabajo en los que los costos laborales son altos y la seroprevalencia es baja, como los bancos de sangre.

Por lo tanto, el tamizaje por lotes de los sueros se realiza usando una de estas pruebas treponémicas de ELISA o de quimioluminiscencia más nuevas, y solo se hará una prueba no treponémica refleja si se encuentra un suero reactivo. Si el suero es reactivo tanto en las pruebas treponémicas como en las no treponémicas, se debe llevar a cabo una prueba no treponémica cuantitativa, tal como ya se ha indicado.

Estas dos estrategias deben teóricamente dar el mismo resultado. Sin embargo, con la segunda se detectan los sueros positivos en la prueba treponémica y negativos en la prueba no treponémica que no se detectaron mediante la estrategia convencional (27). Este modelo de reactividad serológica puede encontrarse en la sífilis muy incipiente, en la sífilis precoz tratada previamente, y en raras ocasiones en la infección terciaria, por lo que se debe prestar considerable atención a los resultados de la exploración física del paciente, a los antecedentes patológicos y al riesgo sexual reciente antes de iniciar cualquier actividad de tratamiento y de notificación a la pareja.

Los laboratorios deben considerar los siguientes factores antes de decidir cuál es el método más apropiado (a menudo el más eficaz en función de los costos) para brindar servicios de realización de pruebas serológicas luéticas a una población en particular, a saber: el número de sueros sometidos a tamizaje de la sífilis en un sitio en particular; la seroprevalencia (no treponémica y treponémica) de la sífilis; el costo de inversión de los instrumentos para el ELISA o los ensayos de quimioluminiscencia; y el costo de los estuches de pruebas no treponémicas y treponémicas y los costos de mano de obra.

(A)

- Se verifica el estuche antes de usarlo. Solo se utilizarán los que no hayan caducado o no estén dañados.
- Siempre deben adoptarse medidas de seguridad universales cuando se manipulen las muestras. Mantener el área de trabajo limpia y organizada.

Este esquema gráfico no pretende sustituir a la información sobre el producto o los procedimientos normalizados de trabajo.

1. Reúna los elementos de la prueba y otros elementos de laboratorio necesarios.

2. Abra 1 envase de la prueba.

3. Marque la tira con el número de identificación del paciente.

4. Obtenga sangre mediante punción en el dedo o venopunción.

5. Obtenga 20 µl de sangre entera. En el caso de la punción en el dedo, use dos gotas de sangre obtenidas de la yema del dedo. En caso de venopunción, abra un tubo para extracción de sangre por sistema de vacío (Vacutainer) y use una pipeta de precisión.

6. Aplique la muestra a la almohadilla absorbente de la tira.

7. Añada 3 gotas del disolvente del ensayo a la almohadilla de la muestra.

8. Espere 10 minutos y lea cuanto antes los resultados.

9. Lea y registre los resultados y toda la información pertinente en el cuestionario de estudio.

Figura 10.10

Procedimientos para realizar una prueba treponémica rápida en un dispositivo de flujo lateral (A) e interpretar los resultados (B)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

Cuadro 10.1: Características del rendimiento de determinadas pruebas serológicas luéticas, por fase de la enfermedad

Prueba	Sensibilidad (%)				Especificidad (%)
	Etapas de la infección sifilítica				
	Primaria	Secundaria	Latente	Terciaria	
FTA-Abs	98 (93–100)	100	100	96	99
TPHA/PA	82 (69–90)	100	100	94	99
RPR	86 (81–100)	100	80 (53–100)	73 (36–96)	98
VDRL	80 (74–87)	100	80 (71–100)	71 (37–94)	98

FTA-Abs: prueba de absorción de anticuerpos antitreponémicos fluorescentes; RPR: prueba rápida de reagina plasmática; TPHA: prueba de hemaglutinación de *T. pallidum*; TPPA: prueba de aglutinación pasiva de partículas de *T. pallidum*; VDRL: prueba serológica luética.



Figura 10.10 (continuación)

Procedimientos para realizar una prueba treponémica rápida en un dispositivo de flujo lateral (A) e interpretar los resultados (B)

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EUA).

Si se detecta una reacción dudosa en alguna prueba, se debe repetir esta, si es posible, en una nueva muestra sérica. Si en las pruebas iniciales el suero no es reactivo y se sospecha una sífilis primaria, las pruebas deben repetirse al cabo de 2 a 3 semanas en una nueva muestra de suero. Por último, algunos pacientes que han recibido tratamiento adecuado que se inició en etapas muy tempranas de la sífilis primaria seguirán mostrando resultados negativos en la determinación de anticuerpos.

La seroinversión de las pruebas no treponémicas en pacientes que han sido tratados adecuadamente suele ocurrir en un plazo que va de 6 meses hasta unos pocos años, y se asocia a la duración de la infección y al título de anticuerpos en el suero en el momento del

tratamiento (28). Sin embargo, en algunos individuos, sobre todo en los que fueron tratados 1-2 años después de la infección inicial, los anticuerpos no treponémicos pueden persistir durante periodos prolongados incluso después de administrar un tratamiento eficaz. Se dice que estos individuos son “seropositivos rápidos”. La seroinversión de las pruebas treponémicas puede producirse también en una minoría de pacientes en un plazo de unos pocos años.

10.4 Diagnóstico de laboratorio de la sífilis congénita

Cualquier lesión cutánea o mucosa que esté presente en un recién nacido hijo de una mujer seropositiva

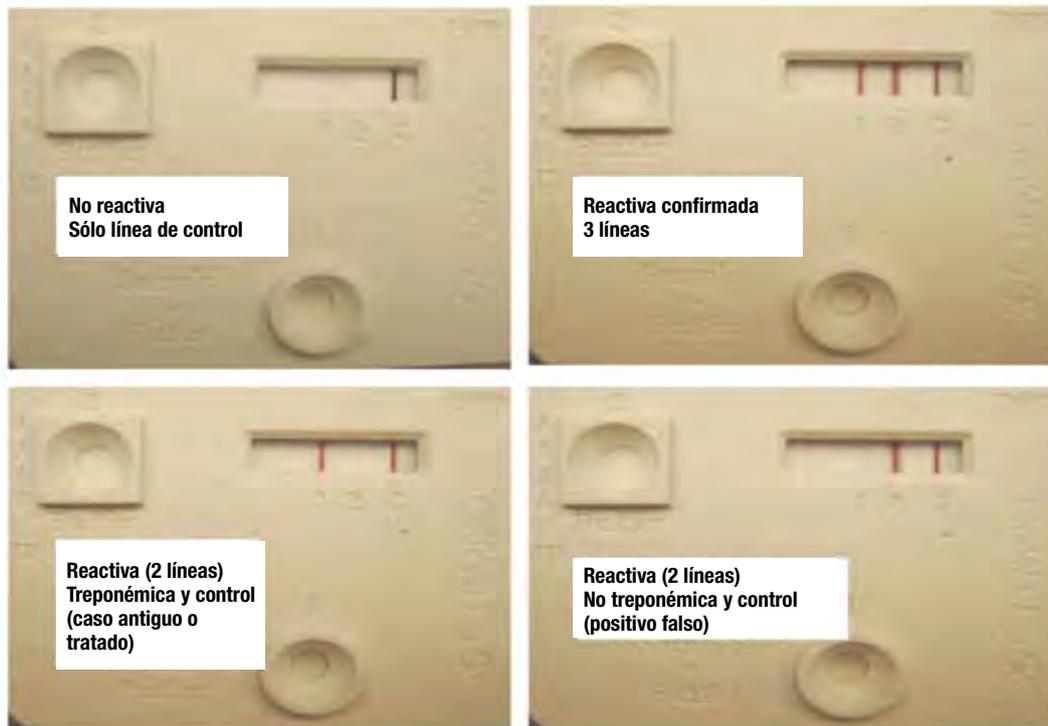


Figura 10.11
Prueba doble (no treponémica y treponémica) en el punto de atención que indica los modelos de reactividad y la interpretación probable.

debe examinarse mediante microscopía de campo oscuro, inmunofluorescencia directa o RCP para obtener pruebas directas de la infección por *T. pallidum*. Los treponemas saprofitos no aparecen en la boca hasta aproximadamente 6 semanas después del nacimiento, de manera que la probabilidad de obtener resultados positivos falsos de las muestras bucales es baja.

Cuando se encuentra un suero reactivo en una prueba serológica de un neonato, puede deberse a la transferencia pasiva de anticuerpos maternos a través de la placenta durante el embarazo, por lo que no puede considerarse diagnóstico. Sin embargo, anteriormente se consideraba que encontrar un título significativamente más elevado en la RPR/VDRL (es decir, ≥ 4 veces mayor) en el suero del neonato en comparación con el título materno, o detectar un aumento importante del título de la RPR/VDRL durante un periodo de 3 meses, era indicativo de una infección congénita.

Las modificaciones de la FTA-Abs (FTA-IgM), de enzoinmunoanálisis específicos y de inmunoensayos en línea que detectan solo IgM pueden usarse para detectar IgM antitreponémicas específicas, que no

pueden atravesar la barrera placentaria. Encontrar tal anticuerpo IgM en la circulación del niño es indicativo de una infección congénita, pero la IgM específica no puede detectarse en todos los casos de infección congénita (29).

La especificidad de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta específicas de las IgM es notablemente baja, y la FTA-IgM, al igual que la FTA-Abs de la que deriva, es inherentemente subjetiva. Por otra parte, las columnas que se usaban para separar las fracciones de inmunoglobulinas para su uso en la prueba 19S-FTA-IgM, que sustituyó en gran medida a la FTA-IgM, ya no pueden adquirirse en muchos países.

En enzoinmunoanálisis específicos de la IgM, el anticuerpo IgM (específico de la cadena μ) antihumano de conejo recubre los pocillos de placas de microtitulación. Se añade una dilución medida del suero del paciente a los pocillos de la placa. La IgM antihumana de conejo captura cualquier IgM que haya en el suero del paciente. Se añade antígeno de *T. pallidum* purificado a los pocillos y se elimina el exceso de antígeno mediante lavado. A continuación se

añade a los pocillos una mezcla de antisuero biotinilado anti-*T. pallidum* humano o de conejo y estreptavidina-peroxidasa de rábano. Después de eliminar mediante enjuague los complejos no unidos, se añade el sustrato de la enzima e indicadores cromógenos. Si el suero contiene anticuerpos IgM específicos contra *T. pallidum*, se produce una reacción de color, de tal manera que la intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos.

10.5 Neurosífilis

Las alteraciones del líquido cefalorraquídeo (LCR) son comunes en los pacientes con sífilis precoz que no presentan síntomas ni signos neurológicos. Aunque una gran proporción de estos pacientes tienen treponemas en el sistema nervioso central, no necesitan el tratamiento reforzado que es preciso administrar en la neurosífilis (30). Como resultado, no se realiza sistemáticamente la punción lumbar en la sífilis precoz a no ser que esté claramente indicado desde el punto de vista clínico. Sin embargo, cuando está indicado, deben analizarse muestras de LCR para determinar la cantidad total de proteínas y el número de leucocitos, y también para hacer una prueba VDRL-LCR. La prueba VDRL-LCR tiene gran especificidad (99%-100%) pero baja sensibilidad para la neurosífilis (31, 32). Por lo tanto, aunque una muestra reactiva en la VDRL-LCR es indicativa de la neurosífilis, no se puede descartar la neurosífilis si la muestra no es reactiva. Por el contrario, el FTA-Abs del LCR tiene gran sensibilidad pero escasa especificidad en lo que respecta a la neurosífilis, dada la transferencia pasiva de anticuerpos IgG específicos a través de la barrera hematoencefálica. Así pues, cuando se obtenga un resultado negativo en la FTA-Abs en el LCR, la probabilidad de que se pueda descartar la neurosífilis es elevada (33).

10.6 Detección de IgM antitreponémicas en el suero de adultos

Al igual que en otras infecciones bacterianas y virales, en la sífilis la síntesis de anticuerpos IgM específicos es la primera respuesta inmunitaria humoral después de la infección. Sin embargo, en la sífilis, los anticuerpos IgM antitreponémicos no solo están presentes en los pacientes con sífilis precoz, sino que pueden encontrarse también durante el periodo de latencia y en pacientes con sífilis tardía. Este fenómeno limita el valor de los

ensayos específicos de la IgM en el diagnóstico de la enfermedad en el adulto.

10.7 Referencias

1. Pillay A et al. Laboratory-confirmed case of yaws in a 10-year-old boy from the Republic of the Congo. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(11):4013-4015.
2. Sparling PF et al. Clinical manifestations of syphilis. In: Holmes KK et al., eds. *Sexually transmitted diseases*, 4th ed. New York, McGraw-Hill Medical, 2008:661-684.
3. Larsen S et al. *A manual of tests for syphilis*, 9th ed. Washington, DC, American Public Health Association, 1998.
4. Wheeler HL, Agarwal S, Goh BT. Dark ground microscopy and treponemal serological tests in the diagnosis of early syphilis. *Sexually Transmitted Infections*, 2004, 80(5):411-414.
5. Hook EW III et al. Detection of *Treponema pallidum* in lesion exudate with a pathogen-specific monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 22(2):241-244.
6. Chen CY et al. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(9):3452-3456.
7. Gayet-Ageron A et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sexually Transmitted Infections*, 2009, 85(4):264-269.
8. Liu H et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(5):1941-1946.
9. Marfin AA et al. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 2001, 40(4):163-166.
10. Orle KA et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(1):49-54.
11. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, 8(1):1-21.
12. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2005, 16(1):45-51.
13. Nandwani R, Evans DT. Are you sure it's syphilis? A review of false positive serology. *International Journal of STD and AIDS*, 1995, 6(4):241-248.

14. Aktas G et al. Evaluation of the fluorescent treponemal antibody absorption test for detection of antibodies (immunoglobulins G and M) to *Treponema pallidum* in serologic diagnosis of syphilis. *International Journal of STD and AIDS*, 2007, 18(4):255-260.
15. Egglestone SI, Turner AJ. Serological diagnosis of syphilis. PHLS Syphilis Serology Working Group. *Communicable Diseases and Public Health*, 2000, 3(3):158-162.
16. Marangoni A et al. Evaluation of LIAISON Treponema screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12(10):1231-1234.
17. Baker-Zander SA et al. Antigens of *Treponema pallidum* recognized by IgG and IgM antibodies during syphilis in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 1985, 151(2):264-272.
18. Moskophidis M, Müller F. Molecular analysis of immunoglobulins M and G immune response to protein antigens of *Treponema pallidum* in human syphilis. *Infection and Immunity*, 1984, 43(1):127-132.
19. Lam TK et al. Comparative evaluation of the INNO-LIA syphilis score and the MarDx *Treponema pallidum* immunoglobulin G Marblot test assays for the serological diagnosis of syphilis. *International Journal of STD and AIDS*, 2010, 21(2):110-113.
20. Zarakolu P et al. Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(8):3064-3065.
21. Diaz T et al. Evaluation of the Determine Rapid Syphilis TP assay using sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11(1):98-101.
22. Peeling RW, Ye H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bulletin of the World Health Organization*, 2004, 82(6):439-446.
23. Rydzak CE, Goldie SJ. Cost-effectiveness of rapid point-of-care prenatal syphilis screening in sub-Saharan Africa. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(9):775-784.
24. Schmid GP et al. The need and plan for global elimination of congenital syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*, 2007, 34(7):S5-S10.
25. Castro AR et al. Novel point-of-care test for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(12):4615-4619. treponemal antibodies in patients with syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(12):4615-4619.
26. Yin YP et al. A dual point-of-care test shows good performance in simultaneously detecting nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis: a multisite evaluation study in China. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, 56(5):659-665.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Syphilis testing algorithms using treponemal tests for initial screening - four laboratories, New York City, 2005-2006. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2008, 57(32):872-875.
28. Romanowski B et al. Serologic response to treatment of infectious syphilis. *Annals of Internal Medicine*, 1991, 114(12):1005-1009.
29. Bromberg K, Rawstron S, Tannis G. Diagnosis of congenital syphilis by combining *Treponema pallidum*-specific IgM detection with immunofluorescent antigen detection for *T. pallidum*. *Journal of Infectious Diseases*, 1993, 168(1):238-242.
30. Rolfs RT et al. The Syphilis and HIV Study Group. A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 1997, 337(5):307-314.
31. Davis LE, Schmitt JW. Clinical significance of cerebrospinal fluid tests for neurosyphilis. *Annals of Neurology*, 1989, 25(1):50-55.
32. Castro R, Prieto ES, da Luz Martins Pereira F. Nontreponemal tests in the diagnosis of neurosyphilis: an evaluation of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) and the Rapid Plasma Reagin (RPR) tests. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2008, 22(4):257-261.
33. Jaffe HW et al. Tests for treponemal antibody in CSF. *Archives of Internal Medicine*, 1978, 138(2):252-255.

Capítulo 11

Linfogranuloma venéreo

11.1 Introducción

El linfogranuloma venéreo (LGV) es una de las tres infecciones de transmisión sexual “tropicales” clásicas. Está causado por la biovariedad L de *Chlamydia trachomatis*, que contiene serovariedades (L1, L2, L2a, L2b, L3) más invasoras que las que causan la enfermedad ocular clásica, el tracoma (serovariedades A-C), y que las serovariedades que provocan uretritis no gonocócicas e infecciones asociadas del aparato genital (serovariedades D-K). El linfogranuloma venéreo tiene distribución mundial, pero es más prevalente en los países tropicales y subtropicales; por ejemplo, es endémico en zonas del este y el oeste de África, en la India y Asia sudoriental, así como en América del Sur y el Caribe. En la mayoría de los casos, estas observaciones epidemiológicas representan el cuadro clínico clásico de linfogranuloma venéreo, que se caracteriza por linfadenopatía inguinal con una lesión primaria asociada o sin ella (1). Estos signos suelen observarse más en los hombres que en las mujeres. En el 2003, se registró en los Países Bajos un grupo de infecciones rectales por linfogranuloma venéreo, con la característica afectación ganglionar y proctitis o proctocolitis, en hombres que mantenían relaciones sexuales con otros hombres (2). Se notificaron posteriormente casos en muchos otros países de Europa, América del Norte, Australia y otras zonas, donde anteriormente sólo se habían registrado casos de linfogranuloma venéreo importados esporádicamente (3-5). Sigue sin conocerse el número de infecciones rectales por *C. trachomatis* debidas a la biovariedad relacionada con el linfogranuloma venéreo o a biovariedades no relacionadas con el linfogranuloma venéreo, debido a que el tamizaje no se hace sistemáticamente ni se usa de forma generalizada una prueba discriminadora.

Por lo general, el linfogranuloma venéreo se manifiesta inicialmente por una lesión primaria herpetiforme y transitoria en los genitales externos, pero en muchos casos esta lesión puede pasar inadvertida, o bien puede manifestarse como una uretritis no gonocócica aguda en los hombres o ser completamente asintomática en las mujeres como consecuencia de

la infección primaria del cuello uterino. En la mayoría de los casos las personas buscan atención médica cuando los vasos linfáticos regionales contraen la infección, como resultado de la propagación linfática del microorganismo causal. En los hombres, la tumefacción de los ganglios inguinales y femorales a menudo da lugar a bubones supurados a uno o ambos lados del ligamento inguinal (es el denominado “signo del surco”, que puede verse también en una minoría de pacientes con chancro blando) (7). Los ganglios perirrectales y pélvicos profundos pueden resultar afectados si la lesión primaria se encuentra en el cuello uterino, y la enfermedad puede comenzar con síntomas compatibles con una enfermedad pélvica inflamatoria grave.

En los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, la enfermedad puede comenzar con una proctitis o proctocolitis ulcerosa grave, con dolor rectal, exudado sanguinolento, importantes anomalías en la exploración mediante anoscopia, fiebre y linfadenopatía (6, 7). Al igual que en las mujeres, en las que el padecimiento también pueden comenzar con tales lesiones, si no se trata la enfermedad en esta etapa se pueden formar abscesos perirrectales, así como estenosis rectales, fístulas y cicatrización crónica. Aparte de estas complicaciones, que surgen como resultado de los cambios inflamatorios agudos, las manifestaciones crónicas de la enfermedad pueden obstruir los vasos linfáticos de drenaje de los genitales o el recto, con el consiguiente edema. Se denomina “elefantiasis” al edema grave de origen linfático.

11.2 Pruebas de laboratorio

Hasta principios de la década de 1980, el aislamiento de *C. trachomatis* en el cultivo celular seguía siendo el método principal de diagnóstico de la infección por clamidias (véase el capítulo 5). Se constató que las cepas de los casos de linfogranuloma venéreo crecen más rápidamente en células de cultivos tisulares que las cepas de clamidias no relacionadas con el linfogranuloma venéreo. Desde mediados de la década

de 1990, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) se han convertido en las pruebas de elección para el diagnóstico de las infecciones por clamidias. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos comercializadas son sustancialmente más sensibles que las pruebas diagnósticas anteriores (véase el anexo 3), aunque no pueden discriminar entre cepas no relacionadas con el linfogranuloma venéreo y cepas causantes del linfogranuloma venéreo. Posteriormente se han desarrollado ensayos moleculares que pueden diferenciar las cepas basándose en una eliminación en el gen *pmpH* que solo tiene lugar en las cepas que causan el linfogranuloma venéreo (8-10). Es crucial obtener, transportar y conservar las muestras de manera apropiada si se quiere conseguir que la sensibilidad y la especificidad de todos los métodos diagnósticos sean elevadas.

En el diagnóstico del linfogranuloma venéreo, las muestras de elección para el cultivo y para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son las obtenidas con hisopo directamente de las lesiones primarias (cuando están presentes), las muestras uretrales obtenidas con hisopo o muestras de orina de la primera parte de la micción en los hombres, muestras del exudado endocervical obtenidas con hisopo en las mujeres y muestras rectales obtenidas con hisopo en los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres. Las muestras que se obtienen mediante aspiración con aguja de los ganglios linfáticos regionales fluctuantes rara vez dan resultados positivos. A diferencia de otras infecciones del aparato genital por clamidias no invasivas, el linfogranuloma venéreo tiende a producir una respuesta inmunitaria humoral importante. En el pasado se usó mucho la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico de la infección tropical clásica, detectándose títulos $\geq 1:64$. Posteriormente, se utilizó la prueba de microinmunofluorescencia, detectándose títulos de anticuerpos $\geq 1:256$ con gran reactividad cruzada.

Cabe señalar que las mujeres con enfermedad pélvica inflamatoria y otras que presentan un linfogranuloma

venéreo no complicado pueden tener respuestas inmunitarias similares. Sigue sin conocerse el valor de las pruebas serológicas en el diagnóstico de la proctitis y la proctocolitis del linfogranuloma venéreo.

11.3 Referencias

1. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sexually Transmitted Diseases*, 2002, 78(2):90-92.
2. Nieuwenhuis RF et al. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39(7):996-1003.
3. Rönn MM, Ward H. The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 2011, 11:70-78.
4. Martin-Iguacel R et al. Lymphogranuloma venereum proctocolitis: a silent endemic disease in men who have sex with men in industrialised countries. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 29(8):917-925.
5. White J, Ison C. Lymphogranuloma venereum: what does the clinician need to know? *Clinical Medicine*, 2008, 8(3):327-330.
6. Levine JS, Smith PD, Brugge WR. Chronic proctitis in male homosexuals due to lymphogranuloma venereum. *Gastroenterology*, 1980, 79(3):563-565.
7. Quinn TC et al. The polymicrobial origin of intestinal infections in homosexual men. *New England Journal of Medicine*, 1983, 309(1):576-582.
8. Morré SA et al. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(8):1311-1312.
9. Chen CY et al. The molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction test using rectal and urethral specimens. *Sexually Transmitted Diseases*, 2007, 34(7):451-455.
10. Alexander S, Martin IM, Ison C. A comparison of two methods for the diagnosis of lymphogranuloma venereum. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57:962-965.

Capítulo 12

Chancro blando

12.1 Introducción

El chancro blando o chancroide está causado por *Haemophilus ducreyi* y se transmite exclusivamente por contacto sexual, con invasión directa del microorganismo a través de la piel sana o erosionada. Es aproximadamente siete veces más frecuente en los hombres que en las mujeres, y su transmisión se asocia al hecho de tener múltiples parejas sexuales. El chancro blando produce úlceras en los genitales, normalmente en el surco coronal peneano en los hombres y en la vulva en las mujeres. El chancro blando perianal puede observarse en hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres (papel pasivo) y también en mujeres que han practicado el coito anal. El chancro blando puede asociarse a veces a linfadenitis inguinal supurativa, en particular si el paciente tarda en acudir a los servicios asistenciales o si se tarda en hacer el diagnóstico correcto. En raras ocasiones el chancro blando se adquiere en el laboratorio por inoculación accidental de *H. ducreyi* en los dedos.

El periodo de incubación suele ser de 4-10 días. La úlcera genital comienza como una pápula dolorosa a la palpación que se convierte en una pústula y se ulcera en 2 días. La úlcera es dolorosa, irregular, con bordes excavados y generalmente no está indurada; estas son las características clásicas que diferencian el chancro blando de las úlceras sifilíticas. Sin embargo, es importante señalar que la sensibilidad del diagnóstico basado simplemente en la aparición clínica de la úlcera es escasa. La base de la úlcera a menudo está cubierta por un exudado purulento y necrótico, y sangra fácilmente si se hace un raspado o se obtiene el exudado mediante hisopo. Es frecuente que haya lesiones múltiples, que pueden converger formando úlceras muy grandes. También pueden darse casos de adenitis inguinal dolorosa unilateral que, si no se trata adecuada y prontamente, puede dar lugar a la ruptura espontánea de los ganglios linfáticos supurados (bubones). Las manifestaciones iniciales atípicas del chancro blando son frecuentes y la enfermedad puede confundirse fácilmente con otras enfermedades ulcerosas genitales, sobre todo con el herpes genital. Algunas úlceras genitales pueden estar infectadas por más de un

microorganismo patógeno productor de enfermedades ulcerosas genitales, pero actualmente esto es menos común debido a la disminución de la prevalencia relativa de las enfermedades ulcerosas genitales de origen bacteriano.

El microorganismo patógeno *H. ducreyi* es un bacilo gramnegativo corto e inmóvil. Es difícil de cultivar y, debido a sus complejas necesidades nutritivas, es preciso utilizar medios de cultivo sumamente enriquecidos para aislarlo. El crecimiento de las cepas de *H. ducreyi* puede ser aerobio o anaerobio, y es óptimo a una temperatura entre 32 °C y 33 °C en una atmósfera saturada de agua. La mayoría de las cepas, en particular en el aislamiento primario, dependen del dióxido de carbono (CO₂). *H. ducreyi* tiene pocas características bioquímicas distintivas: todas las cepas reducen el nitrato a nitrito, son positivas tanto a la oxidasa como a la fosfatasa alcalina y necesitan hemina (factor X) para crecer.

Aunque en tiempos el chancro blando era muy común en ciertas partes del mundo, la prevalencia de la enfermedad ha disminuido extraordinariamente desde la década de 1990, en parte debido al mejor acceso a los antimicrobianos, la introducción del manejo sintomático, la mejor atención de salud de los profesionales del sexo y el cambio del comportamiento sexual en la era de la infección por el VIH.

12.2 Aspectos generales de los procedimientos diagnósticos

El diagnóstico de laboratorio del chancro blando se ha basado tradicionalmente en la recuperación de *H. ducreyi* en el cultivo, que es un procedimiento técnicamente exigente cuyo rendimiento es bajo salvo en los laboratorios sumamente capacitados que se utilizan para trabajar con este microorganismo (1). Aunque no existe en el mercado ninguna prueba de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN), se han utilizado varias PAAN internas para aumentar la sensibilidad diagnóstica (1). Por otra parte, se han descrito varias técnicas basadas en investigaciones, como el uso de la detección de

antígenos basada en anticuerpos monoclonales y las sondas de DNA (1). La sensibilidad y la especificidad de la microscopia directa son muy bajas, por lo que su utilidad como herramienta diagnóstica del chancro blando es escasa. Las pruebas serológicas desarrolladas en laboratorios de investigación de las que se dispone actualmente son útiles exclusivamente a efectos seroepidemiológicos.

12.3 Toma y transporte de las muestras

Las muestras para el cultivo de *H. ducreyi* deben obtenerse de la base de la úlcera. Se limpia la úlcera con una gasa seca o con un hisopo para retirar las costras y los residuos superficiales. No es preciso hacer una limpieza exhaustiva, que puede provocar una hemorragia y ser dolorosa para el paciente. Se obtiene el exudado de la base con un hisopo; el tipo de fibra del hisopo no parece afectar a la sensibilidad del cultivo. El aislamiento de *H. ducreyi* del pus del bubón inguinal es mucho menos satisfactorio que a partir del material de la úlcera genital, por lo que rara vez se realiza. Para obtener resultados óptimos, se inoculan las muestras de inmediato en los medios de aislamiento y se mantienen en un frasco con vela o en una incubadora de tipo ambulatorio en una atmósfera húmeda, a una temperatura que no sea superior a 35 °C hasta la incubación final. Cuando no se dispone de medios de cultivo en el centro clínico, las muestras pueden transportarse a 4 °C en un medio de transporte. Un medio a base de hemina y tioglicolato que contenga L-glutamina y albúmina bovina parece mantener la viabilidad de *H. ducreyi* durante varios días a 4 °C (2).

12.4 Aislamiento e identificación de *H. ducreyi*

El cultivo bacteriológico de *H. ducreyi* sigue siendo el medio principal para el diagnóstico del chancro blando en el marco clínico y durante muchos años fue el método de referencia para evaluar otros métodos diagnósticos. Para que el cultivo sea satisfactorio, es fundamental utilizar medios preparados recientemente (lo ideal es que tengan menos de 7 días) y que las condiciones de incubación sean correctas. Sin embargo, con el advenimiento de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos desarrolladas en laboratorios de investigación, que son más sensibles, ahora se constata que el cultivo puede detectar, en el mejor de los casos, solo 75% de las infecciones por *H. ducreyi* (3).

Inicialmente se intentó cultivar *H. ducreyi* usando sangre de conejo fresca coagulada calentada a 55 °C, sangre humana fresca coagulada y suero humano inactivado mediante calor, pero estos métodos estaban sujetos a problemas recurrentes de contaminación microbiana (1). El problema de la contaminación se abordó posteriormente mediante la adición de vancomicina a agar chocolate semisólido en una concentración de 3 µg/ml (4). Usando tales medios selectivos, Hammond et al. lograron el crecimiento de *H. ducreyi* en 7 (44%) de 16 pacientes con chancro blando diagnosticado clínicamente (4). Cabe observar que con esa concentración de vancomicina puede inhibirse el crecimiento de algunas cepas de *H. ducreyi* y, por lo tanto, tales cepas deberán aislarse en medios de cultivo sin antibióticos.

Se han desarrollado varios medios artificiales selectivos, que se examinan detalladamente en diversos artículos (5). Nsanze et al. demostraron que el rendimiento de los cultivos positivos podía ser mayor cuando se utilizaba más de un tipo de medio de cultivo para aislar *H. ducreyi* del material obtenido de las úlceras genitales (6). Esto puede deberse en parte a diferencias entre las cepas de *H. ducreyi* en lo que respecta a las necesidades nutritivas. Un medio que contenga base de agar GC, hemoglobina (1%-2%), suero de bovino fetal (5%), medio de enriquecimiento con cofactores, vitaminas y aminoácidos (CVA; 10%) y vancomicina (3 mg/ml) parece tener la mayor sensibilidad para el aislamiento de *H. ducreyi* en muestras clínicas, con una tasa de cultivos positivos de hasta aproximadamente 80% de los casos de chancro blando definidos clínicamente (fig. 12.1) (5). No obstante, se ha observado que algunas cepas de *H. ducreyi* no crecerán en este medio, pero que pueden aislarse en un medio diferente compuesto de agar de Mueller-Hinton (MH), sangre de caballo chocolatada (5%), medio enriquecido con CVA (1%) y vancomicina (3 mg/ml) (5). Para facilitar la optimización del cultivo de *H. ducreyi* en el marco clínico, pueden incorporarse dos medios diferentes en una sola biplaca. Más recientemente, se ha desarrollado un medio a base de carbón que evita la necesidad de agregar el costoso suero de bovino fetal y puede ser un medio diagnóstico más rentable en entornos con recursos escasos (fig. 12.2) (7). En el anexo 4 se describen las recetas de laboratorio de los medios apropiados. A fin de poner establecer el cultivo de *H. ducreyi*, es aconsejable usar al menos dos de los medios antes mencionados y definir su sensibilidad en el curso de estudios piloto.



Figura 12.1
Crecimiento de *H. ducreyi* en una placa de agar-chocolate GC enriquecido



Figura 12.2
Agregados de *H. ducreyi* en un medio de carbón

Después de la siembra, se incuban las placas de cultivo a una temperatura de 32 °C a 34 °C en una atmósfera saturada de agua que contenga 5% de CO₂ o, preferentemente, en condiciones microaerófilas. Los cultivos se incuban durante 48 horas antes de hacer la lectura inicial, y se mantienen 5 días antes de llegar a la conclusión de que son negativos. El tamaño de las colonias de *H. ducreyi* puede variar según el tiempo y la temperatura de incubación, la atmósfera y el medio de crecimiento. Las colonias no son mucoides,

son prominentes y granuladas, de color grisáceo a amarillento, y pueden obtenerse con un asa de siembra, deslizándose por la superficie del agar, manteniéndose intactas y formando agregados. Las colonias son translúcidas u opacas, y esta variabilidad puede dar la impresión de un cultivo mixto e impuro. La tinción de Gram de los frotis de las colonias muestra cocobacilos gramnegativos en cadenas cortas, agregados o espirales. Los microorganismos son polimorfos en aproximadamente 50% de los cultivos. Las bacterias a

veces parecen tener tinción bipolar. En muchas zonas del mundo, casi todas las cepas de *H. ducreyi* producen lactamasa, característica que puede servir de ayuda para hacer una identificación presuntiva. En el trabajo de diagnóstico ordinario en zonas donde la enfermedad es endémica, no hay ninguna necesidad de identificación adicional, aunque la identificación confirmatoria puede ser necesaria en caso de presuntas cepas en zonas donde no es endémica. Para facilitar este proceso, pueden combinarse algunos de los siguientes métodos: prueba de la oxidasa, reducción de nitratos, prueba de la porfirina y detección de la fosfatasa alcalina.

- **Prueba de la oxidasa**

La producción de citocromo oxidasa puede evidenciarse poniendo unas cuantas gotas de hidrócloruro de tetrametil-*p*-fenilendiamina en una tira del papel de filtro y haciendo una extensión de varias colonias sobre la zona impregnada mediante un asa de siembra bacteriológica. Se considera que el resultado es positivo si el color cambia al azul o al violeta en 1 minuto.

- **Reducción de nitratos**

Se prepara una suspensión bacteriana densa (patrón 3 de McFarland, 109 UFC/ml) y se transfieren 0,04 ml a un tubo pequeño. Se agregan 0,04 ml de solución de nitrato de sodio (0,5 g/l) y 0,04 ml de tampón fosfato (0,025 mol/l), a pH 6,8, y se incuba en un baño María a 37 °C durante 1 hora. Luego se añaden 0,06 ml de ácido sulfanílico (8 g/l) a ácido acético (5 mol/l) y 0,06 ml de β-naftilamina (5 g/l) a ácido acético (5 mol/l). Se agita el tubo y el resultado se considera positivo si se observa una coloración rosa.

- **Dependencia de la hemina (factor X): prueba de la porfirina**

La prueba clásica de crecimiento con discos o tiras impregnados de hemina no puede usarse para detectar *H. ducreyi*. La única manera fiable de demostrar la dependencia de la hemina es la prueba de la porfirina. Se hace una suspensión bacteriana densa (patrón 3 de McFarland, 109 UFC/ml) en 0,5 ml de una solución de clorhidrato del ácido β-aminolevulínico (2 mmol/l) en tampón fosfato (0,1 mol/l), a pH 6,9, que contenga solución de sulfato de magnesio (0,8 mmol/l). Se incuba en un baño María a 37 °C durante 4 horas. El sustrato se expone a la luz de Wood (longitud de onda de 360 nm) en un cuarto oscuro. Una fluorescencia roja indica la presencia de porfirinas, es decir, que no hay dependencia

de la hemina. Por lo tanto, *H. ducreyi* debe dar un resultado negativo y no presentar fluorescencia roja.

- **Detección de la fosfatasa alcalina**

Se hace una suspensión bacteriana densa (patrón 3 de McFarland, 109 UFC/ml) en un tubo que contenga 0,5 ml de fosfato disódico sin fenol (0,3 g/l) en tampón de citrato-hidróxido de sodio de Sørensen (0,01 mol/l), a pH 5,6, y se incuba el tubo en un baño María a 37 °C durante 4 horas. Se añaden 4 gotas de 2,6-dibromoquinona-4-clorimida (5 g/l) en metanol, se agita y se deja reposar el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 0,3 ml de *n*-butanol, se agita y se deja reposar 5 minutos. La aparición de un color de azul a violeta en la capa del butanol indica un resultado positivo.

- **Otras características de *H. ducreyi***

Las pruebas de la catalasa, el indol y la ureasa son negativas. No se considera que *H. ducreyi* sea sacarolítico. Sin embargo, se han referido casos de reacciones positivas con diferentes carbohidratos. *H. ducreyi* posee una amplia actividad aminopeptidasa y todas las cepas analizadas han mostrado actividad con derivados β-naftilamídicos de L-lisina, L-arginina, L-alanina, L-glicina, glicil-glicina, glicil-L-alanina y L-leucina.

12.5 Detección de *H. ducreyi* basada en los ácidos nucleicos

Al momento de redactarse esta publicación (junio del 2012), no existía en el mercado ninguna prueba de amplificación de ácidos nucleicos aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos para la detección de *H. ducreyi*. En la bibliografía se han descrito varias pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, que utilizan diversas dianas moleculares, como el gen de rRNA de 16s de *H. ducreyi*, la región espaciadora intergénica ribosómica *rrs* (16S)-*rrl* (23S) y el gen *groEL* (1). También se ha desarrollado una robusta reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la detección de microorganismos patógenos que producen enfermedades ulcerosas genitales, incluido *H. ducreyi*, que se utiliza en algunos centros de referencia internacionales (8).

12.6 Tecnologías de sondas de ácidos nucleicos

Se ha investigado el uso de ensayos de hibridación de DNA-DNA y DNA-RNA como posibles medios para detectar *H. ducreyi* en el laboratorio y se ha demostrado que tanto su sensibilidad como su especificidad alcanzan el 100%. No obstante, todavía es preciso establecer su función como herramienta diagnóstica para detectar el chancro blando (7).

12.7 Microscopia

El examen directo del material clínico en frotis con tinción de Gram a veces puede ser útil para el diagnóstico del chancro blando si se observan los característicos bacilos gramnegativos pequeños agrupados en cadenas en forma de “bancos de peces”, “vías de tren” o “huellas digitales”. Sin embargo, estos aspectos morfológicos clásicos rara vez se ven en la práctica clínica. Por otra parte, la mayoría de las úlceras genitales presentan una flora polimicrobiana debido a la contaminación secundaria, por lo que la presencia de bacilos gramnegativos en un frotis puede resultar engañosa y contribuye a que el rendimiento de la microscopia como medio diagnóstico sea bajo. Así pues, no se recomienda la tinción de Gram de los frotis para el diagnóstico del chancro blando.

12.8 Detección de antígenos de *H. ducreyi*

Se han utilizado algunos anticuerpos monoclonales contra importantes antígenos de *H. ducreyi*, incluidos la proteína y el lipooligosacárido de la membrana externa de 29 kDa, para detectar la infección por *H. ducreyi* en varios formatos diagnósticos, como ensayos de inmunofluorescencia y ensayos de inmunolimulus (7). Estos ensayos se han desarrollado en laboratorios de investigación y no se han usado como medio diagnóstico en la práctica clínica.

12.9 Pruebas serológicas

Actualmente no se comercializan pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *H. ducreyi*. Las respuestas serológicas humanas y de conejo a la infección por *H. ducreyi* se han detectado mediante diversas tecnologías, como los ensayos de inmunofluorescencia, la precipitación, la aglutinación y la inmunofijación puntual (7). Durante la fase ulcerativa del chancro blando se desarrolla una respuesta humoral a la infección por *H. ducreyi*, pero, teniendo en cuenta la experiencia

clínica y los estudios de inoculación experimental en el ser humano, parece probable que no exista inmunidad adquirida contra *H. ducreyi*. Las pruebas serológicas aportan poco como ayuda diagnóstica, pero serían una herramienta útil para quienes realizan encuestas seroepidemiológicas de infecciones pasadas por *H. ducreyi* en las comunidades.

12.10 Antibiograma

Se han observado y descrito casos de resistencia de alto nivel conferida por plásmidos a las sulfonamidas, las penicilinas, la kanamicina, la estreptomina, la tetraciclina, el cloranfenicol y la trimetoprima en cepas de *H. ducreyi*. La resistencia cromosómica conferida por plásmidos puede variar enormemente de una zona geográfica a otra. Muchas cepas de *H. ducreyi* muestran resistencia a varios antimicrobianos. El aumento continuo de la farmacoresistencia de los microorganismos patógenos que provocan infecciones de transmisión sexual (ITS) exige la adecuada vigilancia de la sensibilidad de las cepas clínicas de *H. ducreyi* en las zonas donde el chancro blando sigue siendo un importante problema clínico. Sin embargo, hasta ahora no existe ningún procedimiento estándar para los antibiogramas de este microorganismo.

La mayoría de los estudios publicados han usado la técnica de dilución en agar para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Uno de los medios más apropiados es el agar de Mueller-Hinton (MH) enriquecido con hemoglobina al 1%, suero de bovino fetal al 5% y suplemento de enriquecimiento IsoVitaléXTM al 1% (anexo 4). Como alternativa, el agar de Mueller-Hinton puede reemplazarse por la base de agar GC. La determinación de las CIM antimicrobianas de las cepas de *H. ducreyi* es un procedimiento engorroso y delicado desde el punto de vista técnico, que solo puede realizarse con éxito en laboratorios de referencia especializados.

La lista de antimicrobianos que han de examinarse debe incluir aquellos que se recomiendan localmente para tratar el chancro blando, así como medicamentos alternativos, antimicrobianos que sean útiles para el estudio epidemiológico de *H. ducreyi* y, por último, fármacos recién desarrollados que requieren una evaluación microbiológica. Entre los antimicrobianos que suelen incluirse se encuentran el sulfametoxazol y la trimetoprima (usados solos o en combinación), las tetraciclinas, el cloranfenicol, la eritromicina, la

kanamicina (o la estreptomycin), el ciprofloxacino (o el fleroxacino) y la ceftriaxona (o la cefotaxima). La preparación de soluciones madre antimicrobianas y de diluciones para su uso en la determinación de las CIM se describe detalladamente en la sección 4.8.4.2 del capítulo 4.

Para elaborar el medio, se disuelven en agua destilada, por separado, agar de Mueller-Hinton deshidratado y hemoglobina. El volumen de agua usado debe ser 16% inferior al volumen de la fórmula del medio normal (para permitir la adición posterior del volumen de suplementos y solución antimicrobiana). Se calienta hasta llegar al punto de ebullición y se dispensan el agar de Mueller-Hinton y la hemoglobina por separado en dos recipientes, en volúmenes apropiados para el número de placas que deban prepararse para cada dilución antimicrobiana, lo cual dependerá del número de cepas que deban analizarse. Se introduce en el autoclave en envases herméticamente cerrados, se deja que baje la temperatura hasta 50 °C a 55 °C en un baño María, luego se mezcla en un recipiente y se añade suero de bovino fetal al 5%, suplemento de *H. ducreyi* al 1% y solución antimicrobiana al 10%. Se mezcla suavemente y se vierten cantidades de aproximadamente 20 ml sobre placas con un diámetro interno de 9 cm. Cuando el agar se ha solidificado, las placas pueden conservarse a 4 °C hasta 1 semana en bolsas de plástico selladas.

Para preparar el inóculo, se suspende el crecimiento de un subcultivo de 24 horas en agar GC o agar de Mueller-Hinton enriquecido (similar al medio de aislamiento pero sin vancomicina) en caldo con triptona y soja (TSB) hasta alcanzar una densidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de 10^8 por mililitro. Las colonias de *H. ducreyi* a menudo son tan cohesivas que no puede obtenerse una suspensión homogénea, ni siquiera después de agitar vigorosamente en un agitador vorticial. Mediante una jeringa con aguja de calibre 25G naranja se dispersan los agregados, extrayendo la suspensión y echándola a chorro en repetidas ocasiones, lo cual ayuda a crear una suspensión más homogénea, además de ser un procedimiento menos destructivo para los bacilos. La centrifugación a velocidad baja (500 g) puede ser útil para sedimentar grandes agregados. Luego se compara la densidad del sobrenadante con el patrón 0,5 de McFarland (10^8 UFC/ml). Se diluye la suspensión en caldo de triptona y soja (1:10) para obtener 107 UFC/ml y se ponen 0,5 ml de esta dilución en el pocillo correspondiente de un sembrador replicador.

Las placas para el análisis de la CIM se calientan a temperatura ambiente y, si fuera preciso, se secan colocándolas en una incubadora en posición invertida con las tapas entreabiertas. Los inóculos bacterianos preparados se pasan a las placas de análisis usando un replicador de puntas múltiples, para producir puntos de aplicación que contengan aproximadamente 10^4 UFC. Primero se inocula una placa de referencia que no contenga antimicrobianos y, a continuación, las placas que contienen los diferentes antimicrobianos, comenzando con la menor concentración de cada fármaco. Por último, se inocula una segunda placa de referencia. Se deja que los inóculos se sequen, se invierten las placas y se incuban durante 24 horas, a 33 °C, en una atmósfera saturada de agua que contenga un 5% de CO_2 .

La CIM es la menor concentración de antimicrobiano que no produce ningún crecimiento, o bien muy pocas colonias únicas o una fina turbidez, apenas visible. El crecimiento en ambas placas de referencia debe ser confluyente y sin contaminación. La determinación de la CIM de las sulfonamidas es algo difícil, ya que los valores extremos son menos nítidos que con otros antimicrobianos. Se logra una lectura normalizada y resultados reproducibles si la segunda dilución en la que hay una disminución extraordinaria del crecimiento se toma como CIM. Puede ser útil comparar este crecimiento con el de las placas de referencia.

12.11 Conservación de las cepas

Para mantener la viabilidad de las cepas de *H. ducreyi* en el laboratorio, es necesario hacer subcultivos cada 4 días. Las cepas también pueden conservarse hasta 4 semanas si se inoculan y cultivan por picadura en agar chocolate enriquecido. Para periodos de mantenimiento de varios meses, las suspensiones en leche desnatada pueden conservarse congeladas a -70 °C. En lo que se refiere a la conservación a largo plazo, se puede hacer una suspensión de las cepas en un medio de crioconservación —como suero de bovino fetal más dimetilsulfóxido al 10% o leche desnatada más glicerol al 20%— y conservarla en nitrógeno líquido.

12.12 Cuestiones médico-legales

El chancro blando siempre debe considerarse una ITS, salvo en los raros casos en que la infección se haya contraído en el laboratorio.

12.13 Referencias

1. Lewis DA. Diagnostic tests for chancroid. *Sexually Transmitted Infections*, 2000, 76(2):137-141.
2. Dangor Y, Radebe F, Ballard RC. Transport media for *Haemophilus ducreyi*. *Sexually Transmitted Diseases*, 1993, 20(1):5-9.
3. Morse SA et al. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: association with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175(3):583-589.
4. Hammond GW et al. Comparison of specimen collection and laboratory techniques for isolation of *Haemophilus ducreyi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1978, 7(1):39-43.
5. Morse SA. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1989, 2(2):137-157.
6. Nsanze H et al. Comparison of media for the primary isolation of *Haemophilus ducreyi*. *Sexually Transmitted Diseases*, 1984, 11(1):6-9.
7. Lockett AE et al. Serum-free media for isolation of *Haemophilus ducreyi*. *The Lancet*, 1991, 338(8762):326.
8. Orle KA et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(1):49-54.

Capítulo 13

Donovanosis (granuloma inguinal)

13.1 Introducción

La donovanosis, también denominada granuloma inguinal, es una infección crónica que afecta a la piel, las mucosas y el sistema linfático de los genitales y la región perineal (1). La donovanosis se produce en una zona geográficamente limitada, como Brasil, el Caribe, India, Papua Nueva Guinea y el África meridional. Esta enfermedad, cuya infectividad es baja, se transmite entre los seres humanos principalmente por contacto sexual. El periodo de incubación puede ser prolongado, y oscila entre 1 y 12 semanas. La enfermedad comienza como un nódulo subcutáneo indurado que erosiona la superficie de la piel, formando una úlcera granulomatosa hipertrófica de tono rojo oscuro y con un borde bien definido. La lesión sangra fácilmente con el contacto. La úlcera evoluciona lentamente y se vuelve dolorosa si se produce una infección bacteriana secundaria; esta infección secundaria por otros microorganismos puede contribuir a los restos necróticos de la úlcera. En ocasiones se forman lesiones nuevas por autoinoculación, y los ganglios linfáticos inguinales pueden aumentar de tamaño debido a la infección secundaria (seudobubones). La donovanosis puede diseminarse por vía hematógena a los huesos, las articulaciones y el hígado; la difusión también puede dar lugar a lesiones cutáneas en zonas extragenitales. Las lesiones genitales y perianales en diversos estadios se asemejan a veces a las lesiones que se observan en otras enfermedades, como la sífilis, el chancro blando, los carcinomas y la amebiasis.

La donovanosis está causada por *Klebsiella* (anteriormente *Calymmatobacterium*) *granulomatis*, una bacteria gramnegativa (1,5 µm × 0,7 µm) que puede observarse en el interior de vacuolas en grandes células histiocíticas; este corpúsculo intravacuolar se conoce como “cuerpo de Donovan” (1, 2).

13.2 Aspectos generales del diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio depende de la visualización de los cuerpos de Donovan en frotis teñidos obtenidos de las lesiones clínicas o en cortes

histológicos teñidos procedentes de biopsias de tejidos. Este microorganismo solo puede cultivarse con dificultad en centros especializados que utilizan cultivos de monocitos y células Hep-2; todavía no puede cultivarse en medios artificiales. Se han publicado casos de realización de ensayos internos de amplificación de ácidos nucleicos, pero en la mayoría de los países estas pruebas no se pueden utilizar en el diagnóstico ordinario (3).

13.3 Recogida de muestras

Antes de obtener un frotis del material de la úlcera, se toma un hisopo con punta de algodón y se hace girar con los dedos, pasándolo suavemente por toda la lesión para eliminar los exudados debidos a la infección o los detritos, de manera que se reduzca al mínimo la hemorragia. Se toma un segundo hisopo y, girándolo con los dedos, se pasa por la base de la úlcera, comprobando que se hace un buen muestreo de los bordes de la úlcera, donde es más probable encontrar los cuerpos de Donovan. Luego se extiende por igual en un portaobjetos de cristal; el aire seca el portaobjetos antes de transportarlo al laboratorio. Cabe señalar que algunos profesionales prefieren utilizar pinzas para biopsia en sacabocados para obtener un pequeño trozo de tejido, que luego se presiona, se extiende en un portaobjetos de vidrio y se seca al aire. El frotis realizado mediante la técnica de aplastamiento facilita la interpretación microscópica y aumenta el valor diagnóstico.

13.4 Microscopia

Se ha descrito un método de Giemsa sencillo y rápido (1 minuto) (4). Con este método de tinción, el portaobjetos se sumerge cinco veces en un fijador, seis veces en una solución de eosina y seis veces en una mezcla de colorante tiazínico, y luego se enjuaga con tampón fosfato a pH 6,8. Se puede emplear una tinción de Giemsa al 10% o una tinción de Leishman con una dilución similar como alternativa después de fijar el material en el portaobjetos con metanol durante 2 a 3

minutos. Se cubre el portaobjetos durante 10 minutos con la tinción diluida (tinción de Leishman) o hasta 30 minutos (tinción de Giemsa), y luego se enjuaga el portaobjetos con un chorro de agua amortiguada o de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0-7,2). Después de esto, se deja que el portaobjetos se seque al aire y a continuación se examina en el microscopio óptico empleando la inmersión en aceite (aumento de 1000×). Los cuerpos de Donovan aparecen como cocobacilos dentro de grandes vacuolas (25-90 µm de diámetro) en el citoplasma de histiocitos grandes y ocasionalmente en células plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares. Los microorganismos aparecen con una coloración entre azul y violeta, y a menudo están rodeados por una cápsula prominente entre translúcida y de color rosa acidófilo (fig. 13.1). Las bacterias características se asemejan a imperdibles cerrados. A menudo se observa contaminación por otras bacterias. Aunque la microscopia de los frotis de las úlceras es la manera convencional de diagnosticar la donovanosis, los cuerpos de Donovan también se han identificado mediante la prueba de Papanicolaou que se emplea en el tamizaje ordinario del cáncer del cuello uterino mediante citología cervicovaginal (5).

13.5 Histopatología

El examen histológico de una muestra de biopsia puede ser útil para hacer el diagnóstico diferencial entre la donovanosis y otras infecciones. Una úlcera con un infiltrado inflamatorio mixto de células plasmáticas, neutrófilos e histiocitos, y ausencia evidente de linfocitos, indica una donovanosis. Con unas pinzas para biopsia en sacabocados se toma una porción de tejido (3-5 mm de grosor) del borde de la lesión, y se coloca en un frasco con solución salina y formaldehído como fijador. El diagnóstico se confirma si se evidencia la presencia de los cuerpos de Donovan mediante la técnica de impregnación con plata de Warthin-Starry (6). Se deben hacer cortes de 6 µm de muestras de biopsia incluidas en parafina. Después de desparafinar e hidratar con agua destilada, los cortes se fijan en un portaobjetos de vidrio con glicerol, se secan y se tratan con solución ácida de nitrato de plata a 43 °C durante 30 minutos. Se lava con agua caliente, se enjuaga con agua destilada, se deshidrata en etanol a 95% y se aclara con xileno.

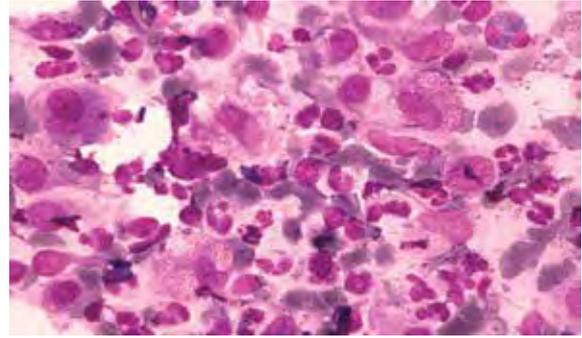


Figura 13.1
Frotis del material de una úlcera que contiene monocitos y cuerpos de Donovan (tinción de Giemsa; 1000×)

13.6 Cultivo

Tras un artículo de 1962 que describía el cultivo de *K. granulomatis* en las heces, se demostró posteriormente que era muy difícil cultivar el microorganismo a partir de muestras clínicas (7, 7). En 1997, dos grupos informaron de la multiplicación satisfactoria de *K. granulomatis* utilizando diferentes sistemas de cultivo: un sistema de cocultivo de monocitos y una técnica modificada de cultivo de clamidias (8, 9). Aparte de las técnicas que se presentan en estos dos artículos, no existe ninguna otra técnica de cultivo *in vitro* para el aislamiento de *K. granulomatis*. Sin embargo, este microorganismo puede cultivarse mediante la siembra de muestras clínicas en el saco vitelino de huevos de gallina embrionados de 5 días (10). El microorganismo es detectable al cabo de 72 horas de incubación.

13.7 Nucleic acid amplification

A research-based diagnostic polymerase chain reaction (PCR) has been developed, which targets the *phoE* gene and incorporates post-amplification *HaeIII* restriction enzyme-based digestion of amplicons (3). This method has been refined further into a colorimetric PCR test (11).

13.8 Serological tests

No serological assays are currently available to assist with diagnosis.

13.7 Amplificación de ácidos nucleicos

En laboratorios de investigación se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) diagnóstica, dirigida al gen *phoE* y que incorpora la digestión de amplicones con la enzima de restricción *HaeIII* posterior

a la amplificación (3). Este método se ha refinado más, dando lugar a una RCP colorimétrica (11).

13.8 Pruebas serológicas

Actualmente no se dispone de ningún ensayo serológico que ayude a realizar el diagnóstico.

13.9 Referencias

1. O'Farrell N. Donovanosis. *Sexually Transmitted Infections*, 2002, 78(6):452-457.
2. Carter JS et al. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(Pt4):1695-1700.
3. Carter JS et al. Diagnostic polymerase chain reaction for donovanosis. *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 28(5):1168-1169.
4. O'Farrell N et al. A rapid stain for the diagnosis of granuloma inguinale. *Genitourinary Medicine*, 1990, 66(3):200-201.
5. De Boer AL, De Boer F, Van der Merwe JV. Cytologic identification of Donovan bodies in granuloma inguinale. *Acta Cytologica*, 1984, 28(2):126-128.
6. Freinkel AL. Histological aspects of sexually transmitted genital lesions. *Histopathology*, 1987, 11(8):819-831.
7. Goldberg J. Studies on granuloma inguinale. V. Isolation of a bacterium resembling *Donovania granulomatis* from the faeces of a patient with granuloma inguinale. *British Journal of Venereal Diseases*, 1962, 38(2):99-102.
8. Kharsany AB et al. Growth and cultural characteristics of *Calymmatobacterium granulomatis* - the aetiological agent of granuloma inguinale (donovanosis). *Journal of Medical Microbiology*, 1997, 46(7):579-585.
9. Carter J et al. Culture of the causative organism for donovanosis (*Calymmatobacterium granulomatis*) in HEP-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(11):2915-2917.
10. Anderson K, Demonbreun WA, Goodpasture EW. An etiologic consideration of *Donovania granulomatis* cultivated from granuloma inguinale (three cases) in embryonic yolk. *Journal of Experimental Medicine*, 1945, 81(1):25-39.
11. Carter JS, Kemp DJ. A colorimetric detection system for *Calymmatobacterium granulomatis*. *Sexually Transmitted Infections*, 2000, 76(2):134-136.

Capítulo 14

Infecciones por los virus de los papilomas humanos

14.1 Virus de los papilomas humanos

Los virus de los papilomas humanos (VPH) son virus pequeños (~55 nm de diámetro), icosaédricos, sin envoltura conformados por un genoma circular y superhélice de doble hebra de DNA de aproximadamente 8 kilobases (fig. 14.1). Estos virus infectan habitualmente la piel y las superficies mucosas de los seres humanos (7). A diferencia de la mayoría de los virus humanos, los papilomavirus no se pueden propagar *in vitro* en el medio de cultivo habitual y, por consiguiente, no permiten una clasificación antigénica clásica por serotipificación. En su lugar, estos virus se identifican mediante una estrategia de genotipificación. Los VPH individuales se denominan tipos o genotipos, se diferencian por su secuencia genómica y se numeran en el orden de su descubrimiento. El gen L1 que codifica el componente principal de la cápside viral (fig. 14.2) es la región más conservada en todos los tipos del virus y se usa en taxonomía en la construcción de los árboles filogénicos (fig. 14.3) (2). Los VPH cuya secuencia de L1 presenta una divergencia de 2% a 10% se conocen como subtipos y los que poseen una divergencia de menos de 2% son las variantes. El término “género” se aplica a los conglomerados de mayor orden y se denominan siguiendo el abecedario griego y, dentro del género, los



Figura 14.1
Microscopía electrónica de VPH natural donde se aprecian las partículas virales en algunas células de una preparación de frotis de Papanicolaou
Fuente: Por cortesía de Colin Laverty, Sídney, Nueva Gales del Sur (Australia), 1978.

conglomerados pequeños se denominan especies y se les asigna un número. Por ejemplo, el género de los papilomavirus contiene las especies 9 y 7 que incluyen respectivamente las dos causas más frecuentes del cáncer cervicouterino, el VPH de genotipo 16 y 18 (2).

Existen más de 200 tipos diferentes, de los cuales 100 se han secuenciado integralmente y 40 se sabe que infectan específicamente la mucosa genitoanal de los seres humanos (VPH mucosótrofo).

Los tipos de VPH que se detectan con frecuencia en la zona genitoanal se subdividen en VPH de bajo riesgo y VPH de alto riesgo, con base en el riesgo relativo de aparición de una complicación infrecuente, que es la neoplasia maligna (3). Los tipos de VPH de bajo riesgo se suelen encontrar en las lesiones intraepiteliales de grado bajo (lesiones que no son precancerosas) y en las verrugas genitanales. Los VPH de tipos 6 y 11 causan cerca de 90% de las verrugas genitales (4, 5). Los VPH de alto riesgo se encuentran en las lesiones de bajo grado y alto grado, y también en los cánceres de cuello uterino y de otras localizaciones genitanales (vulva, vagina, ano) (6). En conjunto, el VPH 16 y el 18 se

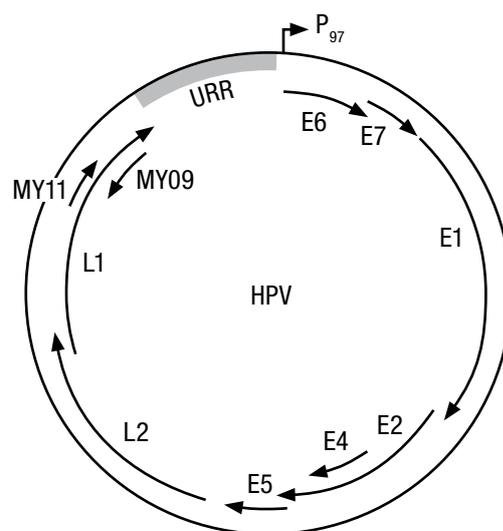


Figura 14.2
Organización génica del VPH (48)
Región reguladora hacia la región 5'.
Fuente: Reimpreso con autorización de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

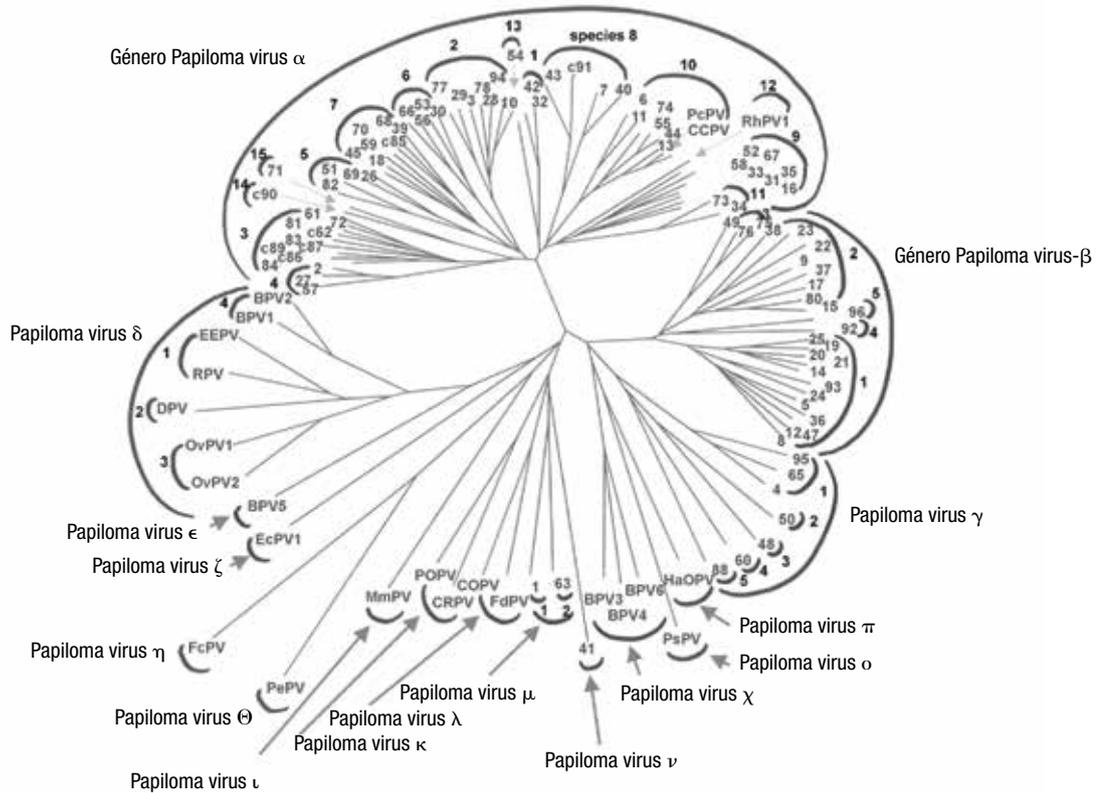


Figura 14.3
Árbol filogenético que contiene las secuencias de L1 de 118 tipos de papilomavirus (2)
 Fuente: Reimpreso con autorización de *Virology*.

encuentran de manera constante en cerca de 70% de todos los casos de cáncer cervicouterino en el mundo (7-11). Aparte de los cánceres de la esfera genitoanal, los VPH oncógenos, sobre todo del tipo 16, desempeñan un papel causal en algunos cánceres bucofaringeos, en especial en los cánceres de la amígdala (12, 13).

14.2 Evolución natural de la infección genital por el VPH

La mayoría de las infecciones genitales por el VPH se adquiere por vía sexual, es transitoria y regresa lentamente como consecuencia de la respuesta del sistema inmunitario del huésped (14). Con menor frecuencia, en cerca de 5% a 10% de los casos, las infecciones por VPH se vuelven persistentes. El VPH de alto riesgo persistente es un marcador indicativo de la probabilidad de aparición de afecciones precancerosas; cuando estas lesiones no se tratan comportan el riesgo de progresión hacia el cáncer con el transcurso de los años (15, 16). Los cofactores reconocidos que favorecen la aparición de la infección persistente y el cáncer cervicouterino son el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales a largo plazo, la multiparidad,

la edad temprana del primer parto y los estados que provocan inmunodepresión como la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (17). No se ha definido aun si existen factores específicos del huésped u otros factores ambientales que determinen las lesiones destinadas a evolucionar hacia lesiones precancerosas o neoplasias (18).

En general, la transmisión del VPH genital ocurre fácilmente por contacto sexual directo con una persona infectada y se calcula que da lugar a tasas de infección vitalicia del VPH hasta de 60% a 80% (piel genital con piel genital) (19, 20). La mediana de la edad de la primera relación sexual en muchos países occidentales como Australia, el Reino Unido y los Estados Unidos es 16 años (19, 21). Por consiguiente, las tasas más altas de infecciones por VPH recién contraídas se observan en las mujeres jóvenes, con un valor máximo a una edad poco después del comienzo de la actividad sexual; se calcula que hasta 75% de las infecciones por VPH ocurren en las mujeres de 15 a 24 años de edad. Según datos recientes, muchas infecciones nuevas en las mujeres jóvenes sin contacto previo con el VPH consisten en infecciones múltiples (se detectan múltiples tipos del VPH) (22).

Se cuenta con menos información acerca de la evolución natural de la infección por el VPH en los hombres. De nuevo, la infección es muy frecuente (piel peneana, genital o anal) y ocurre poco después del inicio de la vida sexual activa, con tasas rápidas de adquisición del virus y de regresión (23, 24). Además, el comportamiento sexual con un mayor número de compañeros sexuales aumenta el riesgo y la circuncisión ejerce un efecto protector (24).

14.3 Características inmunológicas de la infección por el VPH

En la respuesta inmunitaria del huésped al VPH participa el compartimento humoral y la inmunidad mediada por células. A continuación de las infecciones naturales, la respuesta humoral de producción de anticuerpos es específica del tipo y se detecta por primera vez entre 6 meses y 18 meses después de la infección (14). La respuesta es débil y solo alrededor de 50% a 60% de las personas que presentan una respuesta positiva al DNA del VPH generan una respuesta de anticuerpos cuantificable (14). Después de la infección natural, la persona puede seguir teniendo resultados positivos al DNA del VPH a pesar de haber desarrollado anticuerpos específicos; estas personas no están protegidas contra la enfermedad por este tipo de VPH en el futuro. La regresión de la infección por el VPH y la resolución de las lesiones clínicas como las verrugas genitales se caracterizan por una respuesta inmunitaria eficaz mediada por células (25).

La serología del VPH no se usa como medio diagnóstico. La serovigilancia es útil con el fin de calcular la edad y la prevalencia de la exposición en una población en situaciones previas a la vacunación. El examen serológico pos vacunación se usa como una medida de eficacia de la vacuna. La protección consiste en la presencia de anticuerpos neutralizantes detectables, aunque no se comprende a cabalidad el mecanismo real de protección. Los estudios en modelos animales con papilomavirus específicos del huésped ponen en evidencia anticuerpos neutralizantes de la infección primaria que son protectores, incluso después de una nueva exposición al virus respectivo (26). Es digno de mención que aunque se ha documentado en los ensayos humanos una durabilidad de los anticuerpos inducidos por la vacuna más allá de 8 años, no se ha definido aun un correlato inmunitario de la protección (27).

14.4 Manifestaciones de la enfermedad

Verrugas genitoanales

Las verrugas genitoanales, que se conocen también como condiloma acuminado, consisten en tumores benignos exofíticos, papulares o planos que pueden ocurrir en cualquier lugar de la zona genitoanal. Son extremadamente frecuentes sobre todo en los jóvenes que comienzan su actividad sexual y el diagnóstico es en gran medida clínico. En raras ocasiones las lesiones pueden provocar trastornos por causa del tamaño o por obstrucción, pero los principales problemas son cosméticos y psicosociales. Las lesiones tienden a reaparecer después del tratamiento. Los VPH de tipos 6 y 11 causan la mayoría de las verrugas genitoanales (85% a 90%) (5).

Papilomatosis respiratoria recurrente

La papilomatosis respiratoria recurrente es una afección muy rara que se caracteriza por tumores recurrentes semejantes a verrugas (papilomas) en las vías respiratorias superiores, pero se pueden localizar en las vías respiratorias inferiores y ocasionar morbilidad y mortalidad considerables. Los VPH de tipos de 6 y 11 causan gran parte de estas lesiones. La localización más frecuente es la laringe y provoca cambios de la voz. En los niños pequeños, puede ocurrir obstrucción de las vías respiratorias. El diagnóstico se establece por criterios clínicos, con la observación de las lesiones verrugosas características mediante laringoscopia o broncoscopia. Las lesiones son benignas, pero reaparecen con frecuencia después del tratamiento. Existen dos modos de presentación: la forma de aparición juvenil en los niños (la media de la edad es 2 años) y la forma de aparición tardía que se observa en los adultos (28).

Afecciones precancerosas y los carcinomas genitoanales

La infección persistente por los genotipos oncógenos o los VPH de alto riesgo se ha asociado de manera estrecha con un mayor riesgo de cáncer genitoanal. Este aspecto se ha estudiado mejor en el cuello uterino, donde se definieron por primera vez los criterios de detección citológica e histológica de las afecciones precancerosas lentamente progresivas. La nomenclatura ha cambiado a lo largo de los años y continúa evolucionando. Las lesiones precursoras de cáncer se

Cuadro 14.1: Cáncer atribuible al VPH en el 2002

Localización	Atribuible al VPH (%)	De los cuales son positivos al VPH 16 o 18 (%)	Ambos sexos				
			Total de los cánceres	Atribuible al VPH	% todos los cánceres	Atribuible al VPH 16 o 18	% todos los cánceres
Cuello uterino	100	70	492 800	492 800	4,54	344 900	3,18
Pene	40	63	26 300	10 500	0,10	6 600	0,06
Vulva y vagina	40	80	40 000	16 000	0,15	12 800	0,12
Ano	90	92	30 400	27 300	0,25	25 100	0,23
Boca	3	95	274 300	8 200	0,08	7 800	0,07
Oro-pharynx	12	89	52 100	6 200	0,06	5 500	0,05
Todas las localizaciones			10 862 500	561 100	5,17	402 900	3,71

Fuente: Adaptado de Parkin DM. The global burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 2006, 118:3030-3044.

han denominado displasias (leve, moderada y grave) o neoplasias intraepiteliales cervicouterinas (NIC1, 2 y 3) y, últimamente, se denominan lesiones escamosas intraepiteliales de alto (LIAG) o de bajo grado (LIBG) (29). La terminología en otras localizaciones anatómicas sigue el mismo modelo: anal (NIA), vulvar (NIV), vaginal (NIVA), peneana (NIP). En cada caso, las lesiones precursoras (de alto grado o de grado 3) son asintomáticas, progresan lentamente y se diagnostican mediante el examen histológico. Solo se recomienda la detección sistemática de las lesiones cervicouterinas, pero se están evaluando métodos de detección de las lesiones anales (30). En la actualidad, solo se recomienda el tratamiento de las lesiones precursoras (de alto grado).

Existen datos fidedignos de laboratorio y epidemiológicos sólidos que vinculan el VPH al cáncer cervicouterino, y los VPH de alto riesgo y persistentes se consideran un factor causal necesario, pero no suficiente del cáncer cervicouterino. Cuando no existe infección por el VPH, el cáncer cervicouterino es extremadamente improbable; este vínculo estrecho es la razón por la cual la vacuna tiene como objeto evitar las infecciones más frecuentes por VPH oncógenos, a fin prevenir el cáncer y también es la razón por la cual el examen del VPH puede contribuir al tamizaje del cáncer cervicouterino. Las vacunas existentes contra el VPH se dirigen contra los VPH de alto riesgo de tipos 16 y 18, los cuales explican el 70% de casos de cáncer cervicouterino en el mundo (7-11). Los datos epidemiológicos con respecto a otros carcinomas que se asocian con el VPH son menos definitivos, pero se atribuyen también al virus carcinomas de otras

localizaciones genitoanales y de la orofaringe (la base de la lengua y las amígdalas), con lo cual genera una carga de morbilidad considerable (cuadro 14.1).

La proporción de carcinomas que presentan el VPH difiere con cada localización y el VPH 16 predomina especialmente en los carcinomas diferentes del cáncer cervicouterino.

14.5 Procedimientos de detección del VPH en el laboratorio

Las pruebas del VPH se basan en técnicas moleculares. Como se señaló anteriormente, esto se debe a la imposibilidad de cultivar este virus mediante los métodos clásicos y a la sensibilidad relativamente baja de la serología. Las técnicas de las pruebas que se utilizan con fines de vigilancia epidemiológica son diferentes de las usadas en las aplicaciones clínicas. Los métodos epidemiológicos requieren pruebas específicas del tipo con alta sensibilidad analítica. Dado que las evaluaciones clínicas usan la presencia del VPH como un marcador de enfermedades subyacentes, sus resultados se asimilan a los criterios de valoración en los estudios de enfermedades. No existe ningún tratamiento contra el VPH en sí mismo; los tratamientos se dirigen contra las lesiones precursoras del cáncer que se asocian con el VPH o contra otras lesiones relacionadas con este virus. Se cuenta con una amplia variedad de pruebas diagnósticas del VPH comerciales y desarrolladas internamente por los laboratorios. La aplicación de estas pruebas en los entornos clínicos exige que los laboratorios practiquen pruebas que han sido validadas



Figura 14.4

Citología vaginal de células normales exfoliadas que presentan coilocitosis, característica pero no patognomónica de infección por el VPH, atipias escamosas de significado indeterminado, LIE de bajo grado y cambios celulares de LIE de alto grado.

por los organismos reguladores con indicaciones clínicas específicas o que los laboratorios emprendan la validación del desempeño clínico de las pruebas. Al considerar que las lesiones precursoras de cáncer se asocian solo con el VPH de alto riesgo, no hay ninguna indicación clínica de practicar pruebas dirigidas al VPH de bajo riesgo. Existe cierta variación con respecto a los tipos de VPH de alto riesgo con significación clínica, pero la mayoría de las pruebas incluyen (o presentan reacción cruzada) con los siguientes 14 tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

14.6 Aplicación clínica de las pruebas de detección del VPH

Las aplicaciones clínicas de las pruebas de detección del VPH incluyen las siguientes situaciones:

- El tamizaje primario solo o asociado con la citología cervical (fig. 14.4) en las mujeres a partir de los 30 años de edad. Los estudios longitudinales revelan que la prueba del DNA del VPH tiene una mayor sensibilidad en el pronóstico de la displasia prevalente o que puede evolucionar más tarde hacia displasia de alto grado. Además, el valor pronóstico de un resultado negativo es extremadamente alto y superior al de la citología. Por consiguiente, se propone que en las personas con un resultado negativo al DNA del VPH en dos ocasiones, se prolongue el intervalo de la detección sistemática. Esta observación hace que la asociación del frotis de Papanicolaou y la prueba del DNA del VPH sea una estrategia costoeficaz (31-36).

- La selección de las mujeres con anomalías mínimas en la citología (no concluyentes, dudosas o límites), con el fin de discriminar los cambios que se relacionan verdaderamente con el VPH y precisan seguimiento (37).
- El tratamiento posresección de las displasias de alto grado y la vigilancia de las mujeres en busca de signos de enfermedad persistente o recurrente y como una prueba de curación (32, 38).

En este momento se está evaluando el uso del VPH como medio primario de detección del cáncer cervicouterino (39). En la actualidad, si bien la prueba del VPH constituye un excelente factor pronóstico negativo de la enfermedad, el examen carece de la especificidad exigida con fines de tratamiento directo. La citología cervical es una opción para una segunda prueba. Otras pruebas moleculares están en curso de evaluación, como el factor p16INK4a del huésped (p16), que es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina.

Una alta concentración de p16 está en favor de la supresión del control por retroalimentación negativa que ejerce el gen pRB del retinoblastoma. Cuando las proteínas oncogénicas E7 del VPH se fijan al pRB, se sobreexpresa el gen p16 y aumenta el p16, lo cual corresponde a una expresión activa de los oncogenes del VPH (40) (fig. 14.5). Además, la sobreexpresión de p16, aunada a una mayor expresión de otros factores del huésped como el Ki67, se correlaciona bien con las infecciones virales que inducen transformaciones malignas (fig. 14.6) (41).

14.7 Métodos de detección del DNA del VPH

Los métodos clásicos de detección del DNA del VPH fueron las pruebas directas de hibridación como la inmunotransferencia por puntos y la transferencia de Southern. Estas técnicas exigen mano de obra intensa, son lentas, presentan una baja sensibilidad y requieren grandes cantidades de DNA en las muestras clínicas. Las aplicaciones clínicas actuales consisten en pruebas muy bien normalizadas que simplifican la manipulación de las muestras, cuyo método se basa en alguna forma de amplificación. En el cuadro 14.2 se enumeran las pruebas autorizadas actualmente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

La prueba de captura de híbridos (HC2), elaborada por Digene (Qiagen), se utilizaba ampliamente en los primeros estudios y fue la primera prueba autorizada por la FDA. La prueba HC2 consiste en un ensayo semicuantitativo que ofrece muy buena comparabilidad entre los laboratorios y un alto valor pronóstico de un resultado negativo con respecto a las NIC2 y 3 (42).

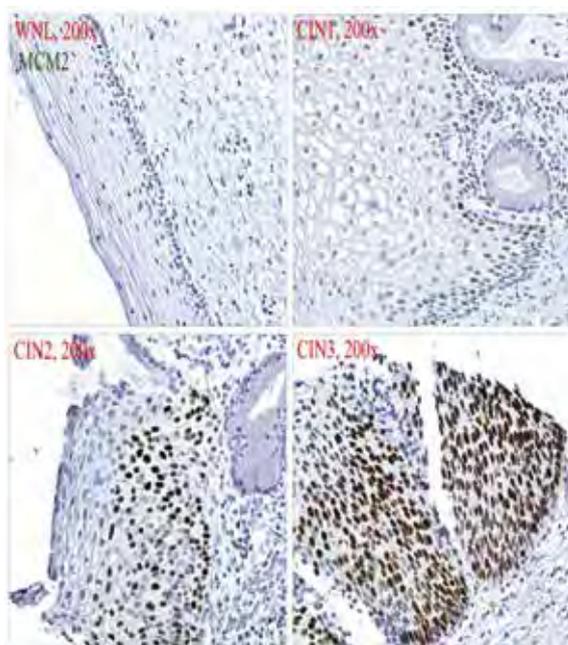


Figura 14.5
El p16 no se expresa en los tejidos normales, pero se expresa en forma progresiva con la evolución de las NIC1 hacia NIC3.

Fuente: Reimpreso con autorización de Magnus von Knebel Doeberitz, Departamento de Biología Tumoral Aplicada, del Instituto de Anatomía Patológica, Universidad de Heidelberg, Heidelberg (Alemania).

Además, existe una versión de la técnica apropiada para los entornos de escasos recursos, que exige un mínimo de equipo y capacitación, y se practica como una prueba rápida (43).

Aunque durante mucho tiempo se utilizó solo en investigación, esta prueba inmediata del VPH está hoy al alcance en la práctica clínica. En un estudio de gran escala realizado en la China la sensibilidad de la prueba en las NIC2+ fue 90% y no se observó una diferencia significativa al compararla con la prueba HC2; en consecuencia, esta técnica representa un método promisorio de detección primaria en la prevención del cáncer cervicouterino en las regiones con escasos recursos (43).

Los resultados de las pruebas no diferencian los genotipos de alto riesgo que están presentes, pero el informe indica la presencia de uno o varios tipos incluidos en la prueba. Recientemente, en una evaluación de diversas pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) destinadas al tamizaje primario y la detección precoz de las lesiones de alto grado, se comunicó una alta sensibilidad cercana a 96% con la amplificación de secuencias selectivas, en el diagnóstico de NIC2+ subyacentes (34, 44). Por ejemplo, la prueba del VPH COBAS 4800 autorizada hace poco por la FDA, que comporta una preparación automatizada de las muestras, aunada a la tecnología de RCP en tiempo real y detecta el VPH de tipo 14 de alto riesgo en un tubo único, aventajó la prueba de captura de híbridos, pues su sensibilidad y especificidad clínica demostraron ausencia de inferioridad frente a la prueba HC2 (44). De manera análoga, según los resultados finales de un ensayo poblacional comparativo y aleatorizado (POBASCAM por la sigla en inglés de *Population-Based Screening Amsterdam*) publicados recientemente, una RCP dirigida a L1 (GP5+/6+) facilitó la detección más temprana de NIC2 o más graves, con importancia clínica, con lo cual se respalda el uso de las pruebas de DNA en todas las mujeres a partir de los 29 años de edad (34). Las pruebas de RCP con cebadores generales dirigidos a la región consensual de L1 en el genoma del virus se denominan pruebas RCP de consenso L1. Cada prueba usa diferentes cebadores: MY09 y MY11, reemplazados luego por PGMY09 y PGMY11, cuyo resultado es un amplicón de 450 pb (45); otros pares de cebadores descritos son GP5+ y GP6+ que producen un amplicón de cerca de 160 pb (46) y el SPF10 que genera un amplicón corto de 65 pb (47). El sistema PGMY09 y PGMY11 se comercializa como prueba de genotipado del VPH en matriz lineal

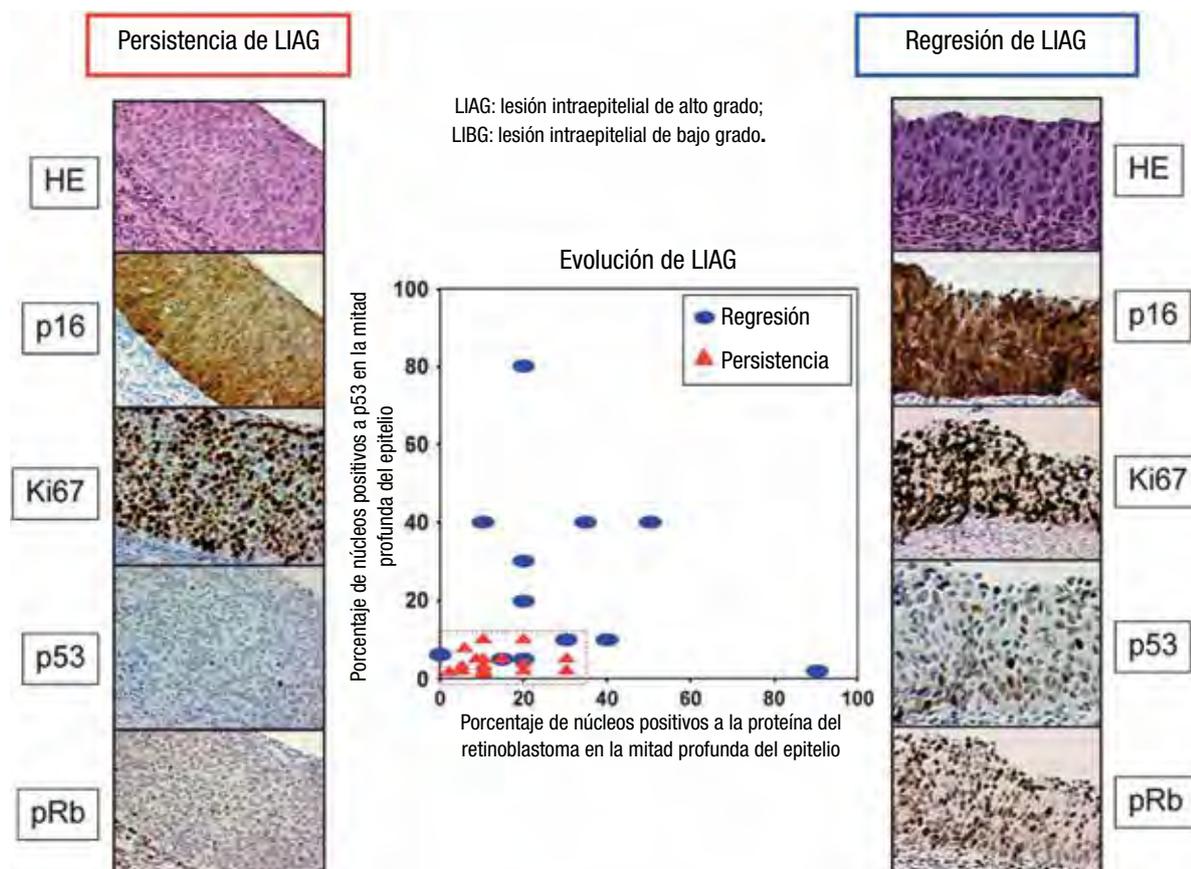


Figura 14.6
Diversos marcadores de riesgo de padecer LIAG, provenientes del huésped y del virus. Centro: Gráfico de dispersión de la detección de la proteína del retinoblastoma (pRb) y del p53 en la mitad inferior del epitelio de LIAG que persisten (triángulos rojos) o que regresan (círculos abiertos azules) durante el seguimiento. Izquierda: LIAG persistente. Derecha: LIBG en regresión (41).

Fuente: Reimpreso con autorización del *American Journal of Surgical Pathology*.

Cuadro 14.2: Pruebas del VPH autorizadas por la FDA

Prueba	Fabricante	Método	Tipos (diana)
Captura de híbridos (HC2)	Qiagen (Valencia, CA, EUA.)	Amplificación de señal	Tipo 13 de alto riesgo (DNA genómico)
Cervista VPH de alto riesgo	Hologic (Bedford, MA, EUA.)	Amplificación con sonda (Invader Technology)	Tipo 14 de alto riesgo (DNA patentado)
Cervista VPH 16 y 18			VPH de tipos 16 y 18
APTIMA VPH	GenProbe (San Diego, CA, EUA.)	Amplificación de secuencia selectiva (amplificación mediada por transcripción)	Tipo 14 de alto riesgo (RNA de E6 y E7)
Cobas VPH	Roche (Pleasanton, CA, EUA.)	Amplificación de secuencia selectiva (RCP)	Tipo 14 de alto riesgo (DNA de L1)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos; VPH: virus de los papilomas humanos; RCP: reacción en cadena de la polimerasa.

(*Lineal Array*, Roche); el sistema de SPF se conoce como el genotipado del VPH INNO-LiPA HPV v2 (Innogenetics); los sistemas GP5+ y GP6+ se aplican en la prueba de genotipado del VPH RUO LQ (Qiagen) o el estuche de genotipado múltiple del VPH, Multiplex HPV (Multimetrix, Heidelberg). Con los tejidos incluidos en parafina, sobre todo las biopsias de archivo, se prefieren las pruebas que detectan amplicones cortos con cebadores SPF, en caso de que el DNA esté degradado.

A fin de obtener información más detallada sobre cada una de las pruebas, se remite el lector al manual sobre el VPH de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el cual se exponen de manera pormenorizada todos los procedimientos, incluida la descripción de los cebadores, los testigos apropiados, los medios de prevención de la contaminación, la interpretación de datos, etc. (48).

Pruebas de mRNA del VPH

Además de las pruebas basadas en el DNA, existen otros sistemas que detectan la expresión del RNA mensajero (mRNA) de los oncogenes E6 y E7 (49, 50).

En los apartados a continuación se analizan los principios de estas pruebas moleculares (51).

Etapa preanalítica

Es primordial contar con muestras clínicas adecuadas y prepararlas de manera óptima a fin de obtener un resultado exacto. Las pruebas idóneas para la detección del VPH incluyen los hisopos, los raspados y las biopsias. Una manipulación apropiada de los hisopos exige su transporte en forma seca o en un medio de transporte de virus, pero los raspados y las biopsias se deben recoger en medio de transporte de virus. La muestra puede estar a temperatura ambiente durante el transporte hasta un lapso de 24 horas o a 4 °C hasta 4 días. Las pruebas autorizadas por la FDA especifican los métodos de obtención y almacenamiento de las muestras, y los resultados no se consideran válidos cuando no se respetan estas condiciones.

Etapa analítica

Después de la toma de las muestras, se debe practicar la extracción o la liberación del ácido nucleico de las muestras. Las pruebas autorizadas por la FDA definen los métodos de procesamiento o extracción que precisa cada una. Los resultados no se consideran válidos cuando la extracción o el procesamiento no cumplen

con estas recomendaciones. El uso de las pruebas comerciales no exime a los laboratorios de la necesidad de ejecutar métodos cuidadosos de garantía de la calidad y de control de calidad. La incorporación de líneas celulares como testigo positivo y negativo en la prueba contribuye a la supervisión de los resultados. Es primordial procesar soluciones blanco, compuestas por agua en todas las etapas de la prueba a fin de vigilar la obtención de resultados positivos falsos que pueden ocurrir por una contaminación cruzada de las muestras.

Algunas pruebas incluyen una secuencia diana endógena de las células del huésped, como la a globina, con el objeto de confirmar la presencia de DNA apto para la amplificación. Las muestras que dan resultados negativos con la secuencia endógena y con el VPH no se pueden interpretar. Las pruebas autorizadas en la práctica clínica comportan pautas de supervisión y notificación. También es posible utilizar como medio de diagnóstico corriente las pruebas desarrolladas internamente y bien verificadas en el laboratorio. Cuando se cuenta con una prueba comercial autorizada, las autoridades de certificación recomiendan su uso. Una de las ventajas de usar las pruebas comerciales es que estos sistemas suelen incluir reactivos de calidad controlada, además de los testigos apropiados.

Garantía de la calidad del laboratorio

Se debe cumplir con las prácticas microbiológicas óptimas, incluidos los testigos positivos y negativos idóneos. La participación en las baterías de pruebas de competencia y en los programas de garantía de la calidad es primordial con el fin de determinar el desempeño de la prueba y se debe hacer todo lo posible por tomar parte en estos programas con cada analito.

Pruebas con fines epidemiológicos y de investigación

En los estudios epidemiológicos y de investigación se usan numerosas pruebas comerciales y de desarrollo interno de los laboratorios. Las pruebas exhiben diferencias en sus características de desempeño como lo destacan los estudios de competencia sobre la tipificación del VPH a escala mundial (52). En el cuadro 14.3 se presentan ejemplos de las pruebas comerciales existentes que se basan en el DNA o el mRNA. Es preciso incitar a los laboratorios que procuran datos sobre la vigilancia de la respuesta a la vacunación a que sigan las pautas del manual de laboratorio sobre el

Cuadro 14.3: Diversas pruebas del VPH disponibles, con el nombre, la diana y el cebador

Tipo de prueba del VPH	Región selectiva del VPH (cebador)
Todas las pruebas	L1/E1/E6/E7
Matriz lineal (Roche)	L1 (PGMY)
PGMY-RBH	L1 (PGMY)
InnoLiPA (Innogenetics)	L1 (SPF10)
CLART (Genómica)	L1 (PGMY)
Matriz de DNA (Biocore)	L1
Micromatriz (Genetel)	L1
Pruebas DEIA LiPA	L1 (SPF10)
Micromatriz (Papillocheck)	E1
RCP específica de tipos (GenoID)	L1
RCP interna Luminex	L1 (PGMY-GP)
RCP Luminex (Multimetrix)	L1 (GP)
RCP + enzimoimmunoanálisis de (GenoID)	L1
RCP de tiempo real VPH de alto riesgo de Abbott	L1
Prueba del VPH Amplicor	L1
Gen-Sonda APTIMA (TMA)	E6/E7
NucliSENS EasyQ HPV	E6/E7

VPH de la OMS (véase la sección 14. 8 sobre la red de laboratorios del VPH).

14.8 Creación de una red de laboratorios del VPH de la OMS

La OMS convocó a un grupo de expertos que se reunió en Ginebra en agosto del 2005 y recomendó la creación de una red mundial de laboratorios del VPH (LabNet del VPH), con el objeto de contribuir a mejorar la calidad de los servicios de laboratorio, de manera que practiquen una vigilancia eficaz, supervisen las repercusiones de la vacunación contra el VPH y ofrezcan capacitación (53-55).

Se supuso que la LabNet del VPH aceleraría la introducción de las vacunas contra este virus al facilitar la ejecución de procedimientos de laboratorio validados

y normalizados; desarrollar sistemas de control de la calidad y pruebas de competencia; capacitar al personal; y poner en servicio una red de vigilancia. Esta red de la OMS se financió mediante una subvención de la Fundación Gates y estuvo en funcionamiento bajo el auspicio de la OMS del 2006 al 2010. Durante estos cuatro años de operación, la red se dedicó a actividades básicas de preparación de las normas internacionales sobre las pruebas de DNA y los exámenes serológicos del VPH, normalización de las pruebas y elaboración de un manual de laboratorio y un programa de capacitación, con hincapié en la garantía de la calidad y el control de calidad. La red colaboró con el Instituto Nacional de Patrones Biológicos e Inspección de Sustancias Biológicas (NIBSC) en la formulación de las referencias internacionales del DNA de los tipos 16 y 18 del VPH y los anticuerpos del tipo 16, que se encuentran disponibles en el catálogo del NIBSC. El manual de laboratorio de la OMS sobre el VPH se publicó en el 2009 y se fundamenta en los conocimientos y las experiencias adquiridas por conducto de los estudios internacionales en colaboración; el manual se puede obtener en la OMS (55). La obra tiene por objeto ayudar a establecer el apoyo de laboratorio necesario durante la ejecución y la vigilancia de los programas de vacunación contra el VPH y se ocupa de las pruebas epidemiológicas, pero no de las pruebas de carácter clínico. Los laboratorios miembros de la red continúan operando como grupo con el fin de mantener una red de expertos que vele por la aplicación óptima de las pruebas del VPH, al convocar cada año la Conferencia Internacional sobre Papilomavirus.

Marcadores de progresión

No todas las lesiones de las mujeres portadoras del VPH de alto riesgo persistente evolucionan hasta el cáncer cervicouterino cuando no reciben tratamiento y, de hecho, tampoco todas las NIC3; por esta razón se están investigando otros marcadores que permitan pronosticar la progresión, como el p16. Estos marcadores de progresión, aunados a la detección del VPH de alto riesgo ofrecen muy buenas perspectivas de un diagnóstico más exacto de la displasia de alto grado (40, 41).

14.9 Conclusiones

La información sobre el VPH y las enfermedades afines se ha incrementado de manera extraordinaria, incluidas las numerosas técnicas nuevas de detección del virus. Es importante utilizar las pruebas apropiadas, ya sea en

Puntos clave:

- Los VPH oncógenos son la causa necesaria de la mayor parte de carcinomas cervicouterinos y de cierta proporción de otras neoplasias malignas genitoanales, incluidos algunos tumores malignos bucofaríngeos. Los VPH genitales son extremadamente frecuentes, pues cerca de 80% de la población que ejerce una vida sexual activa contrae la infección en algún momento de su vida.
- La infección por el VPH oncógeno persistente es un prerrequisito a la aparición de las lesiones precursoras y el desarrollo posterior de neoplasias malignas.
- El cáncer constituye un desenlace raro de esta infección genital muy frecuente.
- Los tipos 16 y 18 del VPH causan de manera constante 70% de casos de cáncer cervicouterino en el mundo.
- La lesión precursora del cáncer cervicouterino es la NIC3, y los VPH de tipo 16 y 18 causan alrededor de 50% de estas lesiones.
- La detección del VPH se basa en técnicas moleculares, pues su cultivo no es fácil por los métodos convencionales de diagnóstico de las infecciones virales y la serología ofrece una sensibilidad insuficiente. El tamizaje primario del VPH se está incorporando a la detección del cáncer cervicouterino, asociado de diversas maneras con la citología cervicouterina tradicional (frotis de Papanicolaou).
- Las pruebas que se utilizan en la práctica clínica con el fin de detectar las NIC3 o el cáncer son diferentes a las pruebas que se aplican en el campo epidemiológico, como los estudios de vigilancia anteriores a la introducción de los programas de vacunación y posteriores a la misma. No existen en la actualidad indicaciones clínicas para practicar la prueba del VPH de bajo grado. Las pruebas clínicas requieren una cuidadosa normalización en materia de obtención y procesamiento de las muestras, y de ejecución de la prueba, en correlación con los criterios clínicos de valoración (diferentes de los criterios analíticos).
- Es importante que exista una garantía y un control de la calidad muy eficientes en materia de detección del VPH. La red de laboratorios del VPH de la OMS, en colaboración con el NIBSC, ha elaborado las referencias internacionales del DNA del VPH de tipo 16 y 18, y de los anticuerpos del VPH de tipo 16.
- En las pruebas de detección del VPH, la obtención cuidadosa y el transporte apropiado de las muestras clínicas al laboratorio, además de su manipulación adecuada en el laboratorio, son factores primordiales a fin de evitar la contaminación y los resultados positivos falsos.
- La detección del DNA del VPH representa un excelente factor de predicción negativa (cuando no se detecta el VPH de alto riesgo, la enfermedad es improbable), pero existen muchos resultados positivos falsos en la predicción de la enfermedad. Las investigaciones en curso examinan la utilidad de algunos marcadores de progresión, a fin de mejorar la especificidad de los desenlaces con importante significación clínica.
- Con programas sanitarios de vacunación contra el VPH adecuados se disminuirá el valor pronóstico positivo de la citología en la detección de la displasia de grado alto y es probable que en el futuro se utilicen más, algunos métodos moleculares de detección del virus.

las aplicaciones clínicas o con fines epidemiológicos. Además, con miras a velar por la mejor calidad de los resultados, los laboratorios que realizan estas pruebas deben cumplir con las prácticas óptimas de garantía y control de la calidad.

14.10 Referencias

1. Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2003, 127(8):935-939.
2. de Villiers EM et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324(1):17-27.
3. Schiffman M et al. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, 2009, 4:1-8.
4. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *Journal of General Virology*, 1992, 73(10):2653-2660.

5. Garland SM et al. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199(6):805-814.
6. Grulich AE et al. Cancers attributable to human papillomavirus infection. *Sexual Health*, 2010, 7(3):244-252.
7. Bosch FX et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 1995, 87(11):796-802.
8. Clifford GM et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 2003, 88(1):63-73.
9. Muñoz N et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348(6):518-527.
10. Wallboomers JM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 1999, 189(1):12-19.
11. de Sanjose S et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncology*, 2010, 11(11):1048-1056.
12. D'Souza G et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2007, 356(19):1944-1956.
13. Hong AM et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine*, 2010, 28(19):3269-3272.
14. Carter JJ et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(6):1911-1919.
15. Wallin KL et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341(22):1633-1638.
16. McCredie MR et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncology*, 2008, 9(5):425-434.
17. Muñoz N et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006, 24(Suppl 3):S1-10.
18. Moore EE et al. The roles of genetic and environmental factors on risk of cervical cancer: a review of classical twin studies. *Twin Research and Human Genetics*, 2012, 15(1):79-86.
19. Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(5):624-629.
20. Garland SM et al. Human papillomavirus prevalence among indigenous and non-indigenous Australian women prior to a national HPV vaccination program. *BMC Medicine*, 2011, 9:104.
21. Rissel CE et al. Sex in Australia: first experiences of vaginal intercourse and oral sex among a representative sample of adults. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 2003, 27(2):131-137.
22. Nielsen A et al. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sexually Transmitted Diseases*, 2008, 35(3):276-282.
23. Giuliano AR et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2008, 17(8):2036-2043.
24. Giuliano AR et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *The Lancet*, 2011, 377(9769):932-940.
25. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology*, 2008, 109(2 Suppl):S15-21.
26. Shope RE. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. *Journal of Experimental Medicine*, 1937, 65(2):219-231.
27. Garland SM, Smith JS. Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs*, 2010, 70(9):1079-1098.
28. Somers GR et al. Juvenile laryngeal papillomatosis in a pediatric population: a clinicopathologic study. *Pediatric Pathology and Laboratory Medicine*, 1997, 17(1):53-64.
29. Darragh TM et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2012, 136(10):1266-1297.
30. Machalek DA et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncology*, 2012, 13(5):487-500.
31. Cuzick J et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*, 2008, 26(Suppl 10):K29-K41.
32. Garland SM, Tabrizi S. HPV DNA testing: potential clinical applications. *International Journal of Health Promotion and Education*, 2006, 44(3):107-112.
33. Kjaer SK et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *British Medical Journal*, 2002, 325(7364):572-575.

34. Rijkaart DC et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncology*, 2012, 13(1):78-88.
35. Rijkaart DC et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *International Journal of Cancer*, 2012, 130(3):602-610.
36. Ronco G et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncology*, 2010, 11(3):249-257.
37. Solomon D et al. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93(4):293-299.
38. Moore EE et al. Clearance of human papillomavirus in women treated for cervical dysplasia. *Obstetrics and Gynecology*, 2011, 117(1):101-108.
39. Sankaranarayanan R et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(14):1385-1394.
40. Klaes R et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *American Journal of Surgical Pathology*, 2002, 26(11):1389-1399.
41. Baak JP et al. Combined p53 and retinoblastoma protein detection identifies persistent and regressive cervical high-grade squamous intraepithelial lesions. *American Journal of Surgical Pathology*, 2005, 29(8):1062-1066.
42. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *Journal of Pathology*, 2003, 201(1):1-6.
43. Qiao YL et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lancet Oncology*, 2008, 9(10):929-936.
44. Heideman DA et al. Clinical validation of the Cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(11):3983-3985.
45. Gravitt PE et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1):357-361.
46. de Roda Husman AM et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 1995, 76(4):1057-1062.
47. Kleter B et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *American Journal of Pathology*, 1998, 153(6):1731-1739.
48. Unger ER, Dillner J, Zhou T, eds. *Human papillomavirus laboratory manual*, 1st ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2010.
49. Ratnam S et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(2):557-564.
50. Ratnam S et al. Clinical performance of the Pre Tect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(8):2779-2785.
51. Garland SM, Tabrizi SN. Pathogens relevant in sexually transmitted infections. In: Kessler HH ed. *Molecular diagnostics of molecular diseases*. Berlin/New York, Walter De Gruyter, 2010: 177-184.
52. Eklund C et al. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7):2289-2298.
53. Pagliusi SR, Garland SM. International standard reagents for HPV detection. *Disease Markers*, 2007, 23(4):283-296.
54. Brotherton JM, Kaldor JM, Garland SM. Monitoring the control of human papillomavirus (HPV) infection and related diseases in Australia: towards a national HPV surveillance strategy. *Sexual Health*, 2010, 7(3):310-319.
55. *WHO technical workshop on the role of laboratory detection of human papillomavirus in global disease prevention and control*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2006 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.04_eng.pdf, consultado el 5 de abril del 2013).

Capítulo 15

Infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana

15.1 Introducción

Los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) se describieron en 1981 y el virus causal se aisló por primera vez en 1983. Desde entonces, el virus se ha propagado en todo el mundo, existen cerca de 34 millones de personas infectadas y, tan solo en el 2010, se registraron 2,7 millones de nuevas infecciones (7). El África subsahariana ha sido la zona más afectada, con 23,1 millones de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y cerca de 1,9 millones de infecciones nuevas en el 2010. La prevalencia del VIH ha alcanzado más de 30% de los adultos en algunos países. Aunque se han desarrollado tratamientos antirretrovirales eficaces y se ha ampliado la cobertura del tratamiento a muchos países de escasos recursos, se calcula que por cada nueva persona que comienza el tratamiento, ocurren de dos a tres nuevas infecciones por el VIH-1. Por consiguiente, mientras no exista una vacuna eficaz, los medios de diagnóstico accesibles, aunados a la orientación sobre la prevención y a la derivación de las personas infectadas a los centros de atención apropiada, constituyen las estrategias fundamentales para frenar el ritmo al que se propaga la epidemia.

El VIH se transmite principalmente por el intercambio de humores orgánicos, que puede ocurrir por vía sexual y por la sangre o los hemoderivados contaminados. Las embarazadas infectadas por el VIH pueden transmitir el virus al hijo durante el embarazo, durante el parto (transmisión perinatal) o por la lactancia materna (transmisión posnatal). También se ha notificado transmisión del VIH después del trasplante de órganos cuando se descubre *a posteriori* que el donante era seropositivo. Con el propósito de garantizar la seguridad, ahora se investiga de manera sistemática la presencia del VIH o de anticuerpos contra el mismo en la sangre, los hemoderivados y los donantes de órganos a fin de eliminar la posibilidad de transmisión del VIH.

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae* y la subfamilia de los lentivirus, junto con virus análogos como el Visna, el virus de la artritis-encefalitis caprina, el

virus de la anemia infecciosa equina y el virus de la inmunodeficiencia de monos. El virión de aproximadamente 100 nm de diámetro consta de una cápside cónica que contiene dos copias de RNA genómico (fig. 15.1). La proteína de la cápside, p24, constituye el componente principal del virus y está recubierta a su vez por una membrana lipídica que contiene dos glucoproteínas, la gp41 y la gp120.

Estas glucoproteínas de superficie son importantes en la fijación del virus a los linfocitos CD4; la fijación es la primera etapa en el mecanismo de la infección y también en la generación de la respuesta inmunitaria del huésped frente al virus. El VIH es sumamente diverso, pues existen en todo el mundo varios subtipos o clados. En diferentes regiones predominan diferentes subtipos del virus. Además, el VIH consta de dos tipos principales, el VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 se subdivide en tres grupos, a saber: M (los subtipos A–K), N y O. El VIH-1 es el virus más frecuente y predomina en la epidemia, con multitud de subtipos y virus recombinados. El VIH-2 se encuentra principalmente en África Occidental y se han notificado casos ocasionales en muchos países en todo el mundo. Existen algunas diferencias entre los subtipos del VIH-1 pero con fines de diagnóstico, presentan reacciones cruzadas muy frecuentes y, por consiguiente, los antígenos o las proteínas derivados de un solo subtipo son adecuados para diagnosticar la infección, independientemente de los subtipos que predominen. Dada la reactividad cruzada entre el VIH-1 y el VIH-2, se precisan antígenos específicos a fin de diagnosticar con exactitud la infección por el VIH-2.

15.2 Pruebas de diagnóstico

15.2.1 Diagnóstico serológico de la infección por el VIH

El diagnóstico serológico de la infección por el VIH se obtiene habitualmente mediante la detección de anticuerpos contra el virus en la sangre o en otros

humores orgánicos. Los anticuerpos se producen en promedio entre 4 y 6 semanas después de la infección, aunque en algunos casos la presencia de anticuerpos detectables puede tardar hasta 3 a 6 meses después de la exposición. Por lo tanto, la infección por el VIH no se puede descartar con base en una prueba negativa entre 4 y 6 semanas después de una exposición documentada. Durante el período inicial de duplicación del virus, no existen anticuerpos y no se puede establecer con exactitud el diagnóstico de la infección mediante las pruebas de detección basadas exclusivamente en los anticuerpos. El período silente agudo se puede acortar con métodos que detecten directamente uno o varios componentes del VIH (el antígeno p24 o el RNA). La duplicación del virus genera en el cuerpo respuestas inmunitarias humorales y también mediadas por células, que estabilizan la carga viral. La presencia de virus detectables en la mayoría de las personas que no reciben tratamiento continúa estimulando la respuesta de las células B y las concentraciones de anticuerpos permanecen altas durante todo el período ulterior, a menos que el paciente presente una inmunodepresión grave, como se observa en las etapas avanzadas de la enfermedad. Por consiguiente, la detección de anticuerpos específicos contra el virus representa un marcador muy fiable en el diagnóstico de la infección por el VIH (fig. 15.2).

Existen tres usos principales de las pruebas de detección del VIH. Esta prueba se practica con el fin de garantizar la seguridad de la sangre, los hemoderivados y el trasplante de órganos; llevar a cabo la vigilancia; y establecer el diagnóstico individual en una persona. Cuando se realiza la prueba con el propósito de velar por la seguridad de la sangre, se suele practicar mediante los procedimientos más sensibles y perfeccionados que detectan los anticuerpos contra el VIH y el antígeno p24 o el RNA del VIH-1, a fin de acortar el período silente.

15.2.1.1 Inmunoensayos enzimáticos

Poco después del descubrimiento del VIH, se desarrollaron inmunoensayos enzimáticos destinados a diagnosticar la infección por el virus. Estos ensayos detectaban anticuerpos específicos del VIH, un signo indirecto de la infección y usaban como antígeno un lisado de virus. Las pruebas de primera generación se reemplazaron luego con las de segunda generación que empleaban antígenos más específicos en forma de péptidos sintéticos o proteínas recombinadas.

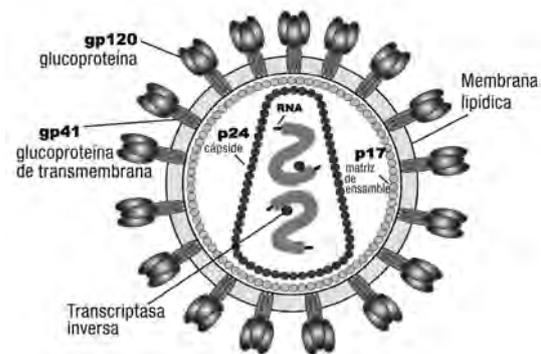


Figura 15.1
Estructura y organización de la partícula viral del VIH

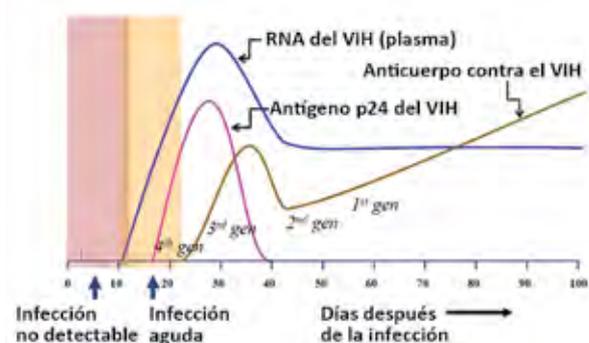


Figura 15.2
Dinámica inicial de la duplicación del virus y aparición de anticuerpos con marcadores de la infección por el VIH. Se indican los tiempos aproximados hasta la detección de anticuerpos mediante los inmunoensayos enzimáticos de primera, segunda, tercera y cuarta generación.

Estas pruebas eran más sensibles y específicas para la detección de los anticuerpos contra el VIH; sin embargo, debido a su estructura y diseño todavía no detectaban las respuestas muy tempranas de anticuerpos del tipo IgM. Los inmunoensayos enzimáticos de tercera generación utilizan una modalidad en sándwich, que comporta antígenos marcados con enzimas y pueden detectar respuestas tempranas del tipo IgM, y acortan con ello el período silente. En los últimos años, se han desarrollado nuevos inmunoensayos enzimáticos de cuarta generación que reducen aun más el período silente, al combinar la detección del antígeno viral (p24) y los anticuerpos contra el VIH (fig. 15.2). Estos ensayos que asocian antígenos y anticuerpos son muy sensibles en la detección de la infección aguda por el VIH antes de la producción de anticuerpos y en la actualidad se usan sistemáticamente en el tamizaje de la sangre y los hemoderivados en muchos países.

Aunque las pruebas moleculares detectan los ácidos nucleicos virales unos pocos días antes de que los inmunoensayos enzimáticos de cuarta generación detecten el antígeno p24, el costo y la complejidad de la detección de los ácidos nucleicos exceden las ventajas de la prueba, excepto en los bancos de sangre muy modernos.

Por consiguiente, el valor pronóstico de un resultado positivo de uno o dos resultados de inmunoensayos enzimáticos reactivos será mucho más alto cuando los resultados se interpretan en el contexto de la señal. Los resultados con una señal baja, aun cuando sean reactivos en dos inmunoensayos, se deben examinar de nuevo con una prueba más específica o una muestra de seguimiento con el fin de confirmar la infección.

15.2.1.2 Pruebas rápidas

En los últimos años, el diagnóstico del VIH se ha desplazado del laboratorio hacia ámbitos externos al laboratorio como consecuencia de la puesta al alcance de varias pruebas rápidas. Solo en el 2011 se practicaron las pruebas rápidas de detección del VIH a más de 100 millones de personas en todo el mundo. Estas pruebas rápidas aplican principalmente dos técnicas diferentes, que son los dispositivos de inmunocentración y las tiras o cartuchos de inmunocromatografía (fig. 15.3). Dado que las pruebas rápidas se diseñan con el fin de detectar anticuerpos contra el VIH en unos pocos minutos (1 a 15 minutos), en comparación con los inmunoensayos enzimáticos que pueden tardar entre 2 y 4 horas, los dispositivos se optimizan de manera que se acelere la interacción entre el antígeno y el anticuerpo. Esta característica exige el uso de una alta concentración de antígeno y la detección de los complejos de antígeno y anticuerpo con colorantes reactivos sensibles como el oro coloidal. Las pruebas rápidas suministran los resultados en el mismo día y, por ello, son ideales en una diversidad de situaciones como las poblaciones de difícil acceso, la orientación y las pruebas en el hogar, las pruebas por iniciativa del profesional de salud, las pruebas a embarazadas y las unidades móviles de diagnóstico. Las pruebas rápidas de detección del VIH con frecuencia se usan en entornos con un bajo volumen de muestras, a fin de prestar una atención más costo-eficiente. Estas pruebas se pueden practicar con muestras de suero, plasma o sangre, lo cual facilita el uso de muestras obtenidas por punción digital; su realización es sencilla y la pueden ejecutar

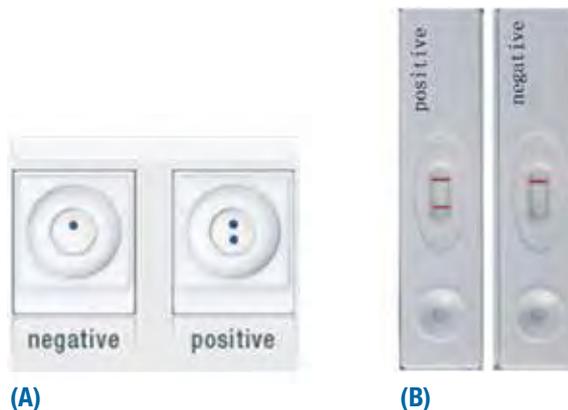


Figura 15.3
Ejemplo de las pruebas rápidas del VIH que muestra:
A) el dispositivo de inmunocentración y B) el
dispositivo de inmunocromatografía. Se observan
pruebas rápidas con resultados positivos y
negativos.

trabajadores legos y orientadores capacitados por fuera del ámbito del laboratorio, con lo cual se amplía el acceso a la detección del VIH. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) han desarrollado un módulo de capacitación exhaustivo que aborda diversos temas como la calidad, la exactitud y la seguridad (2). Al ampliar la disponibilidad de la atención y el tratamiento, se da un mayor impulso a la prestación de la orientación y las pruebas diagnósticas a millones de personas en todo el mundo como un componente importante de la prevención.

Debido a la alta demanda y a la ampliación del mercado, existen más de 50 estuches de pruebas al alcance en todo el mundo, pero no todos tienen características óptimas de desempeño. Es importante procurar que las pruebas rápidas se produzcan con la más alta calidad, en conformidad con las buenas prácticas de fabricación y presenten características de desempeño equivalentes a otros métodos diagnósticos. La OMS y los CDC cuentan con programas de calificación, destinados a evaluar la calidad de los nuevos estuches de pruebas rápidas (3, 4).

Recientemente, se han elaborado pruebas rápidas de cuarta generación capaces de diagnosticar la infección aguda por el VIH mediante la detección del antígeno p24, aunada a la detección de anticuerpos contra el virus. La detección del antígeno p24 puede acortar el período silente unos pocos días y reconocer a las personas que se encuentran en la fase aguda de la infección. Sin embargo, dado que la detección de la infección aguda es

un fenómeno todavía raro en los entornos con prevalencia e incidencia altas, es preciso que después de una prueba de antígenos positiva se practique una prueba de seguimiento en 4 semanas o más, a fin de verificar la seroconversión. En una evaluación reciente de una de estas pruebas rápidas en el terreno se puso en evidencia que la sensibilidad y la especificidad de la detección de antígenos todavía no son aceptables (5). Además, puesto que se trata de una nueva técnica y las infecciones agudas son infrecuentes, sería importante contar con una validación complementaria en el terreno que confirme todas las posibles infecciones agudas, mediante una prueba de ácidos nucleicos. Del mismo modo que con toda prueba, es primordial adoptar las medidas de garantía de la calidad con el fin de velar por la exactitud de la prueba rápida.

Se han desarrollado varias pruebas rápidas que utilizan muestras de secreciones bucales recogidas con un hisopo. Estas muestras contienen una concentración de IgG entre 1/500 y 1/1000 veces inferior a las muestras sanguíneas, pero es suficiente para diagnosticar la infección por el VIH. La mayoría de los anticuerpos en las secreciones bucales provienen de la sangre por transferencia pasiva, en lugar de ser producidos localmente y contienen un complemento total de IgG séricas, aunque en una concentración más baja. El uso de las secreciones bucales simplifica aun más las pruebas de detección del VIH, al ampliar su accesibilidad y disminuir el riesgo biológico que comporta la prueba con muestras sanguíneas. En la actualidad existen como mínimo tres estuches comerciales de pruebas rápidas bucales (OraQuick, ChemBio DPP y Aware OMT).

15.2.1.3 Pruebas de confirmación

Aunque los ensayos individuales mencionados anteriormente son muy sensibles y específicos, pueden presentar resultados positivos falsos y negativos falsos. Los resultados positivos falsos generan repercusiones importantes a escala individual. Por esta razón se desarrollaron las pruebas de confirmación que pueden ratificar los resultados positivos iniciales. Las pruebas de confirmación se basan en diferentes formatos y técnicas como las pruebas de inmunofluorescencia, la inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) y los inmunoensayos lineales. La inmunofluorescencia comporta la utilización de portaobjetos con células fijadas infectadas por el VIH. Los anticuerpos contra el VIH, cuando están presentes, se detectan mediante

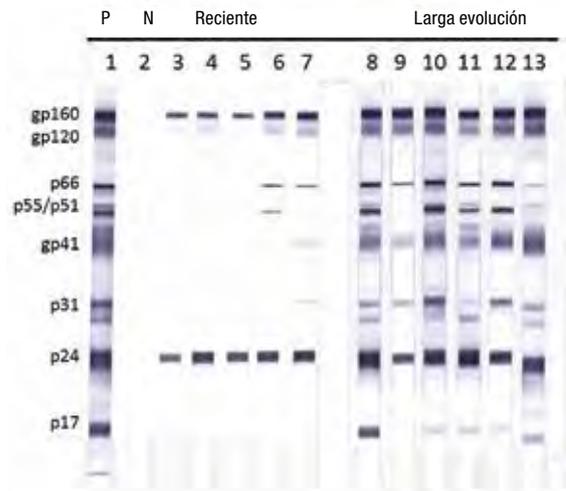


Figura 15.4
Prueba de confirmación por inmunoelectrotransferencia con el bandeo característico de anticuerpos que se observa durante las infecciones recientes (tiras 3 a 7) y en las infecciones de larga evolución (tiras 8 a 13). P es el testigo positivo; N son las muestras de testigos negativos. Al lado del testigo positivo se indican las diversas proteínas específicas del virus.

anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína y se observan con un microscopio de fluorescencia. La inmunofluorescencia ya no se usa de manera generalizada, y se ha reemplazado con otros métodos como la inmunoelectrotransferencia y los inmunoensayos lineales. Estas técnicas comportan el uso de tiras de membrana que contienen de manera aislada proteínas o proteínas y péptidos recombinados, específicos del VIH. Las muestras séricas se ponen en contacto con estas tiras. Los anticuerpos específicos de VIH que se fijan, se detectan mediante anticuerpos secundarios que se conjugan con una enzima y este complejo se pone en evidencia con un sustrato que genera un producto de color. En la figura 15.4 aparecen combinaciones de bandas representativas en la inmunoelectrotransferencia, que indican la presencia de anticuerpos contra las proteínas específicas del virus, incluido un testigo positivo que muestra todos los anticuerpos específicos de las proteínas virales que se pueden detectar, con su perfil característico (carril P). Las personas con una infección nueva o reciente poseen anticuerpos débiles dirigidos contra pocas proteínas, en general contra p24 y gp120 o gp160. A medida que la infección progresa se producen anticuerpos dirigidos contra otras proteínas virales y se hacen más fuertes con el transcurso del tiempo, como se demuestra las personas con infecciones de larga

evolución. Los inmunoensayos lineales son semejantes a la inmunoelectrotransferencia, pero usan determinadas proteínas recombinadas o péptidos purificados que son importantes en el diagnóstico, desde el punto de vista inmunitario. La inmunoelectrotransferencia y los inmunoensayos lineales son costosos y exigen una interpretación a fin de establecer el diagnóstico, con base en una combinación de anticuerpos específicos contra antígenos presentes en la sangre (dirigidos contra p24 y una o varias proteínas de la envoltura).

Estas pruebas solo detectan la IgG específica del VIH. Por consiguiente, no se pueden usar con el fin de confirmar la presencia de IgM específica del VIH ni de virus, como la detectan los inmunoensayos enzimáticos más sensibles de tercera y cuarta generación respectivamente. Una estrategia de pruebas que incluya el uso de dos o varios inmunoensayos enzimáticos o pruebas rápidas en un algoritmo seriado o paralelo proporciona resultados que son casi tan fiables como las pruebas de confirmación por inmunoelectrotransferencia o los inmunoensayos lineales, pero con un costo muy inferior.

15.2.2 Detección del RNA, el DNA o el p24 del VIH

El VIH también se puede diagnosticar por detección directa del virus o los componentes virales (el antígeno p24, el RNA o el DNA proviral). La detección del virus mediante el cultivo u otros métodos no se suele practicar debido a que la sensibilidad es deficiente comparada con los métodos inmunológicos o moleculares corrientes y a la complejidad de las técnicas de cultivo. La detección del antígeno p24, el RNA o el DNA del VIH-1 cumple un importante papel cuando no es posible establecer el diagnóstico con base en los anticuerpos, como ocurre en los lactantes menores de 1 año expuestos durante el período perinatal o en la infección aguda en los adultos antes de la producción de anticuerpos contra el virus (6–10). La detección molecular de una secuencia selectiva de ácidos nucleicos es más sensible que la detección del p24.

Según la fase de la infección, el VIH se puede ser encontrar principalmente como DNA proviral en las células infectadas o como RNA en la sangre (como componente de partículas libres y RNA viral intracelular). Existen estuches comerciales que pueden detectar el DNA o el RNA de manera cualitativa o cuantitativa. Las pruebas cualitativas son suficientes con fines de diagnóstico y están indicadas en la detección precoz de

las infecciones por el VIH en los adultos y los menores de 1 año de edad. La detección de la infección aguda mediante las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) está indicada con el propósito de aumentar la seguridad de la sangre de donantes y los hemoderivados y tal vez en las poblaciones de alto riesgo. En muchos bancos de sangre de países desarrollados y de países en desarrollo se usan sistemáticamente las PAAN como parte de los algoritmos de pruebas. Las personas que padecen una infección aguda presentan una alta carga viral y corren un alto riesgo de transmitir la infección a la pareja. Por lo tanto, se ha fomentado la detección de las personas con infección aguda como parte de la estrategia general de prevención de la infección por el VIH. Sin embargo, la detección de los casos agudos ofrece un bajo rendimiento en la mayoría de los entornos y resulta muy costosa cuando se considera la brevedad del período silente (alrededor de 2 semanas).

Otra aplicación importante de las pruebas moleculares es el diagnóstico precoz de la infección por el VIH en los menores de 1 año expuestos al virus durante el período perinatal.

Dado que todos los niños menores de 1 año nacidos de madres seropositivas adquirieron de manera pasiva anticuerpos contra el VIH, las pruebas corrientes que detectan anticuerpos no se pueden usar con el fin de confirmar o descartar la infección. Los anticuerpos residuales en los lactantes no infectados persisten y se pueden detectar hasta los 18 meses de edad. Por esta razón, el reconocimiento de la presencia o la ausencia de RNA o DNA del VIH en los lactantes de 6 semanas o mayores constituye el medio más definitivo de diagnosticar la infección en este grupo etario. En el diagnóstico precoz de los lactantes en medios con recursos limitados, se aplica una gota de sangre sobre papeles de filtro y se seca (gota de sangre seca) lo cual facilita la obtención, el procesamiento, el transporte y el almacenamiento de las muestras sanguíneas. Las técnicas moleculares de diagnóstico precoz se han introducido en un gran número de laboratorios, con un interés principal en la prevención de la transmisión materno-infantil. Existen varios estuches comerciales que se usan en el diagnóstico del VIH en los menores de 1 año de edad. Estas pruebas incluyen la extracción manual de ácidos nucleicos o las plataformas moleculares de vanguardia que ofrecen una automatización avanzada de la extracción y la detección

cualitativa de RNA y DNA del VIH-1. La extracción manual de ácidos nucleicos exige un número considerable de etapas, con posibilidad de error humano y contaminación de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Frente a la necesidad de una mayor calidad, se han elaborado plataformas que reducen al mínimo las intervenciones del operador y aceleran el procesamiento de las muestras. Se ha notificado que la detección cualitativa de la infección por el VIH-1 en los menores de 1 año ofrece una sensibilidad de detección suficiente a partir de tan solo 500 copias de DNA por mililitro, en función del tipo de muestra (plasma, sangre o gota de sangre seca). En el diagnóstico precoz de la infección en los lactantes no se recomienda la mezcla de las muestras, que a menudo se practica en la detección de las infecciones agudas en los adultos con el fin de aumentar la eficiencia y reducir costos.

Lamentablemente, en la mayoría de los países las pruebas cuantitativas del VIH no están autorizadas con fines diagnósticos, sino únicamente en el seguimiento de la infección. Sin embargo, el uso de una prueba cuantitativa de RNA del VIH en las muestras de plasma antes de iniciar el tratamiento antirretroviral es el método preferido como segunda prueba de confirmación.

Si bien la realización de pruebas serológicas rápidas del VIH de buena calidad en los centros periféricos se ha convertido en práctica ordinaria, las pruebas de DNA por RCP en el punto de atención, donde existe una mínima infraestructura de laboratorio, avanza lentamente. En los entornos con recursos limitados se pueden realizar las nuevas pruebas inmediatas en el punto de atención, que se basan en la amplificación isotérmica con detección rápida de las secuencias diana. Algunas pruebas inmediatas utilizan instrumentos pequeños portátiles que suelen realizar la extracción y la amplificación de los ácidos nucleicos, la amplificación de la señal y la detección. La evaluación de estas pruebas en el terreno será fundamental en la validación de su consistencia analítica y su capacidad de proporcionar resultados exactos.

15.2.3 Algoritmos de pruebas

Con el propósito de diagnosticar la infección por el VIH se asocian dos o varias pruebas en un algoritmo que aumenta el valor pronóstico del resultado positivo de una prueba inicial. En la mayoría de las situaciones, el algoritmo que más se aplica incluye la utilización seriada o secuencial de las pruebas (algoritmo seriado). Un

resultado negativo se suele transmitir al usuario con base en una prueba única, pero un resultado positivo se confirma con una segunda prueba diferente. En función de la especificidad de las pruebas y cuando la prevalencia de la infección por el VIH en la población es relativamente alta (>5%), se usan dos resultados positivos con el fin de diagnosticar la infección. En las poblaciones con baja prevalencia, se recomienda una tercera prueba antes de confirmar un diagnóstico positivo. El algoritmo seriado es lógico y costoeficiente, y comporta en primer lugar una prueba más sensible, seguida de una prueba más específica con el objeto de eliminar los resultados positivos falsos. Sin embargo, en algunas situaciones se aplican algoritmos paralelos, en los cuales se utilizan dos pruebas simultáneamente y el resultado se registra como negativo o positivo con base en los resultados concordantes. En el caso de resultados discordantes, se realiza una tercera prueba o se repite el examen en una fecha posterior, a fin de confirmar o descartar la seroconversión reciente. Los algoritmos paralelos pueden ser más costoeficientes en una situación de prevalencia muy alta, alto volumen de usuarios o cuando se practica la prueba a las embarazadas durante el trabajo de parto. Es importante escoger la combinación correcta de pruebas con el fin de aportar un diagnóstico certero (11).

15.2.4 Muestras de gotas de sangre seca

Si bien la mayoría de las pruebas diagnósticas están destinadas al uso de sangre procesada (muestras de suero o plasma), la obtención de las muestras precisa un flebotomista experimentado y equipo. Además, el transporte de muestras líquidas requiere una cadena de frío, que es relativamente costosa. La muestra en gota de sangre seca es una opción sencilla y fácil para la serología y el análisis molecular del VIH. Los inmunoensayos enzimáticos y la inmunoelectrotransferencia se han optimizado con el objeto de que acepten este tipo de muestras (12). Las muestras de sangre seca se pueden tomar, almacenar y transportar a temperatura ambiente. En general, se usa un sacabocados de 6 mm a fin de eluir los anticuerpos de la prueba. Según la técnica usada, suele ser necesaria alguna optimización de la técnica con el objeto de lograr sensibilidad y especificidad óptimas (13). Cuando se cuenta con sistemas optimizados de pruebas, la muestra de sangre seca es ideal en la vigilancia de la infección por el VIH. Como se indicó anteriormente, la gota de sangre seca es una muestra práctica que se usa de manera sistemática en el diagnóstico precoz de los

lactantes en muchos países. Recientemente, se han optimizado y validado las pruebas destinadas a la vigilancia de la carga viral de muestras en gotas de sangre seca. Después del tratamiento eficaz, la viremia plasmática disminuye rápidamente, en unas pocas semanas, a concentraciones por debajo del umbral de detección. Sin embargo, el RNA y el DNA intracelulares persisten y se pueden detectar en las muestras de sangre seca. Por consiguiente, el uso de estas muestras en el seguimiento longitudinal de los pacientes que reciben tratamiento exige cautela.

15.3 Seguimiento de la infección por el VIH en el laboratorio clínico

15.3.1 Utilidad de la prueba de linfocitos CD4 en el seguimiento clínico de la infección

La infección por el VIH conduce a la aparición del sida, que se caracteriza por una pérdida de linfocitos CD4 que son primordiales en el funcionamiento adecuado del sistema inmunitario de una persona. La prueba de los linfocitos T4 se usa en el seguimiento clínico de las personas infectadas, con el fin de determinar el momento oportuno para iniciar el tratamiento antirretroviral, vigilar la eficacia de este tratamiento y definir cuándo se debe suministrar la profilaxis de las infecciones oportunistas. La OMS recomienda el tratamiento antirretroviral en los adultos y los adolescentes infectados por el VIH con recuentos de CD4 inferiores a 350 células/ μ l, independientemente de los síntomas (14). En los países con recursos limitados, la cifra con la cual se comienza el tratamiento difiere según el país pero suele oscilar entre 200 y 350 células/ μ l. El recuento de linfocitos CD4 también constituye una herramienta de seguimiento de la progresión de la enfermedad y de la eficacia real del tratamiento antirretroviral. Cuando un paciente no responde al tratamiento, el recuento de linfocitos CD4 se usa con el fin de determinar el cambio de una pauta de primera línea a un esquema terapéutico de segunda línea, sobre

todo en los países que no cuentan con la determinación de la carga viral. La decisión sobre el momento de iniciar el tratamiento antirretroviral es fundamental en los países con recursos limitados, en el contexto de las tasas más altas de mortalidad y la mayor incidencia de infecciones oportunistas (15, 16). Cuando disminuye el recuento de linfocitos CD4, es más probable que las personas seropositivas al VIH contraigan infecciones por patógenos oportunistas. El tratamiento antirretroviral se usa cuando el recuento de linfocitos CD4 alcanza un cierto umbral, con el propósito de prevenir la aparición de estas infecciones. El recuento normal de linfocitos CD4 en los menores de 5 años de edad es más alto que en los adultos y disminuye con la edad. Esta evolución hace más difícil que los niños cumplan con los requisitos del tratamiento antirretroviral cuando se tiene en cuenta el recuento absoluto. Se han utilizado los porcentajes de linfocitos CD4 a fin de determinar el momento de iniciar los antirretrovirales en los niños infectados por el VIH.

15.3.1.1 Fundamentos de la prueba de linfocitos CD4

En general, el recuento de linfocitos CD4 se refiere al cálculo del número de células CD4, también llamados linfocitos T 4 o linfocitos T colaboradores. La prueba de células CD4 se usa con el objeto de determinar la concentración absoluta de linfocitos CD4 en la sangre o el porcentaje de células CD4 en la población de linfocitos. Los recuentos normales de CD4 oscilan entre 400 y 1600 células/dl y el porcentaje normal de linfocitos CD4 entre 35% y 55% (17).

Los métodos corrientes de recuento de células CD4 utilizan anticuerpos monoclonales marcados que detectan moléculas de superficie como CD4, CD3, CD8 y CD45 en las células sanguíneas. En la figura 15.5 se ilustran los principales leucocitos con anticuerpos marcados, dirigidos contra el CD4 y el CD3.

Las células sanguíneas que expresan las moléculas de superficie de interés se reconocen con los citómetros de

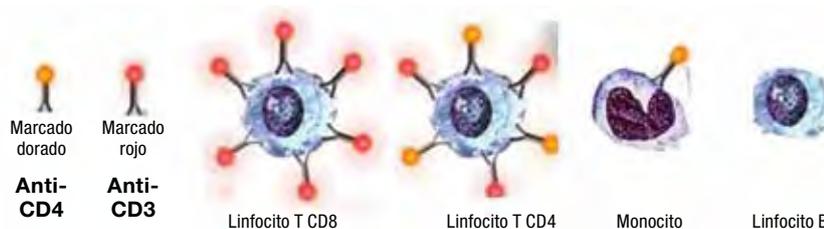


Figura 15.5
Leucocitos con anticuerpos marcados antiCD4 y anti-CD3

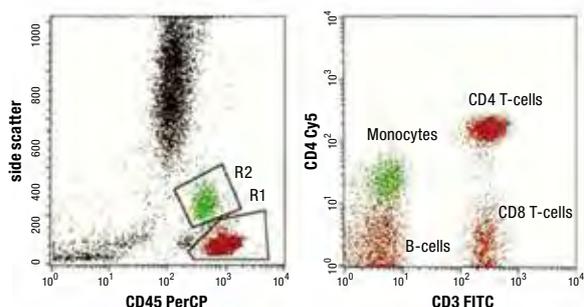


Figura 15.6
Ejemplo de gráficos de puntos de una prueba de células CD4 en citometría de flujo

flujo que detectan el marcador específico de cada uno de los anticuerpos monoclonales. Los citómetros de flujo también diferencian las células por sus propiedades de dispersión de la luz. En la figura 15.6 se muestra un análisis de citometría de flujo en gráficos de puntos con dos parámetros, como ejemplo de la prueba de células CD4. El primer gráfico destaca la población de glóbulos blancos por su propiedad de dispersión de la luz y las moléculas de superficie CD45. La casilla denominada R1 muestra la población de linfocitos y la casilla R2 la población de monocitos.

El segundo gráfico de puntos solo examina las células escogidas en las casillas R1 y R2 del primer gráfico. Las células CD4 corresponden al conglomerado superior derecho de células que expresan CD4 y también CD3. Los linfocitos CD8 se encuentran inmediatamente debajo del conglomerado CD4 y expresan CD3, pero no CD4. Las células B se agrupan en la esquina abajo a la izquierda y no expresan CD4 ni CD3. Los monocitos corresponden al conglomerado verde de células por encima de las células B con baja expresión de CD4 y sin expresión de CD3. El citómetro de flujo puede contar el número de células en cada uno de los conglomerados y así facilita la determinación del recuento de células CD4.

15.3.1.2 Plataformas de análisis de células CD4 y las estrategias de la ventana de análisis

El recuento de CD4 se ha realizado mediante una técnica de plataforma dual con un citómetro de flujo que suministra el porcentaje de células CD4 en la población de leucocitos o de linfocitos, y un analizador de hematología que proporciona el recuento absoluto de leucocitos y linfocitos. En la actualidad, se prefieren las técnicas de plataforma única y se ha demostrado que mejoran la precisión de la prueba de las células CD4 (15). El método de plataforma única determina el recuento de CD4 en los

citómetros de flujo a partir de un volumen preciso escogido de la muestra de sangre. Este método se basa ya sea en un principio volumétrico con recuento de las células CD4 por una unidad de volumen de la muestra procesada o en la comparación del recuento de un número conocido de microcuentas agregadas a la muestra procesada, con el recuento de células CD4.

La estrategia recomendada de la ventana de análisis para el recuento de CD4, reconoce la población de linfocitos mediante los marcadores CD45 y sus propiedades de dispersión lateral de la luz. Existen también varias pruebas destinadas a las células CD4, que utilizan estrategias de ventanas de análisis fijas que son exclusivas de la prueba. Ejemplos de estas pruebas son el FACSCCount CD4 y el Guava Auto CD4/CD4%.

15.3.1.3 Pruebas de células CD4

En el cuadro 15.1 se indican las diversas técnicas comercializadas de la prueba de células CD4. En el cuadro se presentan los métodos manuales de determinación de las células CD4 que se basan en un recuento directo en el microscopio y la nueva prueba inmediata en el punto de atención, que es el analizador CD4 Pima. Antes de introducir las pruebas de células CD4, se deben considerar las políticas del país o de la OMS sobre la utilización de estas pruebas en función de las necesidades de infraestructura y de personal para una instalación adecuada; el suministro y la logística de servicios; y la evaluación y el seguimiento de la calidad de las pruebas (16).

15.3.2 Garantía de la calidad de las pruebas de células CD4

La formulación de las pautas de garantía de la calidad de las pruebas de células CD4 se fundamentó en los adelantos y las experiencias adquiridas en los medios desarrollados y en entornos con recursos limitados (17–19). Es importante que las muestras destinadas a la prueba de células CD4 se rotulen adecuadamente, se recojan en tubos destinados a las muestras de sangre, se mantengan a la temperatura ambiente pero sin exponerlos al calor extremo y se analicen en el lapso que se recomienda con cada prueba. Se han utilizado estabilizadores sanguíneos como el Cyto-chex y el Transfix con el fin de prolongar el tiempo durante el cual una muestra se puede analizar, en especial cuando es preciso remitirlas. La muestra se debe preparar en conformidad con un procedimiento normalizado escrito.

Es importante contar con pipetas calibradas y reactivos almacenados adecuadamente que no estén vencidos, a fin de lograr resultados fiables. La realización de las pruebas de células CD4 debe estar a cargo de un personal de laboratorio capacitado y competente. En todos los resultados generados, incluidas las inmunotransferencias en gotas, es necesario examinar la exactitud, la integridad y el uso de los identificadores correctos. Se debe realizar diariamente el mantenimiento de los equipos y los instrumentos en horarios programados. Los contratos de servicio de los citómetros de flujo pueden extender la vida útil del instrumento y contribuir a obtener una función adecuada. Es preciso contar con un inventario de reactivos y una cadena de suministro fiable, de manera que no haya ningún tiempo de inactividad en la práctica de las pruebas como consecuencia de la falta de reactivos.

Siempre que se practique la prueba de células CD4 se debe realizar diariamente el control de calidad. La sangre estabilizada se puede usar como material de control de su calidad y se consigue comercialmente (19). Se deben examinar como las muestras de pacientes, dos referencias de material de control de calidad, normal y bajo.

Los resultados del control de calidad se deben examinar diariamente. Otra posibilidad es utilizar las cuentas de referencia con el objeto de velar por la exactitud de la función de recuento del instrumento de CD4. Los laboratorios que realizan la prueba de las células CD4 deben además estar inscritos en un programa externo de garantía y evaluación de la calidad.

Cuadro 15.1: Pruebas e instrumentos del examen de las células CD4

Tipo	Instrumentos y empresa	Prueba	Principio de la prueba
Sistemas de gran productividad	Epic XL-MCL & FC500 de Beckman Coulter Brea, CA (EUA)	PLG CD4	Citometría de flujo con cuentas
	FACSCalibur & Canto de BD Bioscience San José, CA (EUA)	Tritest & MultiTest	Citometría de flujo con cuentas
Sistemas de productividad intermedia o baja	FACSCount de BD Bioscience	Reactivo FACSCount & Reactivo CD4	Citometría de flujo con cuentas
	Guava PCA de Millipore Billerica, MA (EUA)	Easy CD4, Easy CD4%, Auto CD4/CD4%	Citometría de flujo volumétrica
	CyFlow SL_3 & Counter de Partec Gorlitz (Alemania)	Partec Easy CD4 & CD4%	Citometría de flujo volumétrica
Sistemas manuales	Beckman Coulter Invitrogen Oslo (Noruega)	Cyto-Spheres Estuche T4 Quant	Direct observation of bead-rosetted cells Observación directa de células en rosetas con cuentas Observación directa de células escogidas por inmunocaptación
	Analizador Pima de Alere Technologies Jena (Alemania)	Pima CD4	Imagen digital de células con doble marcado, técnica volumétrica

15.3.3 Determinación de la carga viral

Aunque el recuento de células CD4 es un criterio clínico importante que permite comprender el estado clínico de los pacientes y definir el momento de iniciar el tratamiento antirretroviral, la carga viral es la medida cuantitativa de la cantidad de VIH en la sangre y es un parámetro importante en el seguimiento de la eficacia del tratamiento con el transcurso del tiempo. Existen muchas pruebas comerciales de determinación de la viremia y se utilizan principalmente con el fin de coordinar la atención de la infección por el VIH, en conjunto con el cuadro clínico y otras pruebas de laboratorio. La técnica de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* se usa con el fin de cuantificar las partículas del VIH en el plasma humano. La RCP con transcriptasa inversa, la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos y los métodos con DNA de cadena ramificada (bDNA) se usan con el fin de cuantificar el RNA del VIH mediante la RCP, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos y la amplificación de señal, respectivamente. Las técnicas que no se basan en los ácidos nucleicos utilizan la detección de las enzimas (transcriptasa inversa) y las proteínas (antígeno p24) del virus como una medida indirecta de la carga viral. Las pruebas de determinación de la carga viral difieren con respecto a la sensibilidad, el intervalo analítico y la capacidad de detectar y cuantificar diferentes subtipos del VIH. Sin considerar la técnica de medición de la viremia, el plasma humano es el tipo de muestra corriente; sin embargo, las limitaciones de su procesamiento, el mantenimiento de la cadena de frío y el almacenamiento de las muestras constituyen auténticas fuentes de preocupación. No obstante, el uso de sangre seca como fuente de muestras ofrece buenas perspectivas; en los establecimientos de atención primaria se pueden recoger las muestras de sangre seca y transportarlas a los laboratorios centrales con el fin de practicar la determinación. La determinación centralizada de la carga viral es la norma actualmente en los países con recursos limitados, pero las pruebas inmediatas en el punto de atención pueden modificar la situación general, allí donde se pueda determinar la carga viral de manera sistemática en el futuro.

15.3.4 Pruebas de farmacorresistencia

La farmacorresistencia del VIH consiste en la capacidad del virus de continuar su duplicación en presencia de los medicamentos antirretrovirales que suelen suprimirla. La causa de la farmacorresistencia son las mutaciones o las modificaciones que afectan porciones

específicas del genoma de RNA del virus, sobre las cuales actúan los antirretrovirales y que, en último término, provocan cambios en las proteínas enzimáticas que son primordiales en la replicación del virus y permiten que el VIH se duplique en presencia de determinados antirretrovirales. En los entornos con recursos limitados, los antirretrovirales recetados con mayor frecuencia se dirigen a las regiones de la transcriptasa inversa y la proteasa del gen *pol* del VIH, por lo tanto, las mutaciones de farmacorresistencia que se detectan se suelen localizar en estas regiones. La evolución de las subpoblaciones farmacorresistentes del VIH puede alterar de manera considerable la capacidad de los antirretrovirales de suprimir la duplicación del virus. Una vez que surgen y se multiplican las cepas virales resistentes, estas persisten indefinidamente ya sea como virus circulantes o integrados en los genomas de los linfocitos T de memoria, en forma de DNA proviral. Estas cepas no solo causan una infección que no responde a los medicamentos en los pacientes que adquieren la resistencia, sino que además se pueden transmitir a las personas recién infectadas y alterar la eficacia del tratamiento antirretroviral en estos pacientes. Se cuenta con dos tipos reconocidos de pruebas de farmacorresistencia del VIH a saber, las pruebas genotípicas y las fenotípicas. Ambos métodos son complejos y costosos. En los países con abundantes recursos, la vigilancia de la farmacorresistencia adquirida en los pacientes que reciben tratamiento antirretroviral y la detección de la farmacorresistencia transmitida en los pacientes recién infectados por el VIH se ha convertido en la norma de atención (17). Se ha demostrado que las pruebas de farmacorresistencia del VIH mejoran la supervivencia y la respuesta inmunitaria cuando se usan como guías en la adopción de decisiones clínicas en los pacientes con antecedente de fracaso de una o varias pautas terapéuticas. En los entornos con escasos recursos, las pruebas de farmacorresistencia a escala individual no se practican de manera sistemática debido a la falta o la limitación en las infraestructuras, el personal capacitado y a los altos costos. La OMS recomienda la supervisión y la vigilancia de la farmacorresistencia del VIH en las poblaciones, con el fin de prevenir la aparición y la transmisión de la resistencia en los países en curso de ampliación rápida de los programas de tratamiento y procurar mantener la eficacia de los esquemas de tratamiento antirretroviral que se escogen para formar parte de las pautas terapéuticas nacionales y de los programas antirretrovirales que los suministran (18–20).

15.3.4.1 Pruebas genotípicas de farmacorresistencia del VIH

Las pruebas genotípicas de farmacorresistencia del VIH evalúan las secuencias de nucleótidos a partir de las cuales se deducen los aminoácidos de las enzimas transcriptasa inversa y proteasa del virus. La secuencia de aminoácidos de las regiones de la transcriptasa inversa y de la proteasa del gen pol del VIH se compara con las secuencias de una cepa natural de referencia del virus o con una secuencia consenso de referencia, específica del subtipo y todos los cambios en los aminoácidos se registran como un cambio en el aminoácido de un codón específico. Las mutaciones se denominan siguiendo un formato normalizado, con base en la posición numérica del codón mutante en la secuencia de aminoácidos de la proteasa o la transcriptasa inversa. Por ejemplo, un cambio de metionina (M) por valina (V) en la posición 184 de la transcriptasa inversa se describe como M184V. La letra a la izquierda del número representa el aminoácido en esa posición en la secuencia de referencia de la transcriptasa inversa y la letra a la derecha corresponde al aminoácido asociado con la mutación en la cepa del VIH examinada. Se ha demostrado que las pruebas genotípicas ofrecen gran reproducibilidad y sensibilidad, y suministran una secuencia génica completa y exacta de los dominios de interés. Los estudios han indicado que la prueba genotípica detecta las mutaciones de farmacorresistencia del VIH presentes en cerca de 20% de las cuasiespecies circulantes.

Los sistemas TRUGENE® y Viroseq®, comercializados en Estados Unidos y autorizados por la FDA, se diseñaron y aprobaron para el genotipado de los virus VIH-1 del subtipo B, que corresponden a las cepas circulantes dominantes en Europa y América del Norte. Aunque con estas pruebas se han genotipado otros subtipos del VIH-1 diferentes del B, aun no se han evaluado plenamente sus características de desempeño y los resultados de la prueba son variables. En laboratorios de todo el mundo se han elaborado y validado pruebas genotípicas dirigidas a los diferentes subtipos del grupo M del VIH-1 y las formas recombinadas circulantes (21, 22).

15.3.4.2 Pruebas fenotípicas de farmacorresistencia del VIH

Las pruebas fenotípicas in vitro utilizan las regiones de la transcriptasa inversa y de la proteasa del gen pol del

VIH-1 derivadas de una persona infectada por este virus, e incorporan estas regiones génicas con el fin de generar un virus recombinado; luego se examina el virus recombinado mediante las pruebas de sensibilidad, en presencia de diversas concentraciones de un medicamento específico. Los resultados se expresan como los cambios de sensibilidad en X veces de la concentración inhibidora del 50% (CI50), comparada con los umbrales obtenidos con un virus natural de referencia. Las pruebas fenotípicas presentan varias limitaciones. En primer lugar, las pruebas fenotípicas no pueden pronosticar en forma adecuada el desenlace clínico cuando existe una población mixta de cepas de virus de tipo natural y de mutantes en las cuasiespecies virales. Además, las pruebas fenotípicas están al alcance solo en un número limitado de laboratorios que aplican métodos diferentes y pueden dar resultados discordantes. Aun más importante, el costo actual de las pruebas fenotípicas es como mínimo tres veces superior al costo de la prueba genotípica. Debido a estas limitaciones, las pruebas fenotípicas no se recomiendan con fines de vigilancia rutinaria de la farmacorresistencia en la población.

15.3.4.3 Tipos de muestras de las pruebas de farmacorresistencia del VIH

El tipo de muestra que se usa de ordinario con las pruebas genotípicas y que se considera el “método de referencia” es el plasma. Las dos pruebas genotípicas autorizadas por la FDA se practican con plasma. La OMS también recomienda que se use el plasma en las encuestas de vigilancia de la farmacorresistencia adquirida del VIH en los pacientes que han recibido medicamentos antirretrovirales de primera línea durante 12 a 15 meses (23). Además, muchos estudios han evaluado las muestras de sangre seca con las pruebas de farmacorresistencia en los entornos con recursos limitados y en los últimos años se han usado con éxito con las pruebas genotípicas en poblaciones recién diagnosticadas con infección por el VIH y sin antecedente de tratamiento, en el estudio de la farmacorresistencia transmitida. La OMS también recomienda el uso de muestras de sangre seca en las encuestas de farmacorresistencia transmitida en las poblaciones que no han recibido previamente antirretrovirales y en las encuestas de farmacorresistencia adquirida en los pacientes que inician el tratamiento (23–25). Si bien las muestras de sangre seca ofrecen ventajas importantes en las pruebas de farmacorresistencia del VIH, como son

una mayor facilidad en la obtención, el transporte y el almacenamiento, sin necesidad de una cadena de frío (21, 22, 26–28), este método presenta limitaciones con las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos antirretrovirales de primera línea que participan en las encuestas de farmacorresistencia adquirida del VIH durante los primeros 12 meses después de la iniciación del tratamiento antirretroviral (23, 29). Esto se debe sobre todo al aporte de una muestra más pequeña para la extracción, una menor carga viral en la mayoría de los pacientes que han recibido tratamiento y a la menor sensibilidad de las pruebas genotípicas de desarrollo interno en los laboratorios. Sin embargo, los resultados recientes de estudios realizados en entornos de recursos limitados con pruebas de carga viral por RCP en tiempo real de segunda generación han revelado que la medición de la viremia a partir de muestras de sangre seca de pacientes tratados con antirretrovirales de primera línea puede constituir una alternativa viable (30–34). Al asociar las pruebas de carga viral por RCP en tiempo real de segunda generación con unas algunas pruebas genotípicas sensibles de elaboración interna (21, 22), puede llegar a ser factible la supervisión de la farmacorresistencia del VIH en los pacientes que han recibido tratamiento, a partir de muestras de sangre seca en los entornos con recursos limitados.

15.3.4.4 Garantía de la calidad de los resultados de genotipado

Al igual que todas las técnicas moleculares, la prueba genotípica de farmacorresistencia del VIH es susceptible de contaminación cruzada cuando al realizarla no se cumplen los procedimientos recomendados o no se utilizan los medios de laboratorio previstos en el diseño de la prueba. Con el propósito de normalizar la ejecución de las pruebas genotípicas de farmacorresistencia del VIH y velar por la calidad de los datos de genotipado en los entornos con recursos limitados, la ResNet de la OMS elaboró una estrategia de laboratorio en materia de farmacorresistencia del VIH (35). En todos los laboratorios de farmacorresistencia acreditados por la OMS se han desarrollado y ejecutado estrategias en materia de genotipado, entre las cuales se cuentan los programas de evaluación externa de la calidad y solo los laboratorios de genotipado acreditados por la organización han realizado estas pruebas y generado los datos con fines de supervisión y vigilancia de la farmacorresistencia del VIH. Además, el equipo de

farmacorresistencia del VIH del Departamento de VIH/sida de la OMS, en colaboración con el Laboratorio de Farmacorresistencia de la División Internacional de Laboratorios, la División Mundial del VIH/sida, el Centro para la Salud Mundial y los CDC, elaboró un módulo de capacitación de laboratorio sobre farmacorresistencia del VIH. Todas estas medidas de calidad han favorecido la buena calidad de los datos de genotipado.

15.4 Referencias

1. *Informe de ONUSIDA para el Día Mundial del Sida 2011*. Ginebra, Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA, 2011.
2. WHO, UNAIDS, CDC. *HIV rapid testing: training package*. Atlanta, GA, USA, Centros para la Prevención y el Control de las Enfermedades, 2006.
3. WHO, UNAIDS. *HIV assays: operational characteristics (phase 1). Report 14, simple/rapid tests*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2004.
4. USAID. *HIV/AIDS rapid test kits: process for USAID approval and technical guidance*. Washington, DC, United States Agency for International Development, 2010 (http://transition.usaid.gov/our_work/global_health/aids/TechAreas/treatment/testkit_explain.pdf, consultado el 5 de abril del 2013).
5. Bhowan K et al. Identifying HIV infection in South African women: how does a fourth generation HIV rapid test perform? *African Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 1(1). <http://dx.doi.org/10.4102/ajlm.v1i1.4>.
6. Leelawiwat W et al. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods*, 2009, 155(2):109–117.
7. Ou CY et al. Early diagnosis of HIV infection in the breastfed infant. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 743:51–65.
8. Ou CY et al. Identification of HIV-1 infected infants and young children using real-time RT PCR and dried blood spots from Uganda and Cameroon. *Journal of Virological Methods*, 2007, 144(1–2):109–114.
9. Facente SN et al. Performance of risk-based criteria for targeting acute HIV screening in San Francisco. *PLoS One*, 2011, 6(7):e21813.
10. Pilcher CD et al. Approaching “HIV elimination”: interventions for acute HIV infection. *Current HIV/AIDS Report*, 2006, 3(4):160–168.
11. UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS/STI Surveillance. *Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation and implementation, 2009 update*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2009.

12. Granade TC et al. Factors influencing HIV-1 banding patterns in miniaturized western blot testing of dried blood spot specimens. *Journal of Immunological Methods*, 1992, 154(2):225–233.
13. *Guide to implementation of services for early diagnosis of HIV in infants in resource-limited settings*. Atlanta, GA, USA, Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades, 2009 (<http://www.womenchildrenhiv.org/wchiv?page=ch-09-00-eid>, consultado el 5 de abril del 2013).
14. *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents: recommendations for a public health approach – 2010 revision*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2010.
15. Westerman LE et al. A quality management systems approach for CD4 testing in resource-poor settings. *American Journal of Clinical Pathology*, 2010, 134(4):556–567.
16. *Laboratory guidelines for enumerating CD4 T lymphocytes in the context of HIV/AIDS*. New Delhi, World Health Organization Regional Office for South-East Asia, 2007 (<http://www.who.int/hiv/amds/LaboratoryGuideEnumeratingCD4TLymphocytes.pdf>, consultado el 5 de abril del 2013).
17. Hammer SM et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*, 2008, 300(5):555–570.
18. Bennett DE et al. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(Suppl 2):1–13.
19. Bennett DE et al. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(Suppl 2):25–36.
20. Jordan MR et al. World Health Organization surveys to monitor HIV drug resistance prevention and associated factors in sentinel antiretroviral treatment sites. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(Suppl 2):15–23.
21. Yang C et al. Development and application of a broadly sensitive dried-blood-spot-based genotyping assay for global surveillance of HIV-1 drug resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(9):3158–3164.
22. Buckton AJ et al. Development and optimization of an internally controlled dried blood spot assay for surveillance of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 62(6):1191–1198.
23. *WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2010 (<http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/dbsprotocol.pdf>, consultado el 5 de abril del 2013).
24. Somi GR et al. Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(Suppl 2):77–82.
25. Kamoto K, Aberle-Grasse J, Malawi HIV Drug Resistance Task Force. Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(Suppl 2):83–87.
26. Ziemniak C et al. A sensitive genotyping assay for detection of drug resistance mutations in reverse transcriptase of HIV-1 subtypes B and C in samples stored as dried blood spots or frozen RNA extracts. *Journal of Virological Methods*, 2006, 136(1–2):238–247.
27. Bertagnolio S et al. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antiviral Therapy*, 2007, 12(1):107–113.
28. McNulty A et al. Evaluation of dried blood spots for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(2):517–521.
29. Bertagnolio S et al. Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: a review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS Reviews*, 2010, 12(4):195–208.
30. Johannessen A et al. Dried blood spots perform well in viral load monitoring of patients who receive antiretroviral treatment in rural Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49(6):976–981.
31. Mbida AD et al. Measure of viral load by using the Abbott Real-Time HIV-1 assay on dried blood and plasma spot specimens collected in 2 rural dispensaries in Cameroon. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2009, 52(1):9–16.
32. Brambilla D et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(5):1888–1893.
33. Garrido C et al. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(4):1031–1036.
34. Lofgren SM et al. Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS*, 2009, 23(18):2459–2466.
35. WHO/HIVResNet HIV drug resistance laboratory strategy. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2010 (http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hiv_reslab_strategy.pdf, consultado el 5 de abril del 2013).

Anexo 1

Microscopia y principios que rigen la tinción

A1.1 Introducción

La microscopia proporciona en el caso de las infecciones de transmisión sexual (ITS) una prueba sencilla, rápida y de bajo costo que puede realizarse cerca del paciente (7). Puede ser sensible y específica, es ideal para el cribado o detección sistemática, y suele dar una sospecha diagnóstica que orienta el tratamiento y, en consecuencia, rompe la cadena de transmisión. La interpretación de la imagen microscópica es una habilidad que requiere capacitación, lo que supone un buen conocimiento práctico del microscopio (7).

A1.2 Preparación de los frotis para microscopia

Uno de los requisitos esenciales para una buena técnica de microscopia es una muestra de buena calidad tomada en el sitio conveniente con un hisopo o un asa de siembra adecuados. Es importante que el portaobjetos esté limpio y que la muestra se coloque en el lado correcto si está esmerilado por uno de los lados. En el caso de preparaciones para el examen en fresco, se colocará una cantidad suficiente de la muestra en el portaobjetos con una gota de solución salina de ser necesario y un cubreobjetos colocado cuidadosamente encima. La cantidad de líquido debe ser suficiente para que extienda bajo el cubreobjetos pero sin salirse por los bordes y debe examinarse de inmediato con un objetivo de poco aumento y sin aceite de inmersión. En los frotis para la tinción Gram, la muestra se debe extender uniformemente en todo el portaobjetos y fijarse con calor o con alcohol, teñir bien y examinar con aceite inmersión.

A1.3 Microscopia de transmisión de luz

La clave de la buena microscopia es que el microscopio esté instalado correctamente y sentarse cómodamente junto a la mesa de laboratorio con la espalda apoyada y el ocular a la altura de los ojos. El microscopista debe tener un buen conocimiento de los componentes individuales del microscopio (fig. A1.1). El microscopio debe mantenerse limpio y cubierto cuando no se utilice, y se debe hacer el mantenimiento correspondiente regularmente. Es una práctica correcta alejar la platina

de la lente y usar el aumento más bajo que dé la mejor imagen.

Procedimiento para instalar el microscopio óptico:

1. Encender el microscopio.
2. Bajar la platina, colocar el portaobjetos.
3. Rotar el revólver hasta el objetivo de 10X.
4. Subir la platina sin perderla de vista (pensando en la distancia de trabajo).
5. Ajustar la distancia entre los oculares y enfocar la muestra.
6. Cerrar el diafragma de campo y abrir el condensador completamente.
7. Levantar o bajar el condensador justo hasta el borde del portaobjetos.
8. Rotar los tornillos hasta enfocar la imagen (el borde se verá nítido).
9. Abrir el diafragma de campo (cuidado con la cantidad de luz).
10. Ajustar nuevamente la cantidad de luz para que el examen sea cómodo.
11. Cerrar el diafragma del condensador lentamente hasta que la imagen es nítida y el resplandor desaparezca.
12. Ajustar nuevamente la cantidad de luz de ser necesario.

Definiciones clave

Aumento total: número de veces que se amplía el largo, el ancho o el diámetro, pero no el área, de un objeto.

- a. “Aumento útil” es cuando la imagen es nítida y se distinguen los detalles, generalmente con un máximo de 1000X.



Figura A1.1
Componentes de un microscopio óptico

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH (BASHH).

- b. “Aumento vacío” se produce a una determinada ampliación en la que la nitidez de la imagen se pierde y no se logra distinguir más detalles.

Aumento total = aumento del ocular × aumento del objetivo × aumento del cabezal inclinado. A menudo es mejor usar un aumento inferior para distinguir los detalles del objeto claramente y tener un campo de visión más grande.

Resolución: capacidad de poder distinguir detalles estructurales estrechamente adyacentes como separados y distintos.

Definición: capacidad de una lente para dar un contorno claro y diferenciado de la imagen del objeto.

Diafragma de campo: protege el objeto del exceso de calor y luz que no son necesarios para la formación de imágenes.

Condensador o apertura de diafragma: contribuye a la resolución y el contraste de la imagen. No debe usarse para la regulación de la luminosidad.

Condensador: concentra los rayos luminosos en el objeto. Los instrumentos modernos tienen un “lupa” o lente auxiliar para usar con los objetivos de 20X y más, y evitar así el continuo reajuste de la óptica.

Problemas que pueden aparecer con la microscopía óptica:

- Objeto borroso e incapacidad de conseguir un enfoque claro
 - aceite en el objetivo, que debe limpiarse con el disolvente recomendado,
 - aceite detrás del objetivo, puede ser necesario llamar al fabricante.
 - aceite en las lentes del condensador;
 - portaobjetos humedecido antes de aplicar el aceite;
 - diferentes lotes de aceite pueden haberse mezclado;
 - cubreobjetos demasiado grueso;

- portaobjetos con una extensión mal hecha, demasiado espesa;
- puede que no se haya puesto el lado correcto del portaobjetos;
- cubreobjetos sucio con restos de aceite o marcas de dedos;
- presencia de aceite seco en el portaobjetos.
- Burbujas que se mueven a lo largo del portaobjetos
 - diferentes lotes de aceite pueden haberse mezclado;
 - restos de agua aún en el portaobjetos al aplicar el aceite;
 - formación de burbujas de aire al aplicar el aceite.
- Iluminación desigual
 - el microscopio no se ha instalado correctamente; condensador descentrado;
 - la torreta de lentes puede estar alineada incorrectamente.
- Aparición de artefactos
 - Puede haber polvo en el ocular, las lentes, el portaobjetos o el cubreobjetos, que hay que limpiar con cuidado. en particular para distinguir la fluorescencia artificial de fondo de la fluorescencia específica. Lo mejor es mantener el microscopio y hacer las observaciones en una habitación que pueda oscurecerse.

En la microscopia de fluorescencia, la muestra se tiñe usando un fluorocromo y luego se ilumina con luz de una determinada longitud de onda que excita el fluorocromo de la muestra; la fluorescencia emitida es captada por la lente de los objetivos. Para el propósito general de las ITS, esto puede lograrse con una conexión a un microscopio de transmisión de luz, que contiene una fuente luminosa (lámpara de vapor de mercurio o halógena de tungsteno) y tiene dos filtros especiales: el filtro de iluminación (o excitación), que asegura una iluminación cercana al monocromático y de una longitud de onda correcta; y un segundo filtro de emisión (o de barrera), que asegura que ninguna de las fuentes luminosas de excitación llegue al detector.

La microscopia de fluorescencia puede presentar los siguientes problemas:

- la imagen no es visible o es más oscura de lo previsto si el microscopio no se ha instalado correctamente o la manija del obturador está cerrada (cierre del diafragma);
- la muestra irradia una fluorescencia secundaria o emite autofluorescencia debido a la tinción inespecífica de la muestra o suciedad en la lente del objetivo;
- la imagen se ilumina de forma desigual debido a que los componentes del microscopio no están bien alineados;
- hay resplandor excesivo en el ocular porque faltan los filtros correctos;
- la decoloración rápida de la muestra cuando se está visualizando.

A1.5 Microscopia de campo oscuro

La microscopia de campo oscuro difiere de la de transmisión óptica en que solo los rayos luminosos que inciden sobre los microorganismos o las partículas con un ángulo oblicuo penetran en el objetivo del microscopio, dando lugar a estructuras brillantes, luminiscentes blancas, sobre un fondo oscuro (fig. A1.2). La microscopia de campo oscuro utilizada para la detección de *T. pallidum* en el diagnóstico de la sífilis debe ser realizada por personal bien formado y con experiencia, que sepa ajustar el microscopio correctamente y diferenciar *T. pallidum* de los

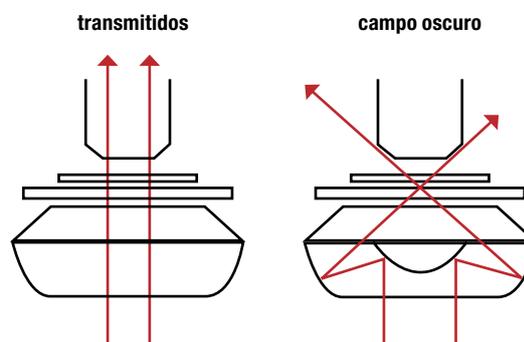


Figura A1.2
Comparación del recorrido de los rayos luminosos de un microscopio de transmisión de luz y uno de campo oscuro.

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica de Salud Sexual y el VIH.

treponemas no patógenos y otras espiroquetas que se hallan generalmente en la mucosa genital y anal. Dado que la cavidad bucal a menudo es colonizada por otras espiroquetas diferentes de los treponemas, no se recomienda el examen con el microscopio de campo oscuro de las muestras procedentes de lesiones bucales.

Procedimiento para usar el microscopio de campo oscuro:

1. Hacer una preparación delgada (capítulo 10) utilizando un portaobjetos y cubreobjetos completamente limpios. Demasiada muestra anulará el efecto.
2. Bajar el condensador y poner una gota de aceite encima de la lente. Se debe evitar que queden burbujas de aire atrapadas.
3. Colocar el portaobjetos en la platina y subir lentamente el condensador hasta que el aceite toque el portaobjetos. Se verá un rápido destello de luz. Se debe tener cuidado de que no se formen burbujas.
4. Enfocar el objeto con un objetivo de poco aumento (10X). Si el condensador está correctamente enfocado, un punto pequeño de luz iluminará el objeto sobre un fondo oscuro. Si se ve un anillo hueco de luz, deberá ajustarse el condensador.
5. Con los tornillos para desplazar la platina, ajustar el condensador hasta que el punto luminoso esté en el medio del campo.
6. Poner una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos y enfocar el objeto con el objetivo inmersión. Si se usa un objetivo con un diafragma iris, puede ser necesario un ajuste leve. Si los objetivos no son par-central (el objeto sigue en el centro del campo cuando se cambia de objetivo), entonces puede ser necesario centrar el condensador.
7. La microscopia de campo oscuro se hace mejor en una habitación sin iluminación.

A veces se presentan los siguientes problemas con la microscopia de campo oscuro:

- El portaobjetos o cubreobjetos son demasiado gruesos.

- La preparación tiene demasiadas burbujas de aire.
- El condensador no está correctamente enfocado o centrado.
- La iluminación puede que no sea suficientemente intensa.
- El campo de visión es demasiado pequeño (abrir el diafragma de campo).
- El centro del campo de visión está oscuro (el portaobjetos es demasiado grueso o el condensador no está en la posición adecuada).

A1.6 Microscopia de contraste de fases

La microscopia de contraste de fases rara vez está disponible o puede utilizarse, pero tiene algunas ventajas cuando se examinan muestras vivas sin teñir porque tienen el mismo índice de refracción que el líquido de montaje y los detalles internos pueden ser difíciles de ver. Se puede considerar que las muestras sin teñir tienen las propiedades de una red de difracción. La luz que atraviesa las distintas partes de la muestra se ve afectada y la fase de los rayos luminosos se modifica levemente, pero el ojo humano no puede percibirlo. Sin embargo, por medios ópticos estas diferencias de fase se pueden hacer visibles como zonas luminosas y oscuras.

Los siguientes componentes son necesarios en la microscopia de contraste de fases:

1. un condensador especial que lleva una serie de diafragmas anulares, el tamaño del anillo varía con la abertura numérica del objetivo usado;
2. objetivos especiales de fase que contienen una placa de difracción (o placa de fase); esta placa consta de un disco de vidrio con una ranura circular de una profundidad tal que la luz que pasa a través de esta porción tiene una diferencia de fase de un cuarto de longitud de onda comparada con el resto de la placa.

Procedimiento para el uso del microscopio de contraste de fases:

1. Preparar un portaobjetos con una muestra delgada, no demasiado abundante, y girar sobre ella el objetivo (los objetivos están marcados como Ph, Phaco o similar). Rotar el anillo en el condensador que sea apropiado para el objetivo colocado.

2. Comprobar que el anillo y la placa de fase están en la posición correcta usando el sistema óptico provisto con el microscopio.
3. Retirar el visor e insertar el sistema óptico. Las imágenes del anillo y la placa de fase deben coincidir. Si no, ajustar con los tornillos macrométrico y micrométrico del condensador.
4. Reemplazar el visor y examinar la muestra.
5. Pueden usarse los objetivos de todos los aumentos siempre que se coloque una placa de fase y que haya un anillo apropiado en el condensador.

En la microscopia de contraste de fase pueden presentarse los siguientes problemas:

- el condensador y el objetivo no se corresponden según el código Ph;
- la placa de fase no está alineada, por lo que es necesario comprobar utilizando el sistema óptico;
- el diafragma de campo no está enfocado sobre la superficie de la muestra, lo que debe solucionarse moviendo el condensador hacia arriba o abajo.

A1.7 Tinción de Gram

Esta tinción fue descrita por primera vez en 1884 por Gram y pone de manifiesto la morfología de las bacterias y los hongos. Según se tiñan, las bacterias se dividen en dos grupos: la que aparecen positivas y las que aparecen negativas. Cada uno de estos grupos se divide a su vez en cocos (esferas) y bacilos (bastones), dando lugar a cuatro grupos. Muchas bacterias que se diferencia muy bien, como *N. gonorrhoeae*, son diplococos gramnegativos, pero es importante recordar que la reacción frente a la tinción de Gram solo da una identificación de sospecha. Se necesitan otros métodos de identificación para clasificar cualquier bacteria. Los hongos aparecen como grampositivos.

A1.7.1 Fundamento de la tinción de Gram

La tinción de Gram refleja diferencias en la estructura de la pared celular bacteriana. Las bacterias grampositivas tienen grandes cantidades de peptidoglicano en la pared celular, que retiene el colorante violeta (fig. A1.3a), mientras que las bacterias gramnegativas tienen una pared celular compleja con menor cantidad de peptidoglicano, por lo que no retiene la tinción violeta sino que toma el colorante de contraste rosado (fig. A1.3b).

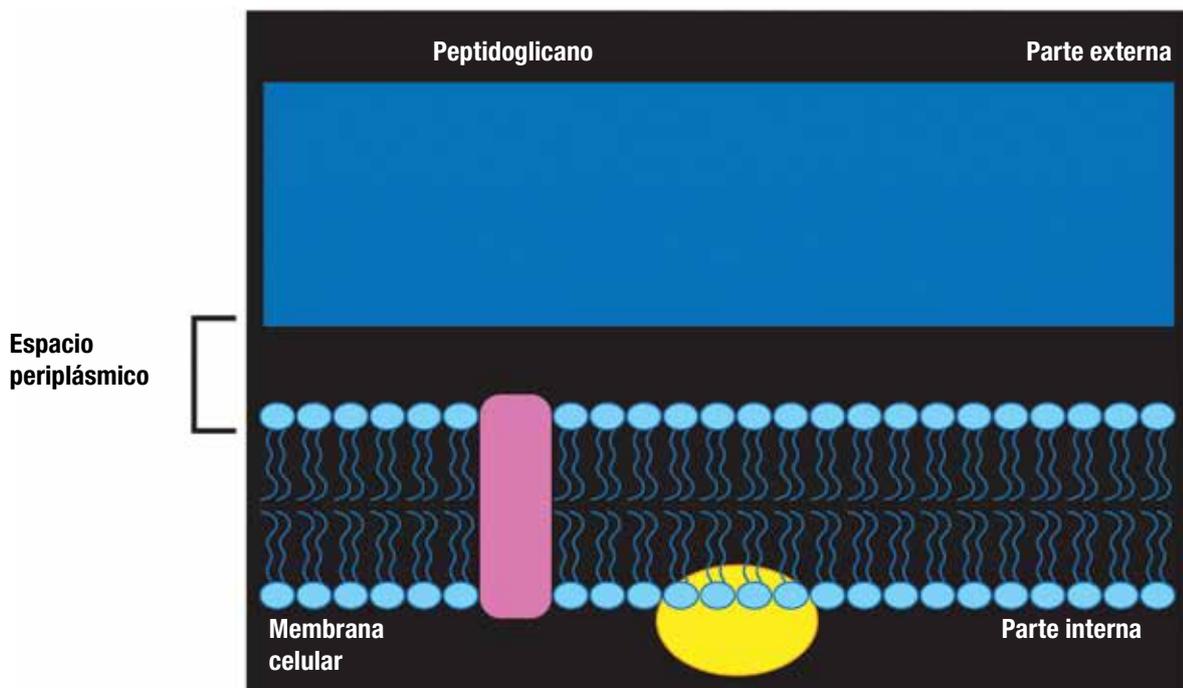


Figura A1.3A
Estructura de la pared celular de una bacteria grampositiva

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica de Salud Sexual y el VIH.

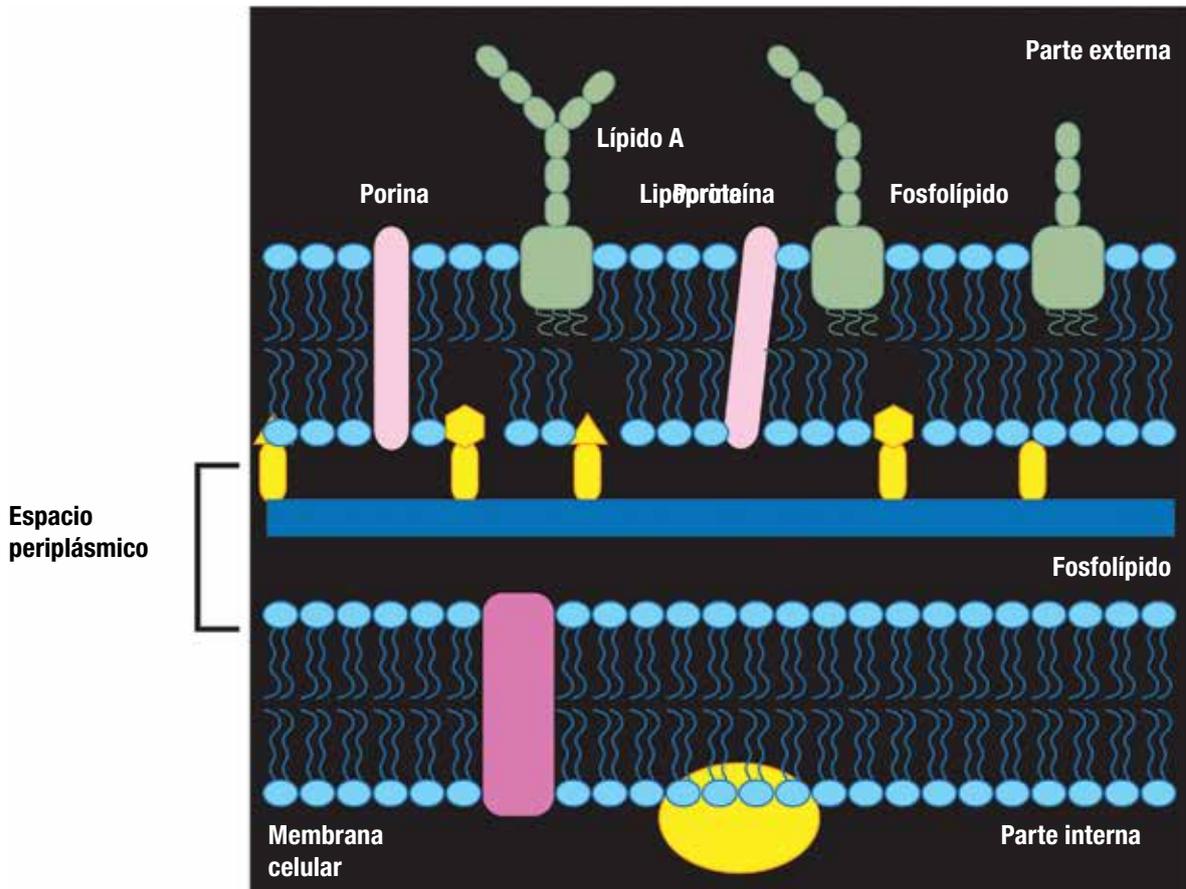


Figura A1.3B
Estructura de la pared celular de una bacteria gramnegativa

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica de Salud Sexual y el VIH.

A1.7.2 Procedimiento de tinción

Un frotis fijado se cubre completamente con cristal violeta durante 30 segundos, en ese tiempo todas las bacterias se tiñen (fig. A1.4). A continuación se lava el frotis suavemente con agua corriente (del grifo) y se cubre de nuevo otros 30 segundos con solución yodoyodurada de Lugol, que actúa como mordiente y fija el colorante violeta a la membrana celular.

Después de lavar con agua, se echa un decolorante para eliminar el exceso de tinción; en este estadio es en el que se arrastra el complejo cristal violeta-yodo de la membrana de celular de las bacterias gramnegativas porque no hay suficiente peptidoglicano para retenerlo. Se usan varios decolorantes, desde el alcohol, que es lento y suave, a la acetona, que es un decolorante fuerte y rápido.

El tiempo que se deja el decolorante en el frotis varía desde unos minutos para el alcohol a solo unos segundos en el caso de la acetona. Es aconsejable mantener el frotis sobre el lavabo y dejar el colorante

correr por el frotis. El complejo violeta se eliminará y tan pronto como deje de salir, se lavará el frotis con agua. En esta etapa es fácil que se produzca una decoloración excesiva del frotis, en particular, si se usa acetona;

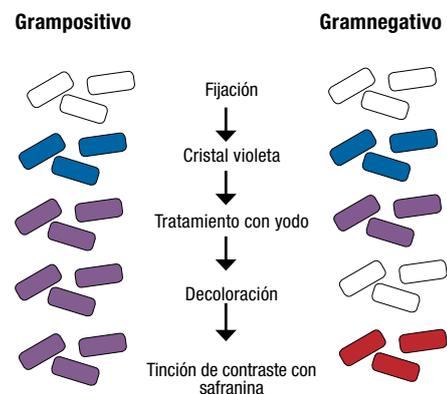


Figura A1.4
Reacción de las bacterias grampositivas y gramnegativas en los diferentes pasos de la tinción de Gram

Fuente: Reimpreso con el permiso de la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH.

muchos laboratorios prefieren utilizar una mezcla de acetona y alcohol (1:1), ya que la velocidad de la acetona se modera levemente con el alcohol.

Después de la decoloración, se cubre el frotis completamente con un colorante de contraste durante aproximadamente 1 minuto, en esta etapa las bacterias gramnegativas se tiñen de rosa. Hay también varios colorantes de contraste: la safranina, rojo neutro y carbol-fucsina. La safranina y el rojo neutro son buenos colorantes para los frotis que contienen polimorfos, ya que estos dan buena definición de la estructura de las células, mientras que la carbol-fucsina es preferible para las bacterias.

Los tiempos individuales de cada colorante pueden variar, pero los tiempos absolutos no son cruciales. Sin embargo, es importante recordar que mientras el primer colorante (cristal violeta) actúa casi instantáneamente, el colorante de contraste tiene un proceso más lento y requiere más tiempo. Es aconsejable dejar la coloración de contraste el doble de tiempo que en el caso del primer colorante.

A1.7.3 Problemas y soluciones

Es muy importante que los colorantes estén correctamente preparados y conservados para conseguir un frotis bien teñido. Los colorantes se comercializan y actualmente es relativamente raro que se preparen a partir del polvo. Sin embargo, aun cuando los colorantes sean comprados, ya sea listos para su uso o concentrados para diluir antes de su uso, es importante conservarlos correctamente. Deben conservarse en frascos limpios y, si los frascos son reutilizables, debe desecharse cualquier resto que haya de colorante y luego enjuagarse con agua antes de rellenarlos. La conservación inadecuada puede dar lugar a depósitos de colorante sobre todo el frotis o adheridos a las células epiteliales, que podrían confundirse con las células clave de la vaginosis bacteriana.

El frotis debe tener un espesor adecuado; un frotis demasiado grueso retendrá el colorante y no se podrá ver la diferencia entre gramnegativos y grampositivos y un frotis que sea demasiado delgado y tenga poco material puede que no sea representativo de la muestra.

La etapa de la decoloración es la más importante de la tinción de Gram y el exceso o defecto de decolorante llevará a una clasificación de las bacterias incorrecta como gramnegativas en lugar de grampositivas, o viceversa.

A1.8 Tinción con azul de metileno

El uso de azul de metileno como único colorante es muy útil en entornos en los que las instalaciones de laboratorio o los recursos son inadecuados para realizar la tinción de Gram. Se pondrá de manifiesto la morfología de los dos tipos de bacterias y de las células que las albergan, pero carecerá de la diferenciación obtenida con la tinción de Gram. El uso principal es en la tinción de los frotis para el diagnóstico provisional de la gonorrea, ya que da una imagen distintiva que tiene un alto valor diagnóstico en los pacientes con riesgo elevado.

A1.9 Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa es una tinción diferencial usada para el diagnóstico de la donovanosis. Es una mezcla de azul de metileno, eosina y azul B y se encuentra comercializada. Preparar un frotis, fijarlo con metanol durante 30 segundos, sumergirlo en tinción de Giemsa al 5% recién preparada durante 20 a 30 minutos, lavar y dejar que se seque.

A1.10 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que se basa en la unión altamente específica de un anticuerpo con el antígeno correspondiente de forma se marcan determinadas proteínas u otras moléculas de la célula. La muestra se trata con un anticuerpo primario específico de la molécula de interés. Se puede conjugar directamente un fluoróforo con el anticuerpo primario. Otra posibilidad es conjugar un anticuerpo secundario con un fluoróforo, que se une específicamente al primer anticuerpo.

A1.11 Salud y seguridad

Se debe nombrar a una persona responsable de la salud y la seguridad en cada lugar de trabajo, ya sean consultorios o laboratorios. Los métodos de tinción deben estar descritos en los procedimientos normalizados de trabajo, que deben actualizarse regularmente y que todo el personal debe haber leído y comprendido cabalmente.

Se debe seguir una serie de normas básicas:

- No comer, fumar ni beber en la zona de laboratorio.
- Proporcionar buena ventilación a la zona de tinción para evitar la inhalación de gases y los riesgos de incendio.

- Usar guantes y batas de laboratorio apropiadas cuando se manipulen los reactivos de las tinciones, ya que se sabe que son tóxicos; algunos colorantes de Gram son cancerígenos.
 - Almacenar los colorantes cuidadosamente para evitar que se derramen.
 - No olvidarse de desechar los portaobjetos y cubreobjetos de los pacientes infectados.
- Guardar el material inflamable en una alacena específica y alejado de cualquier fuente de calor.

A1.12 Referencia

6. British Association for Sexual Health and HIV (BASHH). Microscopy for Sexually Transmitted Infections (<http://www.bsig-resources.org.uk/>).

Anexo 2

Principios que rigen las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención

A2.1 Introducción

En el *Informe sobre la salud en el mundo* del 2004 se citan como razones principales del fracaso de los servicios de salud la falta de asequibilidad y la inaccesibilidad (1). En los países con una gran cantidad de infecciones de transmisión sexual (ITS), a veces no hay servicios de laboratorio para las ITS o, cuando hay alguno, puede ocurrir que los pacientes no tengan acceso físico o no puedan pagar estos servicios. La OMS recomienda recurrir al manejo sindrómico, es decir, tratar al paciente por todas las causas principales de un síndrome particular (2). El manejo sindrómico de las ITS funciona bien en el caso de la secreción uretral, el dolor pélvico y las úlceras genitales, pero las evaluaciones de los diagramas de la OMS han demostrado que el algoritmo para el flujo vaginal carece tanto de sensibilidad como de especificidad para la detección de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres. Se necesitan con urgencia pruebas asequibles, sencillas y rápidas que puedan realizarse en el lugar en el que se presta la atención de salud y faciliten el tratamiento y las decisiones de manejo clínico de casos de estas infecciones. Las pruebas diagnósticas rápidas y sencillas en el punto de atención se necesitan no solo para aumentar la especificidad del manejo sindrómico y reducir el exceso de tratamiento de las infecciones genitales por gonococos y clamidias sino también para la detección sistemática (tamizaje o cribado) de las ITS asintomáticas (3, 4, 5). Según los cálculos realizados con un modelo matemático, una prueba para detectar la sífilis que no requiera ninguna infraestructura de laboratorio podría salvar más de 201 000 vidas y evitaría 215 000 mortinatos cada año en todo el mundo. Una prueba similar podría ahorrar aproximadamente 4 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD), evitar más de 16 millones y medio de nuevas infecciones por clamidias y gonococos y evitar más de 212 000 infecciones por el VIH cada año (6).

Recuadro 1: Criterios de una prueba rápida ideal (ASSURED, por su sigla en inglés)

- A = Asequible
- S = Sensible
- S = Específica
- U = Sencilla (fácil de realizar en unos pocos pasos con la mínima capacitación)
- R = Resistente y rápida (puede almacenarse a temperatura ambiente y los resultados se obtienen en <30 minutos)
- E = Equipo mínimo (solar o con pilas) o sin necesidad de equipo.

A2.2 Características ideales de las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención

Si el diagnóstico puede hacerse en el lugar en el que se presta la atención de salud, se podrá comenzar sin dilación el tratamiento, la asistencia y la notificación a los colegas. En una reunión que tuvo lugar en el 2003 del Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales de la OMS (OMS/TDR), se acuñó la sigla ASSURED (véase el recuadro 1) para definir las características ideales de las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención en cualquiera de los niveles de un sistema de atención de salud (7).

Pruebas rápidas frente a pruebas diagnósticas en el punto de atención

Las pruebas rápidas en general se han definido como las pruebas cuyo resultado se obtiene en <30 minutos. Las pruebas diagnósticas en el punto de atención se

definen como pruebas sencillas que pueden realizarse en todos los entornos de atención de salud, especialmente en establecimientos de salud primaria, con capacitación mínima y sin equipos (o equipos pequeños que funcionan con pilas o energía solar). De siempre, el examen microscópico de la tinción de Gram, el examen en fresco, la determinación del pH, la prueba de Whiff o prueba de aminas y la de la reagina plasmática rápida (RPR) o el test serológico para la sífilis (en inglés TTS o VDRL) han sido consideradas pruebas rápidas y, en principio, pueden proporcionar resultados inmediatos para orientar el tratamiento. Sin embargo, algunas de estas pruebas necesitan electricidad para el funcionamiento del equipo, una centrifugadora o un microscopio, lo que significa que no pueden realizarse en el lugar en el que se presta la atención de salud si no hay una fuente de electricidad. La prueba para detectar la reagina plasmática rápida de la sífilis es un ejemplo. Se realiza en solo 8 a 10 minutos, pero a menudo el análisis es discontinuo (se acumulan varias muestras para analizarlas de una vez) y, por consiguiente, no puede usarse para facilitar el análisis y tratamiento inmediatos. Además, el reactivo de la RPR requiere refrigeración, se necesita una centrifugadora para separar el suero de la sangre entera y un rotador para mezclar los reactivos de la reacción. En consecuencia, la RPR, a pesar de su nombre, no se usa como una prueba rápida ni podría considerarse una prueba diagnóstica en el punto de atención ya que no puede realizarse en entornos en los que no hay electricidad.

Las pruebas diagnósticas rápidas y sencillas en el punto de atención para treponemas, que como su nombre indica son sencillas y rápidas, desarrolladas como tests inmunocromatográficos (TIC) en formato de flujo lateral o de tira reactiva, han demostrado tener un rendimiento aceptable (8). Estas pruebas se realizan en muestras de sangre obtenida por punción en el dedo, se conservan a temperatura ambiente hasta 18 meses, requieren capacitación mínima y el resultado se obtiene en 15 a 20 minutos. En la tabla A2.1 se resumen las diferencias entre dos tipos de pruebas rápidas para el serodiagnóstico de la sífilis.

Hay diversas pruebas rápidas comercializadas para el diagnóstico de las ITS (tabla A2.2). Las infecciones vaginales como la candidiasis, la vaginosis bacteriana o la tricomoniasis pueden diagnosticarse con un microscopio y frotis teñidos con la tinción de Gram o el examen en fresco del flujo vaginal. Sin embargo, a menudo se prescribe un tratamiento empírico con metronidazol a las pacientes con flujo vaginal, ya que los resultados de microscopia para la vaginosis bacteriana, la candidiasis o la tricomoniasis rara vez pueden obtenerse durante la visita de una paciente al consultorio. Las pruebas rápidas que pueden ayudar al diagnóstico de la vaginosis bacteriana son la detección de pH ácido usando un pedazo de papel de pH o el olor a aminas característico tras agregar hidróxido de potasio al flujo vaginal.

Tabla A2.1: Diferencias entre dos tipos de pruebas rápidas, usando como ejemplo las pruebas no treponémicas y las pruebas treponémicas rápidas

Prueba rápida Por ejemplo, prueba de la reagina plasmática rápida no treponémica (RPR)	Prueba rápida en el lugar de atención Por ejemplo, prueba treponémica
Se realiza con suero o plasma (requiere centrifugadora)	Se realiza con sangre entera, suero o plasma
El reactivo debe refrigerarse	Los estuches de las pruebas pueden transportarse y conservarse a temperatura ambiente
Se necesita personal capacitado y equipo (refrigerador, centrifugadora y rotador)	No se necesita ningún equipo y solo una capacitación mínima
Obtención de los resultados en 8 a 10 minutos	Obtención de los resultados en 15 a 20 minutos
Los anticuerpos asociados a una infección reciente pueden usarse para distinguir una infección activa de otra ya tratada y para la prueba de curación.	Los anticuerpos treponémicos persisten durante años; la medida de la exposición no puede usarse para distinguir una infección activa de otra ya tratada.

Dado que la mayoría de los estuches de pruebas rápidas no tienen controles internos de la calidad y se usan generalmente fuera del laboratorio, es fundamental que los programas de control desarrollen programas de garantía de la calidad para asegurar la calidad de la prueba y de los métodos analíticos. Las precauciones especiales cuando se usan estuches de pruebas rápidas se enumeran en el recuadro 2 que figura a continuación.

Recuadro 2: Precauciones con el uso de pruebas rápidas

- **Antes del uso:**
 - Reparar en la fecha de caducidad de los estuches de pruebas rápidas; no usar más allá la fecha de vencimiento.
 - Comprobar que todos los elementos se proveen según se indica en las instrucciones de uso.
 - Observar el aspecto de la caja con el fin de comprobar la integridad de la caja y que los estuches de pruebas no se han dañado en el transporte.
- **Modo de empleo del estuche de pruebas:**
 - Seguir las instrucciones que figuran en el prospecto; no mezclar reactivos de diferentes cajas.
- **Después del uso:**
 - Garantizar la eliminación adecuada de los objetos punzocortantes y otros desechos.

A2.3 Fundamento técnico de las pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención

A2.3.1 Reacciones de aglutinación para detectar antígenos o anticuerpos

A2.3.1.1 Floculación

En la prueba de la reagina plasmática rápida los anticuerpos contra los antígenos no treponémicos, como la cardiolipina, pueden detectarse en las muestras séricas con una reacción antígeno-anticuerpo conocida

como floculación. Se pone una cantidad pequeña de suero en un círculo de la placa, se le agrega una gota de reactivo que contiene la cardiolipina y partículas de carbono, y se remueve o se agita suavemente la mezcla durante 8 minutos. Si la reacción antígeno-anticuerpo es positiva, se forma un retículo en el que se quedan atrapadas las partículas de carbono, tal como se muestra en figura A2.1. Las partículas de carbono ayudan a la visualización de una reacción positiva. Un aspecto homogéneo denota un resultado negativo. Un exceso de anticuerpo en una muestra sérica puede dar lugar a un resultado negativo falso, dado que la estructura reticulada antígeno-anticuerpo característica no puede formarse. Este resultado negativo falso se conoce como fenómeno de prozona.

Algunas pruebas emplean, en vez de las partículas de carbono, el colorante rojo de toluidina para mejorar la visualización de los resultados de la prueba. Dado que la lectura del resultado es subjetiva, es importante que el personal esté adecuadamente capacitado para realizar e interpretar los resultados de la prueba.

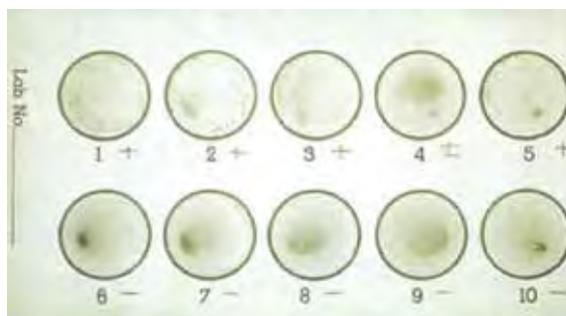


Figura A2.1
Prueba de la reagina plasmática rápida (RPR)

Fuente: Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1999.

A2.3.1.2 Reacción de aglutinación con partículas de látex

Las partículas de látex recubiertas con un antígeno, como los antígenos treponémicos, ofrecen una prueba que puede ser más fácil de interpretar que la prueba de la RPR que usa partículas de carbono. En un círculo de la placa se mezcla una muestra sérica con las partículas de látex recubiertas durante 8 minutos. Si los anticuerpos no treponémicos están presentes en el suero, se

Tabla A2.2: Pruebas rápidas para el diagnóstico de ITS

Pruebas	ITS	Equipo	Costo aproximado (US\$)	Observaciones
Microscopia: <ul style="list-style-type: none"> • Tinción de Gram • Oscuro campo (directo o con anticuerpo fluorescente) • Examen en fresco • Células clave • Puntuación de Nugent 	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Tricomonas vaginalis</i> Candidiasis Vaginosis bacteriana Vaginosis bacteriana	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio • Electricidad 	\$0,50	95% de sensibilidad en infecciones uretrales en hombres sintomáticos, pero <50% en mujeres
pH	Vaginosis bacteriana	Ninguno		
Aminas (KOH)	Vaginosis bacteriana	Ninguno	\$3–6	
Floculación: <ul style="list-style-type: none"> • RPR • VDRL 	Sífilis	<ul style="list-style-type: none"> • Electricidad para el funcionamiento de la centrifugadora y el rotador • Microscopio 	\$0,20	A menudo el resultado no se da el mismo día debido al análisis discontinuo de las muestras
Pruebas rápidas (Tiras inmuno-cromatográficas)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Tricomonas vaginalis</i> Sífilis VIH Virus del herpes simple	ninguno	\$6–20 \$6–20 \$3–5 \$0,50–3,00 \$5–10 \$35	
Detección enzimática	Vaginosis bacteriana (<i>Gardnerella spp.</i>)	ninguno	\$3–6	
PAAN	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos de RCP en tiempo real o ensayos de amplificación isotérmica 	\$15–35	Estos ensayos moleculares nuevos requieren muy poca intervención del usuario y los resultados se obtienen en 15 a 100 minutos

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; KOH: hidróxido de potasio; PAAN: prueba de amplificación de ácidos nucleicos; RCP: reacción en cadena de la polimerasa; RPR: reagina plasmática rápida; ITS: infección de transmisión sexual; VDRL: test serológico para la sífilis (TSS).

producirá una aglutinación con las partículas de látex recubiertas que se verá a simple vista. Una suspensión de aspecto homogéneo denota un resultado negativo. Esta prueba está sujeta a resultados negativos falsos debido al efecto de prozona, similar al de la RPR.

A2.3.2 Pruebas inmunocromatográficas

A2.3.2.1 Formato de flujo lateral

En el diseño de la inmunocromatografía para la detección de anticuerpos, el anticuerpo marcado (conjugado) con un colorante, específico para el antígeno a analizarse (Ag), está presente en la parte inferior de la tira de nitrocelulosa o en un cerco que cubre la tira. El Anticuerpo, específico para otro epítipo presente en el antígeno a analizar, está inmovilizado en la tira en una zona (línea) de detección delgada y el Ac específico para el Ac marcado (conjugado) está unido a la zona (línea) de control. En la figura A2.2A se muestra una representación esquemática de las cuatro etapas de la progresión de una muestra (sanguínea, sérica o plásmica) que contiene anticuerpos treponémicos a través de una tira inmunocromatográfica de flujo lateral. En la etapa 1 la muestra se deposita en el pocillo de muestra, anticuerpos treponémicos, representados por rombos amarillos, que fluyen del pocillo de la muestra a la almohadilla de la zona de muestra. En la etapa 2 los anticuerpos siguen migrando a través de la almohadilla de la zona de conjugado y se unen al antígeno coloidal marcado con oro y forman un complejo oro-antígeno-anticuerpo. En la etapa 3, al cruzar este complejo la zona de detección, se combina con el antígeno inmovilizado en la zona de detección y cuando se acumula suficiente cantidad de antígeno marcado, el colorante marcador se hace visible a simple vista como una banda roja estrecha (línea de detección). En la etapa 4 el conjugado libre es capturado por el anticuerpo inmovilizado en la línea de control y lo vuelve de color rojo.

Si una muestra no contiene anticuerpos treponémicos, fluirá a través de la zona de conjugado y la zona de detección sin que esta aparezca de color rojo. El conjugado libre que fluye con la muestra solo pondrá de color rojo la línea de control. Si una muestra no ha migrado desde el pocillo de muestra, no aparecerá ninguna línea en la zona de detección ni en la zona de control, esto indica que la prueba no es válida.

A2.3.2.2 Pruebas inmunocromatográficas de detección múltiple

Actualmente se encuentran comercializadas pruebas por inmunocromatografía de flujo lateral para determinaciones dobles (VIH y sífilis) o múltiples (VIH, sífilis y hepatitis B o C) que utilizan una única muestra de sangre obtenida por punción en el dedo. Varias de estas pruebas ya forman parte de los estudios o ensayos clínicos. Recientemente se ha evaluado una prueba rápida que puede detectar tanto anticuerpos treponémicos como no treponémicos usando técnicas de doble vía patentadas y se ha visto que tienen un rendimiento aceptable (9). Diversas empresas están desarrollando pruebas sencillas para detectar la sífilis en secreciones bucales y pruebas dobles para sífilis y el VIH (10).

A2.3.2.3 Formato de flujo continuo

En vez de una tira como en el formato de flujo lateral, algunas inmunocromatografías están configuradas según un dispositivo de flujo continuo en el que los antígenos están adsorbidos en un disco de nitrocelulosa. Se deja que el suero o el plasma fluya luego a través de los discos y se lava antes de añadir el conjugado de los marcadores de color que pone de manifiesto los resultados.

A2.3.2.4 Lectores rápidos de pruebas

Hay varios lectores ópticos o escáneres sencillos de bajo costo que se comercializan en la actualidad y se emplean con las inmunocromatografías. El uso de estos lectores elimina el sesgo del observador, aumenta la sensibilidad y permite la cuantificación como en el caso de los títulos de anticuerpos no treponémicos.

A2.4 Tecnologías nuevas

La inmunocromatografía tiene una sensibilidad suficiente para detectar anticuerpos gracias a la gran cantidad de anticuerpos presentes en la sangre, sin embargo, tiende a ser menos sensible para la detección de antígenos. La mayoría de las pruebas rápidas para la detección de infecciones genitales por clamidias y gonococos tienen sensibilidades de solo 50% a 70% en comparación las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

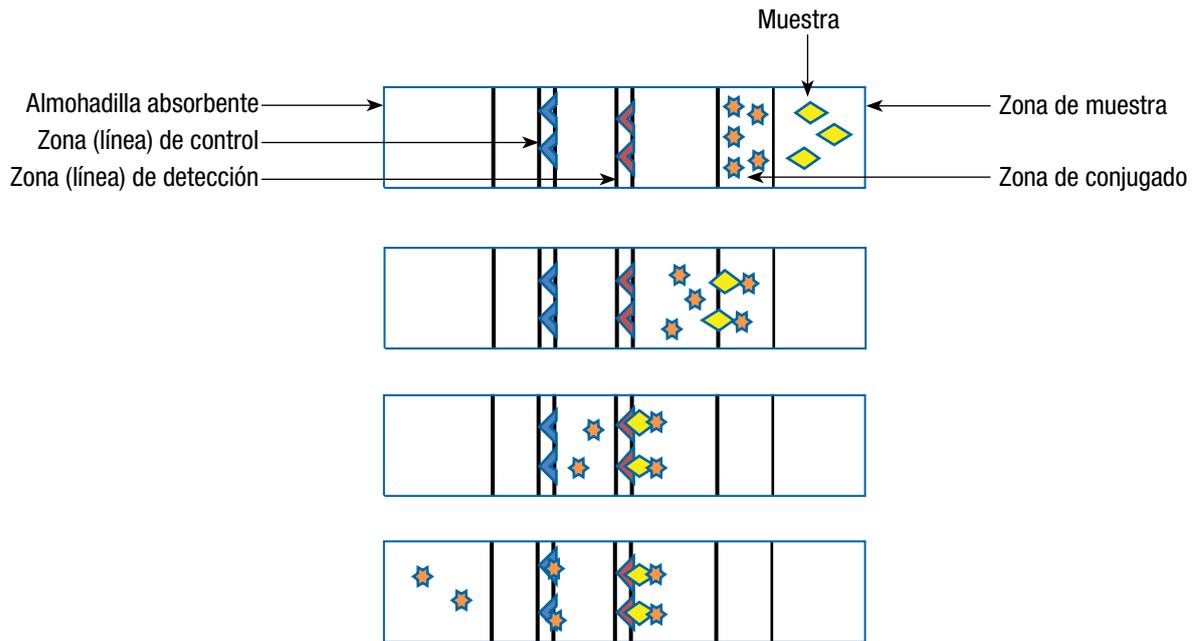


Figura A2.2A
Representación esquemática de una prueba de sífilis positiva en un formato inmunocromatográfico de flujo lateral

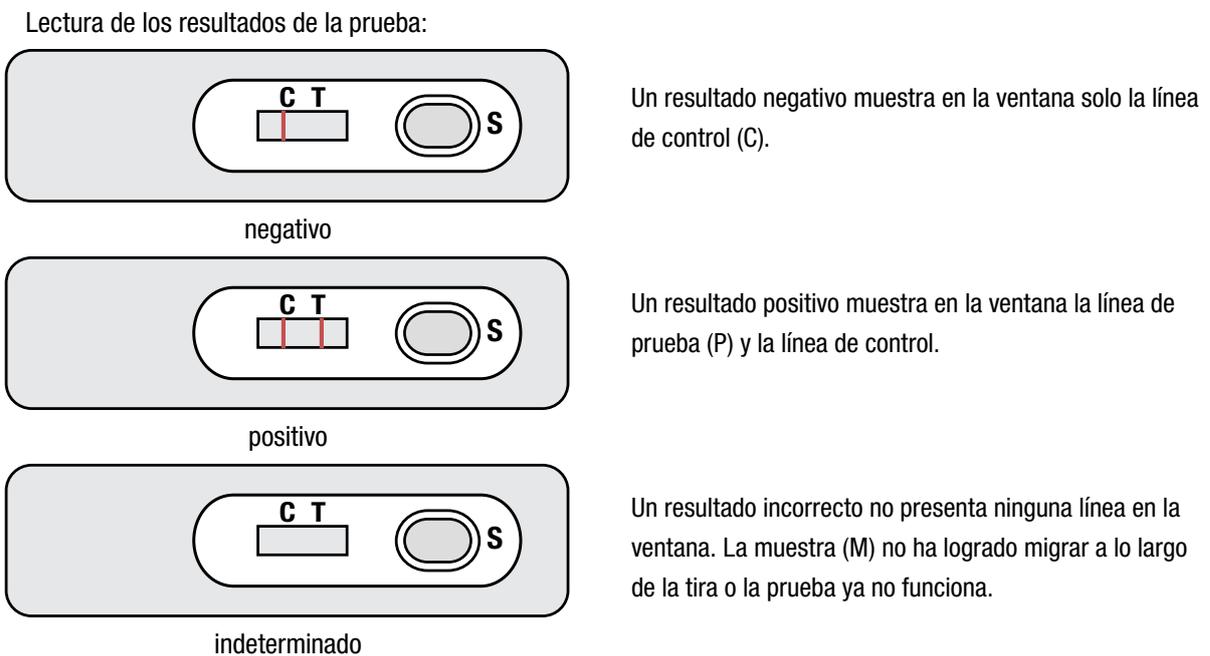


Figura A2.2B
Interpretación de una prueba de flujo lateral para la detección de anticuerpos treponémicos de un paciente con sífilis

A2.4.1 Análisis microfluídico

Se han desarrollado técnicas de análisis microfluídicas que pueden detectar múltiples analitos en una única muestra o pueden reproducir todas las características de desempeño de un inmunoensayo y se han aplicado al VIH y la sífilis (11, 12). La técnica tiene pocas partes móviles y los chips cuestan muy poco, lo que los hace apropiados para los entornos de escasos recursos. Los resultados pueden leerse con un dispositivo pequeño que funciona con una pila. Algunas de estas técnicas ya están usándose ahora en ensayos clínicos en África.

En general, estas técnicas funcionan bien para la detección de anticuerpos en la sangre debido a la abundancia de moléculas diana. Para otras muestras como la orina o las obtenidas con un hisopo, será necesario el procesamiento previo de la muestra antes de introducirla en el cerco. Para la detección de antígenos, el mayor obstáculo es conseguir suficientes moléculas diana en las zonas de detección.

A2.4.2 Ensayos moleculares rápidos

Los avances recientes en los sistemas analíticos o plataformas integradas para la amplificación de ácidos nucleicos han dado lugar a instrumentos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas que son sensibles, específicos, fáciles de usar y la obtención de los resultados se produce poco después de introducir las muestras (13). Esta tecnología es propicia para la detección múltiple de patógenos compatibles con síndromes de ITS graves. El sistema GeneXpert para la detección doble de clamidias y gonococos a partir de una única muestra tiene un rendimiento razonable comparado con el cultivo y la RCP en tanto que patrones de referencia. Puede obtenerse un resultado en menos de dos horas. El analizador permite un acceso libre, lo que lo hace más eficaz en función de los costos si el equipo puede usarse para diferentes enfermedades infecciosas.

Hay algunas técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos prometedoras que son rápidas y fáciles de realizar. Y se están poniendo a punto para la detección de enfermedades infecciosas, como la clamidiosis y la gonorrea.

Amplificación por recombinasa polimerasa (RPA, por sus siglas en inglés): es un ensayo que dura 15 minutos y puede tener la misma sensibilidad y especificidad que la mayoría de las pruebas moleculares más recientes. Es una técnica de acoplamiento isotérmico de cebadores mediante recombinasa con la síntesis posterior de DNA por desplazamiento de cadena. En el ensayo se usan recombinasas capaces de aparear los oligonucleótidos cebadores con las secuencias homólogas en el DNA bicatenario (14). Este ensayo puede lograr una amplificación exponencial a partir de solo unas pocas copias diana sin necesidad de escindir el DNA bicatenario antes de la amplificación. Todos los reactivos requeridos para este ensayo se estabilizan con formulaciones secas y pueden transportarse con total seguridad sin refrigerar. Los resultados se leen con un fluorímetro o visualmente en una tira de flujo lateral.

Amplificación dependiente de helicasa (HDA, por sus siglas en inglés): es un procedimiento de amplificación isotérmico, con un solo tubo, que puede detectar secuencias cortas de DNA (80–120 bp). Los resultados están disponibles en menos de dos horas. Sin embargo, los reactivos deben conservarse a –20 °C.

Amplificación mediante cebadores cruzados (*cross priming* o CPA, por sus siglas en inglés): es un tipo de reacción isotérmica de amplificación de ácidos nucleicos que utiliza múltiples cebadores y sondas, uno o más de estos es un cebador cruzado. La reacción se basa en el uso de una DNA-polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena sin necesidad de un paso inicial de desnaturalización ni adición de enzimas de restricción (15). A la temperatura de ensayo de 63 °C, la formación de un híbrido transitorio cebador-molde, la producción de bucles espontáneos de desnaturalización del DNA molde, está favorecida por la alta concentración de cebadores complementarios que se rehibridan a las cadenas molde. El desplazamiento de la cadena se promueve mediante la hibridación de los cebadores cruzados con extremos 5' que no son complementarios de la cadena molde y por la unión del cebador de desplazamiento en dirección 5' del cebador cruzado. La amplificación exponencial del DNA diana que resulta es sumamente específica y sensible, y produce amplicones a partir de tan sólo cuatro células bacterianas.

Amplificación por círculo rodante (RCA), por sus siglas en inglés) y **amplificación círculo a círculo (C2CA)**, por sus siglas en inglés): son plataformas integradas de amplificación isotérmica con detección electroforética posterior de un gen específico en una micromatriz genética (microchip) de poli(metil metacrilato) (16). La RCA y la C2CA se llevan a cabo a 37 °C en el pocillo de muestra de la micromatriz y proporciona un método para la amplificación de señales que es sensible, rápido, de capacidad analítica ultrarrápida y reproducible.

El progreso rápido en las tecnologías de secuenciación, como la tecnología de detección de nanoporos, ha permitido llevar a cabo amplios barridos del genoma rápidamente y a un costo relativamente bajo. Estas tecnologías pueden aplicarse a la detección de los genes que confieren resistencia gonocócica.

A2.5 Referencias

- Devarajan S, Reinikka-Soininen R, World Bank. *Making services work for poor people: world development report 2004*. Nueva York, Oxford University Press para el Banco Mundial, 2003.
- Guidelines for the management of sexually transmitted infections*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2003.
- Peeling RW et al. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? *Nature Reviews. Microbiology*, 2006, 4(12):909–921.
- Peeling RW et al. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. *Sexually Transmitted Infections*, 2006, 82(Suppl 5):v1–6.
- Peeling RW. Applying new technologies for diagnosing sexually transmitted infections in resource-poor settings. *Sexually Transmitted Infections*, 2011, 87(Suppl 2):ii28–30.
- Aledort JE et al. Reducing the burden of sexually transmitted infections in resource-limited settings: the role of improved diagnostics. *Nature*, 2006, 444(Suppl 1):59–72.
- Kettler H, White K, Hawkes S. *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections*. WHO/TDR publication. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2004.
- Mabey D et al. Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis. *Sexually Transmitted Infections*, 2006, 82(Suppl 5):v13–16.
- Castro AR et al. Novel point-of-care test for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(12):4615–4619.
- Tucker JD, Bien CH, Peeling RW. Point-of-care testing for sexually transmitted infections: recent advances and implication for disease control. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2013, 26(1):73–79.
- Sorger PK. Microfluidics closes in on point-of-care assays. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(12):1345–1346.
- Chin CD et al. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nature Medicine*, 2011, 17(8):1015–1019.
- Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(5):240–250.
- Piepenburg O et al. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, 2006, 4(7):e204.
- Xu G et al. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Scientific Report*, 2012, 2:246.
- Mahmoudian L et al. Rolling circle amplification and circle-to-circle amplification of a specific gene integrated with electrophoretic analysis on a single chip. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(7):2483–2490.

Anexo 3

Principios que rigen las pruebas moleculares para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual

A3.1 Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) pueden ser causadas por virus, bacterias o parásitos, y no es raro que se produzcan coinfecciones. Las muestras clínicas para el análisis de las ITS se obtienen de diversas zonas del organismo —usando para ello diferentes dispositivos y técnicas—, así como en distintos entornos en los que hay grandes variaciones en lo que respecta al transporte y a la conservación de las muestras, así como diversos recursos para el diagnóstico de las ITS. En consecuencia, para lograr un eficaz diagnóstico de laboratorio de las ITS en todo el mundo, existen muchos métodos, y su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para analizar una sola infección o ITS muy diversas pueden diferir significativamente. Entre los métodos de laboratorio tradicionales para detectar los microorganismos causales de las ITS se encuentran el cultivo bacteriológico y el cultivo de tejidos, diversos análisis serológicos para detectar la presencia de anticuerpos específicos, la inmunohistoquímica, la detección de antígenos y la microscopía. Al igual que ocurre con el diagnóstico de muchas otras enfermedades infecciosas, la detección directa de ácidos nucleicos específicos de los microorganismos patógenos que causan las ITS mediante diferentes pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN) se ha convertido en la prueba de referencia en el diagnóstico de muchas ITS, ya que su sensibilidad y su especificidad son superiores. Muchas de las PAAN han recibido la autorización de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) o de otras instancias normativas internacionales, nacionales o regionales, y se comercializan. Sin embargo, también es popular el uso de ensayos desarrollados en el laboratorio que utilizan métodos de detección basados en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) convencional o en la RCP en tiempo real (RCP simultánea) para el diagnóstico de las ITS, especialmente en el campo de la investigación y la epidemiología. Hoy en día, para el diagnóstico de las

ITS se utilizan muchas PAAN comercializadas e incluso PAAN con sondas únicas o múltiples sondas (múltiple) desarrolladas en el laboratorio. En el caso de que se utilicen PAAN no autorizadas por la FDA, deben existir procesos normativos internacionales —como los de la Unión Europea— u otros procesos normativos nacionales que garanticen la calidad y el rendimiento de dichas PAAN. Para el diagnóstico de las ITS, se recomienda usar solo PAAN aprobadas internacionalmente. Si ello no fuera posible, es esencial que la PAAN propuesta haya sido estrictamente validada antes de utilizarla conforme a las normas locales. La evaluación debe hacerse comparándola al menos con una PAAN aprobada internacionalmente, y el ensayo se utilizará después con los controles positivo, negativo y de inhibición apropiados. Por otra parte, es muy recomendable la participación en un sistema de evaluación externa de la calidad (EEC) apropiado.

En muchos casos, se prefiere usar las PAAN antes que los métodos diagnósticos convencionales, debido a su sensibilidad y especificidad superiores, a su menor tiempo de respuesta, a su gran rendimiento y a la posibilidad de automatización, de análisis simultáneo de varias dianas y de cuantificación. Debido a su gran sensibilidad, las PAAN son también efectivas en la detección de microorganismos en caso de infecciones asintomáticas o en una fase temprana de la infección (antes de la seroconversión), y pueden aplicarse a muestras obtenidas por el propio sujeto y de manera incruenta, como las muestras vaginales y las muestras de orina de la primera parte de la micción.

El diagnóstico molecular de las ITS mediante pruebas basadas en los ácidos nucleicos es muy sólido, pero presenta algunas limitaciones. Una de las ventajas de las PAAN es su capacidad de detectar microorganismos

patógenos sin necesidad de que estos estén vivos, lo que hace que el transporte y la conservación de las muestras no sean tan cruciales; sin embargo, esto también constituye uno de sus puntos débiles (por ejemplo, las cepas aisladas no están disponibles para realizar posteriormente el antibiograma o para otro tipo de caracterización fenotípica). En consecuencia, las PAAN detectan el ácido nucleico de microorganismos muertos y vivos, por lo que no son apropiadas como prueba de curación, a no ser que se haya dejado pasar suficiente tiempo para que los microorganismos residuales, así como los ácidos nucleicos, se eliminen del huésped infectado antes de obtener una muestra para la prueba de curación. Además, la estrecha relación genética entre el microorganismo en cuestión y especies estrechamente relacionadas —por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria spp.* comensal— puede dar lugar a resultados positivos falsos (1, 2). También pueden obtenerse resultados negativos falsos debido a una variación de la secuencia o a una supresión de la secuencia diana específica en el microorganismo que debe detectarse a causa de una mutación, como la nueva variante sueca de *Chlamydia trachomatis* (nvCT) (3, 4). El futuro inmediato del diagnóstico molecular de las ITS debe centrarse en validar y autorizar el uso de diferentes ensayos en muestras rectales y faríngeas, y en la expansión de la ciencia de los microfluidos y la nanotecnología actuales que permita integrar la obtención, estabilización y manipulación de las muestras, así como el desarrollo de procesos de análisis que dé lugar a sistemas asequibles, completamente automatizados, de gran rendimiento y fácil utilización. En los países desarrollados, las aplicaciones en el punto de atención pueden ser centro de la expansión del catálogo de detección de microorganismos patógenos causantes de las ITS, la incorporación de la detección cuantitativa y el establecimiento de la tipificación molecular o la detección de marcadores de la resistencia a los antimicrobianos en un solo ensayo de multiplexado. En los países de recursos limitados, las necesidades más importantes sobre el terreno son una instrumentación asequible y sostenible con procesos de análisis simplistas, menor tiempo de manipulación y un sistema cerrado para reducir el riesgo de contaminación, capacidad analítica y reactivos de las pruebas que sean económicos.

En teoría, una PAAN diseñada adecuadamente puede detectar con gran especificidad incluso una sola diana en una muestra. Sin embargo, para alcanzar este nivel de límite de detección se requieren procesos prolongados de optimización de la PAAN. Por otra parte, en la sensibilidad analítica de las PAAN pueden influir diversos factores, como factores inherentes de cada muestra clínica —inhibidores, tipo de muestra, número de copias de la secuencia diana—, así como la tecnología de extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos que se utilice. Existen cinco etapas cruciales en las pruebas basadas en los ácidos nucleicos: obtención de la muestra; estabilización, conservación y transporte de la muestra; extracción y purificación de ácidos nucleicos; amplificación y detección. Todas las etapas tienen una importante relación con la calidad y la fiabilidad de los resultados de las pruebas de laboratorio. Para que una PAAN diagnostique satisfactoriamente las ITS, es preciso obtener de manera adecuada una muestra clínica de la zona anatómica apropiada, y los ácidos nucleicos de las dianas deben estabilizarse en el medio de transporte para su conservación y traslado. En el laboratorio, es crucial contar con un sistema eficiente de extracción y purificación de ácidos nucleicos para preparar la muestra, a fin de producir una plantilla de RCP pura que esté libre de nucleasas e inhibidores contaminantes. Posteriormente, es esencial una PAAN adecuadamente diseñada y optimizada para lograr una amplificación eficiente de modo que se produzcan suficientes amplicones de RCP; por último, pero no por eso menos importante, es preciso contar con una estrategia de detección adecuada para producir señales de positividad claras e intensas y señales evidentemente negativas en caso de negatividad. Se considera que la complejidad del proceso de realización de la PAAN es media o alta, y generalmente es necesario contar con personal adecuadamente capacitado y laboratorios sofisticados.

La gran sensibilidad de las PAAN puede ser problemática, dado que incluso un grado de contaminación muy bajo puede dar lugar a resultados positivos falsos. La posibilidad de contaminación, que es la principal preocupación de muchos laboratorios de diagnóstico molecular, afecta prácticamente a todas las etapas del procesamiento basado en los ácidos nucleicos. En algunos métodos, la adición

Cuadro A3.1: Ejemplos de pruebas comercializadas para el diagnóstico de las ITS basadas en ácidos nucleicos (junio del 2012)

Microorganismos analizados	Tecnología	Empresa
<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT), <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG) o ambas (CT/NG)	RCP TMA-HPA CH (sonda de DNA) RCP en tiempo real SDA CH (sonda de RNA)	Roche, Cepheid Gen-Probe Gen-Probe Abbott, Roche, Siemens Becton, Dickinson Qiagen
VIH	RT-RCP RCP en tiempo real RCP en tiempo real NASBA RCP en tiempo real RT-RCP bDNA	Roche Abbott bioMérieux National Genetics Institute Siemens
Genotipado del VIH	Secuenciación Secuenciación	Siemens Abbott
PVH	RCP en tiempo real TMA-HPA CH RCP	Abbott Gen-Probe Qiagen Roche
Genotipado del PVH	RCP RCP-hibridación en línea	Roche Innogenetics
VHB	RCP en tiempo real RCP en tiempo real bDNA CH	Roche Abbott Siemens Qiagen
Genotipado del VHB	Secuenciación	Siemens
VHC	RCP en tiempo real RT-RCP RCP en tiempo real RT-RCP bDNA	Roche Abbott National Genetics Institute Siemens
Genotipado del VHC	RT-RCP	Abbott
VHS	RCP en tiempo real RCP en tiempo real RCP en tiempo real RCP en tiempo real SDA Amplificación isotérmica dependiente de helicasa	Abbott Roche Qiagen EraGen Biosciences Becton, Dickinson BioHelix

Cuadro A3.1: Ejemplos de pruebas comercializadas para el diagnóstico de las ITS basadas en ácidos nucleicos (junio del 2012). (continuación)

Microorganismos analizados	Tecnología	Empresa
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TMA-HPA	Gen-Probe
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> y <i>Mycoplasma genitalium</i>	RCP	Bio-Rad Laboratories
<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>T. vaginalis</i> y <i>Candida spp.</i>	Hibridación de sondas de DNA	Becton, Dickinson

bdNA: ensayo de hibridación de DNA ramificado; CH: captura de híbridos; HPA: ensayo de protección de la hibridación; PVH: papilomavirus humano; VHS: virus del herpes simple; NASBA: amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico; RCP: reacción en cadena de la polimerasa; RT-RCP: RCP con transcripción inversa; SDA: amplificación por desplazamiento de cadena; TMA: amplificación mediada por transcripción; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

de una enzima, como la uracilo N-glicosilasa, a la preparación de mezcla de componentes de la RCP ayuda a reducir la contaminación remanente por amplicones mediante la degradación de estos, pero no impide la contaminación del DNA genómico directamente de muestra a muestra. Así pues, los requisitos previos para lograr una PAAN satisfactoria son las buenas prácticas de laboratorio molecular, un flujo de trabajo unidireccional, salas separadas para la extracción de ácidos nucleicos de las muestras, la preparación de mezcla de componentes de la RCP y el análisis. Otra alternativa para reducir la posibilidad de contaminación es utilizar un sistema cerrado y robótico, como en muchas plataformas comerciales para la realización de pruebas diagnósticas de las ITS. Aparte de la obtención de muestras en el correspondiente medio de transporte patentado, las restantes etapas del proceso de PAAN están completamente automatizadas, lo que elimina las laboriosas etapas de procesamiento de muestras. Sin embargo, la complejidad de la prueba molecular, la necesidad de equipo sofisticado y a menudo caro, los costosos estuches de las PAAN, así como la necesidad de contar con técnicos experimentados, pueden constituir un obstáculo para los laboratorios con pocos recursos.

Al momento de redactarse este anexo (junio del 2012), existían dos categorías principales de tecnologías diagnósticas para la identificación de las ITS mediante métodos moleculares. Una categoría (tecnologías de ácidos nucleicos amplificados, como las PAAN), la más utilizada, se basa en la amplificación de ácidos nucleicos específicos (DNA o RNA) del microorganismo diana

para dar lugar a suficientes productos amplificados que deben convertirse, mediante diferentes tecnologías, en señales de detección. La segunda categoría (tecnología basada en ácidos nucleicos sin amplificar) utiliza sondas de ácidos nucleicos sin amplificar (por ejemplo, marcados con enzimas) que se hibridan directamente a la plantilla deseada; posteriormente, a través, por ejemplo, de reacciones entre enzima y sustrato, se amplifican y detectan las señales. Las tecnologías basadas en ácidos nucleicos sin amplificar suelen ser menos caras, y la sensibilidad analítica supera a la de los métodos diagnósticos convencionales, como el cultivo o los enzimoanálisis (EIA), si bien su sensibilidad es sustancialmente inferior a las de las tecnologías de amplificación. En el **cuadro A3.1** se enumeran algunas de las pruebas diagnósticas basadas en ácidos nucleicos para el diagnóstico molecular de las ITS que estaban en el mercado cuando se redactó este anexo.

A3.2 Tecnologías de ácidos nucleicos amplificados

Las PAAN son las pruebas de diagnóstico molecular más sensibles y a la vez complejas y, por lo general, tienen un rendimiento superior en lo que se refiere a la sensibilidad, en comparación con las pruebas directas basadas en sondas (sin amplificar), así como las demás clases de pruebas diagnósticas. Algunas de las primeras PAAN para el diagnóstico de las ITS se han automatizado parcialmente para reducir los requisitos laborales, pero siguen teniendo el riesgo de contaminación. Actualmente, las plataformas de análisis de segunda generación que se encuentran en el mercado cuentan

Cuadro A3.2: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (junio del 2012)

Tecnología	Empresa	Prueba isotérmica	Diana	Enzimas
RCP	Roche	No	DNA	DNA-polimerasa
RCP en tiempo real	Abbott, Roche	No	DNA	DNA-polimerasa
TMA	Gen-Probe	Sí	RNA	Retrotranscriptasa y RNA-polimerasa
SDA	Becton, Dickinson	Sí	DNA	DNA-polimerasa y endonucleasa de restricción
NASBA	bioMérieux	Sí	RNA	Retrotranscriptasa, RNasa H, RNA-polimerasa

NASBA: amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico; RCP: reacción en cadena de la polimerasa; SDA: amplificación por desplazamiento de cadena; TMA: amplificación mediada por transcripción.

con módulos de procesamiento de muestras mejorados y están completamente automatizadas para lograr un diagnóstico molecular sumamente eficiente y libre de contaminación, así como el tamizaje a gran escala. Los sistemas comerciales de diagnóstico molecular basados en la amplificación se han centrado principalmente en ensayos para la detección de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, el virus del herpes simple (VHS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de los papilomas humanos (VPH). Además de la detección cualitativa de virus, la cuantificación de la carga viral en muestras clínicas tiene gran valor, y está disponible para hacer el diagnóstico, establecer el pronóstico y hacer la vigilancia del efecto del tratamiento de la infección por el VIH, el VHB y el VHC. En el **cuadro A3.2** se indican algunas de las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos disponibles en el mercado y se muestran las empresas que comercializan estas pruebas, sean o no isotérmicas, así como el tipo de diana y las enzimas que utilizan. Como ya se ha mencionado, uno de los principales puntos fuertes de estos ensayos amplificados sumamente sensibles es su capacidad de analizar tipos de muestras obtenidos de forma incruenta, como las muestras de orina de la primera parte de la micción y muestras vaginales, que pueden obtener los propios pacientes. El uso satisfactorio de ensayos amplificados con multiplexado y de tipos de muestras obtenidos de forma incruenta ha facilitado enormemente el proceso de tamizaje, algo que es particularmente importante ya que la mayoría de las ITS son asintomáticas y su detección depende del tamizaje de poblaciones que normalmente no se

someterían a análisis de utilizar estrategias tradicionales. Ahora se dispone de alternativas, como la obtención domiciliar de muestras para los programas de tamizaje fuera de los consultorios de ITS o de los consultorios de planificación familiar, cuando no se necesita una muestra obtenida por el médico. La orina de la primera parte de la micción o las muestras vaginales obtenidas por los propios pacientes son más que aceptables para los programas de detección sistemática de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* cuando se utilizan con tecnologías de ácidos nucleicos amplificados. La obtención incruenta de muestras diagnósticas puede constituir un medio para llegar a personas sexualmente activas que deberían someterse al tamizaje de las ITS pero carecen de un acceso adecuado a la atención de salud o temen las exploraciones ginecológicas. También puede ahorrar costos cuando no es preciso que el médico realice exploraciones ginecológicas onerosas.

A3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

La RCP se desarrolló en 1983 (5, 6) y a menudo se la considera uno de los más importantes avances científicos en los campos de la biología y la medicina. Actualmente es una técnica fundamental y a menudo indispensable, ampliamente usada en biología molecular, microbiología, diagnóstico clínico y muchas otras aplicaciones.

El nombre RCP proviene de la DNA-polimerasa utilizada para amplificar una secuencia específica de DNA mediante replicación enzimática in vitro. La fase inicial de calentamiento (por lo general a 94 °C a 95 °C)

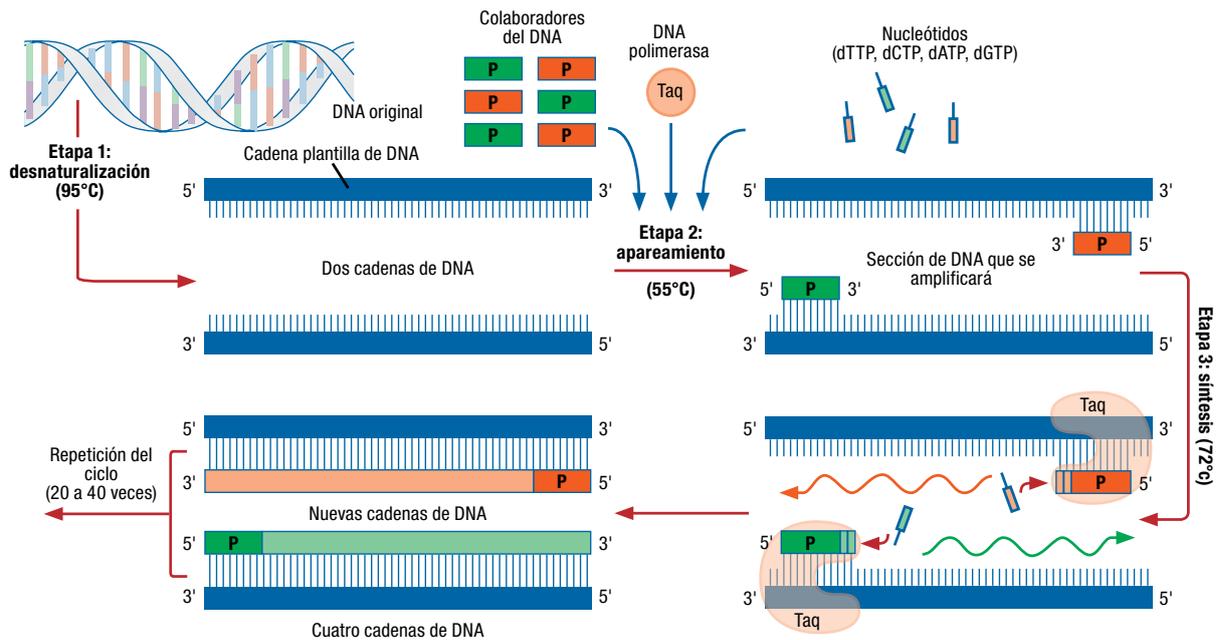


Figura A3.1

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP): un proceso de tres etapas

Fuente: Por cortesía de Encyclopædia Britannica, Inc. (<http://www.britannica.com/EBchecked/media/18071/The-three-step-process-of-the-polymerase-chain-reaction>; consultado el 23 de junio del 2013).

desnaturaliza el DNA bicatenario (dsDNA) diana original y da lugar a dos cadenas de DNA complementarias, lo que permite que los cebadores se apareen a menor temperatura (dependiendo del cebador) con sus secuencias complementarias, flanqueando la secuencia específica que debe amplificarse. A continuación, la extensión (generalmente a 72 °C) de los cebadores es catalizada por una DNA-polimerasa termoestable (como la Taq DNA-polimerasa), que sintetiza dos nuevas cadenas de DNA usando trifosfodesoxirribonucleósidos (dNTP) y las cadenas originales como plantillas. Este proceso (figura A3.1) da lugar a la duplicación de la secuencia del DNA diana original, y cada una de las nuevas moléculas contiene una hebra antigua de DNA y una nueva. Posteriormente, cada una de estas cadenas puede usarse para crear dos nuevas copias, y así sucesivamente. Numerosos ciclos repetitivos de desnaturalización, apareamiento y extensión pueden traducirse en una acumulación exponencial de un fragmento de DNA específico. Estos ciclos de RCP de tres etapas pueden repetirse hasta 30 o 40 veces, dando lugar a millones de copias de la secuencia de DNA diana original. Todo el proceso cíclico de la RCP está automatizado, es programable y puede finalizarse en apenas unas pocas horas. Se lleva a cabo en un

aparato denominado termociclador, que está equipado con elementos o ventiladores para calentar o enfriar a fin de alterar rápidamente la temperatura y así permitir la desnaturalización del DNA, el apareamiento de los cebadores y la extensión. Es importante señalar que el mantenimiento apropiado y la verificación de las temperaturas y la duración de la rampa de los termocicladores son fundamentales para conseguir resultados de gran calidad y reproducibles.

La tecnología de RCP ha revolucionado la detección y la caracterización de microorganismos que provocan enfermedades infecciosas, incluidos los que causan las ITS. Tradicionalmente, los amplicones específicos producidos por RCP se detectaban mediante electroforesis en gel teñido con bromuro de etidio. Otros métodos de detección de amplicones son el uso de sondas de captura y detección (marcadas, por ejemplo, con enzimas o moléculas fluorescentes) en formato de micropocillos, y la determinación del tamaño de los productos de la RCP usando un aparato Genetic Analyzer (Applied Biosystems) o un Bioanalyzer (Agilent). Para ampliar el uso y los beneficios de la técnica de RCP original se han hecho numerosas modificaciones y adaptaciones, entre las que se encuentran las

siguientes técnicas: RCP anidada, RCP con gradiente decreciente de temperatura, RCP de inicio en caliente, RCP por retrotranscriptasa (RT) (para dianas de RNA), RCP asimétrica, RCP digital, RCP múltiplex, RCP semicuantitativa y RCP cuantitativa en tiempo real.

A3.2.2 RCP en tiempo real

El principio de la RCP en tiempo real es idéntico al de la RCP convencional salvo en que los procesos de amplificación y detección se combinan para permitir el control de la amplificación de la RCP a medida que ocurre, en tiempo real; la RCP convencional solo puede hacer mediciones finales, es decir, detectar o visualizar los productos de la RCP tras finalizar la amplificación. El avance más importante del diseño de una RCP en tiempo real es la incorporación de una tecnología de detección basada en la fluorescencia que utiliza colorantes de unión al DNA bicatenario (dsDNA) o sondas marcadas con moléculas fluorescentes específicas (como sondas hidrolizables, de hibridación o conformacionales, balizas moleculares) para permitir no solo la detección de la diana de ácido nucleico específica, sino también la cuantificación de la diana (Q-RCP). Además, la RCP en tiempo real integra y automatiza la amplificación y la detección en un solo equipo, lo que a menudo requiere menos tiempo y trabajo para obtener resultados, en comparación con la RCP convencional. Otras ventajas de la RCP en tiempo real son el uso de secuencias diana más cortas (<150 bp), la necesidad de un menor volumen de muestras, un intervalo de detección dinámico más amplio, mayor sensibilidad y especificidad analítica, la capacidad de multiplexado y el análisis de las curvas de fusión, así como el hecho de que no se requiera la manipulación posterior a la RCP.

Para controlar la amplificación durante la RCP en tiempo real, se usan moléculas indicadoras fluorescentes (fluoróforos) para generar señales de fluorescencia. La mayoría de los sistemas de RCP en tiempo real usan una matriz fija de un dispositivo emisor de luz para la excitación de la fluorescencia y una cámara con un dispositivo de carga acoplada o un tubo fotomultiplicador con filtros adecuados para detectar la fluorescencia. El aumento de la señal fluorescente es directamente proporcional al número de amplicones de RCP generados en la fase exponencial de la reacción. La línea de

base de una RCP en tiempo real es el nivel de la señal durante los 5 a 15 ciclos iniciales, en los que la señal fluorescente cambia poco, mientras que el umbral es el nivel de señal que refleja un aumento significativo respecto a la señal inicial calculada. El umbral puede establecerse automáticamente mediante el programa informático del equipo o bien lo puede establecer manualmente el usuario. El umbral de ciclos (Ct) es el número de ciclos de RCP en los que la señal fluorescente de la reacción supera el umbral. En consecuencia, la presencia de un umbral de ciclos refleja la acumulación de un número suficiente de amplicones para considerar que la reacción es positiva, y el umbral de ciclos está inversamente relacionado con la cantidad de plantilla inicial. Los datos de la RCP en tiempo real suelen mostrarse en un gráfico con el número de ciclos de RCP en comparación con la intensidad de la fluorescencia, que se relaciona con el número de plantillas iniciales. En la **figura A3.2** se muestra una curva característica de amplificación de la RCP en tiempo real.

Dos métodos frecuentes para detectar productos de amplificación en la RCP en tiempo real son: la detección inespecífica usando colorantes fluorescentes que se intercalan con cualquier DNA bicatenario, como SYBR Green; y la detección específica mediante sondas fluorescentes específicas de las dianas, como la sonda

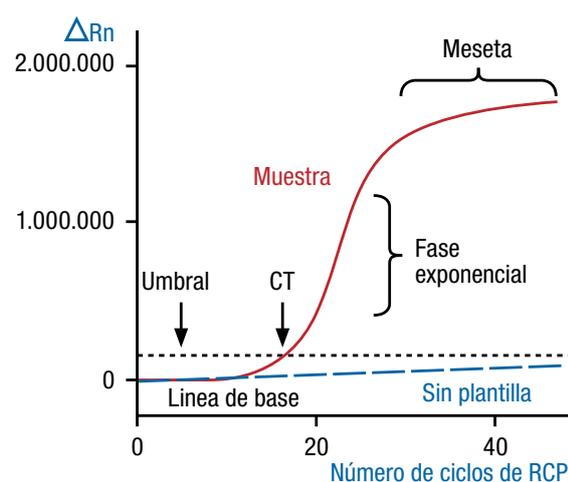


Figura A3.2
Curva característica de amplificación de la RCP en tiempo real

Fuente: Por cortesía del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>); consultado el 23 de junio del 2013).

TaqMan (sonda hidrolizable), balizas moleculares o sondas de hibridación dobles. SYBR Green es probablemente el colorante de unión al DNA bicatenario que más se utiliza en la RCP en tiempo real. En la solución, las moléculas de colorante no unidas muestran una fluorescencia muy escasa, pero la fluorescencia aumenta significativamente cuando se unen al DNA bicatenario. A medida que el DNA bicatenario se acumula, SYBR Green genera señales que son proporcionales a la concentración del DNA diana (fig. A3.3A). Se considera que esta tecnología no tiene

gran especificidad, debido a que el colorante se une indiscriminadamente a todos los DNA bicatenarios que se forman durante la RCP y, en consecuencia, cualquier producto espurio de la amplificación puede contribuir también a las señales fluorescentes generales. Sin embargo, la amplificación que usa colorantes de unión al DNA bicatenario puede someterse a análisis de las curvas de fusión para diferenciar los productos de la RCP específicos e inespecíficos mediante los picos de fusión (fig. A3.3B).

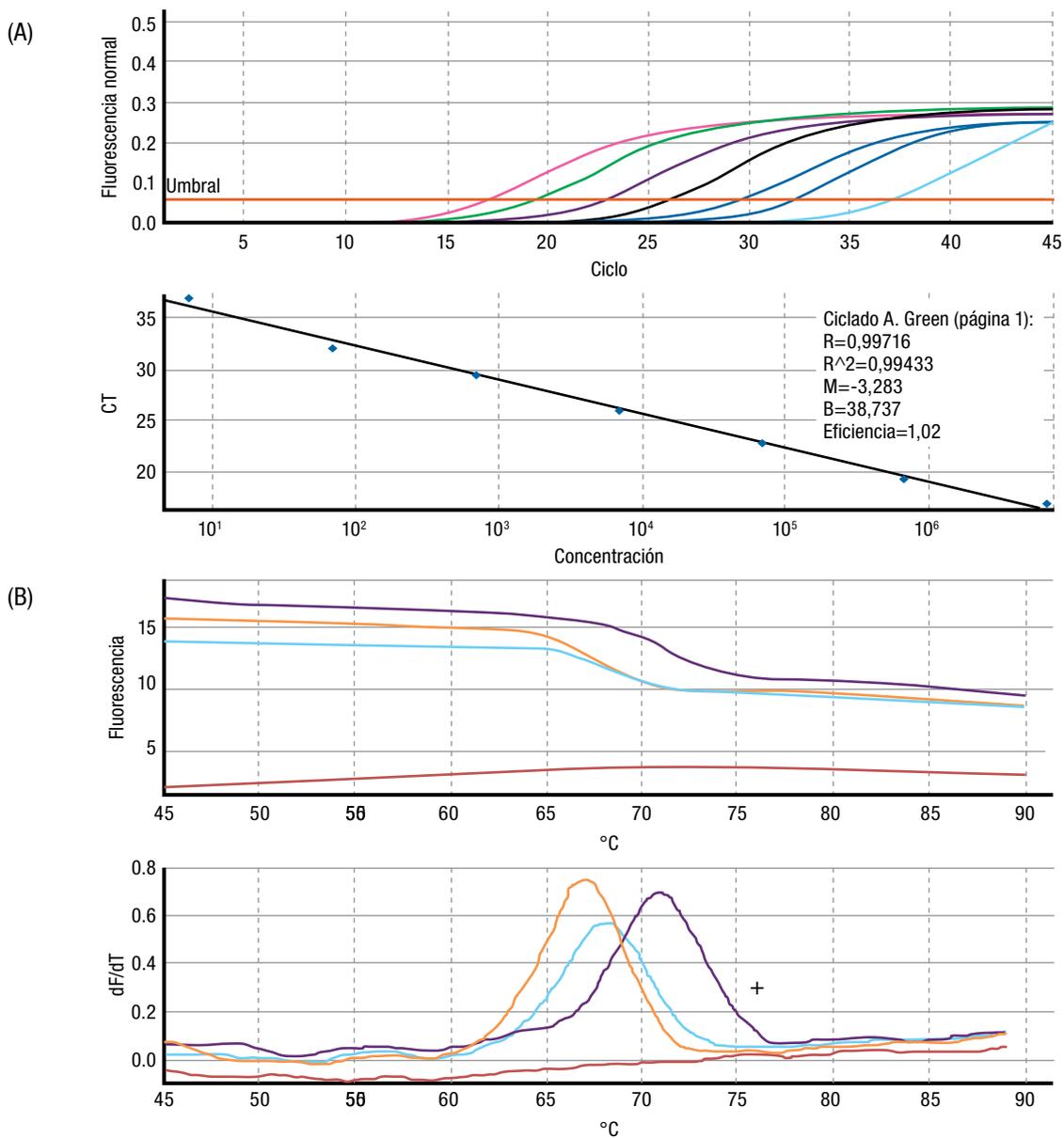


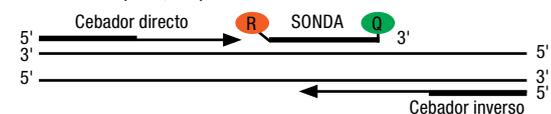
Figura A3.3

A) Curvas típicas de amplificación de la RCP en tiempo real que presentan las muestras con una dilución seriada del DNA diana y la curva estándar. B) Análisis de las curvas de fusión usando las temperaturas de fusión (T_m) para aumentar la especificidad de la RCP en tiempo real con utilización del colorante SYBR Green.

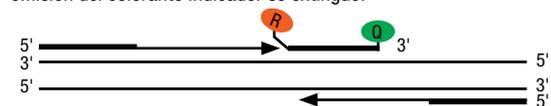
Fuente: Centros para el Control y la Prevención de enfermedades (Atlanta, EUA).

La sonda TaqMan (sonda hidrolizable; fig. A3.4) es la sonda específica de dianas que más se emplea en la detección mediante RCP en tiempo real. La RCP que utiliza la sonda TaqMan requiere un par de cebadores de RCP específicos y una sonda TaqMan oligonucleotídica complementaria de una secuencia de DNA específica de la plantilla entre los cebadores directo e inverso. La sonda suele diseñarse con un colorante de alta energía, denominado indicador (fluoróforo), en el extremo 5', y una molécula de baja energía, denominada extintor de fluorescencia, en el extremo 3' (que impide la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo). Esta sonda fluorescente doblemente marcada emite poca fluorescencia cuando está libre en la solución, debido a que el extintor y el fluoróforo están muy cerca el uno del otro. Durante la amplificación de la RCP en tiempo real, la sonda apareada a la plantilla es escindida debido a la actividad 5' nucleasa de la Taq DNA-polimerasa

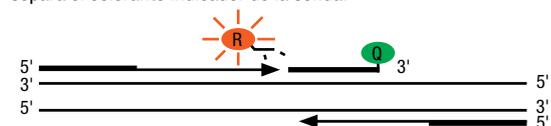
1. Polimerización: Un colorante indicador (R) fluorescente y un extintor de fluorescencia (Q) están unidos a los extremos 5' y 3' de una sonda TaqMan, respectivamente.



2. Desplazamiento de la hebra: Cuando la sonda está intacta, la emisión del colorante indicador se extingue.



3. Escisión: Durante cada ciclo de extensión, la DNA-polimerasa separa el colorante indicador de la sonda.



4. Polimerización concluida: Cuando el colorante indicador se ha separado del extintor, el indicador emite su fluorescencia característica..

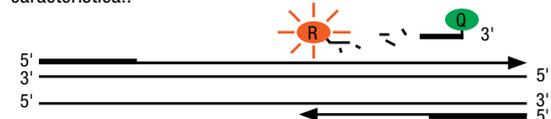


Figura A3.4
RCP en tiempo real con sonda TaqMan (sonda hidrolizable)

Fuente: Por cortesía de Life Technologies Corporation (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>, consultado el 23 de junio del 2013).

para liberarse (separarse del extintor); después de la excitación producida por una fuente de luz, el fluoróforo genera fluorescencia que aumenta con cada ciclo de RCP. Los ensayos que utilizan la sonda TaqMan se han usado mucho en la RCP en tiempo real para la expresión génica, la determinación de la carga viral, el genotipado de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), la identificación bacteriana, la discriminación alélica y la verificación de los resultados de los estudios de micromatrices.

Las balizas moleculares (sondas en horquilla) son sondas de hibridación de oligonucleótidos monocatenarios que forman una estructura en horquilla (fig. A3.5). La porción curva de la horquilla contiene una secuencia sonda que es complementaria de una secuencia diana, y la porción recta de la horquilla está formada por el apareamiento de secuencias de brazo complementarias que se encuentran a ambos lados de la secuencia sonda. Un fluoróforo se une covalentemente al extremo 5' de uno de los brazos y un extintor de fluorescencia se une covalentemente al extremo 3' del otro brazo. La porción recta de la horquilla mantiene estas dos moléculas muy próximas entre sí, lo que hace que la fluorescencia del fluoróforo sea extinguida

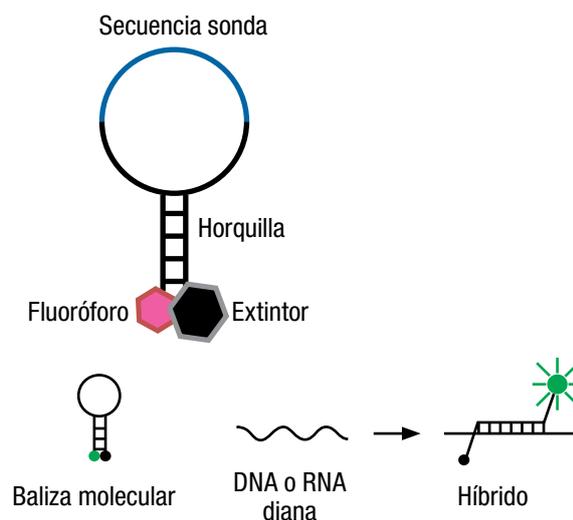


Figura A3.5
Baliza molecular (sonda en horquilla)

Fuente: Por cortesía de Horspool D. Wikipedia, 2009 (http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_beacon, consultado el 11 de abril del 2013); *Introduction to molecular beacons*. Nueva Jersey, EUA, Public Health Research Institute, 2013 (http://molecular-beacons.org/MB_introduction.html, consultado el 23 de junio del 2013).

por transferencia de energía, por lo que las balizas moleculares no muestran fluorescencia cuando están libres en la solución. Sin embargo, cuando se hibridan a una hebra de ácido nucleico que contiene su secuencia diana complementaria experimentan un cambio de conformación que les permite emitir fluorescencia intensamente. En consecuencia, cuando la sonda se hibrida a la molécula diana, forma un híbrido sonda-diana que es más largo y más estable que el híbrido de la parte recta de la horquilla. La rigidez y la longitud del híbrido sonda-diana impiden la existencia simultánea del híbrido de la parte recta de la horquilla. En consecuencia, la baliza molecular experimenta una reorganización conformacional espontánea que fuerza la separación de las partes rectas de la horquilla y hace que el fluoróforo y el extintor de fluorescencia se separen, lo que a su vez hace que la fluorescencia se restaure.

Las balizas moleculares pueden usarse en la RCP en tiempo real para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido y la detección de mutaciones.

La hibridación doble o sistema de sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (fig. A3.6) consiste en dos sondas fluorescentes emparejadas que se hibridan muy cerca en la secuencia diana (en general con una diferencia máxima de cuatro nucleótidos). La sonda donante (ancla) está marcada con un fluoróforo en el extremo 3', y la sonda aceptora

(indicadora) con otro fluoróforo en el extremo 5'. Los fluoróforos están diseñados para permitir que el espectro de emisión de uno se superponga significativamente con el espectro de excitación del otro. Durante la RCP, el fluoróforo donante es excitado por una fuente de luz externa, y la energía se transfiere al fluoróforo aceptor si se encuentra junto al anterior. Luego el fluoróforo aceptor excitado emite luz con una longitud de onda diferente, que posteriormente puede detectarse y medirse. Las sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia se usan a menudo en la RCP en tiempo real, por ejemplo, en los ensayos de discriminación alélica.

A3.2.3 Amplificación mediada por transcripción (TMA)

La tecnología de amplificación mediada por transcripción (TMA) patentada (7, 8) puede usarse para amplificar DNA o RNA, y produce amplicones de RNA, a diferencia de la mayoría de las otras PAAN, que solo producen DNA. En los sistemas de amplificación mediada por transcripción disponibles en el mercado, se realiza un proceso de captura de dianas (TC) antes de la amplificación mediada por transcripción, es decir, para reducir la inhibición de la amplificación y la contaminación. En este método de captura de dianas, se usan oligómeros poli-T unidos a partículas magnéticas para que se unan a una sonda de captura que contiene una cola poli-A y una secuencia

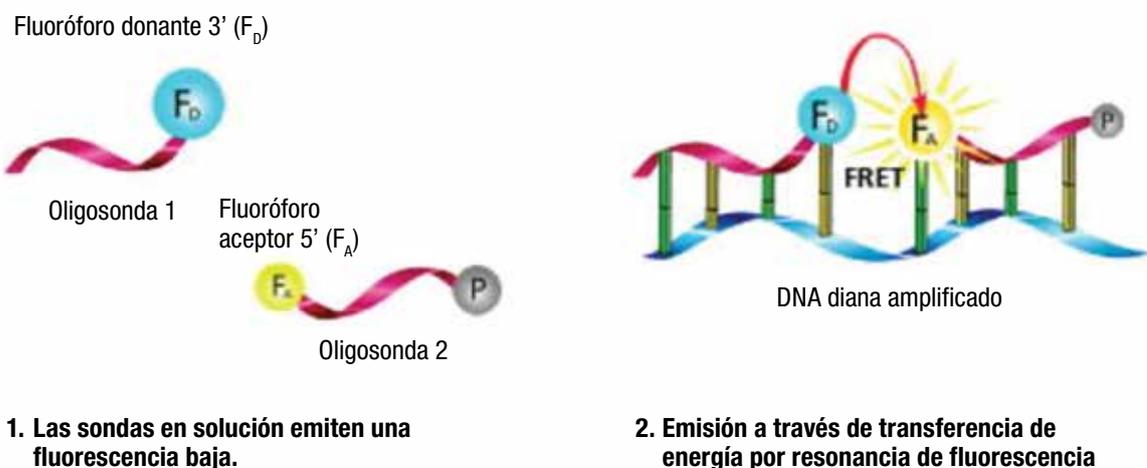


Figura A3.6

Hibridación doble o sistema de sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

Fuente: Por cortesía de SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Misuri, EUA) (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/fluorescent-probes/lightcycler-probes.html>, consultado el 23 de junio del 2013).

específica de la diana, que luego puede hibridarse específicamente a la secuencia complementaria del RNA diana. El posterior proceso de amplificación mediada por transcripción (fig. A3.7), que amplifica la secuencia diana capturada, usa dos cebadores específicos de la diana y dos enzimas diferentes (retrotranscriptasa y RNA-polimerasa) para la amplificación. Uno de los cebadores específicos de la diana contiene una secuencia promotora para la RNA-polimerasa, y cuando este cebador se hibrida al RNA diana se inicia una transcripción inversa, que da lugar a una copia de DNA complementario

(cDNA). El RNA del heterodúplex RNA:DNA resultante es degradado por la actividad RNasa H de la retrotranscriptasa. Esto permite que el segundo cebador se una a la copia de DNA y que se sintetice una nueva cadena de DNA mediante la retrotranscriptasa, lo que crea una molécula de DNA bicatenario. Ambas cadenas de la molécula de DNA bicatenario creada ahora contienen secuencias del promotor para la RNA-polimerasa, y por lo tanto pueden usarse como plantilla para iniciar la transcripción. Posteriormente, cada uno de los amplicones de RNA recién sintetizados reentra en el proceso de

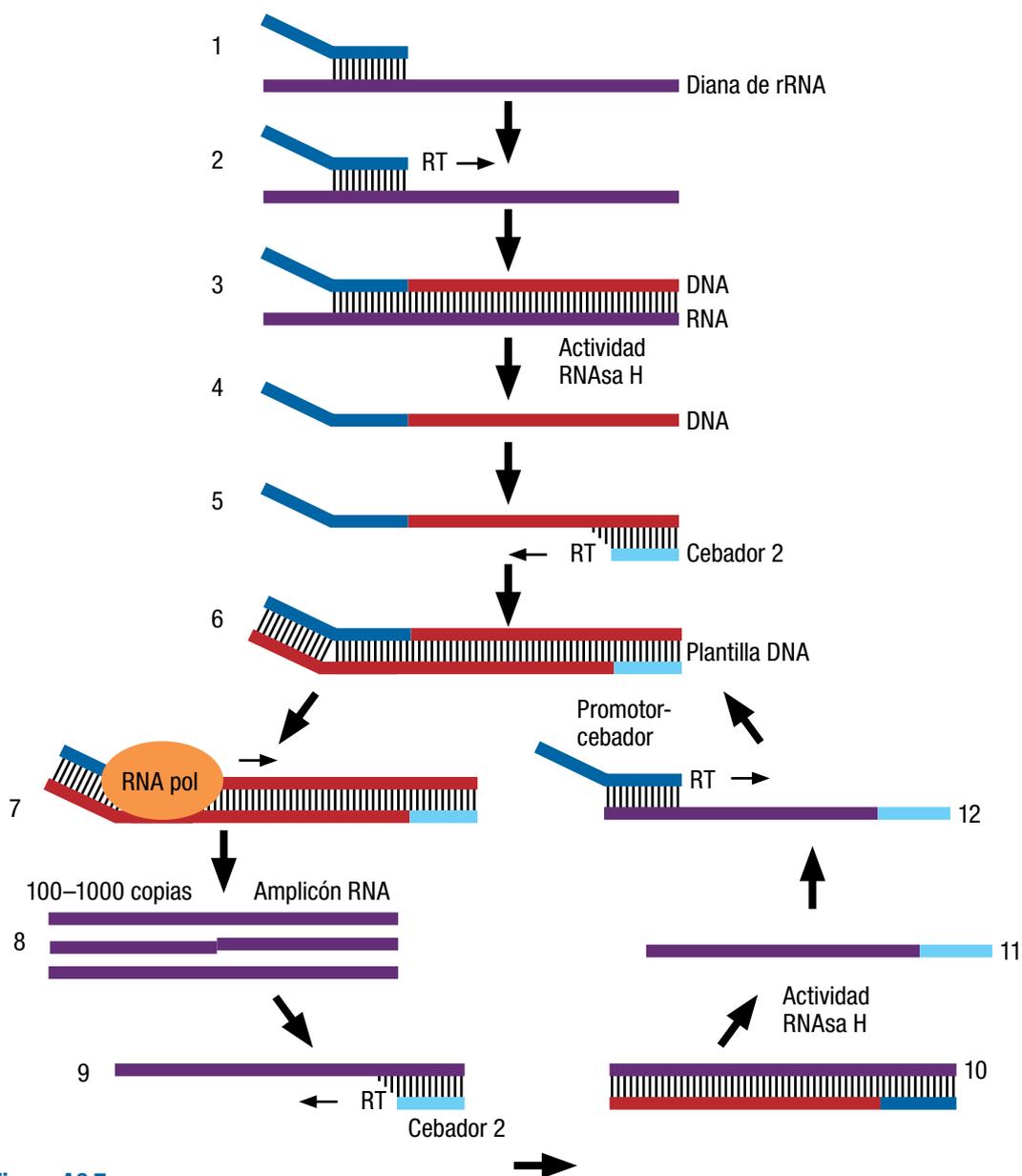


Figura A3.7
Amplificación mediada por transcripción (TMA)

Fuente: Hill CS. *Gen-Probe transcription-mediated amplification: system principles*. Cortesía de Gen-Probe Inc. (San Diego, California, EUA) (http://www.gen-probe.com/pdfs/tma_whiteppr.pdf; consultado el 23 de junio del 2013).

amplificación mediada por transcripción y sirve como plantilla para un nuevo ciclo de replicación, lo que da lugar a una expansión exponencial de la secuencia diana de RNA. La amplificación mediada por transcripción puede producir 100-1.000 copias por ciclo de amplificación, a diferencia de la RCP, que solo produce 2 copias por ciclo. La amplificación mediada por transcripción es isotérmica; toda la reacción se realiza a la misma temperatura en un baño María o bloque térmico y no en un termociclador.

Los amplicones de RNA producidos en la reacción de amplificación mediada por transcripción pueden combinarse con antorchas moleculares para la detección en tiempo real o con una sonda génica específica en el ensayo de protección de la hibridación (HPA) para la detección final por quimioluminiscencia. La técnica de protección de la hibridación se describe en el apartado dedicado a las tecnologías basadas en ácidos nucleicos sin amplificar (véase el apartado A3.3.2).

A3.2.4 Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA)

La amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (8, 9) es otra tecnología de amplificación isotérmica para secuencias diana de RNA

o de DNA. Esta tecnología es similar a la amplificación mediada por transcripción salvo porque la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos utiliza tres enzimas (en lugar de dos): retrotranscriptasa del virus de la mioblastosis aviaria (AMV-RT), RNasa H y T7 RNA-polimerasa. Estas enzimas, junto con cebadores específicos, permiten la amplificación de la secuencia del ácido nucleico diana (fig. A3.8). Los productos de RNA amplificados pueden detectarse mediante hibridación posterior a la amplificación usando sondas marcadas por electroquimioluminiscencia o mediante un sistema de detección en tiempo real que utilice balizas moleculares.

A3.2.5 Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA)

La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es otro proceso enzimático isotérmico *in vitro* que permite la amplificación de moléculas diana a partir de una sola plantilla de DNA o RNA (8, 10).

Esta tecnología patentada se basa en la acción combinada de una enzima de restricción, la DNA-polimerasa, y dos pares cebadores (cebadores de amplificación y cebadores *bumper* [adaptadores] de la amplificación por desplazamiento de cadena).

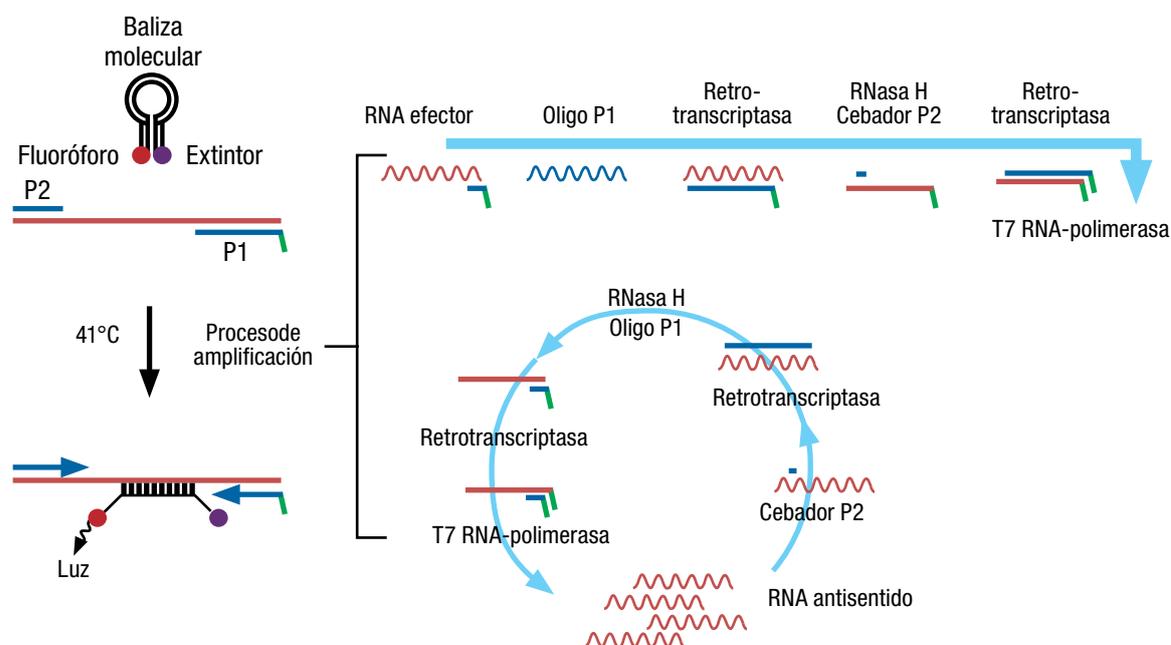


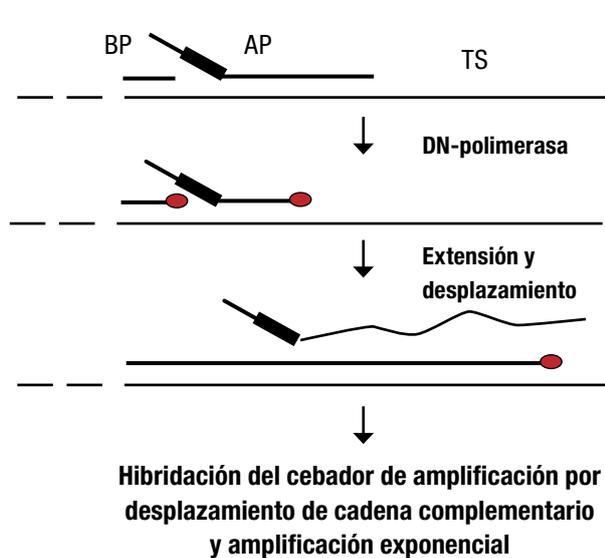
Figura A3.8
Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA)

Fuente: *Tecnología NASBA*. Por cortesía de PREMIER Biosoft (Palo Alto, California, EUA) (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html; consultado el 23 de junio del 2013).

Los cebadores *bumper* contienen solo secuencias de DNA específicas de la diana, mientras que los pares de cebadores de amplificación de la amplificación por desplazamiento de cadena contienen una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción específica en su extremo 5' además de una secuencia complementaria con el segmento diana. La amplificación por desplazamiento de cadena consta de dos fases. En la **figura A3.9** se muestra el proceso de amplificación por desplazamiento de cadena. La primera fase consiste

en la generación de DNA bicatenario de la plantilla de interés que contiene el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción que alimenta la segunda fase de amplificación exponencial, en la que la endonucleasa de restricción hace una muesca en una de las dos hebras del DNA bicatenario recién formado, lo que permite que la DNA-polimerasa cree una nueva secuencia de DNA bicatenario a partir de la hebra desplazada. Este proceso, que se asemeja a la replicación en círculo rodante de fagos y pequeños

A. Generación de la diana

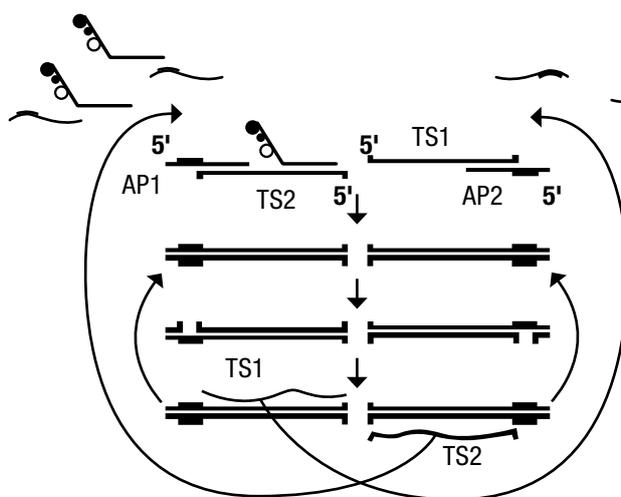


El cebador de amplificación (AP) y el cebador *bumper* (BP) de la amplificación por desplazamiento de cadena se hibridan a la hebra de DNA diana (TS).

El cebador de amplificación (AP) y el cebador *bumper* (BP) de la amplificación por desplazamiento de cadena se extienden por acción de la DNA-polimerasa a lo largo de la hebra diana.

La extensión del cebador *bumper* desplaza el producto de extensión del cebador de amplificación.

B. Amplificación exponencial



Hibridación del cebador de amplificación (AP1) y de la sonda detectora (DP) de la amplificación por desplazamiento de cadena a la secuencia de DNA diana (TS2).

La extensión del cebador de amplificación desplaza al producto de extensión de la sonda detectora (la conversión de la sonda detectora se muestra abajo), formando un dúplex con el sitio de la enzima de restricción (BsoBI).

La enzima de restricción crea una muesca en el sitio de restricción; la DNA-polimerasa se une a la muesca y se extiende para desplazar la hebra. Las hebras de DNA que están desplazadas en la solución son capturadas por cebadores complementarios que experimentan el mismo proceso de extensión seguida por formación de muescas y desplazamiento, lo cual da lugar a una amplificación exponencial, tal como se muestra.

Figura A3.9
Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA)

Fuente: Por cortesía de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EUA).

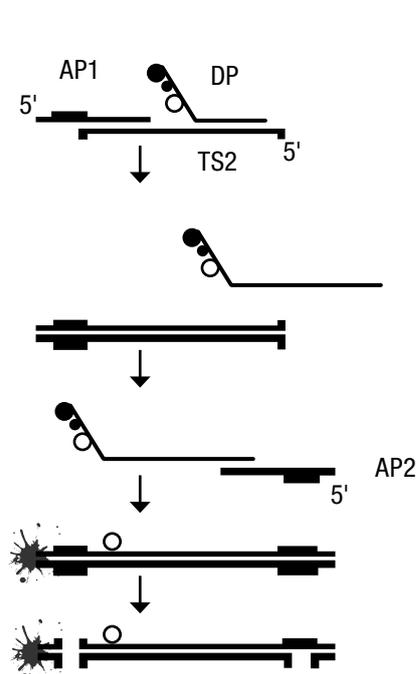
plásmidos monocatenarios, se repite continuamente hasta que se produce una cantidad suficientemente grande de la hebra de DNA de interés y puede detectarse mediante una sonda detectora.

Actualmente, en una plataforma comercial de segunda generación, la detección en tiempo real de los productos de la amplificación por desplazamiento de cadena tiene lugar simultáneamente con la amplificación mediante una sonda detectora fluorescente y transferencia de energía de fluorescencia (fig. A3.10). La sonda detectora consta de una región de hibridación específica de la diana en el extremo 3' y una estructura en horquilla en el extremo 5'. La parte curva de la horquilla contiene la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción, y la base 5' se conjuga con la molécula donante, mientras que la base 3' de la parte recta de la horquilla se conjuga con una molécula aceptora. En su estado natural, la horquilla mantiene a las moléculas donante y aceptora muy cerca y se observa poca fluorescencia. Cuando la sonda detectora se aparea con

la diana, la polimerasa hace que la horquilla comience a linealizarse y extenderse. Esta extensión crea una sonda detectora bicatenaria con un sitio de restricción escindible, que la enzima de restricción escinde rápidamente. Esto provoca la separación física del donante y del aceptor (y sus efectos de extinción), lo que permite detectar la fluorescencia en tiempo real.

A3.3 Tecnologías basadas en ácidos nucleicos sin amplificar

También existen pruebas de ácidos nucleicos sin amplificación para ciertas ITS, como la gonorrea y las infecciones por clamidias, el virus de la hepatitis y el VIH. Suelen ser rápidas, pueden automatizarse para realizar el tamizaje a gran escala, son relativamente baratas y sólo requieren una pericia técnica moderada. Sin embargo, su sensibilidad es considerablemente inferior a la de métodos basados en la amplificación de la diana (PAAN). Es más probable que se usen ensayos de hibridación y detección de sondas más



Conversión de la sonda detectora

Hibridación del cebador de amplificación (AP1) y de la sonda detectora (DP) de la amplificación por desplazamiento de cadena con la secuencia de DNA diana (TS2).

La extensión del cebador de amplificación desplaza el producto de extensión de la sonda detectora.

El producto de extensión de la sonda detectora se convierte en la diana del cebador de amplificación (AP2) de la amplificación por desplazamiento de cadena.

AP2 El cebador de amplificación y el producto de extensión de la sonda detectora se extienden en dirección 3' formando un dúplex.

El sitio de restricción de la sonda detectora es diferente del incorporado en las secuencias del cebador de amplificación y sigue siendo vulnerable a la escisión por parte de BsoBI. Así pues, el fluoróforo y el extintor de la fluorescencia difunden aparte, lo que da lugar a un aumento de la fluorescencia. En ausencia del DNA diana, las sondas detectoras se mantienen sin escindirse y la fluorescencia sigue apagada.

Figura A3.10

Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) de segunda generación, en la que los productos amplificados se detectan en tiempo real usando una sonda detectora fluorescente y transferencia de energía.

Fuente: Por cortesía de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EUA).

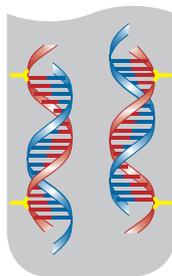
directos cuando se espera que estén presentes grandes cantidades de DNA o RNA diana (por ejemplo, en un frotis uretral o un cultivo bacteriano). La detección fiable de la diana sin el uso de la amplificación de señales generalmente requerirá al menos 10^4 copias de la diana de ácido nucleico por microlitro. Sin embargo, la amplificación de la señal después de la hibridación de la sonda mejora la detección hasta un valor tan bajo como aproximadamente 500 moléculas diana por microlitro y aporta capacidades cuantitativas.

A3.3.1 Captura de híbridos (CH)

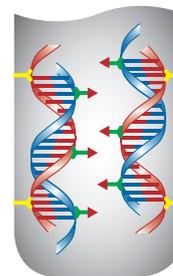
La tecnología de captura de híbridos (CH) es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos in vitro con amplificación de señal que usa la quimioluminiscencia en microplacas para la detección cualitativa de las dianas de ácidos nucleicos (17). El ensayo de captura de híbridos consta de las siguientes etapas básicas: lisis de los virus o de las bacterias para que liberen el DNA o el RNA diana; hibridación con sondas de RNA o DNA específicas para crear híbridos RNA:DNA; captura de los híbridos de RNA:DNA en una fase sólida usando anticuerpos universales específicos de los híbridos; amplificación de la señal con anticuerpos conjugados con una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina); detección de la señal cuando el sustrato (por ejemplo, dioxetano quimioluminiscente) es escindido por la enzima; y medición de la quimioluminiscencia producida en unidades de luz relativas (RLU) con un luminómetro (fig. A3.11).



1. **La sonda de RNA se hibrida al DNA diana.** El DNA diana se combina con sondas específicas de RNA, formando híbridos de RNA:DNA.



2. **Captura de híbridos.** Los híbridos de RNA:DNA se capturan en una fase sólida recubierta con anticuerpos de captura universales específicos de híbridos de RNA:DNA.



3. **Amplificación de la señal.** Los híbridos de RNA:DNA capturados se detectan con múltiples anticuerpos conjugados con la fosfatasa alcalina. Se lee la señal resultante de la reacción quimioluminiscente y se interpretan los resultados.

A3.3.2 Ensayo de protección de la hibridación (HPA)

La tecnología del ensayo de protección de la hibridación (HPA) es un método patentado mediante el cual se detectan dianas de RNA o de DNA monocatenario por medio de una sonda de DNA quimioluminiscente (12, 13). En el ensayo de protección de la hibridación, se permite que sondas de DNA específicas de secuencias marcadas con éster de acridinio (EA) se hibriden a los productos de la amplificación. La separación (selección) de las sondas hibridadas de las no hibridadas se hace mediante la adición de un reactivo de selección (un álcali), que hidroliza el marcador (el éster de acridinio) de las sondas no hibridadas. Cuando la sonda se une a su secuencia diana específica, el éster de acridinio de la sonda hibridada está protegido en la doble hélice y no se hidroliza. Tras añadir el reactivo de detección, sólo el éster de acridinio unido a la sonda hibridada se libera para producir una señal que indica que el DNA o el RNA diana está presente. Las sondas no hibridadas no emiten quimioluminiscencia (fig. A3.12). En el ensayo de protección de la hibridación no son necesarias las engorrosas etapas de lavado que se precisan en las pruebas con sondas y los inmunoanálisis convencionales. Además, solo una molécula de la sonda marcada con éster de acridinio puede unirse a cada amplicón de RNA; así pues, la señal quimioluminiscente obtenida es directamente proporcional al número de moléculas diana de la muestra inicial. La tecnología de ensayo cinético doble (DKA), que es una modificación del ensayo de protección de la hibridación,

Figura A3.11

Tecnología de captura de híbridos (CH)

Fuente: Por cortesía de Qiagen Inc. (Germantown, Maryland, EUA) (<http://www.qiagen.com/hpv/hc2technology.aspx>).

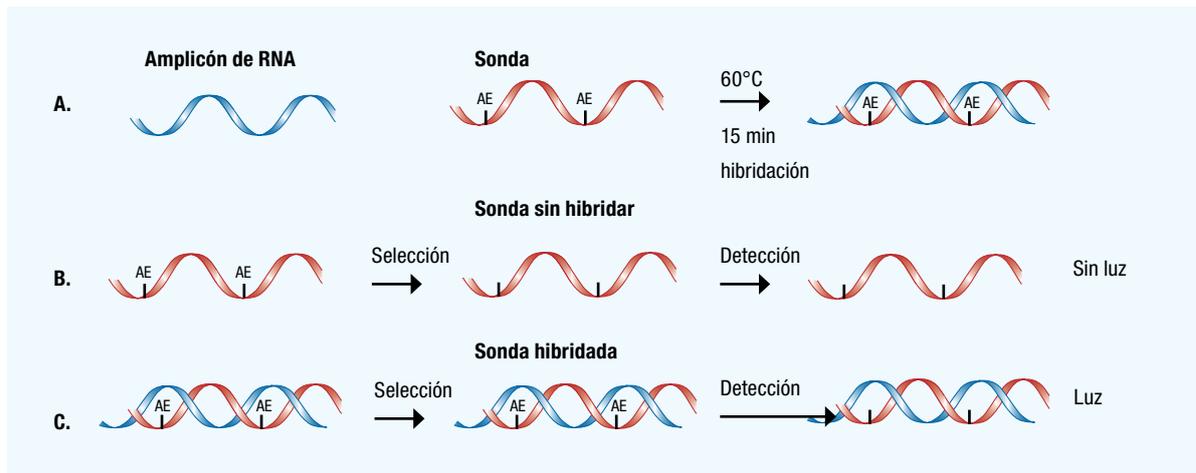


Figura A3.12

Ensayo de protección de la hibridación (HPA)

Fuente: Hill CS. Gen-Probe transcription-mediated amplification: system principles. Por cortesía de Gen-Probe Inc. (San Diego, California, EUA) (http://www.gen-probe.com/pdfs/tma_whitepr.pdf; consultado el 23 de junio del 2013).

utiliza dos tipos de sondas marcadas con dos ésteres de acridinio distintos que muestran una cinética de apagado de la luminiscencia diferente en un ensayo único que permite detectar simultáneamente dos dianas distintas. El ensayo de protección de la hibridación o el ensayo cinético doble se utilizan frecuentemente para detectar amplicones de RNA producidos mediante amplificación mediada por transcripción.

A3.3.3 Hibridación del DNA ramificado (bDNA)

A diferencia de la tecnología de RCP que se basa en la amplificación *in vitro* de la secuencia diana, la hibridación del DNA ramificado (bDNA) implica el uso de una serie de oligonucleótidos en un método de hibridación en sándwich de ácidos nucleicos para detectar y cuantificar la diana mediante la amplificación de señales (14). El proceso de hibridación del DNA ramificado implica la lisis de los microorganismos analizados, la captura de la diana, la amplificación de la señal y la detección, tal como se muestra en la [figura A3.13](#).

La etapa inicial de un ensayo de hibridación del DNA ramificado consiste en la lisis de los microorganismos estudiados usando detergente y proteinasa K para liberar los ácidos nucleicos (A). El primer conjunto de oligonucleótidos específicos de la diana (extensor de la captura) se hibrida luego en condiciones muy rigurosas tanto a los ácidos nucleicos diana como a las sondas de captura que están unidas a una placa de micropocillos

(B). El segundo conjunto de oligonucleótidos (extensores del marcador) se han diseñado para que se hibriden con regiones contiguas de la diana y para que proporcionen secuencias para la hibridación de un oligonucleótido preamplificador. El preamplificador forma un híbrido estable solo si se hibrida a dos extensores del marcador adyacentes (C). Luego se hibridan al preamplificador numerosas moléculas amplificadoras del DNA ramificado para crear una estructura ramificada (D). Por último, los oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina que son complementarios de secuencias amplificadoras del DNA ramificado se unen a la molécula de DNA ramificado mediante hibridación. La señal del DNA ramificado es el producto quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina y su sustrato específico. De esta manera, la señal se amplifica sin copiar la secuencia del ácido nucleico diana, y la cantidad de señal detectada es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico unido.

La tecnología de DNA ramificado ha progresado desde los ensayos de primera generación, que eran precisos y reproducibles aunque relativamente insensibles, hasta las pruebas de tercera generación, que son precisas, reproducibles, muy sensibles y pueden automatizarse completamente. Por otra parte, los ensayos de DNA ramificado no requieren la amplificación de una secuencia diana, por lo que la contaminación cruzada entre las réplicas de las muestras o remanente es menos probable en los ensayos de DNA ramificado.

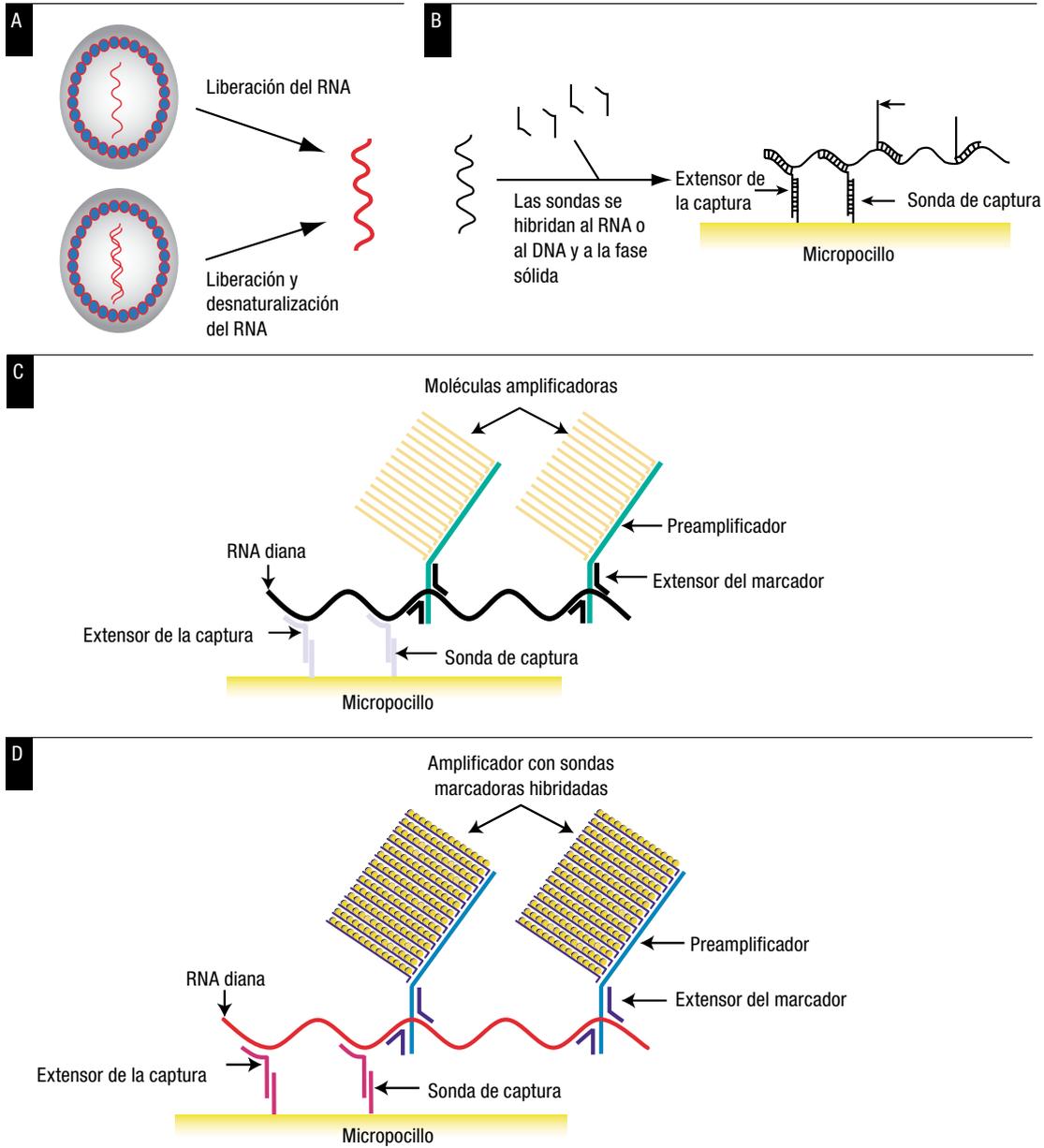


Figura A3.13
Ensayo de amplificación de señales de DNA ramificado (bDNA)

Fuente: Tsongalis, G.J. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *American Journal of Clinical Pathology*, 2006, 126:448-453.

A3.4 Referencias

1. Palmer HM et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2):835–837.
2. Tabrizi SN et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(10):3610–3615.
3. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Eurosurveillance*, 2006, 11(11):E061109.2.
4. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2011, 24(1):62–69.
5. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 1987, 155:335–350.
6. Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239(4839):487–491.
7. La Rocco MT et al. Evaluation of a commercial rRNA amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in processed sputum. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1994, 13(9):726–731.
8. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2008, 27(3):224–243.
9. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350(6313):91–92.
10. Little MC et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(6):777–784.
11. Vernick JP, Steigman CK. The HPV DNA virus hybrid capture assay: what is it—and where do we go from here? *Medical Laboratory Observer*, 2003, 35(3):8–13.
12. Nelson NC. Rapid detection of genetic mutations using the chemiluminescent hybridization protection assay (HPA): overview and comparison with other methods. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1998, 35(5):369–414.
13. Dhingra K et al. Hybridization protection assay: a rapid, sensitive, and specific method for detection of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood*, 1991, 77(2):238–242.
14. Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *American Journal of Clinical Pathology*, 2006, 126(3):448–453.

Anexo 4

Medios, reactivos, pruebas diagnósticas y tinciones (recetas de laboratorio)

NOTA: Los reactivos para las tinciones y la preparación de los medios se han incluido por categorías en orden alfabético. No se repiten en este anexo algunas recetas de laboratorio que se encuentran en los capítulos.

A4.1 Medios de cultivo, transporte y conservación

Medio de transporte de Amies (ingredientes referidos al producto comercializado; Van Dyck *et al.*, 1999)

Carbón neutro farmacéutico	10 g
Cloruro de sodio	3,0 g
Hidrogenofosfato de sodio	1,15 g
Dihidrogenofosfato de potasio	0,2 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Tioglicolato de sodio	1,0 g
Cloruro de calcio	0,1 g
Cloruro de magnesio	0,1 g
Agar	4,0 g
Agua destilada	1 l

1. Suspender todos los ingredientes en 1 litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición para disolver el agar completamente.
3. Distribuir en los tubos o frascos pequeños con tapa de rosca, agitando entretanto para mantener el carbón en suspensión. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 15 minutos.
4. Conservar el medio a una temperatura de 2 a 8 °C hasta 6 meses.

Agar de infusión de cerebro-corazón (BIH) + medio de conservación glicerol al 20% (comercializado)

Infusión de cerebro-corazón	3,7 g
Glicerol	20 ml
Agua destilada	80 ml

1. Mezclar los ingredientes en un frasco con tapa de rosca de 150 ml, esterilizar en autoclave y dejar que se enfríe a temperatura ambiente.
2. Dispensar asépticamente con una pipeta estéril 1,0 ml de la solución en criotubos de polipropileno con tapa de rosca de 1,5 ml (es importante usar tubos adecuados para evitar roturas).
3. Conservar el medio a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

Agar chocolate, véase el medio base de agar para gonococos (GCMB) más hemoglobina (debajo del medio de Thayer–Martin).

Agar sangre tipo Columbia

Base de agar sangre tipo Columbia	39 g
Sangre de caballo (desfibrinada)	90 ml
Agua destilada	1 l

1. Suspender 39 g de base de agar sangre tipo Columbia en 1 litro de agua destilada al tiempo que se mezcla. A continuación se somete a vapor fluente o se calienta a ebullición suavemente hasta la disolución completa.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. Dejar que se enfríe el medio de agar a 70 °C en un baño María.
4. Agregar asépticamente 90 ml de sangre desfibrinada de caballo al agar. Agitar para mezclar y dejar a 70 °C durante 30 minutos, sin dejar de mezclar de vez en cuando suavemente, hasta que la sangre tome un color marrón chocolate.
5. Transferir el matraz a un baño de agua a 50 °C para que se enfríe antes de distribuir volúmenes de 20 ml en placas de Petri de 9 cm.
6. Dejar que las placas se solidifiquen a temperatura ambiente y luego mantenerlas invertidas a una temperatura entre 2 y 8 °C en bolsas de plástico cerradas hasta 4 semanas.

Agar Columbia + 1% de hemoglobina + carbón activado + 5% de suero fetal de ternero + 1% de enriquecimiento IsoVitaleX + vancomicina (3 µg/ml)

Se recomienda para el cultivo de *Haemophilus ducreyi*.

Base de agar tipo Columbia	40 g
Hemoglobina bovina	10 g
Carbón activado	2 g
Suero fetal de ternero	50 ml
Enriquecimiento IsoVitaleX	10 ml
Solución de vancomicina	3 mg en 5–10 ml de líquido
Agua destilada	1 l

1. Pesar la hemoglobina bovina en un matraz (A) y agregar 400 ml de agua destilada. Dejar reposar en un refrigerador a 4 °C hasta el día siguiente. A la mañana siguiente agitar el matraz y suspender todo el polvo. Con una pipeta o una varilla suspender la hemoglobina en polvo que pueda estar adherida al fondo del matraz. Dejar a temperatura ambiente.
2. Poner en un segundo matraz (B) el agar Columbia, el carbón activado y 600 ml del agua destilada.
3. Esterilizar en autoclave los matraces A y B por separado a 121 °C durante 15 minutos.
4. Enfriar los matraces a 56 °C en baño María.
5. Con una técnica aséptica en una campana de flujo laminar, transferir lentamente con cuidado la solución esterilizada de hemoglobina bovina (matraz A) al matraz B que contiene la base de agar Columbia y el carbón, vertiendo sobre el lado interno del matraz para evitar que se formen burbujas.
6. Agregar asépticamente 50 ml (5%) de suero fetal de ternero estéril, 10 ml (1%) de enriquecimiento IsoVitaleX y un volumen de líquido estéril que contenga 3 mg de vancomicina (realizar una filtración estéril en caso necesario).

- Una vez que se ha agregado todo, mezclar el medio agitando con un movimiento suave. Verter asépticamente el medio en placas de Petri de 20 ml y dejar que se solidifique antes de colocar las placas en bolsas de plástico y conservarlas en el refrigerador a 4 °C hasta que se necesiten. Las placas de agar deben usarse antes de transcurridas 1 o 2 semanas de su preparación.

Medio Diamond (ingredientes referidos al producto comercializado; Van Dyck *et al.*, 1999)

El medio Diamond se usa para el cultivo de *Trichomonas vaginalis*. Otro sistema de cultivo comercializado es InPouch TV (anexo 5).

Peptona tripticasa	20 g
Extracto de levadura	10 g
Maltosa	5,0 g
Hidrocloreuro de L-cisteína	1,0 g
Ácido L-ascórbico	0,2 g
Hidrógenofosfato de potasio	0,8 g
Dihidrogenofosfato de potásico	0,5 g
Agar	0,5 g

- Suspender y disolver 38 g de medio Diamond en polvo (todos los ingredientes anteriores) en 900 ml de agua destilada.
- Esterilizar en autoclave y dejar que se enfríe el medio a 50 °C.
- Agregar 100 ml de suero ovino o bovino y 0,1 g/l de cloranfenicol.
- Conservar a 4 °C y utilizarlo en un plazo de 3 meses desde la preparación.

Medio base de agar para gonococos (GC) complementado con 1% de suplemento de crecimiento definido (suplemento definido de Kellogg o IsoVitaleX-Vitox)

El medio base de agar para GC con suplementos se recomienda en la realización del antibiograma de *N. gonorrhoeae* con los métodos: dilución en agar, difusión en disco y Etest (bioMérieux Francia).

Medio base de agar para GC	36 g
Suplemento definido IsoVitaleX-Vitox-Kellogg	10 ml
Agua destilada	1 l

- Disolver 36 g de medio base de agar para GC en 1 litro de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar que se enfríe el medio de agar en baño María a 50 °C, agregar 10 ml de IsoVitaleX-Vitox disuelto o Kellogg y mezclar bien.
- Dispensar 20 a 25 ml por placa de Petri de 9 cm y 60 ml por placa de Petri de 14 cm.
- Dejar que las placas se solidifiquen a temperatura ambiente y mantenerlas invertidas a una temperatura entre 2 y 8 °C en bolsas de plástico cerradas hasta 4 semanas.
- IsoVitaleX y Vitox están comercializadas mientras que el suplemento definido de Kellogg se prepara en el laboratorio (ver más adelante).

Suplemento definido de Kellogg (1, 2)

Glucosa	40 g
Glutamina	1,0 g
Solución de nitrato de hierro (III) al 0,5%	10 ml
Agua destilada	90 ml

1. Mezclar todos los ingredientes en un matraz de 150 ml.
2. Esterilizar en autoclave.
3. Enfriar en un baño María a 50 °C.
4. Agregar 1 ml de solución de cocarboxilasa estéril al 20% (filtrada sin esterilizar en autoclave).
5. Dispensar asépticamente la solución en un frasco de almacenamiento con tapa de rosca de 100 ml y conservar a 4 °C (estable durante varios meses).

GCMB + 2% de hemoglobina + 5% de suero fetal de ternero + 1% de enriquecimiento IsoVitaleX + vancomicina (3 µg/ml)

Este medio se recomienda para el cultivo del *H. ducreyi*.

GCMB	36 g
Hemoglobina bovina	20 g
Suero fetal de ternero	50 ml
Enriquecimiento IsoVitaleX	10 ml
Solución de vancomicina	3 mg en 5–10 ml de líquido
Agua destilada	1 l

1. Poner en un matraz de 2 litros (A) 500 ml de agua destilada y agregar la hemoglobina bovina, a continuación agitar bien para mezclar.
2. Poner en otro matraz de 2 litros (B) 500 ml de agua destilada y agregar el GCMB, a continuación calentar en una placa de agitación hasta ebullición.
3. Esterilizar en autoclave ambos matraces a 121 °C durante 30 minutos y luego enfriar a 56 °C.
4. Con una técnica aséptica en una campana de flujo laminar, verter lentamente con cuidado la solución de hemoglobina bovina esterilizada (matraz A) en el matraz B que contiene el GCMB, vertiendo sobre la pared interna del matraz para evitar la formación de burbujas.
5. Agregar 50 ml (5%) de suero fetal de ternero estéril, 10 ml (1%) de enriquecimiento IsoVitaleX y un volumen de líquido estéril que contenga 3 mg de vancomicina (realizar una filtración estéril en caso necesario).
6. Mezclar el medio con un movimiento de agitación suave.
7. Verter el medio asépticamente en placas de Petri de 20 ml y dejar que el medio se solidifique antes de ponerlas en bolsas de plástico y colocarlas en el refrigerador a 4 °C hasta que se necesiten.
8. Las placas de agar deben utilizarse en un plazo de 1 a 2 semanas desde la preparación.

Medio de Dulbecco con modificación de Iscove (IMDM-VGA) (comercializado, Sigma-Aldrich Life technologies, EUA)

Medio de Kupferberg (ingredientes referidos al producto comercializado; Van Dyck *et al.*, 1999)

Triptosa (o tripticasa)	20 g
Maltosa	1,0 g
Hidrocloreuro de L-cisteína	1,5 g
Agar	1,0 g
Azul de metileno	0,003 g
Cloranfenicol	0,1 g
Extracto de levadura	0,1 g

1. Suspender 23,7 g de medio de Kupferberg en polvo en 950 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave y enfriar hasta 50 a 55 °C.
2. Agregar 50 ml de suero (bovino, humano, ovino, de conejo o de caballo), 1 000 000 UI de penicilina y 150 mg de estreptomicina.

Medio líquido para citología (comercializado, BD Diagnostics)**Medio de Eagle modificado (MEM-VG)** (comercializado, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, Gibco Life Technologies, EUA)**Medio de Martín Thayer modificado**

Preparar el GCMB con la hemoglobina y los suplementos (véase medio de Thayer–Martin). Agregar las mezclas de los antibióticos selectivos, que están comercializadas: VCAT (vancomicina, colistina, anfotericina B o anisomicina, lactato de trimetoprima), VCNT (vancomicina, colistina, nistatina, lactato de trimetoprima) o LCAT (lincomicina, colistina, anfotericina B o anisomicina, lactato de trimetoprima). Estos suplementos deben hidratarse según la recomendación del fabricante y agregarse al medio (3, 4). El medio también está comercializado.

Caldo de Mueller-Hinton (comercializado)

Ingredientes en las preparaciones comerciales:

Extracto de carne de bovino	2,0 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g
Almidón soluble	1,5 g

1. Suspender 21 g de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada.
2. Mezclar y dispensar en pequeñas alícuotas (1,5 ml o 2 ml) y esterilizar en autoclave.

Agar de Mueller-Hinton + 5% de sangre de caballo lisada + 1% de enriquecimiento IsoVitaléX + vancomicina (3 µg/ml)

Medio que se recomienda para el cultivo del *H. ducreyi*.

Base para agar de Mueller-Hinton	36 g
Sangre de caballo	50 ml
Suero fetal de ternero	50 ml
Enriquecimiento IsoVitaléX	10 ml
Solución de vancomicina	3 mg en 5-10 ml de líquido
Agua destilada	1 l

1. Pesar 38 g de base para agar de Mueller–Hinton y enrasar a 1 litro con agua destilada, esterilizar en autoclave y enfriar a 56 °C.
2. Agregar 50 ml (5%) de sangre de caballo estéril cuando la base para agar disuelta alcance los 56 °C y mezclar.
3. Lisar la suspensión colocando el matraz en un baño María a 70 °C durante aproximadamente 15 minutos.
4. Enfriar hasta 56 °C y luego agregar 50 ml (5%) de suero fetal de ternero estéril, agregar 10 ml (1%) de enriquecimiento IsoVitaleX y un volumen de líquido estéril que contenga 3 mg de vancomicina (realizar una filtración estéril en caso necesario).
5. Mezclar el medio con un movimiento de agitación suave.
6. Verter el medio asépticamente en placas de Petri de 20 ml y dejar que el medio se solidifique antes de ponerlas en bolsas de plástico y colocarlas en el refrigerador a 4 °C hasta que se necesiten.
7. Las placas de agar deben utilizarse en un plazo de 1 a 2 semanas desde la preparación.

Base de caldo de micoplasma (5) (medio comercializado)

Infusión de corazón bovino	50 g
Peptona	10 g
NaCl	5,0 g
Agua destilada	1 l

1. Mezclar los ingredientes.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y conservar a 4 °C.

Agar New York City (NYC) (comercializado; Van Dyck *et al.*, 1999)

Preparar el GCMB con los suplementos y agregar sangre de caballo hemolizada, una mezcla de dializado de levadura y los inhibidores VCAT.

La mezcla de dializado de levadura contiene:

Dializado de levadura	5,0 g
Glucosa	0,5 g
Bicarbonato de sodio	0,075 g

Sangre de caballo hemolizada: lisar mediante congelación y descongelación o mediante la adición de 5 ml/l de saponina al medio base de agar para GC.

1. Suspender 18 g de medio base de agar para GC en 430 ml de agua destilada, mezclar y calentar a ebullición.
2. Esterilizar en autoclave y enfriar hasta 50 a 55 °C.
3. Agregar 50 ml de sangre de caballo hemolizada, una mezcla de dializado de levadura y los inhibidores VCAT (siguiendo las instrucciones del fabricante).
4. Mezclar y verter en las placas de Petri.

Agar de Sabouraud dextrosado (5)

Glucosa	40 g
Neopeptona o polipeptona (comercializado)	10 g
Agar	15–20 g
Agua desmineralizada	1 l

1. Calentar la mezcla para que se disuelva completamente. El pH final será de 5,6.
2. Dispensar en los tubos (18 a 25 mm de diámetro) y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Si hay que añadir cloranfenicol al medio, el volumen y la concentración serán los adecuados.

Medio de leche desnatada (Van Dyck *et al.*, 1999)

Leche en polvo	100 g
Agua destilada	1 l

1. Suspender 100 g de leche en polvo en 1 litro de agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a una temperatura entre 112 y 115 °C.
3. Conservar a una temperatura entre 4 y 8 °C.

Nota: Es importante evitar el sobrecalentamiento para que no se produzca caramelización.

Medio de transporte según Stuart (también comercializado)

Tioglicolato de sodio	1,0 g
Glicerofosfato de sodio	10,0 g
Cloruro de calcio	0,1 g
Azul de metileno	0,002 g
Hidrocloreuro de cisteína	0,5 g
Agar	3–5,0 g
Agua destilada	1 l

1. Mezclar los ingredientes en agua destilada y calentar a ebullición.
2. Distribuir en frascos pequeños con tapa de rosca una vez ajustado el pH entre 7,3 y 7,4.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y enroscar de inmediato la tapa.
4. Cuando esté frío, el medio debe ser incoloro.
5. Conservar en un refrigerador a una temperatura entre 4 y 8 °C.
6. Si el color se torna azul durante el almacenamiento, el medio se ha aireado y por consiguiente es inadecuado para su uso.
7. Aflojar la tapa de rosca y calentar el medio para eliminar el aire retenido.

Medio de transporte sacarosa-fosfato (2SP) con antibióticos (ingredientes referidos al producto comercializado; Van Dyck *et al.*, 1999)

Hidrogenofosfato de potasio	2,1 g
Dihidrogenofosfato de potasio	1,1 g
Sacarosa	68,5 g
Agua destilada	1 l

1. Reunir los ingredientes, llevar a pH 7,2 y filtrar para esterilizar.
2. Agregar asépticamente los suplementos (véase a continuación) a alícuotas de 90 ml.

Suplementos:

Suero fetal de ternero	10 ml
Gentamicina	10 mg
Vancomicina	10 mg
Anfotericina B	0,5 mg

Medio de conservación sacarosa-fosfato-glutamato (SPG)

Sacarosa	75 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	2.83 g
Agua, cantidad suficiente para	1 l

1. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 2N, en caso necesario.
2. Hacer alícuotas en botellas de 100 ml y esterilizar en autoclave durante 20 minutos.
3. Conservar hasta 1 año a 4 °C.

Medio de Thayer Martin

Medio base de agar para GC (ingredientes en la preparación comercializada): agar chocolate

Peptona	15,0 g
Almidón de maíz	1,0 g
Hidrogenofosfato de potasio	4,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	10,0 g
Hemoglobina: polvo seco de hemoglobina bovina	10,0 g
Enriquecimiento IsoVitaleX, Vitox o suplemento de Kellogg	10,0 ml
Agua destilada	1 l

4. Disolver 36 g de medio base de agar para GC (Difco, BD) en 500 ml de agua destilada, dejar en reposo hasta que el polvo se disuelva completamente. En caso necesario, usar una barra agitadora magnética.
5. Suspender 10 g de hemoglobina en 500 ml de agua destilada, hacer una pasta antes de agregar el agua, mezclar enérgicamente para que se disuelva y calentar a ebullición.
6. Esterilizar las soluciones en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar colocando los matraces en baño María 50 °C.
7. Sacar los matraces del baño María y agregar aseptícamente la solución de hemoglobina al matraz de GCMB.
8. Agregar aseptícamente 10 ml de suplemento definido disuelto (por ejemplo, suplemento definido de Kellogg, IsoVitaleX o Vitox).
9. Mezclar el contenido totalmente con un suave movimiento de agitación.

10. Inmediatamente verter 20–25 ml de la mezcla en cada placa de Petri (9 cm).
11. Dejar que los medios se solidifiquen a temperatura ambiente.
12. Las placas se conservan invertidas en bolsas de plástico cerradas entre 2 y 8 °C durante 3 semanas.

Se pueden adquirir IsoVitalEx y Vitox comercializados, mientras que el suplemento definido de Kellogg se prepara en el laboratorio (véase GCMB).

Agregar al agar chocolate los inhibidores vancomicina, colistina y nistatina (VCN).

Fórmula de VCN:

Vancomicina	300 µg/ml
Colistín	750 µg/ml
Nistatina	1250 unidades/ml

El medio de Thayer–Martin modificado se prepara agregando lactato de trimetoprima a una concentración de 5,0 µg/ml.

Caldo de triptona y soja (Van Dyck *et al.*, 1999)

Hidrolizado ácido de caseína (triptona)	17 g
Peptona de soja	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Hidrogenofosfato de potasio	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada	1 l

1. Suspender 36 g de polvo comercial en 1 litro de agua destilada; pH 7,3.
2. Mezclar bien y dispensar alícuotas de 2 ml en tubos pequeños.

Medio para el transporte de virus (Van Dyck *et al.*, 1999)

El medio consta de una solución salina equilibrada de Hank (HBSS, comercializado), complementado con anfotericina B, albúmina sérica bovina y gentamicina.

Solución salina equilibrada de Hank (comercializado)	10,3 g
Anfotericina B	5,0 mg
Albúmina sérica bovina al10%	100 ml
Gentamicina	50 mg
Agua destilada	1 l

1. Disolver 10,3 g de polvo de solución salina equilibrada de Hank en 1 litro de agua destilada.
2. Agregar anfotericina B, albúmina sérica bovina (disuelta en agua destilada) y gentamicina.
3. Mezclar y ajustar el pH a 7,3 con una solución de hidrogenocarbonato de sodio al 7,5%.

A4.2 Reactivos y pruebas diagnósticas

API NH: *Neisseria gonorrhoeae*

Dado que el sistema API NH requiere un inóculo con una turbidez equivalente al estándar 4,0 de la escala de McFarland, generalmente es necesario subcultivar la colonia aislada antes de identificarla para obtener inóculo suficiente. Antes de realizar las pruebas con la tira API NH se puede cultivar *N. gonorrhoeae* en el siguiente medio: agar chocolate con 2% IsoVitaleX o su derivado (es decir, Thayer–Martin) con o sin antibióticos; también puede usarse el GCMB con suplementos. Otra opción es usar medios de agar con sangre (la base de agar sangre tipo Columbia, medio de tripticasa de soja, medio New York City), aunque ciertas reacciones bioquímicas pueden modificarse y resultar más débiles (esto debe tenerse en cuenta al leer la reacción; lea las instrucciones del fabricante). El sistema API NH puede sustituirse también por el RapID NH (Remel).

1. Registrar el número de cepa en la tira.
2. Colocar la tira en la caja de incubación.
3. Recoger con un hisopo unas pocas colonias bien aisladas y preparar una suspensión (en el NaCl proporcionado con el estuche) con una turbidez equivalente al estándar 4,0 de la escala de McFarland, asegurarse de que está bien mezclado usando una agitadora vorticial. Utilizar un cultivo de 18 a 24 horas. La suspensión debe usarse inmediatamente después de la preparación.
4. Distribuir la suspensión bacteriana preparada (aproximadamente 50 µl) en los 7 primeros microtubos (de PEN a URE, ambos inclusive). Evite la formación de burbujas.
5. Llenar los 3 últimos microtubos con la suspensión (aproximadamente 150 µl), evitando que se forme un menisco convexo.
6. Cubrir los 7 primeros microtubos (PEN a URE, inclusive) con el aceite mineral (proporcionado con el estuche).
7. Incubar durante 2 horas a 36 °C en condiciones aeróbicas.
8. Tras el período de incubación, leer las reacciones con referencia a la tabla de lectura incluida en el estuche (bioMérieux, consultar en www.biomerieux.com).

Cepas de referencia:

Para el control de la calidad, véase la recomendación del fabricante (bioMérieux, Francia). Utilizar la cepa *N. gonorrhoeae* ATCC 31426 o una cepa de referencia de *N. gonorrhoeae* de la OMS del 2008.

Amortiguadores del pH

Tipo de solución	Concentración (mol/l)	Peso por litro de solución madre		pH	Volumen (ml) para preparar 100 ml de solución de trabajo	
		A	B		A	B
Tampón de fosfato	0,025	3,41 g de KH_2PO_4	4,46 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	6,8	50,8	49,2
	0,1	13,62 g de KH_2PO_4 compra 4	17,82 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	6,9	43,9	56,1
Tampón de citrato-hidróxido de sodio de Sørensen	0.01	Disolver 2,1 g de ácido cítrico monohidrato en 20 ml de NaOH 1 mol/l y agregar agua destilada hasta llegar a un 1 litro (=citrato disódico 0,01 mol/l)	HCl 0,01 mol/l	5,6	69,3	30,7

Prueba de la β -lactamasa

Hay varias pruebas para determinar si una cepa produce β -lactamasa (por ejemplo, método yodométrico, rojo de fenol) (3). La más fácil es la prueba de la cefalosporina cromogénica (nitrocefina). Véase el capítulo 4 para más detalles.

Prueba rápida de utilización de los hidratos de carbono

Ingredientes para el agar tripticasa de cisteína (ATC) (Difco, BD, EUA):

Triptona	20 g
L-Cisteína	0,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sulfito de sodio	0,5 g
Agar	2,5 g
Rojo de fenol	17 mg

- Suspender 28,5 g de agar tripticasa de cisteína en polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar enérgicamente.
- Calentar agitando frecuentemente y dejar en ebullición durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
- Esterilizar en autoclave a una temperatura que no pase de 118 °C durante 15 minutos.
- Agregar 5 a 10 g de hidratos de carbono, es decir, glucosa, maltosa, sacarosa o lactosa, antes de esterilizar en autoclave o disolver el medio en 900 ml de agua, esterilizar en autoclave y agregar asépticamente 100 ml de una solución estéril de carbohidratos al 5% a 10%.
- Mezclar el contenido del matraz con un movimiento de agitación suave y distribuir asépticamente en tubos de 10 ml con tapa de rosca ya esterilizados.
- Enfriar los tubos en posición inclinada para que se forme una pendiente y dejar que el medio se solidifique a temperatura ambiente.

7. Conservar los tubos a 4 °C.
8. Probar el resultado del medio preparado usando cultivos estables característicos de control según las especificaciones del fabricante (Difco, BD, EUA).

Prueba rápida de utilización de los hidratos de carbono

Los siguientes reactivos están comercializados:

Medio de agar sangre lisada con solución de glucosa al 0,5%

Solución salina tamponada, equilibrada, con indicador (SST)

Soluciones de hidratos de carbono:

glucosa al 10%

lactosa al 10%

sacarosa al 10%

maltosa al 10%

Solución de ampicilina (200 mg/ml) para la prueba de producción de β -lactamasa

El cultivo puro para la identificación de la posible *N. gonorrhoeae* se obtiene subcultivando una única colonia en un medio de agar sangre lisada que contiene solución de glucosa al 0,5%.

1. Emulsionar 2 asas de siembra de 10 μ l llenas de colonias aisladas que han crecido en un cultivo puro sembrado el día anterior en un tubo que contiene 1,5 ml de solución salina tamponada, equilibrada, con indicador y mezclar bien con una pipeta Pasteur para obtener 10⁹ bacterias por ml.
2. Marcar 6 pocillos de una placa de microtitulación de la siguiente forma: C (control), G (glucosa), L (lactosa), M (maltosa), S (sacarosa) y Pasa (penicilinas).
3. Agregar 25 ml de una solución de hidratos de carbono estéril al 10% a los pocillos G, L, M, S y 25 ml de solución de ampicilina al pocillo Pasa. El primer pocillo sin ningún azúcar servirá de control.
4. Agregar 100 μ l (4 gotas) de suspensión bacteriana a cada uno de los seis pocillos.
5. Leer después de 2 a 4 horas de incubación a una temperatura entre 35 y 37 °C en aerobiosis (no en atmósfera de CO₂). Se recomienda examinar la reacción de la β -lactamasa nuevamente después de 24 horas ya que algunas cepas pueden producir una reacción lenta de la β -lactamasa.

Interpretación:

Dado que *N. gonorrhoeae* utiliza glucosa (no maltosa, sacarosa ni lactosa), solo el tubo que contiene glucosa debe presentar un cambio de color.

Los resultados de la utilización de los hidratos de carbono y la producción de β -lactamasa se registran de la siguiente manera:

Tubo o pocillo control =	Rojo
Color amarillo =	Reacción positiva
Color rojo anaranjado =	Reacción negativa

Nota: Si se sospecha la presencia de *N. gonorrhoeae* y se obtiene un resultado dudoso con la prueba rápida de utilización de los hidratos de carbono, comprobar la pureza del cultivo y confirmar la identificación utilizando otro tipo de prueba como las pruebas serológicas.

Solución de glucosa-potasio-sodio-fosfato (GKNP)

Es la solución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (comercializada)

10× solución madre

NaCl	80,0 g
Glucosa	10,0 g
KCl	4,0 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
Na ₂ HPO ₄	0,48 g
Solución madre de rojo de fenol (optativo)	100 ml
H ₂ O	900 ml

1. Mezclar los ingredientes.
2. Esterilizar en autoclave y conservar la 10× solución madre a 4 °C hasta su uso; la solución madre caduca a los 6 meses.
3. La solución de trabajo se obtiene diluyendo la 10× solución madre 1:10 con H₂O.

Gonocheck-II

El Gonocheck-II (TCS Biosciences, Ltd.) es una prueba que no depende del crecimiento y se utiliza para distinguir las especies de *Neisseria* por su capacidad para hidrolizar tres enzimas producidas específicamente por cada una de las especies: iminopeptidasa de prolina /proliliminopeptidasa (PIP) por *N. gonorrhoeae*, β-glutamylaminopeptidasa por *N. meningitidis* y β-galactosidasa por *N. lactamica*.

El estuche Gonocheck-II comprende un único tubo que contiene tres sustratos cromogénicos. La hidrólisis de estos sustratos produce un color diferente. El color específico producido está relacionado con la enzima presente y, por consiguiente, indica la presencia de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* o *N. lactamica*, según sea el color.

Otras especies comensales de *Neisseria* pueden producir proliliminopeptidasa, por tanto las pruebas enzimáticas deben realizarse con las cepas que han crecido en medios selectivos. También se han registrado cepas de *N. gonorrhoeae* PIP negativa (6–8); por consiguiente, deben confirmarse estas muestras utilizando un método alternativo (3).

GonoGen-II

El GonoGen-II (New Horizons Diagnostics Corporation) es una prueba colorimétrica que emplea anticuerpos monoclonales. En esta prueba los anticuerpos monoclonales frente a la proteína PorB (PorB IA y PorB IB) de *N. gonorrhoeae* se han reunido y adsorbido sobre partículas coloidales metálicas en suspensión. GonoGen II usa un tampón solubilizador para separar la pared celular de la bacteria analizada, de ese modo queda expuesta la proteína PorB. Se usa una mezcla de anticuerpos monoclonales unidos a un portador rojo de partículas coloidales metálicas en suspensión para detectar los antígenos específicos de *N. gonorrhoeae*. El consiguiente complejo formado antígeno-anticuerpo se detecta con un dispositivo de filtración que hace que aparezca un punto final rojo perfectamente dibujado (3).

1. Marcar un tubo de ensayo para cada una de las cepas aisladas y las cepas de referencia.
2. Dispensar 0,5 ml de tampón solubilizador y ajustar la turbidez al estándar 1,0 de McFarland añadiendo colonias crecidas en un agar selectivo o enriquecido.

3. Agitar vigorosamente a mano o con una agitadora vorticial el reactivo GonoGen-II.
4. Agregar una gota de reactivo GonoGen-II en cada uno de los tubos a analizar. Mezclar bien.
5. Dejar que los tubos reposen durante al menos 5–15 minutos (tiempos de reacción más largos aumentan la claridad de la reacción).

Interpretación:

Positivo: es *N. gonorrhoeae*, punto de color rosa a rojo en el pocillo.

Negativo: no es *N. gonorrhoeae*, punto de color blanco a rosa pálido en el pocillo.

Estándares de turbidez de McFarland (9)

Los estándares de turbidez de McFarland se preparan mezclando las siguientes soluciones en diferente proporción para obtener la turbidez deseada de la escala de McFarland (por ejemplo 0,5, 1, 2 etc.).

Escala de turbidez de McFarland	0.5	1	2	3	4
Solución de cloruro de bario anhidra al 1% (w/v)	0,05 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml
Solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v)	9,95 ml	9,9 ml	9,8 ml	9,7 ml	9,6 ml

Cerrar herméticamente los tubos y conservarlos a temperatura ambiente en la oscuridad (estos permanecerán estables durante 6 meses). Antes del uso, invertir los tubos varias veces para suspender el precipitado de bario.

Para la comparación, utilizar un fondo con rayas horizontales blancas y negras. Prueba de la oxidasa (para confirmar la identificación de *N. gonorrhoeae* tras el cultivo): Preparación en el laboratorio (Morse *et al.*, 1996 y 2010):

Dihidrocloreuro de tetrametil-p-fenilendiamina	0,5 g
Agua destilada	50 ml

1. Disolver el sustrato en 50 ml de agua destilada.
2. Colocar un trozo de papel de filtro en una placa de Petri y empapararlo con el reactivo.
3. Recoger una porción de la colonia a analizar con un alambre platino y frotar sobre el papel de filtro.

Interpretación:

Un resultado positivo estará indicado por la aparición de un color violeta oscuro en un plazo de 10 segundos. Los reactivos de la prueba de la oxidasa pueden adquirirse en el comercio.

Método del papel de filtro:

1. Comprimir la ampolla de vidrio que contiene el reactivo en el dispensador apretando los lados del tubo.
2. Marcar el papel de filtro con el número de la bacteria a analizar y humedecer el papel de filtro con el reactivo.
3. Tomar una colonia de un cultivo de un día para otro con un asa de siembra estéril o una varilla.
4. Frotar el inóculo sobre el papel de filtro empapado con el reactivo.
5. Examinar la posible aparición de un color violeta oscuro (reacción positiva) en 10 a 30 segundos.

Método directo en placa de agar:

1. Agregar de 2 a 3 gotas del reactivo de la oxidasa directamente sobre las placas de agar con un cultivo sembrado el día anterior.
2. Observar el cambio de color rápido de rosa a granate y a violeta oscuro en 10 a 30 segundos.

Interpretación:

Las bacterias oxidasa positiva dan un color violeta en 30 segundos. Las bacterias oxidasa negativa dan un color rosado claro o permanece incoloro.

Prueba Phadebact monoclonal GC

En la prueba de Phadebact monoclonal GC dos mezclas (*pool*) de anticuerpos monoclonales murinos se juntan por separado con la Proteína A de *Staphylococcus* no viable, que permite formar subgrupos con las cepas gonocócicas aisladas dando el grupo WI (PorB IA) y el WII/WIII (PorB IB).

1. Recoger colonias frescas de *N. gonorrhoeae* que supuestamente se han identificado y suspenderlas en 0,5 ml de solución salina estéril al 0,9% amortiguada con fosfato (PBS, ver abajo) hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Utilizar un tubo de ensayo con tapa.
2. Colocar el tubo cerrado en un baño de agua hirviendo durante al menos 5 minutos y luego enfriar a temperatura ambiente.
3. Antes de usar el reactivo gonocócico, agitar enérgicamente. Poner una gota del reactivo WI y una gota del WII/WIII, separadas, en un portaobjetos.
4. Agregar una gota de la suspensión gonocócica calentada a ebullición al reactivo WI y una gota al reactivo WII/WIII. No olvidar de incluir un control negativo al que solo se le agrega solución salina amortiguada con fosfato.
5. Mezclar las gotas por completo pero suavemente con un asa de siembra desechable recién abierta. Usar un asa de siembra nueva para cada reactivo.
6. Balancear el portaobjetos y leer el resultado en el plazo de 1 minuto.

Interpretación:

Un precipitado con uno de los reactivos gonocócicos, WI o WII/WIII, indica un resultado positivo. Una reacción positiva con ambos reactivos es un resultado dudoso y deberá volver a realizarse. Si no se produce ninguna reacción con el reactivo gonocócico WI ni con el WII/WIII, el resultado de la prueba es negativo (un resultado negativo indica que las cepas analizadas no son de *N. gonorrhoeae*).

Tampón de fosfato (véase amortiguadores del pH)

Solución salina amortiguada con fosfato (PBS)

La solución salina amortiguada con fosfato se puede preparar en el laboratorio (véase abajo) y está también comercializado en polvo o comprimidos preparados con antelación. Para preparar 1 litro de la 1× solución salina amortiguada con fosfato mezclar:

Cloruro de sodio	8,0 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Hidrogenofosfato de sodio	1,78 g
Dihidrofosfato de potasio	0,27 g
Agua destilada	1 l

1. Disolver los ingredientes en 80 ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH según convenga (7,4, 6,8, etc.).
3. Ajustar el volumen a 1 litro con el agua destilada restante.
4. Esterilizar en autoclave.

Tampón de citrato-hidróxido de sodio de Sørensen (véase amortiguadores del pH)

A4.3 Tinciones

Tinción de Giemsa (10%) (10)–*Klebsiella granulomatis* (cuerpos de Donovan)

Solución madre:

Giemsa, polvo	0.5 g
Glicerol	33 ml
Metanol puro, sin acetona	33 ml

1. Disolver el colorante de Giemsa, polvo, en el glicerol poniendo la mezcla en un baño María a 55 °C durante 90 minutos.
2. Una vez disueltos los cristales, agregar el metanol puro.
3. Conservar a temperatura ambiente.

Solución de trabajo (se debe preparar en el momento de uso):

Solución madre	1 ml
Tampón de fosfatos	23 ml

Tampón de fosfatos:

Solución 1		Solución 2	
Na_2HPO_4	9,47 g	KH_2PO_4	9,08 g
Enrasar hasta 1 litro con agua destilada		Enrasar hasta 1 litro con agua destilada	

1. Mezclar 72 ml de la solución 1 con 28 ml de la solución 2.
2. Agregar 900 ml de agua destilada.

Procedimiento de tinción:

1. Secar al aire el frotis, fijar con metanol puro durante al menos 5 minutos y dejar que se seque otra vez.
2. Cubrir con la solución de trabajo de Giemsa durante 1 hora.
3. Lavar rápidamente con alcohol etílico al 95% para eliminar el exceso de colorante.

Tinción de Gram

El procedimiento de la tinción de Gram se describe en el capítulo 4 y se recuerda en este anexo ya que también se usa para teñir otros agentes patógenos. Los reactivos pueden adquirirse en el comercio o prepararse en el laboratorio (Van Dyck *et al.*, 1999). También se encuentran comercializados juegos de reactivos ya preparados para usar.

Solución de cristal violeta (tinción primaria)

Solución de yodo (mordiente)

Etanol-acetona (decolorante)

Solución de Safranina (colorante de contraste)

1. Cubrir con cristal violeta durante 30 segundos una extensión fijada (con calor). Lavar suavemente con agua fría del grifo.

2. Inundar el porta con solución de yodo durante 30 segundos. Lavar suavemente con agua fría del grifo.
3. Decolorar con acetona, etanol-acetona o solo etanol al 95% hasta que deje de salir colorante violeta del frotis. Es mejor sujetar el porta con la mano, protegida con guantes, cerca del agua corriente. El tiempo de decoloración dependerá del decolorante químico utilizado y del espesor del frotis y será más corto (normalmente solo unos segundos) con acetona y más largo (hasta un minuto) con etanol. Debe evitarse la decoloración excesiva ya que las bacterias grampositivas podrían confundirse con las gramnegativas. No tener en cuenta las porciones gruesas que puedan teñirse de azul en un frotis que no esté bien extendido y nivelado.
4. Lavar rápidamente con agua corriente para detener la decoloración y escurrir el exceso de agua.
5. Cubrir con el colorante de contraste, safranina o fucsina, durante 1 minuto.
6. Lavar con agua corriente y secar suavemente el porta con papel de filtro.

Solución de cristal violeta:

Solución A (10%)		Solución B (10%)	
Cristal violeta en polvo	2 g	Oxalato de amonio	0,8 g
Etanol al 95%	20 ml	Agua destilada	80 ml

Mezclar las soluciones A y B con el fin de obtener el reactivo de tinción cristal violeta. Almacenar durante 24 horas y filtrar a través del papel. Etanol-acetona (proporción 1:1):

Acetona	50 ml
Etanol al 95%	50 ml

Solución de yodo:

Yoduro de potasio	2 g
Cristales de yodo	1 g
Agua destilada	300 ml

La mayoría de las referencias bibliográficas recomiendan triturar yodo y yoduro de potasio en un mortero.

Agregar agua lentamente al tiempo que se sigue triturando los productos químicos hasta que se disuelva el yodo.

Solución de safranina:

Solución madre		Solución de trabajo	
Safranina	5 g	Solución madre	10 ml
Etanol al 95%	100 ml	Agua destilada	90 ml

Tinción de Leishman

La tinción de Leishman puede usarse en lugar de la tinción de Giemsa para *Klebsiella granulomatis* (donovanosis, capítulo 13) una vez fijado el frotis en el portaobjetos con metanol.

Solución madre:

Leishman, polvo	1,5 g
Metanol	1 l

1. Agregar el colorante Leishman, polvo, al metanol y mezclar bien utilizando unas perlas de vidrio.
2. Dejar en reposo la solución madre a temperatura ambiente durante 24 horas.

Solución de trabajo:

Solución madre	1 parte
Agua tamponada	2 partes

1. Preparar una solución de trabajo nueva cada día diluyendo 1 parte de solución madre en 2 partes de agua destilada (agua tamponada con 3,76 g/l de hidrogenofosfato de sodio y 2,10 g/l de dihidrogenofosfato de potasio, pH 7,0–7,2).
2. Conservar en un frasco herméticamente cerrado para evitar que la solución madre se humedezca.

Método:

1. Preparar un frotis con la muestra tomada de los bordes de la úlcera (donde es más probable que se encuentren los cuerpos Donovan) en un portaobjetos de vidrio.
2. Cubrir el portaobjetos con la solución de trabajo de la tinción de Leishman durante 10 minutos o hasta 30 minutos (tinción de Giemsa).
3. Lavar el portaobjetos con agua tamponada o solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0–7,2).
4. Dejar que el portaobjetos se seque al aire y luego examinar al microscopio óptico con aceite de inmersión (aumento total 1000X).

Interpretación:

Los cuerpos de Donovan aparecen en forma de cocobacilos con grandes vacuolas en el citoplasma de los histiocitos grandes y de vez en cuando en las células plasmáticas y los leucocitos polimorfonucleares. Los microorganismos se ven de color azul-violeta, a menudo rodeados por una cápsula rosada acidófila.

Tinción de azul de metileno: *N. gonorrhoeae* (5)

Azul de metileno	0,3 g
Etolol	30 ml
Agua destilada	100 ml

1. Disolver el colorante en etanol.
2. Agregar agua destilada.
3. Preparar y fijar el frotis en un portaobjetos de vidrio.
4. Cubrir el portaobjetos con la tinción de azul de metileno durante 1 minuto.
5. Lavar el colorante del portaobjetos con agua corriente del grifo.
6. Enjuagar, secar al aire y examinar al microscopio.

Tinción de azul de metileno o violeta de genciana: *N. gonorrhoeae* (11)

Azul de metileno

Violeta de genciana

La tinción de azul de metileno o violeta de genciana se prepara añadiendo 4 partes de azul de metileno a 1 parte de violeta de genciana (fórmula de Huker).

1. Preparar un frotis delgado a partir de una muestra clínica gonocócica y otro a partir de un cultivo de control adecuado, etiquetar ambos portaobjetos.
2. Fijar con calor pasando el portaobjetos sobre una llama.
3. Agregar azul de metileno durante 30 a 60 segundos.
4. Lavar, dejar secar al aire y examinar al microscopio.
5. *N. gonorrhoeae* aparecerá como cocos o diplococos de color violeta oscuro.

Técnica de impregnación con plata de Warthin–Starry

Ácido cítrico al 1%:

Ácido cítrico	1 g
Agua destilada o desionizada	100 ml

Agua acidulada:

Agua destilada o desionizada	500 ml
------------------------------	--------

Agregar una cantidad suficiente de ácido cítrico al 1% para llegar a un pH de 4,0.

Solución de nitrato de plata al 2% para la solución de revelado:

Nitrato de plata	5 g
Agua acidulada	250 ml

Solución de nitrato de plata al 1% para la impregnación:

Solución de nitrato de plata al 2%	25 ml
Agua acidulada, pH 4,0	25 ml

Solución de gelatina al 5%:

Gelatina, calidad analítica elevada	2,5 g
Agua acidulada	50 ml

Solución de hidroquinona al 0,15%:

Cristales de hidroquinona	0,075 g
Agua acidulada	50 ml

Solución de revelado:

Solución de nitrato de plata al 2%	12 ml
Solución de gelatina al 5%	30 ml
Solución de hidroquinona al 0,15%	16 ml

A4.4 Agradecimientos

Los autores reconocen las contribuciones de Rajinder Parti y Aura Helena Corredor en la preparación de este anexo.

Los siguientes textos se reconocen agradecidamente como una fuente para varias recetas:

Morse SA, Moreland AA, Holmes KK, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 2nd ed. Baltimore, Mosby-Wolfe, 1996.

Morse SA, et al., eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4th ed. Edinburgh, Saunders/Elsevier, 2010.

Van Dyck E, Meheus AZ, Piot P. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases*. Geneva, World Health Organization, 1999.

A4.5 Referencias

1. Kellogg DS Jr et al. *Neisseria gonorrhoeae*: virulence genetically linked to clonal variation. *Journal of Bacteriology*, 1963, 85:1274–1279.
2. Dillon JA, Tostowaryk W, Pauzé M. Effects of different media and methods of inoculum preparation on results of antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* by agar dilution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987, 31(11):1744–1749.
3. Dillon JR, Starnino S. *Laboratory manual: identification and antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae*, 2nd ed. Co-ordinating Centre for the Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Program in Latin America and the Caribbean, 2002 (http://www.gasp-lac.net/wp-content/uploads2/EnglishFull_FINAL-VERSION-1_Mar-27-2012.pdf, accessed 5 April 2013).
4. Young H, Moyes A. An evaluation of pre-poured selective media for the isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Medical Microbiology*, 1996, 44(4):253–260.
5. Sarafian SK. Media, reagents, test procedures and stains. In: Morse SA, Moreland AA, Holmes KK, eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 2nd ed. Baltimore, Mosby-Wolfe, 1996:326–332.
6. Brown S et al. Absence of prolyminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains in Ontario, Canada. *Canada Communicable Disease Report*, 2008, 34:20–23.
7. Martin IE et al. Identification of prolyliminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains in Canada. *Sexually Transmitted Diseases*, 2011, 38(1):40–42.
8. Unemo M et al. Global transmission of prolyliminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains: implication for changes in diagnostic strategies. *Sexually Transmitted Infections*, 2007, 83(1):47–51.
9. Benson HJ. *Microbiological applications. A laboratory manual in general microbiology*, 6th ed. Dubuque, Wm C Brown Company, 1994.
10. Pillay A et al. Media, stains, reagents and test procedures. In: Morse SA et al., eds. *Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS*, 4th ed. Edinburgh, Saunders/Elsevier, 2010:355–365.
11. Taylor SN, DiCarlo RP, Martin DH. Comparison of methylene blue/gentian violet stain to Gram's stain for the rapid diagnosis of gonococcal urethritis in men. *Sexually Transmitted Diseases*, 2011, 38(11):995–996.

Anexo 5

Material de laboratorio

NOTA: El material de laboratorio figura en esta lista en el mismo orden cronológico con el que aparece en cada capítulo. Solo se ha indicado el nombre del fabricante del producto o reactivo. El propósito de la lista no es identificar integralmente a cada fabricante. No se hace mención de los distribuidores locales.

Capítulo 3. *Micoplasmas genitales*

- Equipo
 - Centrifugadora
 - Cámara de electroforesis
 - Congelador (–70 °C)
 - Refrigerador (4 °C)
 - Equipo para la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)
 - Equipo para la RCP en tiempo real
- Reactivos
 - Agarosa en polvo
 - Bromuro de etidio
 - Reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa
 - Reactivos de la RCP en tiempo real
- Material fungible
 - Puntas de pipeta con filtro (1 µl, 10 µl, 100 µl, 1.000 µl)
 - Pipeteadores (10 µl, 200 µl, 1.000 µl)
 - Hisopos (dacrón o rayón)
 - Tubos de ensayo (2 ml, 200 µl)
- Pruebas (estuches comercializados)
 - Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN), una prueba de amplificación mediada por transcripción (AMT) para uso exclusivo en investigación (Gen-Probe)

Capítulo 4. *Gonorrea*

- Equipo
 - Balanza analítica (para pesar)
 - Centrifugadora
 - Crioviales
 - Jarra de anaerobiosis (con vela o con sobres generadores de CO₂)
 - Congelador (–80 °C)
 - Refrigerador (4 °C)
 - Mechero de gas
 - Incubadoras (a 37 °C, 5±1% CO₂)
 - Estándares nefelométricos de McFarland (PRO-LAB Diagnostics)

- Microscopio (microscopio óptico y microscopio de fluorescencia)
 - Pipeteadores (10 µl, 200 µl, 1.000 µl)
 - Pehachímetro
 - Regla de plástico (mm) o compás nonio
 - Replicador automático de Steer (inoculador de puntas múltiples o asa de siembra calibrada) (CMI-Promex Inc., NJ, EUA)
 - Agitadora vorticial o vórtex
 - Baño de agua o baño María
- Reactivos
 - Discos de antimicrobianos (o antibióticos) para antibiograma (Oxoid)
 - Polvos antimicrobianos o antibióticos (Sigma-Aldrich o del fabricante de productos farmacéuticos, si lo hay)
 - Caldo para infusión de cerebro - corazón (BHI) (Oxoid)
 - Agar chocolate inclinado
 - Base de agar Columbia (Oxoid)
 - Agar tripticasa de cisteína (ATC) (contiene glucosa, maltosa y sacarosa en una concentración final de 1% a 2%) (Difco, Becton, Dickinson)
 - Discos (antibióticos) (Oxoid)
 - Tiras Etest (bioMérieux, Francia)
 - Medio base para GC (Difco)
 - Glicerol (15% a 20%) (Sigma-Aldrich)
 - Tinción de Gram (cristal violeta, solución de yodo, [acetona, etanol-acetona o etanol], safranina) (PRO-LAB Diagnostics)
 - Isovitalex-Vitox (Oxoid)
 - Azul de metileno (PRO-LAB Diagnostics)
 - Caldo de Mueller-Hinton (Oxoid)
 - Nitrocefina (Oxoid)
 - Reactivo de la oxidasa
 - Medios selectivos (Thayer-Martín, Thayer-Martín modificado y NYC)
 - Estos medios pueden adquirirse comercialmente, mediante proveedores locales o se puede preparar en el propio laboratorio, es decir, preparación interna
 - Medio de transporte, no nutritivo (Amies o Stuart) (Sigma-Aldrich)
- Material fungible
 - Crioviales
 - Portaobjetos de vidrio
 - Pipetas graduadas
 - Líquido criogénico estéril con perlas congeladas
 - Placas de microtitulación
 - Pipetas de Pasteur
 - Placas de Petri (90 mm)
 - Puntas de pipeta (1 µl, 10 µl, 200 µl, 1.000 µl)
 - Tubos transparentes de plástico
 - Asa de siembra de plástico (1 µl, 10 µl)
 - Frasco Bijou de policarbonato con tapa de rosca
 - Gradillas para tubos (15 ml o 50 ml) y para crioviales (2 ml)
 - Hisopos (dacrón o rayón)

- Pruebas (estuches comercializados)
 - Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular)
 - API NH (bioMérieux)
 - APTIMA Combo 2 (Gen-Probe)
 - Prueba de la cefalosporina cromogénica (discos de nitrocefina)
 - Cobas Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics)
 - Gonocheck-II (E-Y Laboratories)
 - GonoGen II (New Horizons Diagnostics Corporation)
 - Captura de híbridos de segunda generación (HC2) CT/NG (Digene Corporation)
 - MicroTrak (Trinity Biotech PLC Co)
 - Caldo de Mueller–Hinton (Oxoid)
 - Prueba de la oxidasa (BACTIDROP oxidase)
 - PACE 2 (Gen-Probe)
 - Prueba Phadebact Monoclonal GC (Boule Diagnostics)
 - ProbeTec ET (Becton, Dickinson)
 - ProbeTec GC Q (Becton, Dickinson)
 - RapID NH (Remel-Termo Fisher Scientific)
 - Medio selectivo (Thayer–Martin, Thayer–Martin modificado y NYC) (Oxoid)

Capítulo 5. Infecciones por clamidias

- Equipo
 - Balanza analítica (para pesar)
 - Cabina de seguridad biológica o bioseguridad
 - Centrifugadora
 - Crioviales
 - Microscopio de fluorescencia
 - Congelador (–80 °C)
 - Mechero de gas
 - Hemocitómetro
 - Incubadoras (una a 37 °C y una a 35 °C)
 - Pipeteador multicanal
 - Pipeteadores (10 µl, 200 µl, 1.000 µl)
 - Homogeneizador ultrasónico
 - Matraz de vacío
 - Agitadora vorticial
 - Baño de agua o baño María
- Reactivos
 - Acetona
 - Anfotericina B
 - Anticuerpos monoclonales fluorescentes contra *C. trachomatis*
 - Solución de glucosa-potasio-sodio-fosfato (GKNP)
 - Medio de Dulbecco con modificación de Iscove (IMDM-VGA) (Invitrogen; Sigma-Aldrich)
 - Medio de transporte sacarosa-fosfato (SP) con suero y antibióticos
 - Medio de conservación sacarosa-fosfato-glutamato (SPG)

- Material fungible
 - Puntas de pipeta de 200 µl
 - Pipetas calibradas
 - Crioviales
 - Cubreobjetos de vidrio
 - Portaobjetos de vidrio
 - Línea celular McCoy (McCoy B; ATCC CRL-1696)
 - Pipetea de Pasteur
 - Película de sellado
 - Matrices de cultivo tisular
 - Placas de cultivo tisular (96 pocillos)
 - Viales de cultivo tisular (5 ml) con cubreobjetos de vidrio de 13 mm

Capítulo 6. Tricomoniasis

- Equipo
 - Refrigerador (4 °C)
 - Incubadora (37 °C)
 - Microscopio óptico
- Reactivos
 - Medio Diamond
 - Medio Kupferberg
- Material fungible
 - Cubreobjetos
 - Hisopos de dacrón o de rayón con mango de aluminio
 - Hisopos de dacrón o de rayón con mango de plástico
 - Portaobjetos de vidrio
- Pruebas (estuches comercializados)
 - Prueba diagnóstica en el punto de atención: Prueba rápida para tricomonas OSOM (Genzyme Diagnostics) (autorizado solo para muestras vaginales tomadas con hisopo)
 - Estuche para cultivo: Sistema de cultivo InPouch TV (BioMed Diagnostics)
 - Prueba de amplificación de ácidos nucleicos: APTIMA TV (Gen-Probe)

Capítulo 7. Vaginosis bacteriana

- Equipo
 - Microscopio óptico
 - Espéculo
- Reactivos
 - Hidróxido de potasio al 10% (KOH)
 - Tinción de Gram (cristal violeta, solución de yodo, safranina) (PRO-LAB Diagnostics)
 - Solución salina o solución salina amortiguada con fosfato (PBS)

- Material fungible
 - Hisopos de algodón
 - Cubreobjetos de vidrio
 - Tiras de papel indicador del pH (intervalo de pH 3,8–6,0)
- Pruebas (estuches comercializados)
 - Affirm VP III (Becton, Dickinson)
 - BV blue (OSOM)
 - FemExam Card Test (New Rapid Diagnostic Kit) (Litmus Concepts)

Capítulo 8. Candidiasis

- Equipo
 - Incubadora a 36 °C
 - Microscopio óptico
- Reactivos
 - Solución de KOH al 10%
 - Suero bovino (o equino)
 - Tinción de Gram (cristal violeta, solución de yodo, safranina) (PRO-LAB Diagnostics)
 - Solución salina o solución salina amortiguada con fosfato (PBS)
 - Agar de Sabouraud dextrosado, selectivo, con o sin cloranfenicol
 - Medio de transporte (Amies)
- Material fungible
 - Hisopos de algodón
 - Cubreobjetos
 - Portaobjetos de vidrio
 - Tiras de papel indicador del pH
 - Tubos de ensayo
- Pruebas (estuches comercializados)
 - API 20C (bioMérieux)
 - API ID3 2C (bioMérieux)
 - Vitek Yeast Biochemical Card (bioMérieux)

Capítulo 9. Infecciones por el virus del herpes simple

- Equipo
 - Centrifugadora
 - Congelador (–20 °C y –80 °C)
 - Incubadora (36 °C, 5% de CO₂)
 - Microscopio (de fluorescencia y estereoscópico)
 - Agitadora vorticial o vórtex

- Reactivos
 - Acetona
 - Isotiocianato de fluoresceína (sondas moleculares)
 - Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(2- etanosulfónico) (HEPES)
 - Solución salina amortiguada con fosfato (PBS)
 - Sacarosa

- Material fungible
 - Hisopos con punta de algodón, dacrón o conglomerado de nilón
 - Tubos de cultivo
 - Anticuerpos monoclonales específicos de tipo marcados con isotiocianato de fluoresceína o inmunoperoxidasa (para usar directamente en células infectadas)
 - Portaobjetos de microscopio
 - Frascos ampolla con cubreobjetos circular al fondo (shell vial) o placas multipocillos
 - Hisopos con punta de algodón, dacrón o conglomerado de nilón y mango de madera, plástico o aluminio
 - Agujas estériles
 - Espéculo vaginal
 - Frascos con medio de transporte

- Pruebas
 - Prueba de amplificación de ácidos nucleicos (comercializado pero no autorizado por la FDA)
 - Pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención para el VHS que están comercializadas pero sin evaluar en muchos entornos

Capítulo 10. Sífilis

- Analizador genético ABI 310 (Applied Biosystems)
 - Microscopio binocular con condensador de campo oscuro
 - Analizador de quimioluminiscencia
 - Cámara de electroforesis
 - Lector de enzimoimmunoanálisis (ELISA)
 - Microscopio de fluorescencia
 - Congelador (–70 °C)
 - Refrigerador
 - Homogeneizador ultrasónico
 - Baño de agua o baño María

- Reactivos
 - Acetona
 - IgG o IgM antihumana de cabra marcada con fosfatasa alcalina
 - IgG antihumana de cabra biotinilada, marcada con estreptavidina-peroxidasa
 - Carbón
 - Fluoresceína
 - Conjugado de fluoresceína
 - Globulina contra *Treponema pallidum* marcada con fluoresceína
 - Peroxidasa de rábano

- Aceite de inmersión
- Parafina
- Solución salina amortiguada con fosfato (PBS)
- Proteínas recombinantes para inmunoensayos lineales (TpN47, TpN17, TpN15 y TmpA)
- Rojo de tolueno
- Material fungible
 - Asas de siembra bacteriológicas o espátula de acero inoxidable
 - Hisopos de algodón
 - Portaobjetos de microscopio
 - Placas de microtitulación
 - Tiras inmunocromatográficas de nitrocelulosa
 - Pipetas
 - Tiras de membrana de nitrocelulosa
 - Jeringas (2 ml o 5 ml)
 - Pruebas (estuches comercializados y preparación en el laboratorio de los reactivos de las pruebas)
- Pruebas
 - Pruebas serológicas (no treponémicas o reagínicas)
 - Prueba de la reagina plasmática rápida (RPR) (Becton, Dickinson)
 - Prueba de rojo de toluidina en suero no calentado (TRUST; New Horizon Diagnostics)
 - Test serológico para la sífilis (TTS o VDRL por su sigla en inglés)
 - Reacción de Wasserman (RW)
 - Pruebas serológicas (treponémicas)
 - Prueba de absorción de los anticuerpos antitreponémicos fluorescentes (FTA-Abs)
 - Prueba de hemaglutinación con *T. pallidum* (TPHA por su sigla en inglés)
 - Aglutinación pasiva de partículas para la detección de anticuerpos contra *T. pallidum* (TPPA) (Fujirebio)
 - Enzimoimmunoanálisis treponémico (EIA) y ensayos por quimioluminiscencia (CIA)
 - Detección de anticuerpos treponémicos por inmunoelectrotransferencia (WB)
 - Pruebas diagnósticas rápidas en el punto de atención para la sífilis
 - Estas pruebas se formatean como:
 - 1) Pruebas en tiras de flujo lateral (véase el procedimiento en el capítulo 10)
 - 2) Dispositivo o sistema de flujo directo (Span Diagnostics, Ltd.)
 - Pruebas dobles: rápidas no treponémicas y treponémicas (Chembio Diagnostic Systems, Inc.)

Capítulo 11. Linfogranuloma venéreo

- Prueba
 - Las pruebas moleculares para distinguir las cepas que causan el linfogranuloma venéreo de las que no lo producen se basan en la detección del gen *pmpH*, que solo está presente en las cepas de linfogranuloma venéreo

Capítulo 12. Chancro blando

- Equipo
 - Centrifugadora
 - Congelador (–70 °C)
 - Incubadora (32 a 34 °C, atmósfera saturada de vapor de agua o 5% de CO₂)
 - Microscopio óptico
 - Estándares nefelométricos de McFarland (PRO-LAB Diagnostics)
 - Baño de agua o baño María
- Reactivos
 - Detección de la fosfatasa alcalina (n-butanol, tampón de citrato-hidróxido de sodio de Sörensen [0,01 mol/l], 2,6-dibromoquinona-4-clorimida en metanol [5 g/l], hidrogenofosfato de sodio sin fenol)
 - Reactivos de tinción de Gram (véase el anexo 4)
 - Prueba de reducción de nitratos (solución de nitrato de sodio [0,5 g/l], tampón de fosfato, pH 6,8 [0,025 mol/l], ácido acético [5 mol/l], naftilamina [5 g/l])
 - Prueba de la oxidasa (dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina)
 - Prueba de la porfirina (solución de sulfato de magnesio, tampón de fosfato, pH 6,9 [0,1 mol/l], hidrocloreuro del ácido aminolevulínico [2 mol/l])
 - Medios de crecimiento (véase el anexo 4)
- Material fungible
 - Asas de siembra bacteriológicas
 - Hisopo de algodón
 - Tiras de papel de filtro
- Pruebas (identificación de dianas moleculares)
 - Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos desarrolladas en laboratorios de investigación

Capítulo 13. Donovanosis (granuloma inguinal)

- Equipo
 - Microscopio óptico
 - Pinzas para biopsia en sacabocados
- Reactivos
 - Etanol al 95%
 - Reactivos de la tinción de Giemsa (véase el anexo 4)
 - Reactivo de la tinción de Leishman (véase el anexo 4)
 - Técnica de impregnación con plata de Warthin-Starry (véase el anexo 4)
 - Parafina
- Material fungible
 - Portaobjetos de vidrio
- Pruebas (identificación de dianas moleculares)
 - Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos desarrolladas en laboratorios de investigación, dirigidas al gen *phoE*

Capítulo 14. Infecciones por el virus de los papilomas humanos

- Equipo
 - Balanza analítica (para pesar)
 - Centrifugadora
 - Cámara de electroforesis
 - Microscopio de fluorescencia
 - Congelador (–70 °C)
 - Refrigerador
 - Incubadora (37 °C)
 - Horno de microondas
 - Adaptador de pipetas
 - Transiluminador ultravioleta
 - Agitadora vorticial o vórtex
 - Baño de agua o baño María
- Reactivos
 - Ácido acético
 - Agarosa o acrilamida en polvo
 - Bromuro de etidio
 - Sondas de DNA específicas del VPH
 - Aceite de inmersión
 - Mercaptoetanol
 - Marcadores serológicos
- Material fungible
 - Portaobjetos de vidrio
 - Microplacas o tubos pequeños para la reacción de la RCP
 - Pipetas (2 ml, 5 ml y 10 ml)
 - Puntas con filtro (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)
- Pruebas (véanse también los cuadros 14.2 y 14.3, capítulo 14)
 - Métodos de detección de DNA del VPH
 - RCP con la técnica de captura de híbridos 2 (HC2), Prueba del VPH (Qiagen)
 - Prueba del VPH en el punto de atención
 - Prueba del VPH COBAS 4800 (Roche)
 - Prueba de genotipado del VPH en matriz lineal (Roche)
 - Prueba de genotipado del VPH RUO LQ (Qiagen)
 - Estuche de genotipado múltiple del VPH (Multimetric)
 - Prueba del RNAm del VPH
 - Prueba del VPH APTIMA (Gen-Probe)
 - PreTect HPV proofer (Norchip)

Capítulo 15. Infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana

- Equipo
 - Centrifugadora
 - Cámara de electroforesis
 - Lector y lavador de ELISA
 - Citómetro de flujo
 - Microscopio de fluorescencia
 - Congelador (–25 °C)
 - Refrigerador
 - Incubadora (37 °C)
 - Adaptador de pipetas
 - Baño de agua o baño María

- Reactivos
 - Acrilamida en polvo
 - Aceite de inmersión
 - Anticuerpos monoclonales marcados para análisis en un citómetro de flujo (antiCD4, antiCD3, antiCD8 y antiCD45)

- Material fungible
 - Estabilizadores sanguíneos (tubos Cyto-Chex y TransFix)
 - Tubos sanguíneos
 - Pipetas calibradas
 - Reactivo colorante o reactivo de detección (oro coloidal)
 - Hisopos de algodón
 - Papel de filtro
 - Anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia
 - Tiras de la membrana (con proteínas separadas específicas del VIH o proteínas recombinadas o péptidos)
 - Portaobjetos (para células fijadas infectadas por el VIH)

- Pruebas
 - Pruebas serológicas
 - EIA (de primera, segunda, tercera y cuarta generación)
 - Pruebas rápidas
 - Ensayos confirmatorios (serológicos)
 - Pruebas de inmunofluorescencia
 - Pruebas de WB
 - Inmunoensayos lineales
 - Pruebas moleculares
 - Detección de RNA, DNA y p24 del VIH (estuches comercializados para las PAAN)
 - Prueba diagnóstica en el punto de atención de DNA por RCP
 - Prueba de resistencia genotípica del VIH a los antirretrovirales (TRUGENE y Viroseq)
 - Prueba de resistencia fenotípica del VIH a los antirretrovirales (sumamente costosa, no se recomienda para el diagnóstico habitual)

Agradecimientos

Los autores agradecen a Rajinder Parti y Aura Helena Corredor su colaboración en la preparación de este anexo.

Para mayor información favor ponerse en contacto con:
Department of Reproductive Health and Research
World Health Organization
Avenue Appia 20, CH-1211 Geneva 27,
Switzerland
Fax: +41 22 791 4171
E-mail: reproductivehealth@who.int
www.who.int/reproductivehealth



ISBN 978 92 4 350584 8



9 789243 505848