

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

24. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales

2 0 0 7

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

Coordinador: Fernando Vázquez Valdés

**Autores: Javier Aznar Martín
María Antonia Blanco Galán
José Antonio Lepe Jiménez
Luis Otero Guerra
Fernando Vázquez Valdés**



ISBN: 978-84-611-7214-6

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Consideraciones clínicas

3. Recogida de las muestras

- 3.1. Aspectos generales
- 3.2. Medios de transporte y recogida de las muestras
- 3.3. Tipos de muestras
 - 3.3.1. Exudado anal
 - 3.3.2. Exudado balano-prepucial.
 - 3.3.3. Exudado de la glándula de Bartolino
 - 3.3.4. Exudado endocervical
 - 3.3.5. Exudado faríngeo
 - 3.3.6. Exudado parauretral
 - 3.3.7. Exudado de úlceras
 - 3.3.8. Exudado uretral
 - 3.3.9. Exudados vaginales
 - 3.3.10. Secreción prostática
 - 3.3.11. Semen
 - 3.3.12. Serología
 - 3.3.13. Líquido cefalorraquídeo(LCR)
 - 3.3.14. Hemocultivos

4. Transporte y conservación de las muestras

5. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de microbiología

6. Procesamiento de las muestras

- 6.1. Inoculación e identificación presuntiva
- 6.2. Pruebas rápidas para el diagnóstico de las ITS
- 6.3. Procedimientos específicos de detección de los patógenos causales de las ITS
 - 6.3.1. *Neisseria gonorrhoeae*
 - 6.3.2. *Chlamydia trachomatis*
 - 6.3.3. Micoplasmas genitales
 - 6.3.4. *Treponema pallidum*
 - 6.3.5. Donovanosis
 - 6.3.6. Chancroide
 - 6.3.7. Herpes genital
 - 6.3.8. Linfogranuloma venéreo
 - 6.3.9. Vaginosis bacteriana
 - 6.3.10. Vulvovaginitis candidiasica
 - 6.3.11. Tricomoniasis
 - 6.3.12. Papilomavirus humanos (VPH)
 - 6.3.13. Otros

7. Interpretación e información de los resultados

8. Aproximación diagnóstica al paciente con infecciones de transmisión sexual (ITS) y otras infecciones genitales

9. Evidencias científicas del diagnóstico de las its (anexo I)

10. Bibliografía

11. Anexo I

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT-ITS-1. RPR (Rapid Plasma Reagin) para *Treponema pallidum*
- 2. PNT-ITS-2. TPHA (Hemaglutinación) para *Treponema pallidum*
- 3. PNT-ITS-3. Detección cualitativa rápida de *Chlamydia trachomatis*
- 4. PNT-ITS-4. Cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*
- 5. PNT-ITS-5. Cultivo y sensibilidad a los antimicrobianos de micoplasmas genitales mediante el sistema comercial Mycoplasma IST2
- 6. PNT-ITS-6. Detección del ADN del virus del papiloma humano (VPH) mediante captura de híbridos

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

24. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL Y OTRAS INFECCIONES. 2007

Coordinador: Fernando Vázquez Valdés

**Autores: Javier Aznar Martín
María Antonia Blanco Galán
José Antonio Lepe Jiménez
Luis Otero Guerra
Fernando Vázquez Valdés**

1. INTRODUCCIÓN

Se calcula que en el mundo existen 333 millones de casos de infecciones de transmisión sexual (ITS) en adultos con edades comprendidas entre los 15 y los 49 años, de los que 16 millones se producen en Europa. Entre estos, los debidos a *Chlamydia trachomatis* ascienden a 89 millones de casos nuevos (de 563 a 10.081 casos por 100.000 habitantes), de los que 2,75 millones corresponden a Europa. En el caso de la gonococia se calcula que existen 62,2 millones de casos (0,6 millones en Europa). Los casos nuevos de sífilis ascienden a 12,2 millones en el mundo (0,1 millones en Europa). En Africa, Sudamérica y Asia se producen entre 100 y 1.000 casos nuevos por 100.000 habitantes. El herpes genital es la primera causa de úlceras genitales en países desarrollados y subdesarrollados, existiendo a nivel mundial 20 millones de casos. Se calcula que se producen 270 millones de casos de infecciones de transmisión sexual por virus del papiloma humano (diagnosticados por presencia de ADN vírico) de los cuales 27 millones presentan condilomas genitales, otros 27 millones lesiones de bajo grado, 1,5 millones lesiones de alto grado y 0,4 millones carcinoma de cérvix. En el caso de la tricomoniasis se calcula que hay unos 170 millones de casos nuevos en el mundo y en Europa unos 5,53 millones.

En este documento se desarrollarán los aspectos relativos tanto a las ITS como a otras infecciones genitales, que aunque no sean de transmisión sexual, su diagnóstico requiere un procesamiento de las muestras similar al utilizado para el diagnóstico de las ITS. Se excluyen las infecciones producidas por los virus de las hepatitis B y C, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr, así como las producidas por patógenos entéricos y por protozoos intestinales.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

El estudio de las ITS se realiza generalmente desde una clasificación sindrómica que permita al laboratorio utilizar los medios y recursos más apropiados para el diagnóstico de los patógenos implicados. Según estos criterios, las ITS se clasifican en:

A. Úlceras genitales. Las causas más frecuentes de estas infecciones son los virus del herpes simple (VHS) y *Treponema pallidum* (agente causal de la sífilis o lúes); otros agentes etiológicos menos frecuentes son *Haemophilus ducreyi* (productor del chancroide), *Chlamydia trachomatis* serovariedades L1, L2, L3 (causales del linfogranuloma venéreo, y más excepcionalmente, *Klebsiella granulomatis* (antes denominado *Calymmatobacterium granulomatis*, agente causal de la donovanosis o granuloma inguinal).

B. Uretritis y Cervicitis. La uretritis gonocócica está producida por *Neisseria gonorrhoeae*. La uretritis no gonocócica puede estar causada por diferentes

agentes como *C. trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, VHS, *Trichomonas vaginalis*, especies de *Candida*, enterobacterias, *T. pallidum*, virus del papiloma humano (VPH) y otros menos frecuentes como adenovirus, *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Clostridium difficile*, y otras bacterias anaerobias. Los agentes causales de cervicitis son *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*. Esta infección puede acompañar a la vulvovaginitis producida por tricomonas, por VHS-2, y por otros agentes menos frecuentes como *Capnocytophaga* spp., *Pasteurella bettyae*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Streptococcus agalactiae*.

C. Vulvovaginitis. Los agentes etiológicos más frecuentes son diferentes especies del género *Candida*, así como *Trichomonas vaginalis*. La vaginosis bacteriana puede estar causada por *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides bivius*, y *Bacteroides disiens*. Otros agentes causales de vulvovaginitis son *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella-Shigella*, *N. gonorrhoeae*-*C. trachomatis*, VHS y CMV, y en niñas prepuberales, los oxiuros.

D. Otros. Otros agentes causales de ITS son el VPH (revisado en este documento en el contexto de una ITS con expresión clínica), la infección denominada *molluscum contagiosum*, los virus de las hepatitis B, C y VIH, y algunos ectoparásitos (sarna y ladillas). También pueden producir ITS el CMV, el virus de Epstein-Barr, así como patógenos entéricos (*Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter*) y protozoos intestinales (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y microsporidios). En las Tablas 1A y 1B se detallan los agentes más probables en función del cuadro clínico.

Es importante recordar que a todos los pacientes con ITS se les debe realizar una determinación de anticuerpos frente al VIH, especialmente a los pacientes con sífilis y úlceras genitales ya que estas patologías favorecen la adquisición y transmisión del VIH, mientras que las ITS inflamatorias favorecen sólo la transmisión del VIH.

3. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

3.1. ASPECTOS GENERALES

Las muestras genitales mal recogidas, como aquellas poco representativas o con pocas células, las obtenidas de lesiones cronificadas, las recogidas después de iniciado el tratamiento antimicrobiano, en contacto con desinfectantes, de volumen escaso, en recipientes no adecuados, enviadas con demora o almacenadas a una temperatura inadecuada, solo conducen a errores diagnósticos. Si no se puede realizar una inoculación *in situ*, las muestras se deben recoger siempre utilizando medios de transporte.

Tabla 1A. Cuadro clínico y microorganismos implicados en las ITS

Impresión clínica	Agentes etiológicos habituales en las ITS	Otros microorganismos implicados (no ITS)
Amnionitis (líquido amniótico)	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>U. urealyticum</i>	<i>Bacteroides</i> spp., <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>G. vaginalis</i> (también en asintomáticas), <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i>
Bartolinitis (glándulas de Bartolino)	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	Anaerobios, <i>E. coli</i> , estreptococos, <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>U. urealyticum</i>
Cervicitis	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , VHS, <i>M. genitalium</i>	<i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>
Enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) (salpingitis)	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> <i>M. genitalium</i>	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., enterobacterias, <i>Enterococcus</i> spp., <i>H. influenzae</i> , <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp, <i>Prevotella bivia</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. agalactiae</i>
Endometritis	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i>	Actinomicetos, <i>Bacteroides</i> spp., enterobacterias, <i>Enterococcus</i> spp., <i>G. vaginalis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>M. hominis</i> (en cervix)
Endometritis postparto	-	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>B. bivius</i> , <i>B. disiens</i> , cocos anaerobios, enterobacterias, <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Epididimitis	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> <i>U. urealyticum</i>	Enterobacterias, <i>M. tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
Esquenitis (glándula de Skene)	<i>N. gonorrhoeae</i>	-
Orquitis	-	Enterobacterias, estafilococos, estreptococos, <i>P. aeruginosa</i> , virus de las paperas

Tabla 1B. Cuadro clínico y microorganismos implicados en las ITS

Impresión clínica	Agentes etiológicos habituales en ITS	Otros microorganismos implicados (no ITS)
Prostatitis	<i>T. vaginalis</i>	<i>E. coli</i> , otras enterobacterias, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>S. aureus</i> (también productor de abscesos prostáticos)
Úlceras genitales con linfadenopatía	<i>T. pallidum</i> , <i>H. ducreyi</i> , <i>C. trachomatis</i> (LGV), <i>Klebsiella granulomatis</i> , VHS, VPH	-
Uretritis masculina	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> , VHS	<i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>S. agalactiae</i> , raro: <i>N. meningitidis</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Adenovirus</i>
Uretritis femenina (y síndrome uretral)	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>U. urealyticum</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Vaginosis bacteriana	-	<i>G. vaginalis</i> , <i>M. hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp. Cocos anaerobios, <i>Prevotella</i> spp., <i>Atopium vaginae</i> y otros
Vulvovaginitis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., enterobacterias, <i>Eubacterium nodatum</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>Pasteurella bettyae</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>P. disiens</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , VHS, <i>C. diphtheriae</i> (raro)

En las ITS se deben siempre tener presentes los principios generales de la recogida de muestras y específicamente los que se aplican a las muestras genitales: a) empleo de torundas y medios específicos, especialmente en el caso de *Chlamydia* (torundas de dacrón o alginato cálcico), *Mycoplasma* (dacrón o poliéster) o herpes (dacrón); b) realizar un agotamiento de la muestra (es decir, utilizar varias torundas, insertarlas en los medios de transporte y rotarlas completamente) para evitar la posibilidad de falsos negativos; c) inoculación directa de las muestras en los medios de cultivo, método muy recomendable directamente en la consulta, inoculando medios de transporte para *Mycoplasma*, medios de cultivo para tricomonas o incluso cultivo de gonococo (lo ideal es enviar al laboratorio en atmósfera con CO₂ y en un medio de cultivo específico).

3.2. MEDIOS DE TRANSPORTE Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Como norma general se debe realizar: a) envío rápido de la muestra al laboratorio de microbiología para asegurar la viabilidad y el aislamiento de microorganismos de crecimiento difícil y evitar el sobrecrecimiento de bacterias de crecimiento más rápido, además de acortar la duración del contacto de la muestra con anestésicos locales usados en los

procedimientos de recogida de algunas muestras; b) uso de sistemas de transporte de muestras adecuados para microorganismos aerobios: torundas de alginato cálcico o dacrón (para clamidias), torundas de algodón normales o finas, con varilla de plástico o madera, con medio de cultivo de Amies, tubos con medio de "urea-arginina" (medio líquido para transporte de micoplasmas), tubos con medio de Roiron o Diamond como medio de transporte y cultivo de *Trichomonas vaginalis*, medio de transporte para virus, tubos secos para envío de suero.

3.3. TIPOS DE MUESTRAS

3.3.1. Exudado anal. Para realizarlo, y para el diagnóstico de la gonococia rectal, se debe introducir una torunda de algodón con medio tipo Stuart-Amies a través del esfínter anal unos 3 cm y rotar contra las criptas rectales durante unos segundos. Se ha de evitar el contacto con materia fecal, lo que invalidaría la muestra, obligando a una nueva toma. Si se sospecha proctitis por *Chlamydia*, se emplearán torundas de alginato cálcico o dacrón.

3.3.2. Exudado balano-prepucial. Se debe recoger la muestra con una torunda estéril de algodón con medio tipo Amies fundamentalmente para el aislamiento de *Candida* spp., y de bacterias anaerobias y aerobias (principalmente *Streptococcus agalactiae*). Para

realizar la toma se frota la torunda en el surco balano prepuccial.

3.3.3. Exudado de la glándula de Bartolino. Para realizar la toma en estadios tempranos de la infección, previa colocación de la paciente en posición ginecológica, se coloca un espéculo humedecido con agua y sin lubricantes y se inserta una torunda estéril en la glándula de Bartolino que se introducirá en un medio de transporte para posterior cultivo de *N. gonorrhoeae*. Se utilizará otra torunda estéril para detección de *C. trachomatis*. Se realizará una toma con una tercera torunda estéril con medio de transporte para el resto de patógenos (levaduras, etc). También se deben realizar tomas adicionales que se introducirán en los correspondientes medios de transporte para tricomonas y micoplasmas. Para estadios tardíos de la infección es preferible la aspiración con aguja y jeringa que se enviará al laboratorio para la búsqueda de los diferentes microorganismos implicados.

3.3.4. Exudado endocervical. Debe disponerse de una torunda específica para *Chlamydia* propia de la técnica concreta que utilice el laboratorio aunque el patrón de referencia actualmente son las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Se debe proceder inicialmente de forma similar a la utilizada para la toma del exudado vaginal (ver más adelante), pero antes de obtener la muestra es necesario limpiar el moco cervical con una torunda seca y descartarla. Posteriormente, se debe comprimir suavemente el cérvix con el espéculo para introducir la torunda en el canal y repetir esta operación con otra torunda. Una de las torundas se empleará para el cultivo de gonococo y otras bacterias aerobias y anaerobias indicadas en la Tabla 1A y la otra para la detección de *C. trachomatis*.

3.3.5. Exudado faríngeo. Se utilizará un depresor lingual. Se debe frotar vigorosamente con la torunda sobre las zonas tonsilares, faringe posterior y zonas ulceradas, inflamadas o con exudados purulentos. Se investigará la presencia de gonococo y clamidia.

3.3.6. Exudado parauretral. Para la toma de esta muestra se frota con una torunda estéril las paredes de la uretra y posteriormente se introducirá en un medio de transporte tipo Stuart-Amies para el diagnóstico de los mismos microorganismos que en la uretritis.

3.3.7. Exudado de úlceras. Se limpiará la superficie de la lesión con una gasa humedecida en suero salino y se tendrán en cuenta las particularidades de los microorganismos que se pretendan detectar: a) para cultivo de virus, se emplearán bien medios de transporte específicos comercializados o se preparará en el laboratorio una solución tamponada con rojo fenol, antibióticos y una fuente proteica, como la albúmina. Con una torunda se frota la base de la lesión, con el fin de obtener células, y posteriormente se introducirá la torunda en el medio de transporte para desprender las células al medio. Para

ulceraciones con sospecha de infección por VHS se debe romper la vesícula y recoger el líquido con una torunda estéril o bien aspirar el líquido y después raspar la base de la vesícula con un bisturí y recoger con una torunda de dacrón frotando vigorosamente la base de la vesícula. Si la lesión es costrosa se debe retirar la costra con la ayuda de la punta de un escalpelo o aguja estéril. Posteriormente, tras humedecer la torunda con solución salina estéril se debe frotar vigorosamente la lesión evitando hacer sangrar a la misma durante el raspado. Se debe realizar una extensión en un portaobjetos para tinción por inmunofluorescencia directa (IFD); b) para cultivo de *H. ducreyi*, se puede usar indistintamente un escalpelo o aguja para aspirar el líquido de la úlcera evitando el sangrado, irrigar con solución salina e introducir en un medio de transporte a base de hemina y tioglicolato con L-glutamina, fracción V de albúmina bovina y vancomicina (3 mg/L). En este medio la supervivencia oscila entre 24 horas y 7 días a 4°C. Alternativamente se puede usar un medio de transporte (tipo Stuart-Amies) que confiere una supervivencia entre 2-4 horas y que puede ser de 24 horas si se refrigera a 4°C; c) en el caso de diagnóstico de sífilis, se debe limpiar la úlcera con una gasa estéril, apretar suavemente la base de la lesión hasta que se obtenga un líquido claro, tocar la úlcera con un portaobjetos, poner encima un cubreobjetos y observar inmediatamente al microscopio en campo oscuro. Si no se obtuviera líquido, se debe añadir una gota de solución salina a la lesión o aspirar el material de la base de la lesión con aguja y jeringa. Posteriormente se debe aspirar una gota de solución salina con la misma aguja y extender el material en un portaobjetos. Para la realización de IFD, se realizarán improntas de la base de la úlcera en un portaobjetos, dejar secar a temperatura ambiente y enviar laboratorio para su tinción y examen. El tipo de fijación de la muestra depende del tipo de anticuerpos utilizados en la tinción. Si se va a teñir con anticuerpos policlonales se fijará con acetona (10 minutos), dejando secar al aire. Si se va a teñir con anticuerpo monoclonal, se debe fijar con 1-2 gotas de metanol al 100% durante 10 segundos, dejando escurrir y secar al aire; d) en el caso de sospecha de donovanosis, las muestras tomadas por debajo de la superficie de la úlcera tienen mejor rendimiento que las muestras superficiales. Son adecuados dos tipos de muestras para el diagnóstico: la biopsia o raspado del borde activo de la lesión y las muestras del tejido de granulación de la úlcera obtenidos con ayuda de un escalpelo. Estas muestras se colocan sobre un porta y se dejan secar al aire. Es importante evitar en lo posible el sangrado. Para aumentar la calidad de las muestras obtenidas se debe realizar una apropiada limpieza de la úlcera con solución salina estéril; e) en el caso de sospecha de linfogranuloma venéreo (LGV) se debe aspirar la úlcera (o realizar una punción de la adenopatía y

aspirar su contenido) y extender sobre un porta el aspirado para realizar una tinción de IFD o preferiblemente para detección de ácidos nucleicos y genotipado en laboratorios de referencia para la confirmación de los casos.

3.3.8. Exudado uretral. Para obtener un mejor rendimiento, el paciente no debe haber orinado en las 2 horas previas a la realización de la toma de la muestra. Se deben usar torundas finas con varilla de alambre, de alginato cálcico o dacrón y con medio de transporte tipo Stuart-Amies. Si existe secreción abundante, puede recogerse con la torunda, incluso “exprimiendo” la uretra. Si no fuese el caso, se debe introducir la torunda suavemente por la uretra unos 2 cm realizando un movimiento de rotación, para posteriormente extraerla e introducirla en el medio de transporte. Lo ideal es utilizar varias torundas de forma consecutiva, procurando que cada vez penetren más en la uretra, para así recoger muestra de zonas no recogidas previamente. Idealmente se debe realizar una extensión en un porta para tinción de Gram, inoculación directa de la muestra en un medio de cultivo para gonococo, detección de clamidia mediante amplificación de ácidos nucleicos y cultivo para *Ureaplasma urealyticum* por métodos comerciales como el sistema Mycoplasma IST. Actualmente no se recomienda ni el exámen en fresco para la visualización de tricomonas ni la IFD para la detección de clamidia debido a su baja sensibilidad. Es recomendable la realización del cultivo de tricomonas. Existen también técnicas de PCR para detección de tricomonas y *M. genitalium* que se realizan en laboratorios de referencia.

3.3.9. Exudados vaginales. Se precisa un espéculo que se introducirá sin la utilización de lubricante. Utilizando una torunda de alginato cálcico o de dacrón se recomienda recoger el exudado de la zona donde éste sea más abundante, o en su caso, del fondo de saco vaginal posterior. Se debe recordar que si bien el exudado vaginal es óptimo para la recuperación de *Candida* spp., *T. vaginalis*, y para el diagnóstico microbiológico de las vaginosis, cuando se sospeche la infección por *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis*, se debe realizar la toma de exudado endocervical (excepto en mujeres histerectomizadas en las que se realiza la toma en el fornix posterior). Se deben enviar dos muestras, vaginal y endocervical, debidamente rotuladas para que el laboratorio emplee cada una en la recuperación de los patógenos que con mayor probabilidad se encontrarán en cada caso. En niñas está indicado el cultivo de *Haemophilus* spp. y estreptococos beta-hemolíticos aunque se pueden producir casos de vulvovaginitis por estos microorganismos también en mujeres adultas por lo que su presencia puede indicar patología o bien estado

de portador de los mismos. En el caso de *Streptococcus agalactiae* hay estado de portador en un porcentaje alto cuando se trata de prostitución y la presencia de *Haemophilus* spp. puede indicar relaciones sexuales orales.

3.3.10. Secreción prostática. Este tipo de muestras se debe recoger después de efectuar un masaje prostático por vía rectal. Una vez realizado el masaje, la muestra se debe recoger en un contenedor limpio, estéril, de boca ancha y con cierre de rosca. Para el diagnóstico general de las prostatitis se recomienda realizar la técnica Meares y Stamey que incluye muestras de orina inicial, del chorro medio, secreción prostática y orina postmasaje y más fácilmente la técnica de Nickel-Curtis que sólo incluye orina pre y postmasaje en la que el recuento bacteriano es mayor en la orina postmasaje en caso de prostatitis.

3.3.11. Semen. Este tipo de muestra se obtendrá mediante estimulación local y se recogerá en un contenedor limpio, estéril, de boca ancha y con cierre de rosca. El valor de esta muestra es escaso para el diagnóstico de prostatitis para el que se deben realizar las técnicas descritas en el apartado anterior. Para el diagnóstico de tricomoniasis se recomienda seguir la metodología descrita en el apartado 6.3.11.

3.3.12. Serología. Se deben extraer 5 ml de sangre sin anticoagulante, obtenida mediante venopunción previa desinfección de la zona donde se va a realizar la extracción.

3.3.13. Líquido cefalorraquídeo (LCR). Se obtendrá por punción lumbar para el diagnóstico indirecto de la neurosífilis (serología) o para cultivo en casos excepcionales de meningitis gonocócica.

3.3.14. Hemocultivos. En la infección gonocócica diseminada se recomienda recoger hemocultivos de la misma forma que para cultivo de otros microorganismos.

En las Tablas 2A y 2B se describen los tipos de muestras y los métodos necesarios para la recogida de las mismas.

4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

De especial importancia es el envío inmediato de las muestras al laboratorio en su medio de transporte ante la sospecha de infección por *N. gonorrhoeae*. Idealmente la muestra debe procesarse antes de 3 horas desde su recogida, y como máximo antes de 6-12 horas. La temperatura de transporte y almacenamiento debe ser de 35-37°C o en su defecto a temperatura ambiente, aunque estudios recientes han demostrado que el gonococo puede resistir la temperatura de refrigeración. En la Tabla 3 se detallan las temperaturas de conservación y el almacenamiento de las diferentes muestras.

Tabla 2A. Recogida de muestras para el diagnóstico de las ITS

Muestra	Preparación	Tipo, volumen	Recipiente	Comentario
Anal / rectal	-	Torundas (insertar tras el esfínter anal, mover, dejar 10-30 segundos (si hay heces repetir)	Con medio de transporte tipo Stuart-Amies y dacrón o alginato cálcico	Para gonococo, <i>C. trachomatis</i> , y patógenos entéricos en el caso de diarrea en VHS y VIH positivos
Cérvix	Limpiar secreciones vaginales y moco. Espéculo no lubricado	Secreción no contaminada 2 torundas	Medio transporte adecuado para <i>C. trachomatis</i> y para gonococo	ITS Infección postparto Procesar lo antes posible
Culdocentesis (EIP)	Quirúrgica	Líquido, secreciones Punción transvaginal	Para cultivo de anaerobios y patógenos causantes de ITS	EIP, ITS
DIU	Quirúrgica	DIU y secreción, pus	Estéril	Posibilidad de <i>Actinomyces</i> , levaduras Historia de sangrado
Endometrio	Como cérvix	Curetaje o aspiración	Medio de transporte para anaerobios (o torunda de dacrón)	Fiebre postparto, ITS Posible contaminación a través de la vagina
Epididimo y líquido testicular	Quirúrgica	Aguja y jeringa	Estéril	-
Faringe	Depresor y torunda	Torunda. Frotar las amígdalas y faringe posterior	Torunda con medio de transporte	No contaminar con mucosas y lengua
Glándulas de Skene	Descontaminación piel	Aspiración del material	Aguja y jeringa	-
Hemocultivos	Descontaminación piel	Sangre, volumen habitual	Frascos de hemocultivos	-
Lesión (sífilis)	Empapar en solución salina estéril con gasa	Preparar varios portas o aspirar líquido en un tubo capilar	Porta y cubre o tubo capilar	Sellar cubre, ver movilidad en material templado
Lesión pene	Preparar piel	Ver toma ulceraciones	-	Técnicas especiales para chancroide y granuloma inguinal

Tabla 2B. Recogida de muestras para ITS

Muestra	Preparación	Número, tipo, volumen	Recipiente	Comentario
Líquido amniótico	Descontaminación piel	Líquido sin contaminar	Tubo estéril	Rotura prematura de membranas >24 horas
LCR	Descontaminación piel	1 ml estéril	Tubo estéril	Sífilis
Líquido prostático	-	Secreción prostática	Tubo estéril	Para diagnóstico de prostatitis realizar la técnica de los 4 vasos de Meares-Stamey o de los 2 vasos de Curtis-Nickel
Nódulo linfático inguinal	Descontaminación piel	Biopsia o aspirado con aguja	Estéril	ITS A veces contaminado por toma del exudado Enviar a laboratorio de referencia
Suero	Descontaminación piel	5 ml sangre	Tubo seco	-
Uretra	Limpiar con gasa estéril o torunda en mujeres	Torunda con secreción uretral (exprimir la uretra). Si no es posible recoger 2 h después de orinar	Torundas con medio de transporte adecuado para <i>C. trachomatis</i> y para gonococo	En mujeres se puede estimular la secreción mediante masaje de la uretra contra la sínfisis del pubis a través de la vagina Tinción de Gram en varones
Vagina	Espéculo sin lubricante	Aspirar o con torunda (dacrón), Gram y exámen en fresco	Torundas con medio de transporte tipo Stuart-Amies	Ulceraciones: descartar patógenos de lesiones ulcerosas. Levaduras, gonococo (mejor cérvix), tricomonas, células clave
Vulva (incluye labios y glándulas de Bartolino)	Preparar piel con solución de NaCl 0,85% (no utilizar alcohol en mucosas)	Torunda o aspirado (absceso glándula Bartolino)	Torunda con medio transporte adecuado para <i>C. trachomatis</i> y para gonococo	Ver comentario de ulceraciones de vagina

Tabla 3. Temperaturas de conservación de las muestras

MUESTRAS	TEMPERATURA	ALMACENAJE	CONTENEDOR
Ex. anal	35°C	Estufa	Torunda con medio Stuart-Amies
Ex. de glándulas de Bartolino	35°C	Estufa	Torunda con medio Stuart-Amies
Ex. faríngeo	35°C	Estufa	Torunda con medio Stuart-Amies
Ex. nasofaríngeo	2°C-8°C	Frigorífico	Torunda con medio de transporte para virus
Ex. uretral (preparación para tinción de Gram)	Temperatura ambiente	Ambiente	Portaobjetos
Ex. uretral (micoplasmas, <i>C. trachomatis</i> y VPH)	2°C-8°C	Frigorífico	Tubo con caldo urea-arginina
Ex. uretral (otros microorganismos)	35°C	Estufa	Torunda con medio Stuart-Amies
Ex. vaginal	35°C	Estufa	Torunda con medio Stuart-Amies
Ex. vaginal (micoplasmas, <i>C. trachomatis</i> y VPH)	2°C-8°C	Frigorífico	Tubo con caldo urea-arginina
Ex. vaginal (sondas de ADN)	Temperatura ambiente	Ambiente	Tubo Affirm VP III*
Orina	2°C-8°C	Frigorífico	Frasco estéril con cierre de rosca
Suero	2°C-8°C	Frigorífico	Tubo con gel separador

* Método comercial de detección mediante sondas de ADN de *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp. y *T. vaginalis*

5. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Las muestras deben recibirse en el laboratorio de microbiología debidamente etiquetadas, de lo contrario deben rechazarse. Antes de su procesamiento el microbiólogo debe determinar si la muestra enviada es adecuada para el examen o cultivo solicitado, y si el recipiente y el volumen son adecuados.

6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

6.1. INOCULACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA

Los medios se deben inocular comenzando por el medio más general hasta el más selectivo (primero agar chocolate y posteriormente agar Thayer-Martin, agar Levine, agar CNA, agar Sabouraud). El cultivo en agar chocolate debe hacerse junto con el medio Thayer-Martin o similar debido a que algunos gonococos pueden inhibirse por la vancomicina que contiene el medio. La utilización de otros medios como agar Levine y agar CNA es opcional para otros microorganismos menos frecuentes en este tipo de muestras como por ejemplo *Pasteurella bettyae* (vease la Tabla 1B). En el caso de muestras de exudados

vaginales y uretrales se requieren dos torundas por muestra para una mejor recuperación de los microorganismos buscados; las muestras se deben incubar hasta 72 horas en las estufas correspondientes antes de descartarlas como negativas. Para el estudio de virus se deben seguir las normas generales de inoculación y procesamiento para el aislamiento de los mismos.

6.2. PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS ITS

En la Tabla 4 se expone la sensibilidad y especificidad de algunas pruebas rápidas de detección de cada uno de los patógenos.

6.3. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS DE DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS CAUSALES DE LAS ITS

6.3.1. *Neisseria gonorrhoeae*. Los medios de transporte tipo Stuart-Amies tienen un nivel de recuperación del gonococo a temperatura ambiente del 100% a las 12 horas y de más del 90% a las 24 horas. Otros medios de transporte como el Transgrow o Jembec son también útiles pero más caros.

Tabla 4. Pruebas de diagnóstico rápido de las ITS

Patógeno	Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>C. trachomatis</i>	Inmunocromatografía	<50	98
<i>N. gonorrhoeae</i>	Tinción Gram endocervix	45-65	90-99
	Tinción Gram uretra (con clínica)**	85-98	95-99
	Tinción Gram uretra (asintomático)	45-70	85-87
<i>T. pallidum</i> *	Microscopía de campo oscuro	80-90; 39-81	<100; 82-100
	Inmunofluorescencia directa**	90-95	>98
	RPR (anticuerpos no treponémicos)	73-100	79-98
Herpes simplex	Inmunofluorescencia directa**	70-80	>95
<i>H. ducreyi</i>	Tinción de Gram	<50	50-70
Donovanosis	Tinción directa Wirght-Giemsa	40-50	<50
Vaginosis bacteriana	Examen en fresco**	70-90	95-100
	Tinción de Gram**	60-80	95-100
	pH**	75-80	60-70
	Sonda de ADN (Affirm VPIII)**	>90	>99
	Rapid pH y Rapid Amine (FermCard)	80-90	85-90
	Rapid PIP (<i>G. vaginalis</i>)	80-85	90-92
<i>Candida</i> spp.	BVBlue system	91,7	97,8
	Examen en fresco**	40-60	>99
	Examen con KOH 10%	54-80	96
	Sonda de ADN (Affirm VPIII)**	85-90	>99
<i>T. vaginalis</i>	Examen en fresco**	62-92	99-100
	Aglutinación látex	95	100
	XenoStrip	90	92,5

* Hay variaciones en función del estadio de la enfermedad

** Técnicas recomendadas al alcance de cualquier laboratorio

La tinción de Gram es una técnica rápida y tan sensible como el cultivo en la uretritis sintomática en hombres, pero es poco sensible en otras localizaciones. Se debe observar con el objetivo de x100 con aceite de inmersión, durante al menos 2 minutos, buscando la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), núcleo rosa y citoplasma sin color), usualmente >4-5 leucocitos PMNs por campo de inmersión. Si se realiza una tinción de Gram de orina se recomienda recoger los primeros 10 ml de la micción y observar el sedimento para observar la presencia de leucocitos PMNs, que generalmente hay >10. El gonococo aparece como cocos gramnegativos ovales, arriñonados y en parejas intra y extracelularmente (Figura 1).

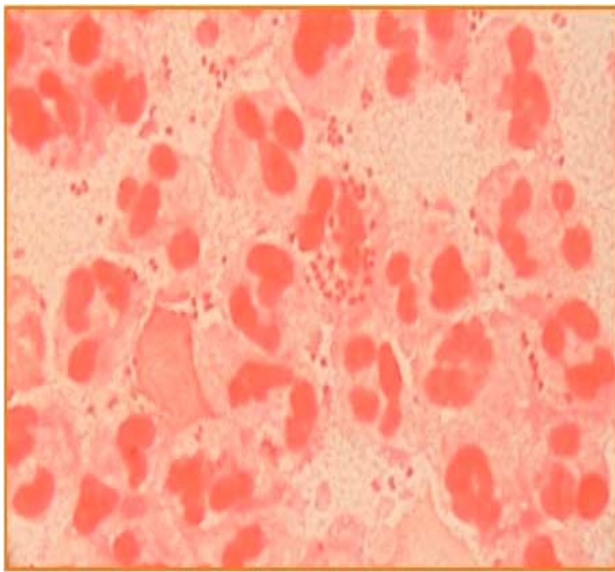


Figura 1. Tinción de Gram de exudado uretral de paciente con uretritis gonocócica (x1000)

La identificación presuntiva del gonococo a partir de muestras genitales se realiza mediante cultivo tanto en medios no selectivos, como el agar chocolate (algunas cepas pueden inhibirse en los medios selectivos), como en medios selectivos: agar Thayer-Martin, Martín-Lewis o medio New York city. El cultivo es la técnica de referencia por su sensibilidad, especificidad, bajo coste e idoneidad para múltiples tipos de muestras. Además permite obtener microorganismos viables para investigaciones epidemiológicas y sensibilidad a antibióticos. Las desventajas son la necesidad de recogida de muestras invasivas y los requerimientos de transportarse en condiciones adecuadas. Los medios se deben incubar en ambiente húmedo y con 5% de CO₂ a 37°C. El cultivo debe examinarse cada 24 h durante al menos 72 horas. La morfología característica en la tinción de Gram, pruebas de la oxidasa positiva y superóxido positiva, proporcionan una identificación suficientemente adecuada para iniciar el tratamiento antimicrobiano.

Para la identificación definitiva, además de las pruebas de identificación presuntiva se deben realizar una o más técnicas que demuestren los patrones de utilización de carbohidratos y las características inmunológicas o perfiles enzimáticos de los microorganismos. Cuando sea posible se deben utilizar dos métodos distintos (utilización de carbohidratos y método inmunológico).

Los medios clásicos utilizados para la determinación de los patrones de utilización de los carbohidratos consisten en agar con cistina, tripticasa y soja con dextrosa, maltosa, lactosa o sacarosa al 1%, sin embargo, no proporcionan buenos resultados para la identificación de gonococo ni de meningococo. Actualmente se utilizan varios métodos de identificación comerciales como el API NH (bioMérieux). Las pruebas de detección de ácidos nucleicos mediante hibridación con sondas y de amplificación de ácidos nucleicos poseen una elevada sensibilidad y especificidad. Para la realización de estas últimas se debe tener en cuenta la prevalencia de la enfermedad y el valor predictivo positivo en la población estudiada. La calidad de la muestra no es un factor crítico en la sensibilidad de detección de *N. gonorrhoeae*, a diferencia de *C. trachomatis* en el que la calidad de la muestra, sobre todo de las endocervicales, puede hacer disminuir la sensibilidad hasta el 10%.

Para la tipificación de *N. gonorrhoeae* se utilizan métodos fenotípicos como la auxotipificación y la determinación de serovariedades (requieren un largo tiempo de procesamiento y los reactivos disponibles son caros) y los métodos genotípicos: PFGE, AFLP, y secuenciación.

En los casos infrecuentes de infección diseminada se deben realizar hemocultivos que deben llevar una concentración de polianetolsulfonato de sodio (SPS) no superior al 0,025% ya que el gonococo es sensible a este compuesto. En estos casos el subcultivo debe realizarse exclusivamente en agar chocolate. En el caso de estudiar muestras de líquidos orgánicos estériles (LCR, líquido articular), y siempre que se tome más de 1 mL de muestra, se deben centrifugar a temperatura ambiente a 1500xg durante 15 minutos y cultivar el sedimento.

La vigilancia de la sensibilidad a antimicrobianos es una medida esencial del control de la infección gonocócica, ya que el tratamiento se realiza utilizando una dosis única con la que se consigue una curación en más del 95% de los casos. En los últimos años se ha preconizado el cambio de tratamiento cuando se supere el 5% de aislamientos resistentes a un determinado antimicrobiano, como ocurre actualmente en España con la resistencia a ciprofloxacino (se considera alto nivel de resistencia cuando la CMI es ≥ 1 µg/ml). Para la determinación de la CMI se recomienda utilizar la metodología del CLSI

(anteriormente NCCLS) o bien otros métodos más sencillos como el Etest.

6.3.2. *Chlamydia trachomatis*. En los 10 últimos años las pruebas para diagnosticar las infecciones por *C. trachomatis* han cambiado mucho como resultado de la rápida expansión y comercialización de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. El proceso de evaluación de estas pruebas no siempre se ha hecho de una forma científicamente rigurosa. Pese a todo, los CDC recomiendan estas técnicas en base a diversos estudios multicéntricos realizados a nivel mundial, como las más sensibles y específicas tanto para estudios de cribado poblacional, sea cual sea la prevalencia, como para diagnóstico de pacientes sintomáticos. Se estima que tienen una especificidad entre el 95% y el 98% y una sensibilidad entre el 88% y el 90%.

Dependiendo del tipo de muestra que se vaya a procesar y de la técnica que se vaya a utilizar para la detección e identificación de *C. trachomatis*, se utilizará un tipo específico de torunda y medio de transporte que suministrará la casa comercial respectiva, teniendo en cuenta que el moco y los microbicidas presentes en geles vaginales pueden interferir en la detección de los ácidos nucleicos. Algunos estudios han sugerido que estas técnicas también se pueden interferir por sustancias presentes en muestras clínicas (sangre, gonadotropina coriónica humana y productos de la inflamación). Sin embargo, en un reciente estudio multicéntrico dirigido por los CDC se observó que la sangre menstrual no afectaba a los resultados. Asimismo, la sensibilidad de las técnicas de PCR y LCR en muestras cervicales fue más alta cuando había exudado purulento y coinfección con *N. gonorrhoeae*. La infección uretral también se asoció con un aumento de la sensibilidad en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos realizadas en muestras de orina. Estos resultados se explican porque la cantidad de cuerpos elementales presentes en una muestra determinada parecen relacionarse directamente con signos de inflamación en hombres y mujeres, y con presencia de síntomas en el hombre. Existen varias técnicas para eliminar las sustancias inhibitorias, como la utilización de torundas secas (sin medio de transporte), la dilución de las muestras 1:10, el tratamiento por calor (95°C 10 minutos), una combinación de calor y dilución 1:10, congelación-descongelación, y el mantenimiento de las muestras a 4°C. En orinas de mujeres se puede reducir la inhibición de la amplificación eliminando la orina residual del fondo del tubo después de procesar y almacenar la muestra durante 18-24 h a -20°C o a 4-8°C (congelador o nevera). La FDA no ha aprobado la mezcla ("pool") de muestras para realizar estas pruebas.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son muy sensibles, considerándose el nuevo patrón de referencia. Pueden detectar una sola copia genómica y

no necesitan que el microorganismo sea viable. También son muy específicas, aunque puede haber falsos positivos y falsos negativos. Son las más adecuadas para cualquier población y tipo de muestra, incluso recogidas por el propio paciente. PCR Amplicor fue la primera técnica comercial autorizada por la FDA en 1993, va dirigida al plásmido críptico específico que está presente en más del 99% de las cepas. Su sensibilidad y especificidad son del 99% y del 98%, respectivamente. La segunda generación comercial utiliza un analizador (COBAS amplicor PCR) y tiene mayor sensibilidad y especificidad, tanto en muestras de orina como en urogenitales, y tanto en varones como en mujeres. En 1995 la FDA autorizó la LCR (Abbott), actualmente retirada del mercado), cuya diana también es el plásmido críptico. La amplificación mediada por transcripción (TMA, Gen Probe) tiene como diana el ARN ribosómico. Es un sistema isotérmico que utiliza amplificación, diana enzimática y detección quimioluminiscente en un solo tubo. Actualmente APTIMA Combo 2 (AC2, Gen-Probe) es una nueva TMA con la mayor sensibilidad de todas las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos comercializadas para muestras no invasivas que pueden contener pequeñas cantidades de ácidos nucleicos. Las torundas vaginales recogidas por la propia paciente son la muestra de elección para cribado poblacional en mujeres así como la orina en los hombres. Actualmente se encuentra en evaluación su automatización (sistema TIGRIS), que podría ser útil en laboratorios con gran volumen de muestras.

Otras técnicas utilizadas son el SDA (Probetec, Becton-Dickinson), que es una técnica de amplificación con desplazamiento de cadena, y otra técnica en desarrollo que utiliza la PCR en tiempo real (Rotor-Gene 3000; Corbett Robotics, Australia), con amplificación en una sola reacción de 3 dianas: plásmido críptico, MOMP (*major outer membrane protein*), y un control interno. Detecta todas las genovariedades (incluyendo las del LGV) sin reacción cruzada con bacterias de faringe o tracto genital. Esta técnica demostró un 100% de correlación con resultados de Amplicor y puede utilizarse también para detectar *N.gonorrhoeae*.

También se utilizan otras técnicas moleculares de detección y/o amplificación de ADN/ARN, como la PACE2, PCR, LCR y TMA. Las técnicas de hibridación usan sondas de ADN específicas marcadas con moléculas quimioluminiscentes, que son complementarias de una secuencia específica de ARN ribosómico de *C. trachomatis* (PACE2 Gen Probe). Su sensibilidad es similar al cultivo e inferior a la de las técnicas de amplificación, ya que detectan ARN que se altera fácilmente cuando los microorganismos no son viables.

El cultivo sigue siendo la técnica más específica (100%) y en algunos países es la única legalmente aceptada para confirmación de *C. trachomatis* en caso

de abusos sexuales. Se utilizan habitualmente células McCoy, HeLa229 y BGMK, y generalmente en “shell vial”. Las inclusiones citoplasmáticas se pueden observar a las 48 o 72 horas de incubación, tras tinción de las preparaciones con lugol o Giemsa, o con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína.

La inmunofluorescencia directa ofrece mejores resultados en tomas endocervicales y uretrales de pacientes sintomáticos, y requiere personal experimentado en microscopía de fluorescencia y en la observación de cuerpos elementales. Una vez fijada y secada la muestra debe conservarse en cámara oscura y húmeda y observarse en menos de 7 días. Es altamente específica pero requiere un largo tiempo de observación por lo que sólo es útil para laboratorios que procesen pocas muestras. También existen sistemas comerciales como Microtrack®.

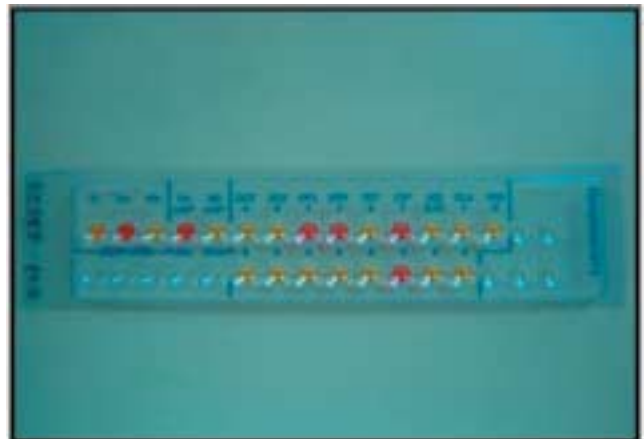
Los métodos inmunoenzimáticos (como Clamydiazime®, IDEIA®, etc) van dirigidos a detectar el antígeno de grupo LPS (lipopolisacárido) que puede dar falsos positivos por reacción cruzada con LPS de otros microorganismos, incluyendo otras especies de *Chlamydia*. El método IDEIA® tiene una sensibilidad aproximada del 80%, especificidad del 97%, valor predictivo positivo del 80%, valor predictivo negativo del 97% y eficiencia diagnóstica del 95%. Recientemente se ha comparado esta técnica IDEIA PCE EIA (Dako) con Cobas PCR (Roche); la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de PCE EIA con confirmación de PCR fueron del 75%, 100%, 100% y 99,2% respectivamente. Los valores correspondientes para Cobas PCR fueron: 100%, 99,8%, 94,1% y 100%.

6.3.3. Micoplasmas genitales. Los micoplasmas pierden viabilidad especialmente si las muestras se secan o se someten a calor. Lo ideal es su procesamiento inmediato. Si no es posible se debe emplear un medio de transporte, y si se va a retrasar el procesamiento unas horas, se debe mantener la muestra en nevera el menor tiempo posible o congelar a -70 °C si el retraso es superior a 24 horas (la congelación a -20°C produce pérdida de viabilidad). Para el transporte de muestras para cultivo, son válidos los medios 10B o SP-4 y existen sistemas comerciales que proporcionan estos medios. El transporte para la realización de PCR puede realizarse en medio 2-SP si se va a investigar la presencia de *M. genitalium*. El caldo SP-4 con arginina y rojo fenol es apropiado para el enriquecimiento y el aislamiento de *M. hominis* y la adición de penicilina, anfotericina B y polimixina B permiten evitar las contaminaciones. El caldo 10B, se enriquece con urea para aislar *U. urealyticum* y con arginina para *M. hominis*. La adición de clindamicina o lincomicina (10 mg/L) convierte al medio en selectivo para ureaplasmas y la adición de eritromicina (10 mg/L) en selectivo para *M. hominis*. Para el aislamiento diferencial de *M. hominis* y *U. urealyticum* se utiliza el agar A8.

Las muestras deben homogeneizarse antes de la siembra. En el caso de muestras líquidas se centrifugan a 600xg durante 15 minutos y se inocula el sedimento. Para neutralizar la posible presencia de antibióticos, anticuerpos y otros inhibidores, es muy importante que las muestras se diluyan antes de la siembra, lo que ya ocurre al utilizar el medio de transporte. Se inoculan diluciones seriadas en caldo 10B y agar A8, incubando los caldos en atmósfera aerobia y las placas en 5-10% CO₂ a 37°C. Los caldos se deben observar durante 4 días para detectar signos de alcalinidad y las placas de cultivo se incuban 7 días antes de descartarlas como negativas. La búsqueda de colonias en la superficie del agar se realiza utilizando una lupa (x20 o x60 de aumento total). La presencia de *U. urealyticum* se pone de manifiesto habitualmente a los 1-3 días por un cambio de color debido a la ureasa y se observan colonias marrones granulares de entre 15 a 60 µm de diámetro; las colonias de *M. hominis* tienen aspecto de “huevo frito”, y se observan a los 2-4 días con un tamaño entre 200-300 µm de diámetro. Esta identificación es presuntiva y la definitiva requiere estudios de inhibición del crecimiento o mediante PCR.

Las pruebas de sensibilidad de micoplasmas a los antibióticos tienen verdadera utilidad en infecciones sistémicas y en pacientes inmunodeprimidos pero no existe ningún método estandarizado por el CLSI para su determinación. El método más usado es la microdilución en caldo, que es además económico y permite ensayar varios antimicrobianos, aunque es muy laborioso. El método de Etest presenta unos resultados comparables con la microdilución en caldo y es válido para determinar la sensibilidad de *M. hominis* a tetraciclinas y a fluoroquinolonas mientras que en el caso de *U. urealyticum* la mejor correlación es con las fluoroquinolonas. Los métodos comerciales Mycofast (International Microbiology) y Mycoplasma IST (bioMerieux) (Figura 2) comparados con la microdilución en caldo, presentan una buena correlación para las tetraciclinas, pero peor para el resto de antimicrobianos.

Figura 2. Galería “Mycoplasma IST 2” con crecimiento



de $\geq 10^4$ ucc/ml de *Ureaplasma urealyticum*

6.3.4. *Treponema pallidum*. En la historia natural de la sífilis se diferencian varios periodos (Tabla 5).
6.3.4.1. Diagnóstico directo. Se realiza mediante la microscopía de campo oscuro del material obtenido del chancro en la que se observan espiroquetas móviles en el exudado de la lesión antes de que transcurran 20 minutos desde su recogida. Este procedimiento es sólo válido para lesiones genitales, ya que no diferencia treponemas patógenos de saprófitos en muestras de boca y ano. También puede emplearse la técnica de inmunofluorescencia directa en extensiones secas, lo que permite la observación en un tiempo posterior a la recogida de la muestra. Estas dos técnicas se utilizan para el diagnóstico directo de la infección y pueden ser muy útiles en periodos muy precoces antes de la aparición de los anticuerpos. Tienen como inconvenientes que sus resultados se pueden afectar por las condiciones de la recogida de la muestra y del estadio de la enfermedad, por lo que un resultado negativo no excluye sífilis. También se puede demostrar la presencia de *T. pallidum* en las lesiones mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, aunque son generalmente ensayos no

comercializados sino preparados y desarrollados en centros de referencia.

6.3.4.2. Diagnóstico indirecto. Existen dos tipos de reacciones serológicas: pruebas no treponémicas y pruebas treponémicas. Las primeras utilizan cardiolipina, lecitina y colesterol como antígeno y detectan anticuerpos IgG e IgM producidos frente a lípidos de las células dañadas por la infección, y frente a lipoproteínas y cardiolipina del propio treponema. Las pruebas treponémicas emplean antígenos procedentes de técnicas de clonación o del propio treponema y detectan anticuerpos específicos.

a) **Pruebas no treponémicas.** Las principales pruebas no treponémicas son el VDRL (requiere pretratamiento del suero y un microscopio para su lectura) y el RPR (emplea partículas de carbón para visualizar la reacción sin microscopía). Son baratas, se pueden emplear en situaciones con elevado número de muestras y no requieren instrumental sofisticado.

Tabla 5. Fases de la sífilis y sensibilidad de las pruebas diagnósticas

Fase	Duración	Sensibilidad pruebas biológicas (%)*					Comentario
		VDRL	RPR	FTAabs	TPHA	EIA	
Inicial (incubación)	3 semanas (10-90 días)	-	-	-	-	-	Ausencia de reacción serológica
Primaria	1-5 semanas	78	86	84	88	97	Inoculación de pápula que se ulcera con gran número de treponemas (hasta 4 semanas). Reactividad serológica: 1-4 semanas desde aparición del chancro El chancro cura espontáneamente
Secundaria	2-6 semanas	100	100	100	100	97	Afectación de piel y mucosas en distinta localización. Diagnóstico serológico (positividad de todas las pruebas)
Latencia: - temprana	1 ^{er} año	95	98	100	100	97	Sin clínica y seroactividad; 20-25% síntomas de sífilis secundaria. Contagiosa
- tardía y terciaria	>1 año	71	73	96	94		Rara transmisibilidad. En 1/3 de pacientes es latente toda la vida (serología positiva), 1/3 cura biológicamente (serología negativa) y 1/3 tiene manifestaciones 10-20 años después (benigna-gomatosa, cardiovascular y neurosífilis)

* la especificidad varía entre el 96-99%

Otra característica muy importante es su posibilidad de cuantificación, lo que permite establecer niveles base de reactividad sobre los que estudiar la

evolución de la enfermedad, tanto en la eficacia del tratamiento (disminución significativa del título) como posibles reinfecciones (aumento significativo del

título). Si el tratamiento es eficaz durante una sífilis temprana, los títulos disminuyen y llegan a desaparecer en 1 año o a ser muy bajos. En los pacientes tratados en el periodo tardío, o con múltiples episodios de reinfecciones, la caída de los títulos es más gradual. Pueden persistir títulos bajos en el 50% de estos pacientes después de 2 años, sin que esto signifique fracaso terapéutico (reacción *serofast*).

La sensibilidad de estas técnicas es buena, pero en estadios tempranos de la sífilis primaria y en la sífilis tardía pueden ser negativas, y pueden existir también falsos negativos debidos al efecto prozona.

Existen falsos positivos producidos por anticuerpos anti-cardiolipina en ausencia de infección treponémica. Estos pueden dividirse en dos grupos: los que permanecen menos de 6 meses (reacciones falsamente positivas agudas), y más de 6 meses (falsos positivos crónicos) (Tabla 6). El título puede ayudar a distinguir los verdaderos positivos (>8) de los falsos positivos (<8), aunque esta regla puede variar, ya que los usuarios de drogas por vía parenteral, pueden presentar falsos positivos con título >8.

Todas las pruebas no treponémicas tienen la misma sensibilidad y especificidad, pero el nivel de reactividad entre ellas puede ser diferente: el RPR suele ser positivo a una dilución mayor que el VDRL. Se recomienda que el seguimiento serológico secuencial de los pacientes se realice siempre con la misma prueba, y preferiblemente, en el mismo laboratorio.

b) Pruebas treponémicas. Las principales pruebas treponémicas son el TPHA, el FTA-ABS, los enzimo-inmunoanálisis (EIA), el inmunoblot y el Western blot. Los dos primeros se usaron clásicamente como confirmación de las pruebas no treponémicas, puesto que su especificidad y sensibilidad son superiores. No se utilizan como cribado debido a su mayor complejidad de realización y difícil aplicación en situaciones con elevado número de peticiones. También se usan en situaciones clínicas con alta sospecha de infección y con pruebas no treponémicas negativas, principalmente ante una posible sífilis tardía.

Al contrario que las pruebas no treponémicas, las pruebas treponémicas no sirven para monitorizar el tratamiento, ya que en el 85% de los pacientes correctamente tratados, estas pruebas permanecen positivas, incluso de por vida. Solamente un 15-25% de los pacientes tratados correctamente durante los primeros estadios de la enfermedad, negativizan las pruebas treponémicas pasados 2-3 años. Se han descrito falsos positivos, aunque son muy poco frecuentes (Tabla 6).

Cada vez se utilizan más las técnicas de EIA, ya que sus formatos automatizados permiten ensayos sobre gran número de muestras, por lo que se están

convirtiendo en la prueba de cribado de muchos laboratorios. Su sensibilidad y especificidad es similar a la de otras pruebas treponémicas. Si se utilizan como cribado, el resultado positivo debe al menos ensayarse con una prueba no treponémica, y si el resultado es negativo, debe ensayarse una segunda prueba treponémica para descartar un falso positivo. Se debe tener presente que las pruebas treponémicas utilizadas como cribado pueden detectar tanto casos antiguos bien tratados como casos activos no tratados. Los EIA que sólo detectan IgM tienen su principal interés en el diagnóstico de la sífilis congénita. El inmunoensayo en línea es una técnica que emplea una tira de nylon sobre la que se fijan proteínas recombinantes y un péptido sintético de *T. pallidum* en forma de bandas independientes. Permite determinar la reactividad de anticuerpos frente a cada antígeno. La lectura es visual, y el resultado en función del número de antígenos que son reactivos puede ser negativo (ausencia de bandas), positivo (presencia de dos a más bandas) o indeterminado (una banda positiva). La sensibilidad y especificidad referenciada en la literatura son del 100% y 99,3%, respectivamente.

6.3.4.3. Neurosífilis. La infección del sistema nervioso central por *T. pallidum* se produce muy poco tiempo después del contagio, por lo que pueden aparecer casos de meningitis a los 3 meses de la infección, si bien la *neuro-lues* es la manifestación más frecuente de la sífilis tardía. El diagnóstico se realiza mediante análisis del LCR: recuento de leucocitos, determinación de niveles de proteínas y presencia de anticuerpos detectados mediante VDRL. La existencia de dos o más anomalías en los parámetros normales del LCR se consideran diagnósticas de neurosífilis. La presencia de anticuerpos frente a *T. pallidum* en LCR no es por sí misma diagnóstica de *neuro-lues*. El VDRL en LCR presenta una elevada especificidad diagnóstica (99,8%), pero una reducida sensibilidad (30-78%), por lo que un resultado negativo no la descarta. Se producen falsos positivos en muestras de LCR contaminadas con sangre. Algunos autores recomiendan realizar el FTA-ABS en LCR, que aunque es menos específico (94,8%) y tiene por tanto más falsos positivos que el VDRL, es una prueba muy sensible (100%) y un resultado negativo en LCR descartaría una *neuro-lues*. En la *neuro-lues*, el recuento de leucocitos en LCR se encuentra elevado (>4 leucocitos/mm³) y es el parámetro que valora con mayor sensibilidad la eficacia del tratamiento. Los cambios en los valores de las proteínas y el título del VDRL son más lentos, y su persistencia tiene menor valor para determinar la eficacia del tratamiento. Si el recuento celular no ha disminuído después de pasados 6 meses del tratamiento, o no se normalizó a los dos años, se debe considerar la posibilidad de volver a tratar la neurosífilis.

6.3.4.4. Sífilis y VIH. La serología de la sífilis se debe interpretar de igual modo en los pacientes coinfectados por el VIH que en los que no padecen esta infección. Sin embargo, en los pacientes infectados por el VIH se han observado reacciones serológicas poco habituales, como un aumento de los falsos positivos en las pruebas serológicas, así como un incremento en los títulos del RPR. También se observan falsos negativos y retrasos en la aparición de reactividad en las pruebas. Por ello, las pruebas de diagnóstico directo pueden ser útiles cuando la clínica es sugestiva de sífilis pero la serología es negativa o poco concluyente. Se ha descrito que las pruebas treponémicas de los pacientes tratados tienden a perder reactividad más frecuentemente en aquellos infectados por el VIH.

6.3.5. Donovanosis. Es una ITS pero también puede adquirirse por traumatismos en los genitales, contaminación fecal o autoinoculación. La enfermedad es endémica en India, Papúa-Nueva Guinea, Sudamérica, Vietnam, Australia y el sur de África.

El diagnóstico se realiza mediante el examen microscópico que es el método de elección. Las extensiones de tejido se tiñen mediante coloración de Giemsa o Wright. La confirmación del diagnóstico

clínico se establece tras la observación de los típicos cuerpos de Donovan, que son inclusiones de localización intracitoplasmática en las grandes células mononucleares e histiocitos. Las células mononucleares tienen un diámetro entre 25–90 µm, mientras que las dimensiones de los cuerpos de Donovan son de 0,5–0,7 por 1–1,5 µm y pueden estar encapsulados o carecer de cápsula.

El cultivo de *K. granulomatis* es difícil y laborioso por lo que no se realiza de forma rutinaria. Puede cultivarse en sistemas de co-cultivo con monocitos y más fácilmente usando un medio de cultivo para *Chlamydia* modificado, pero su rendimiento no es adecuado. La PCR se utiliza en muy pocos centros y presenta problemas en el diseño de los cebadores, lo que conduce a posible amplificación cruzada con otras especies del género *Klebsiella*. La prueba de inmunofluorescencia indirecta da buenos resultados cuando la lesión está establecida, pero tiene poca sensibilidad con lesiones tempranas, por lo que se emplea más para estudios epidemiológicos que como prueba confirmatoria.

Tabla 6. Falsos positivos de las pruebas diagnósticas de la sífilis

Prueba		Falsos positivos
No treponémicas (a títulos bajos)	Permanecen <6 meses	Hepatitis Mononucleosis Neumonía vírica Sarampión Paludismo Vacunaciones Embarazo Errores técnicos
	Permanecen >6 meses	Conectivopatías: lupus sistémico Anormalidades inmunoglobulinas Drogadicción (a altos títulos, 10%) Lepra Cáncer Vejez
FTA (1%)		Lupus eritematoso sistémico Vejez Enfermedad de Lyme Error técnico
TPHA (<1%)		Mononucleosis infecciosa Drogadicción Enfermedades del colágeno Lepra Error técnico

6.3.6. Chancroide. Actualmente está indicada la utilización de la técnica de PCR para la detección de *H. ducreyi*, debido a la baja sensibilidad de la tinción de Gram (la típica en “banco de peces” con bacilos gramnegativos pequeños pleomórficos) y a que el cultivo (agar Mueller-Hinton o agar gonococo base enriquecido con 1-2% de hemoglobina bovina, 5% de suero bovino fetal o 0,2% de carbón activado, 1% de Isovitalex y 3 mg/L de vancomicina) no siempre está disponible y su sensibilidad no es superior al 80%. La PCR presenta una sensibilidad del 95% en comparación con el cultivo, mientras que la sensibilidad de éste cuando se compara con la PCR es del 75%. *H. ducreyi* requiere hemina (factor X) para crecer (es positivo en la prueba de la porfirina) y no requiere NAD (factor V).

6.3.7. Herpes genital. Está causado por el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) o herpes simplex tipo 2 (VHS-2). Los síntomas y signos clínicos de la infección inicial o recurrente varían dependiendo del tipo de VHS, del sexo del paciente y de la exposición previa al VHS. Tras la adquisición del VHS (infección primaria), el genoma vírico reside en estado latente en los cuerpos neuronales (principalmente sacro-ileales) de manera indefinida. El primer episodio de herpes genital, puede deberse a una primoinfección (ausencia de anticuerpos frente a VHS) o a una infección inicial no primaria (presencia de anticuerpos frente a cualquier tipo de VHS). El herpes genital primario, en base a razones socioeconómicas y geográficas, está causado por el VHS-1 en un rango que varía entre el 7-50% de los casos; el resto de los casos (50-93%) están producidos por el VHS-2. La infección recurrente por VHS-2 puede ser sintomática o, más comúnmente, asintomática. Dentro del primer año después del diagnóstico el 90% de los pacientes tienen al menos una recidiva, el 38% tiene más de seis recurrencias, y el 20% diez o más. Las infecciones genitales por VHS-1 recidivan menos frecuentemente que las infecciones por VHS-2, de modo que la mayoría de los casos de infección por VHS-1 sintomáticos son infecciones primarias. La excreción vírica en los periodos asintomáticos es la principal fuente de transmisión de la enfermedad. El ADN del VHS puede detectarse por métodos moleculares en muestras genitales de mujeres infectadas por el VHS-2 el 28% de los días y el virus podría transmitirse a sus parejas en estos periodos de excreción subclínica, de hecho se piensa que es el principal mecanismo de transmisión. Las complicaciones de la infección genital por el VHS generalmente afectan al sistema nervioso central e incluyen meningitis aséptica (la más frecuente), radiculopatía sacral y mielitis transversa. Aproximadamente un tercio de las mujeres y 10% de los hombres con infección primaria pueden presentar signos meníngeos.

El estado de las lesiones y la cantidad de muestra recogida afectan significativamente a los métodos de

diagnóstico. La sensibilidad de los métodos diagnósticos disminuye con la edad de la lesión. En general, los mejores resultados se obtienen a partir de lesiones vesiculares, y las lesiones primarias arrojan mejores resultados que las recurrentes. En ausencia de lesiones externas, en varones se deben recoger muestras uretrales y en mujeres tomas cervicales. También debe considerarse la extracción de sangre para estudios serológicos.

Si la muestra se va destinar a cultivo o a diagnóstico molecular se debe introducir inmediatamente la torunda en un medio de transporte para virus. La misma muestra puede emplearse para cultivo y para diagnóstico molecular. El calor afecta a la viabilidad del VHS, por ello las muestras se deben enviar refrigeradas al laboratorio y mantenerlas así hasta su procesamiento. Si adicionalmente se va a proceder al diagnóstico microscópico, es necesario realizar una extensión en portas adecuados, dejar secar, y fijar con acetona para su posterior tinción.

El diagnóstico de la infección por VHS se puede realizar mediante:

A) Microscopía óptica. No es una técnica adecuada.

El exámen directo mediante la tinción de Tzanck o de Papanicolaou es poco sensible e inespecífico. No diferencia entre VHS-1 y 2, y las inclusiones intranucleares tipo Cowdry A no son exclusivas del VHS. Además un resultado negativo no descarta la posibilidad de herpes genital.

B) Microscopía electrónica. Está en desuso ya que requiere concentraciones superiores a 10^8 viriones/mL. Proporciona resultados rápidos, pero es poco sensible y requiere un equipo no disponible generalmente en laboratorios clínicos.

C) Inmunofluorescencia directa. La detección de antígenos del VHS se puede realizar mediante inmunofluorescencia o por técnicas inmunoenzimáticas. Son técnicas rápidas con una sensibilidad y especificidad en pacientes sintomáticos que oscilan entre el 70 y el 90%. Sobre muestra directa la sensibilidad disminuye a medida que evoluciona la lesión en el tiempo. El empleo de anticuerpos monoclonales aporta una buena especificidad y permite diferenciar VSH-1 y 2. Actualmente se emplea más como complemento para la identificación vírica en los cultivos celulares.

D) Cultivo celular. Se considera el método de referencia. Su especificidad es virtualmente del 100%, pero los niveles de excreción de virus, la calidad de la muestra y las condiciones de transporte influyen en su sensibilidad. Para el aislamiento del virus pueden emplearse células Hep-2 o VERO pero es posible su recuperación en casi cualquier línea diploide o heterodiploide. La agitación durante la incubación puede aumentar el número de aislamientos y disminuir el tiempo de aparición de efecto citopático. El efecto citopático es típico afectando a la totalidad de la monocapa en el caso

del VHS-1, siendo más focal en el caso del VHS-2 y caracterizándose por la aparición de células refráctiles de mayor tamaño, que tienen tendencia a fusionar sus núcleos. El tiempo medio de aparición del efecto citopático es de tres días, aunque en muestras de líquido vesicular el efecto puede aparecer en 24 horas. La identificación del virus se realiza generalmente por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales frente al VHS-1 y 2. Dependiendo de la calidad del anticuerpo empleado pueden existir reacciones cruzadas, sin embargo el tipo de virus responsable de la infección mostrará una fluorescencia más intensa. La fluorescencia aparece principalmente en el citoplasma de las células infectadas, pero puede llegar a expresarse en el núcleo.

La muestra también se puede cultivar por inoculación y centrifugación en monocapas celulares (*shell-vial*), y las inclusiones víricas se pueden detectar por inmunofluorescencia directa. La mayor ventaja es la posibilidad de tener resultados positivos en 24-48 horas con una buena sensibilidad y especificidad.

E) Técnicas moleculares. La PCR incrementa el porcentaje de detección de VHS de muestras mucocutáneas obtenidas con torunda en un 11-41% comparado con el cultivo. Actualmente las nuevas técnicas de PCR a tiempo real totalmente automatizadas permiten la detección del VHS en un sistema cerrado con bajos tiempos de respuesta y bajo riesgo de contaminación. Además, permiten simultáneamente la detección y el tipado del VHS-1 y 2 en un sólo paso en base al análisis de las diferentes temperaturas de fusión de los amplicones específicos de VHS -1 y 2.

Las técnicas de captura de híbridos se han utilizado para el diagnóstico de la infección por VHS en muestras cervicales. En ellas el ADN híbrida con sondas de ARN y los híbridos son inmovilizados mediante un sistema de captura en placas de microtiter.

F) Serología. La serología convencional (no tipo-específica) tiene una utilidad limitada en el diagnóstico de la infección genital por el VHS y debe ser sustituida por la detección de anticuerpos tipo-específicos. Este diagnóstico serológico está basado en el empleo de ensayos que emplean como antígenos una proteína de superficie del VHS, glucoproteína (gG), y que detectan una respuesta tipo-específica de anticuerpos. Las glucoproteínas de envoltura del VHS-1 (gG1, con 150 aminoácidos) y del VHS-2 (gG2, con 600 aminoácidos) son lo suficientemente diferentes como para utilizarlas como antígeno tipo-específico. Existen algunos sistemas comerciales no tipo-específicos que pueden distinguir entre VHS -1 y 2 pero su especificidad es baja. Estos sistemas sólo detectan IgG.

También se pueden utilizar el Western blot y el inmunoblot para detectar anticuerpos tipo-específicos. Estos métodos detectan anticuerpos frente a múltiples proteínas individuales del VHS, incluyendo las glucoproteínas gG1 y gG2, y generalmente se emplean como confirmatorios de los resultados positivos de IgG.

En la actualidad, el abordaje diagnóstico de la infección genital por VHS se basa principalmente en las técnicas de cultivo (generalmente *shell-vial*) y en el diagnóstico molecular por PCR a tiempo real o captura de híbridos, quedando la serología para situaciones especiales y para estudios epidemiológicos.

Existen tres situaciones en las que la serología puede ser un método complementario de diagnóstico en el herpes genital sintomático: a) pacientes con lesiones recurrentes compatibles con herpes genital, cuando el cultivo y las pruebas de detección de antígeno son negativas, b) historia clínica compatible con herpes genital, pero sin lesiones visibles, c) herpes genital diagnosticado clínicamente pero los cultivos o pruebas moleculares no han sido realizados. La serología también se puede utilizar como cribaje del herpes genital en las siguientes circunstancias: a) pacientes con alto riesgo de ITS o de infección por el VIH, b) enfermos diagnosticados de infección por el VIH, c) parejas de pacientes diagnosticados de herpes genital, d) mujeres embarazadas.

6.3.8. Linfogranuloma venéreo. Tras 3 a 30 días de incubación aparece una lesión inicial con una pequeña pápula indolora que puede ulcerarse y desaparecer a los pocos días sin dejar cicatriz, en uretra, vagina o recto. Entre 2 a 6 semanas después, aparece el estado secundario de afectación linfática, clásicamente ingüinal (bubas) y doloroso que puede ser fluctuante y perforarse. En hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres es más frecuente la proctitis y proctocolitis con exudado y rectorragias sin detección de adenopatías. Este diagnóstico clínico se sustenta si aparecen unos títulos serológicos altos frente a *C. trachomatis* por microinmunofluorescencia (>1:128) o fijación de complemento (>1:256). El diagnóstico de confirmación se realiza mediante identificación de *C. trachomatis* y genotipificación por PCR recogiendo una muestra con torunda seca a partir de la lesión.

6.3.9. Vaginosis bacteriana. La vaginosis bacteriana constituye una alteración masiva (disbacteriosis) de la microbiota vaginal, donde el género dominante *Lactobacillus* es reemplazado en gran proporción por *G. vaginalis*, y bacterias anaerobias como *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. y *Mobiluncus* spp., así como por micoplasmas genitales. La cantidad de estos microorganismos se incrementa entre 100 y 1000 veces en mujeres con vaginosis en comparación con mujeres sanas. Además, la vaginosis bacteriana se caracteriza por grandes concentraciones

de enzimas bacterianas, incluyendo fosfolipasa A2, mucinasas y neuraminidasas, así como endotoxinas e interleukina-1.

En los últimos años se han descrito nuevas especies asociadas a vaginosis como *Atopobium vaginæ* y muchas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad tienen que ver con la formación de biocapas bacterianas sobre la superficie vaginal donde *Gardnerella* y *Atopobium* constituyen más del 90% de la masa de estas biocapas. Por lo tanto, la vaginosis bacteriana probablemente es el resultado de la colonización por comunidades bacterianas complejas, muchas de ellas no cultivables, que tienen metabolismos interdependientes (sintrópicos). Existe controversia sobre la transmisión sexual de la vaginosis bacteriana, ya que puede presentarse tanto en mujeres sexualmente activas como no, aunque en mujeres con vaginosis se observan mayores porcentajes de infección por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.

El 50% de las mujeres con vaginosis bacteriana son asintomáticas. Cuando existe expresión clínica, el síntoma más común es el mal olor de la secreción vaginal (olor a pescado). El olor es causado por la volatilización de aminas alcalinas producidas por el metabolismo de las bacterias anaerobias. La exacerbación del olor ocurre después de relaciones sexuales y durante la menstruación como resultado de un incremento del pH. El aumento y cambio en el flujo vaginal es otra manifestación frecuente. El flujo es generalmente de poca densidad, color grisáceo, homogéneo y tiende a adherirse a la pared vaginal. El diagnóstico de la vaginosis bacteriana se establece fundamentalmente por los signos clínicos y las características del flujo vaginal, y puede confirmarse por criterios objetivos microscópicos (Nugent) en la tinción de Gram del exudado vaginal. Los criterios clínicos de Amsel están basados en la presencia de tres de los siguientes síntomas o signos: a) flujo vaginal fino, homogéneo, blanco, adherido a las paredes vaginales y uniforme, b) pH vaginal > 4,5, c) olor a pescado tras añadir a la muestra KOH al 10%, y d) más de un 20% de células clave en preparaciones en fresco (microscopio x40). El diagnóstico microbiológico de la vaginosis bacteriana se realiza mediante tinción de Gram del exudado vaginal (Figura 3), determinando la cantidad relativa de los morfotipos característicos de la microbiota vaginal alterada (bacilos grampositivos, gramnegativos y bacterias curvas) y la presencia de células clave (células epiteliales tapizadas de morfotipos grampositivos y gramnegativos que pierden los contornos). La citología cervical teñida por el método de Papanicolau no es un método adecuado por su baja sensibilidad. El cultivo de *G. vaginalis* tampoco es una herramienta diagnóstica adecuada por su baja especificidad. Sin embargo, se ha comercializado una sonda de ADN basada en la detección de altas concentraciones de *G.*

vaginalis (Affirm VP III, Becton-Dickinson) que puede ser de utilidad clínica. Otros equipos comerciales que podrían ser útiles en el diagnóstico incluyen pruebas en tarjeta para la detección de pH elevado, trimetilaminas y prolinaminopeptidasas. Otros métodos diagnósticos, como el cultivo de muestras en anaerobiosis y el empleo de métodos moleculares (16S ARNr) no tienen aplicación en la práctica diaria y se emplean con fines de investigación.

6.3.10. Vulvovaginitis candidiásica. Supone aproximadamente un tercio de todas las vaginitis en mujeres en edad fértil, aunque también pueden aparecer en niñas y mujeres postmenopáusicas. No suele tener la consideración de ITS pero se ha demostrado la transmisión sexual, y epidemiológicamente se observa que la máxima frecuencia en los episodios ocurre cuando las mujeres tienen actividad sexual. No se ha establecido relación epidemiológica con el número de parejas sexuales, ni con la frecuencia de las relaciones, pero sí parece existir alguna relación con el sexo oral-genital. En la etiología participan levaduras del género *Candida*, aunque también se incluyen vulvovaginitis producidas por *Saccharomyces cerevisiae*, que representan aproximadamente un 1% de los casos. *C. albicans* es la causa de un 80-90% de los casos, seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, y *C. krusei*.

Para el diagnóstico se realiza la observación microscópica de levaduras en el exudado vaginal mediante visualización en fresco o tras tinción de Gram. Esta técnica tiene la ventaja de la rapidez, pero su sensibilidad es baja (50%). La confirmación diagnóstica se realiza mediante cultivo en agar Sabouraud (Figura 4) o en agares cromogénicos y posterior identificación con la prueba de la filamentación y/o la identificación por métodos comerciales como el API C AUX (bioMérieux).

6.3.11. Tricomoniasis. El diagnóstico de la tricomoniasis se realiza fundamentalmente mediante exámen en fresco, cultivo, y más recientemente, por métodos de amplificación de ácidos nucleicos. El exámen en fresco es de fácil realización, rapidez y bajo coste, pero presenta una escasa sensibilidad (entre el 62 y 92%) dependiendo del observador, aunque tiene una especificidad del 98%. Para su realización se mezcla en un portaobjetos una gota de secreción uretral o vaginal con una gota de suero fisiológico o salino al 0,5% atemperado a 37°C, se pone un cubreobjetos y se observa al microscopio para observar la movilidad característica de las tricomonas. El cultivo del parásito requiere numerosos nutrientes en el medio como carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos, hierro y vitaminas. Actualmente, el cultivo en los caldos de Roiron y de Diamond se considera el método de referencia para el diagnóstico de la tricomoniasis. Es fácil de realizar, de bajo coste y requiere un inóculo de tan solo 300 a 500 tricomonas/mL. Su principal inconveniente es el tiempo

de incubación ya que se requieren de dos a siete días para identificar el parásito.



Figura 3. Tinción de Gram de exudado vaginal mostrando las “células clave”, diagnóstico presuntivo de la vaginosis bacteriana



Figura 4. Agar Sabouraud con crecimiento de *Candida* spp.

No obstante, estudios recientes indican que en varones el cultivo puede infraestimar el número de pacientes con tricomoniasis. Si se realiza exclusivamente cultivo de orina o de exudado uretral se diagnostican el 67% de los casos. El cultivo de las muestras de semen puede tener una mayor rentabilidad. La inoculación de los medios de cultivo según el tipo de muestra se realiza según se describe a continuación:

- uretra: se inocula la torunda directamente
- orina: se recogen 10 mL, se centrifugan a 1500xg durante 10 minutos y se inoculan 50 µL del sedimento en el caldo de cultivo
- semen: se deja licuar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de procesar, se centrifuga a 2000xg durante 10 minutos y se inoculan 50 µL del sedimento en el caldo

Los cultivos, incubados a 37°C, se deben observar al microscopio un mínimo de 1 minuto en los días 2 y 5 tras la inoculación. Recientemente se ha introducido el medio InPouch TV test, que tiene la ventaja de aumentar la viabilidad del protozoo hasta 21 días y presenta una estabilidad a temperatura ambiente de hasta 6 meses. La sensibilidad del cultivo se considera que es del 98% y la especificidad del 100%.

Existen sondas genéticas comerciales (Affirm VP III, Becton-Dickinson) que detectan la presencia de *Candida* spp., *G. vaginalis* y *T. vaginalis* en muestras vaginales con una sensibilidad y especificidad para *T. vaginalis* del 83% y 100% respectivamente en comparación con el cultivo y el examen en fresco.

Además poseen la ventaja de ofrecer un resultado fiable en menos de 45 minutos. Otras técnicas recientes para el diagnóstico de la tricomoniasis son la inmunocromatografía de flujo capilar (OSOM trichomonas rapid test. Genzyme Diagn.), y el XenoStrip-Tv (Xenotope Diagnostic). Las técnicas de PCR presentan una sensibilidad del 70% en algunos estudios y no se utilizan rutinariamente, además, los métodos tradicionales de PCR requieren detección postamplificación de productos, lo que resulta laborioso y puede conducir a errores. La PCR a tiempo real (Roche LightCycler) mejora la precisión y elimina la necesidad de un procesamiento postamplificación y ofrece una sensibilidad del 90,1% y una especificidad del 100%.

6.3.12. Papilomavirus humanos (VPH). Son virus ADN de doble cadena con un genoma de aproximadamente 8.000 pares de bases, en el que se distinguen dos regiones: las ORF (*open reading frames*) que codifican la síntesis de 10 proteínas víricas -ocho son de expresión temprana (*early*: E1-E7) y dos de expresión tardía (*late*: L1-L2)- y regiones de secuencias no codificables. Las proteínas tempranas están involucradas en la replicación vírica y en la oncogénesis, mientras que las tardías codifican proteínas estructurales de la cápside y de la fase final del ensamblaje vírico. Las proteínas codificadas por las regiones E6 y E7 tienen importantes propiedades transformadoras.

En base a su asociación con el cáncer cervical y las lesiones precursoras, los VPH pueden agruparse en

tipos de alto y bajo riesgo. Los de bajo riesgo incluyen los tipos 6, 11, 42, 43, y 44. Los VPH de alto riesgo abarcan los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 70. El tipo 16 es probablemente el que se presenta con mayor frecuencia y se asocia al cáncer de células escamosas, seguido por el tipo 18, asociado preferentemente al adenocarcinoma. Desde el punto de vista de las ITS, los más importantes son los tipos 6 y 11 asociados al condiloma acuminado y los tipos 16 y 18 asociados al carcinoma cervical.

Los VPH adquiridos sexualmente pueden producir varios tipos de lesiones dependiendo del tipo de VPH involucrado: a) Infecciones latentes, sin expresión clínica permaneciendo la piel afectada citológicamente normal. El ADN del VPH se detecta por métodos moleculares y pertenece a los tipos 6 y 11, aunque pueden estar presentes otros tipos. Generalmente afectan al epitelio cervical. b) Infecciones subclínicas, la piel afectada no presenta lesiones a simple vista pero tras la aplicación de ácido acético al 3-5% aparece una zona blanquecina en la zona afectada. c) Las verrugas anogenitales que aparecen sobre la piel de la región genital y anal de hombres y mujeres. Están asociadas a los tipos 6 y 11, y no evolucionan a neoplasias. d) Infecciones activas de larga evolución, asociadas con VPH de alto riesgo (principalmente los tipos 16 y 18), que producen cambios en las células infectadas que conducen a neoplasias genitales.

Existen cuatro tipos de verrugas genitales: condiloma acuminado (lesiones blandas papilomatosas con su característica morfología en "coliflor"), verrugas papulares (en forma de cúpula, del mismo color de la piel), verrugas queratocíticas (engrosadas y con una capa córnea que le da una consistencia dura a diferencia del condiloma acuminado) y verrugas maculares (pápulas con una corona plana que las asemeja a máculas). El diagnóstico de las verrugas genitales en el paciente inmunocompetente en la mayoría de los casos es sólo clínico ya que las lesiones son suficientemente características. Se basa en el examen visual minucioso del área genital (puede ser una enfermedad multifocal y multicéntrica), que puede favorecerse con el empleo de luz incidente y lente de aumento. El uso de colposcopio, uretoscopia o anoscopio puede ser útil en algunas situaciones, pero no es necesario en la práctica clínica rutinaria. La pincelación con ácido acético al 3% -5% (las lesiones adquieren una coloración blanquecina superficial) tampoco se recomienda rutinariamente ya que tiene un bajo valor predictivo positivo, aunque puede ser útil en la piel parcialmente queratinizada. No se recomienda la biopsia de las verrugas genitales para el estudio histopatológico ya que no aporta valor añadido a su diagnóstico de rutina.

El diagnóstico microbiológico de las infecciones por VPH, se realiza por técnicas de microbiología molecular ya que son virus no cultivables y la detección de anticuerpos por técnicas serológicas no

aporta ninguna información sobre el genotipo infectante ya que utiliza un antígeno común. No obstante, el uso de técnicas de microbiología molecular para la detección y tipado de los VPH no ha demostrado beneficio para el diagnóstico y manejo de las verrugas genitales y no se recomienda su uso rutinario. Cuando se utilizan los métodos moleculares sobre biopsias, la técnica recomendada es la PCR con cebadores de consenso y posterior genotipado mediante secuenciación, RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) o hibridación con sondas específicas usando formatos dot-blot o microtiter. Las técnicas de captura de híbridos y de PCR a tiempo real también pueden ser alternativas adecuadas para el diagnóstico.

El diagnóstico de las lesiones inducidas por VPH es fundamentalmente clínico. La realización de una biopsia simple (con estudio histopatológico y molecular) puede ser necesaria como apoyo diagnóstico y debe considerarse en los siguientes supuestos: existen lesiones atípicas; el diagnóstico es dudoso; hay progresión durante el tratamiento; las recurrencias son frecuentes; las verrugas son pigmentadas, induradas o ulceradas; las verrugas individuales son mayores de 1 cm; en pacientes inmunodeprimidos. Todas las mujeres con verrugas genitales han de ser exploradas para descartar la presencia de lesiones a nivel del cérvix mediante citología, técnicas moleculares y colposcopia. En las pacientes con verrugas genitales y/o cervicales o con pareja infectada es necesaria la realización de revisiones periódicas que incluyan colposcopia y citología cervical debido al riesgo de desarrollo de neoplasia cervical.

6.3.13. Otros. El diagnóstico de molluscum contagiosum y ectoparásitos (sarna y ladillas) suele ser fundamentalmente clínico.

7. INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

El aislamiento de un gonococo siempre es significativo, si bien una amplificación de ácidos nucleicos positiva se debe confirmar por la posibilidad de reacciones cruzadas con otras especies de *Neisseria* (Tabla 7). El aislamiento de micoplasmas genitales también es significativo en líquidos estériles y en uretra, considerándose como tal cuando hay $\geq 10^4$ ucc/mL (unidades cambiadoras de color /mL utilizando métodos comerciales líquidos) de *U. urealyticum* y el mismo recuento de *M. hominis* en muestras vaginales asociado a vaginosis. La detección por PCR de *M. genitalium* siempre es significativa.

En el caso de vaginosis bacteriana, la interpretación de la tinción de Gram se realiza según los criterios de Nugent basados en la cantidad relativa de los distintos morfotipos presentes en la extensión del flujo vaginal, asignando una puntuación (Tabla 8). Si la puntuación obtenida oscila entre 0 y 3, se informará como

“microbiota habitual”. Puntuaciones entre 7 y 10, se informarán como “Tinción de Gram compatible con vaginosis bacteriana”. Estados intermedios con puntuaciones entre 4 y 6, se informará como “microbiota vaginal alterada”. En el año 2005, se han revisado los criterios de Nugent y correlacionado con los resultados de técnicas de amplificación de ácidos

nucleicos para incrementar la precisión del diagnóstico y profundizar en la patogenia de esta enfermedad. Independientemente de los criterios de Nugent, se acepta que más de un 20% de células clave es indicativo de vaginosis bacteriana.

Tabla 7. Comentarios a los resultados obtenidos mediante amplificación de ácidos nucleicos de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*

Tipo/ situación de la muestra	Informe/ acción	Comentario a incluir
Detección de ácidos nucleicos	Informar: Detectado	Necesario ensayo adicional en población con baja prevalencia o en caso de que pueda haber un falso positivo por las consecuencias legales o psicosociales
No detectado	Informar: No detectado	No descarta la posibilidad de infección
Equívoco	Informar: Equívoco	Resultado inconcluso, remitir una nueva muestra para confirmar o realizar una prueba alternativa
Presencia de inhibición	Informar: Presencia de inhibición	No puede determinarse un resultado válido. La inhibición puede ser debida a lubricantes, moco, sangre u otras sustancias. Remita por favor una nueva muestra para confirmar o realizar un método alternativo si está indicado clínicamente
Muestra no recogida siguiendo las indicaciones del fabricante	Rechazar la muestra	Prueba no realizada. La muestra no se recogió adecuadamente
Muestra no incluida en las indicaciones del fabricante	Rechazar la muestra	Prueba no realizada. El tipo de muestra no es aceptable para el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos. (Recomendar una prueba alternativa como el cultivo)
Muestra vaginal de mujer hysterectomizada	Rechazar la muestra o consultar con el clínico antes de realizar	Interpretar los resultados con precaución. Esta muestra no ha sido validada
Abuso sexual o violación	Rechazar la muestra o consultar con el clínico antes de realizar	El cultivo es el método recomendado para <i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> en estos casos de muestras urogenitales, faríngeas y rectales
Paciente <13 años o con menarquia o prepuberal	Rechazar la muestra	No está validada esta técnica para niños. Se recomienda el cultivo

Tabla 8. Interpretación de los criterios de Nugent

Puntuación	Bacilos Gram positivos (<i>Lactobacillus</i> spp.)	Bacilos pequeños Gram variables (<i>G. vaginalis</i>)	Bacilos curvados Gram negativos (<i>Mobiluncus</i> spp.)
0	4+ (>30 morfotipos / campo)	0	0
1	3+ (5-30 morfotipos / campo)	1+	1+ 2+
2	2+ (1-4 morfotipos / campo)	2+ (1-4 morfotipos / campo)	<5 morfotipos / campo 3+ 4+
3	1+ (<1 morfotipo / campo)	3+ (5-30 morfotipos / campo)	>5 morfotipos / campo -
4	0	4+ (>30 morfotipos / campo)	-

Para valorar los resultados de las pruebas diagnósticas de un herpes genital se deben tener en cuenta las siguientes situaciones: A) Cultivo. Siempre debe realizarse el tipado, los resultados positivos deben ser tipo-específicos. Si el cultivo es positivo el paciente probablemente tiene un herpes genital, son raros los falsos positivos. Si el cultivo es negativo no indica necesariamente que el paciente no esté infectado por el VHS, puede ser un virus no detectable en la muestra; los falsos negativos son muy comunes, la baja sensibilidad puede llegar al 50% para el herpes primario y a menos del 30% para el herpes recurrente. Además el porcentaje de recuperación del VHS disminuye significativamente con el tiempo de evolución de las lesiones (52-93% en vesículas, 41-72% en úlceras y 19-27% en lesiones costrosas). La carga vírica disminuye con la evolución de las lesiones, y el cultivo no es un método diagnóstico adecuado durante el periodo interlesional.

B) Pruebas moleculares. Si el resultado es positivo indica que el paciente presenta un herpes genital, los falsos positivos son muy raros. Si el resultado es negativo no se puede asegurar la ausencia de herpes genital, aunque los falsos negativos son extremadamente raros. C) Serología tipo-específica. Un resultado positivo para VHS-2 indica herpes genital previo o actual, además la mayoría de los pacientes que no refieren historia de herpes pero que presentan serología positiva pueden excretar virus. Un resultado positivo para VHS-1 no diferencia entre infección genital y oral. Alrededor de un 5% de los pacientes con IgG positiva no se confirman por Western blot y pueden corresponder a pacientes en periodo de seroconversión ya que el inmunoensayo es más sensible (pero menos específico) que el Western-blot. La realización de una nueva determinación varias semanas después puede confirmar los resultados. Se puede obtener un resultado negativo mediante serología tipo-específica durante el periodo de seroconversión (menos de seis semanas), por lo que si existe alta sospecha de infección es necesario repetir la prueba al cabo de varias semanas. Un resultado persistentemente negativo descarta un herpes genital. Ocasionalmente, los pacientes tratados con antivíricos en el curso de una infección primaria no muestran seroconversión debido a los bajos títulos de anticuerpos.

Es complicado diferenciar entre primoinfección e infección recurrente ya que los anticuerpos IgM no son buenos marcadores de primoinfección, de hecho más del 30% de los pacientes con infección recurrente tienen IgM detectable frente al VHS-2. Las nuevas técnicas de avidéz de anticuerpos podrían contribuir a solucionar este problema.

8. APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA AL PACIENTE CON INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL Y OTRAS INFECCIONES GENITALES

Desde un punto de vista práctico y según se expuso en el apartado 2. *Consideraciones clínicas*, el laboratorio de microbiología procesa las muestras de forma sindrómica y en función de la frecuencia y posibilidades de los laboratorios, ya que algunos disponen de pocos recursos y personal. A continuación se exponen diversos esquemas de los microorganismos que se deben investigar y de las técnicas que se deben realizar de forma habitual. En caso de sospecha y de fracasos terapéuticos se puede ampliar la búsqueda a otros microorganismos menos frecuentemente implicados y ya citados anteriormente que se incluyen en los algoritmos presentados en las figuras 5 a 10.

A. Úlceras genitales. (Figura 5). Se debe hacer un diagnóstico de los virus del herpes simplex (VHS) mediante inmunofluorescencia directa (IFD) y cultivo (que se realizará en un laboratorio de referencia si no se dispone de él) y *Treponema pallidum* mediante técnicas serológicas (EIA, pruebas no treponémicas y treponémicas).

B. Uretritis y Cervicitis (Figura 6). Se debe realizar tinción de Gram y cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*; detección de *C. trachomatis* mediante amplificación de ácidos nucleicos y cultivo de *U. Urealyticum*.

C. Vulvovaginitis y vaginosis (Figuras 7 y 8). Se realizará exámen en fresco, cultivo de levaduras, cultivo de tricomonas y se evaluará en la consulta según los criterios de diagnóstico de vaginosis bacteriana (exudado, pH, olor a pescado, células clave) o según los criterios de Nugent. También se puede realizar, si se dispone de ellas, alguna técnica rápida tipo Affirm VP11.

D. Otros (Figuras 9 y 10). Derivación de muestras a laboratorios de referencia para detección del virus del papiloma humano y extracción de suero, ya que a todos los pacientes con ITS se les debe realizar una determinación de anticuerpos frente al VIH.

9. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DEL DIAGNÓSTICO DE LAS ITS

En el Anexo I se incluyen las evidencias científicas del diagnóstico de las ITS

Figura 5. Diagnóstico microbiológico de las úlceras genitales

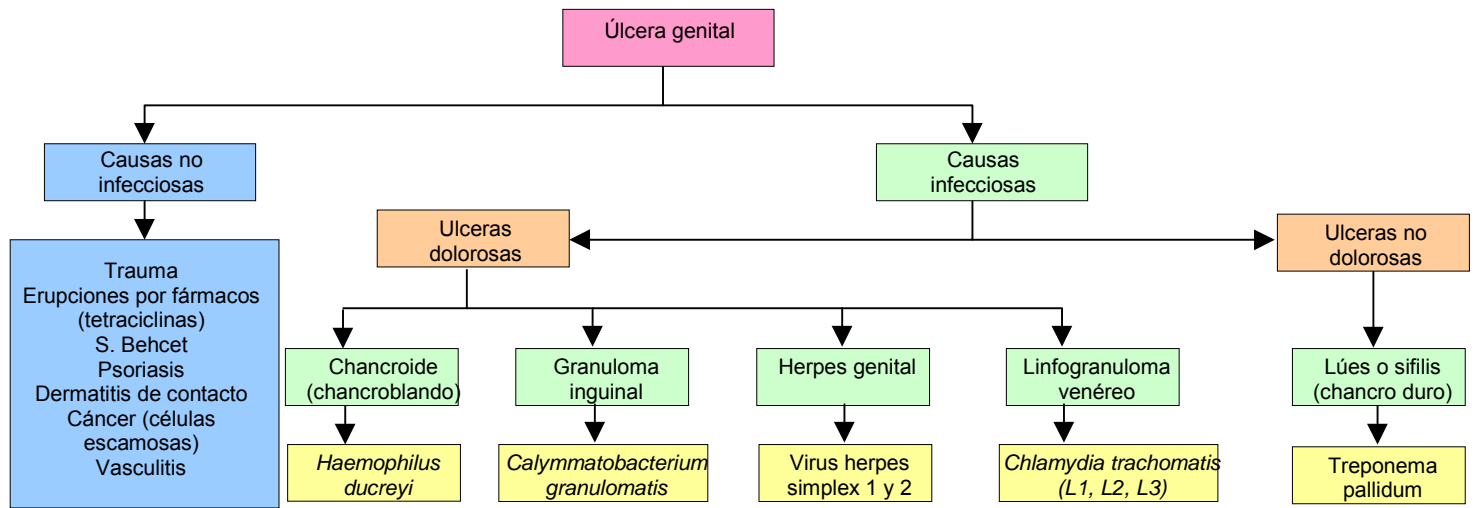


Figura 6. Diagnóstico microbiológico de las uretritis y cervicitis

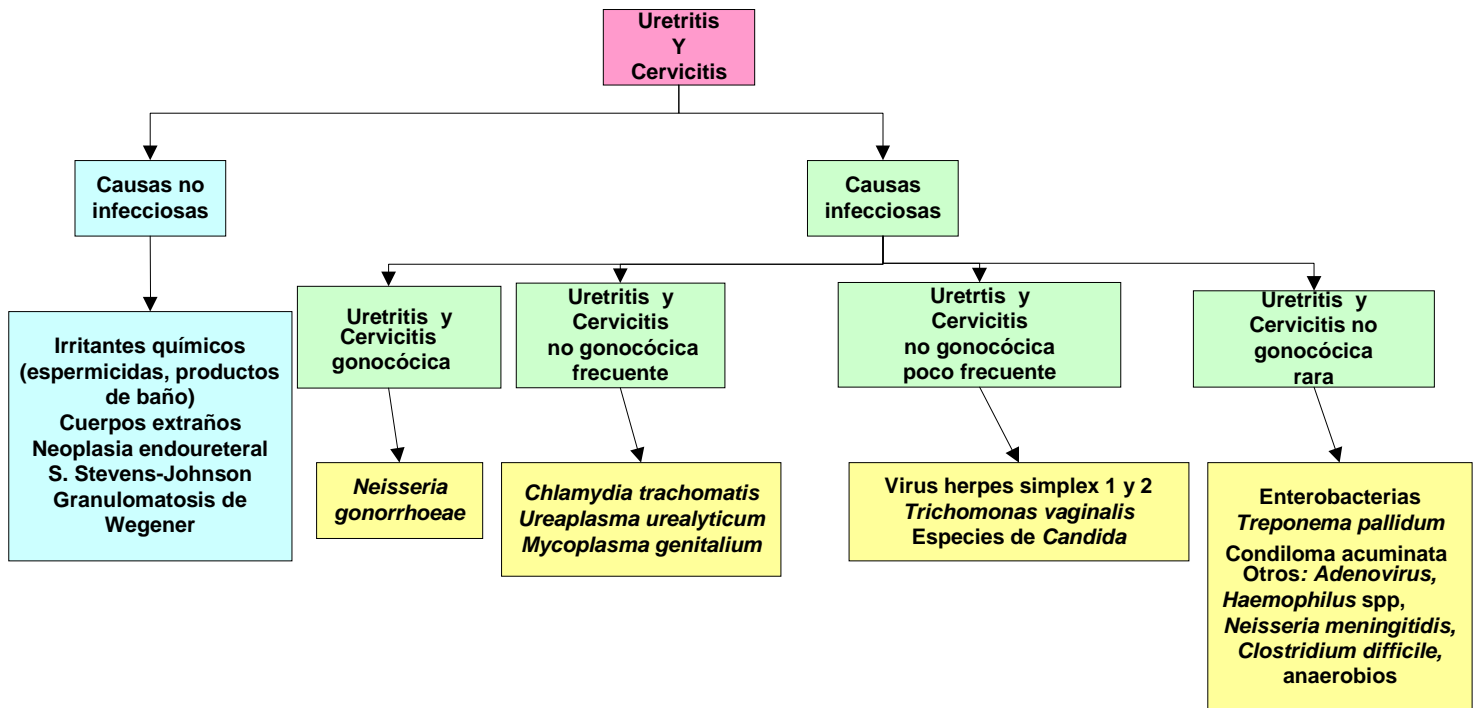


Figura 7. Diagnóstico microbiológico de la vulvovaginitis y la vaginosis en mujeres adultas

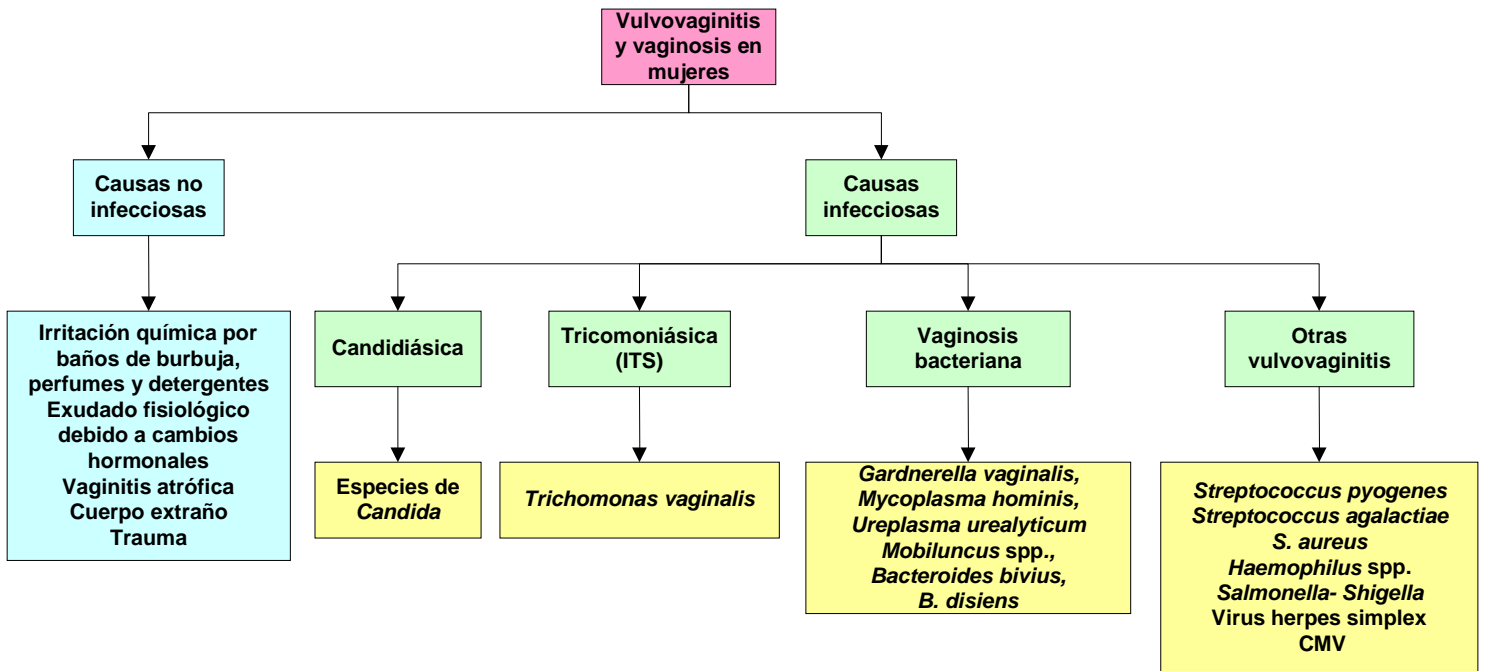


Figura 8. Diagnóstico microbiológico de la vulvovaginitis y la vaginosis en niñas

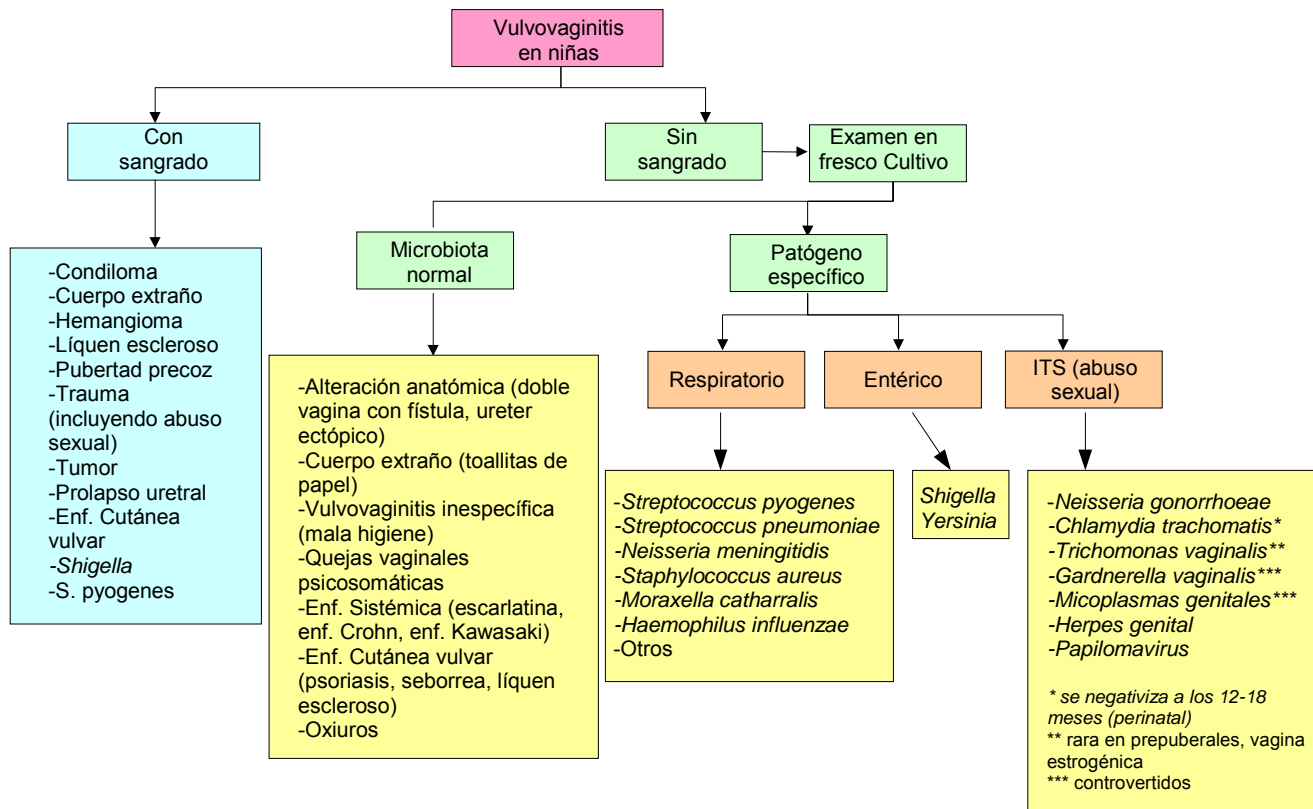


Figura 9. Diagnóstico microbiológico de las verrugas genitales

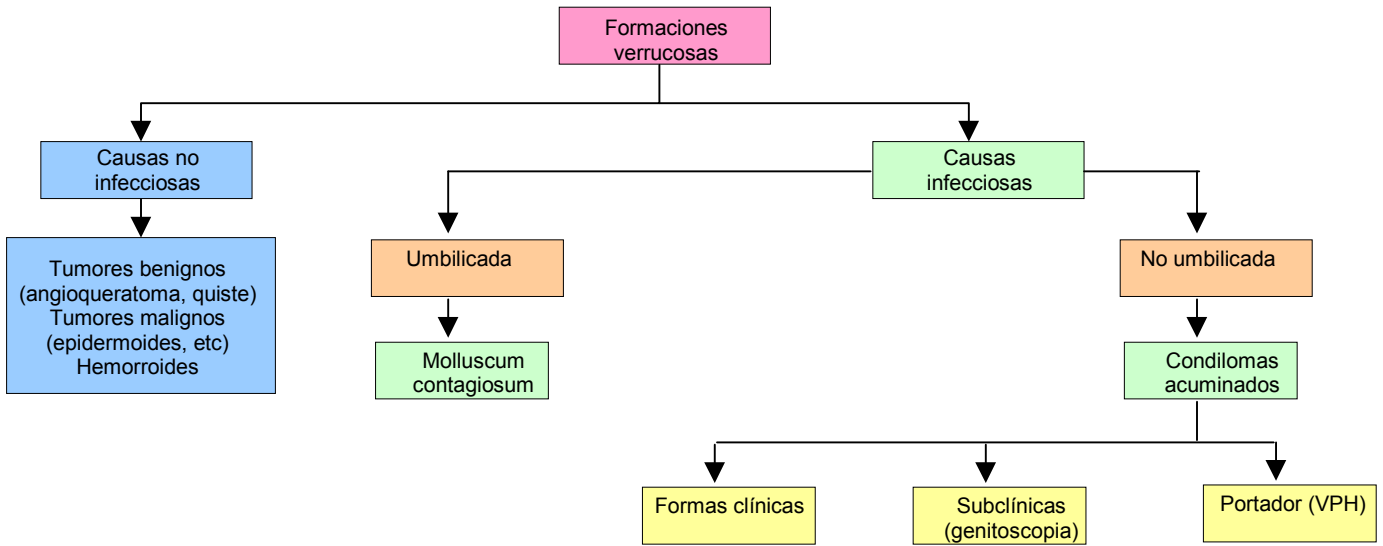
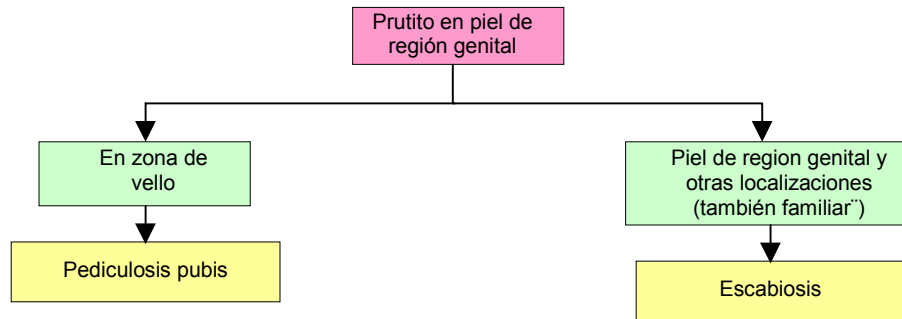


Figura 10. Diagnóstico microbiológico del prurito en la piel de la región genital



10. BIBLIOGRAFÍA

1. Baron EJ, Cassell GH, Eschenbach DA, Greenwood JR, Harvey SM, Madinger NE, Paterson EM, Waites KB. Cumitech 17^a, Laboratory diagnosis of female genital tract infections. Baron EJ (coordinador). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
2. Beutner KR, Reitano MV, Richwald GA, Wiley DJ et al. External genital warts: Report of the American Medical Association Consensus Conference. Clin Infect Dis 1998; 27: 796-806.
3. Bignell C, Ison CA, Jungman E. Gonorrhoea. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv6-iv9.
4. Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 1-17.
5. Carder C, Mercey D, Benn P. *Chlamydia trachomatis*. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv10-iv12.
6. Carter J, Bowden FJ, Sriprakash KS, Bastian I, Kemp DJ. Diagnostic polymerase chain reaction for donovanosis. Clin Infect Dis 1999; 28:1168-1169.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections- 2000. MMWR 2002; 51 (No. RR-15): 1-38.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines-2006. MMWR 2006; 55 (No. RR-11): 1-94.
9. Corey L., A. Rodriguez Pichardo. Manejo del paciente con herpes oro-labial y herpes genital. Programa de Formación continuada. ScienceTools. 2005.
10. Cunningham AL, Flexman JP, Dwyer D, Holland D. Clinician's Manual on Genital Herpes. Science Press. London 1997.
11. Eschenbach DA. History and review of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 441-445.
12. Gaydos CA. Rapid tests for sexually transmitted diseases. Curr Infect Dis Rep 2006; 8: 115-124.
13. Geretti AM. Genital Herpes. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv31-iv34.
14. Herring A, Richens J. Lymphogranuloma venereum. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv23-iv225.
15. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 455-459.
16. Horner P, Skidmore S, Herring A et al. Enhanced enzyme immunoassay with negative-gray zone testing compared to a single nucleic acid amplification technique for community-based *Chlamydia* screening of men. J Clin Microbiol 2005; 43: 2065-2069.
17. Isenberg HD (ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook (2nd edition CD-ROM). ASM Press Washington, D.C. 2004.
18. Jalal H, Stephen H, Curran MD et al. Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. J Clin Microbiol 2006; 44: 206-213.
19. Keane F, Ison CA, Noble H, Estcourt C. Bacterial vaginosis. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv16-iv18.
20. Kharsany AB, Hoosen AA, Kiepiela P, Naicker T, Sturm AW. Growth and cultural characteristics of *Calymmatobacterium granulomatis*-the aetiological agent of granuloma inguinale (Donovanosis). J Med Microbiol 1997; 46:579-585
21. Koumans EH, Jonson RE, Knapp JS, St. Louis ME. Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture tests: a performance review with clinical and public health considerations. Clin Infect Dis 1998; 27: 1171-1180.
22. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 1-21.
23. Leber AL, May GS, LeBar WD. Cumitech 44, Nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Coordinating ed., S. E. Sharp, ASM Press, Washington, D.C. 2006.
24. Lewis DA. Chancroid. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv19-iv20.
25. Lewis DA, Young H. Syphilis. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv13-iv15.
26. Mabey D, Ackers J, Adu-Sarkodie Y. *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv26-iv27.
27. Marrazzo JM, Johnson RE, Green TA et al. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification tests and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections. J Clin Microbiol 2005; 43: 577-584.
28. Maw R. Anogenital warts. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv40-iv41.
29. Navarro Ortega D, Navalpotro Rodriguez D, O Fraile Santos. Actualización en el diagnóstico del herpes genital. Bol Cont Calid SEIMC 2005. 17(2):55-59.
30. Norris SJ, Pope V, Johnson RE, Larsen SA. *Treponema* and other human host-associated spirochetes. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology (8^a ed.), ASM Press, Washington D.C. 2003.
31. Nugent RP, Kron MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301.
32. Ramaswamy M, McDonald C, Smith M, Thomas D, Maxwell S et al. Diagnosis of genital herpes by real time PCR in routine clinical practice. Sex Transm Infect 2004; 80: 406-410.
33. Richens J. Donovanosis (granuloma inguinale). Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv21-iv22.
34. Vázquez F, Otero L, Ordás J, Junquera ML, Varela JA. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22:392-411.
35. White DJ, Vanthuyne A. Vulvovaginal candidiasis. Sex Transm Infect 2006; 82 (Suppl IV): iv28-iv30.

ANEXO I. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DEL DIAGNÓSTICO DE LAS ITS

Niveles de evidencias en el diagnóstico de ITS

Niveles de evidencia (prueba)

- Ia, evidencia (prueba) obtenida de meta-análisis de ensayos aleatorios controlados.
- Ib, evidencia (prueba) obtenida de al menos un ensayo aleatorio controlado.
- IIa, evidencia (prueba) obtenida de al menos un estudio controlado no aleatorio bien diseñado.
- IIb, evidencia (prueba) obtenida de al menos un estudio quasi-experimental bien diseñado.
- III, evidencia (prueba) obtenida de un estudio descriptivo bien diseñado.
- IV, evidencia (prueba) obtenida a partir de informes de comités de expertos u opiniones o experiencia clínica de autoridades respetadas.

Grado de recomendación

- A, evidencia (prueba) de nivel Ia o Ib.
- B, evidencia (prueba) de nivel IIa, IIb o III.
- C, evidencia (prueba) de nivel IV.

Evidencias científicas en el diagnóstico del chancroide

Tipo de situación	Nivel de evidencia
1. Cultivo A. Se requiere el uso de más de un tipo de cultivo para aumentar la sensibilidad B. Se requiere un agente selectivo (vancomicina) 2. Microscopía: no se recomienda la tinción por su baja sensibilidad 3. Serología: ha sido útil epidemiológicamente pero no es útil para el manejo directo del paciente	Nivel IIa, Grado B Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B

Evidencias científicas en el diagnóstico de la donovanosis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
1. Microscopía: tinción para cuerpos de Donovan 2. Biopsia 3. Cultivo 4. PCR	Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IIa, Grado B Nivel IIa, Grado B

Evidencias científicas en el diagnóstico del linfogranuloma venéreo

Tipo de situación	Nivel de evidencia
1. No hay pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para muestras rectales pero los datos disponibles apoyan su uso (detectan todas las serovariedades incluyendo LGV)	Nivel III, Grado B
2. La confirmación de LGV se puede hacer mediante PCR en tiempo real, genotipificación (con el gen <i>omp</i>) y RFLP del gen <i>crp</i>	Nivel III, Grado B
3. En proctitis cualquier prueba positiva de amplificación de ácidos nucleicos se investigará mediante PCR en tiempo real y genotipificación	Nivel III, Grado B Nivel IIa, Grado B

Evidencias científicas en el diagnóstico de la sífilis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Pruebas de cribado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - EIA (sin datos de su evaluación) - EIA IgG e IgM más sensible en infección primaria - TTPA (<i>T. pallidum</i> particle assay) preferible a TPHA - TPHA se usará asociado a VDRL o RPR para aumentar su sensibilidad <p>2. Pruebas confirmatorias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - EIA IgM se usará en ulceraciones o contactos conocidos (la IgM es detectable en 2-3 semanas, y la IgG en 4-5 semanas) - TTPA cuantitativo para confirmar un TTPA positivo - EIA se usará para confirmar un TTPA - Si hay discrepancia entre EIA y TTPA usar una técnica de inmunoblot o una de FTA - Se hará un VDRL o RPR cuantitativo antes del tratamiento - Aumento 4x en VDRL o RPR y/o cambio en EIA IgM de negativo a positivo confirmado en una 2ª muestra sugiere reinfección o recaída <p>3. Detección directa en sífilis primaria o secundaria:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se visualizará en campo oscuro por personas experimentadas (no en lesiones genitales como recto u orales) - Se repetirá campo oscuro diariamente durante 3 días sin tratamiento antibiótico - Las muestras en torundas secas para PCR son válidas para lesiones no genitales <p>4. Frecuencia de repetición de pruebas en paciente asintomático:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Depende de la historia sexual - Exposición de alto riesgo es sexo oral, anal o vaginal sin protección en pareja de alto riesgo - No necesario si exposición previa hace >6 semanas con bajo riesgo - Recomendado 3 meses después si ha tenido contacto de alto riesgo <6 semanas antes - Repetir EIA IgM a las 6 semanas y 3 meses si exposición múltiple de alto riesgo, lesiones ulcerativas con campo oscuro negativo y contacto sospechado o probado con paciente con sífilis <p>5. Prueba de curación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Recomendado VDRL o RPR cuantitativo - Se hará con el mismo antígeno (misma casa comercial) y en el mismo laboratorio - Se realizará mensualmente durante 3 meses, a los 6 y 12 meses de una sífilis temprana - El VDRL o RPR se hará cada 6 meses hasta que se vuelva negativo/ serofast en sífilis tardía no infecciosa - En pacientes VIH positivos se repetirá la serología anualmente o más frecuentemente si hay reinfección - No es necesario una punción lumbar en sífilis temprana y si es necesaria por las guías se hará cada 6 meses hasta que el recuento de células sea normal 	<p>Nivel IIb, Grado B Nivel IIb, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico del herpes genital

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Pruebas diagnósticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Actualmente no se recomienda en pacientes asintomáticos la detección de anticuerpos - Actualmente no se recomienda en pacientes asintomáticos la detección del virus en muestras genitales <p>2. Pruebas de detección directa:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se utilizarán métodos para demostrar directamente el VHS en torundas o raspados de una lesión - Tinciones de Tzanck y de Papanicolau tienen baja sensibilidad y especificidad y no se utilizarán para el diagnóstico - Cultivo: es el patrón de referencia - PCR: será introducida después de la evaluación local como método de preferencia - Inmunofluorescencia directa: limitada sensibilidad y especificidad por lo que no se recomienda - Enzimonio sobre muestra de lesión tiene sensibilidad variable - Enzimonio para anticuerpos contra glucoproteínas gG1 o gG2 (hay argumentos a favor y en contra de su utilización) <p>3. Poblaciones especiales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En pacientes con baja probabilidad de herpes genital, se debe confirmar un resultado positivo para VHS-2 repitiéndolo o usando otro método - Cribado serológico: se considerará en personas con historia de recurrencias de etiología desconocida y si los métodos directos son repetidamente negativos - Cribado serológico: se considerará para parejas sexuales de personas con herpes genital y con resultados serológicos discordantes - Pacientes <14 años: no se usarán las pruebas de anticuerpos frente al VHS-2 por su alto número de falsos positivos - Cribado de embarazadas: se recomienda cuando hay una historia de herpes genital en la pareja 	<p>Nivel IV, Grado C Nivel IIa, Grado B</p> <p>Nivel Ia, Grado A Nivel Ib, Grado A No se especifica Nivel Ib, Grado A Nivel Ia, Grado A No se especifica Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico de las verrugas anogenitales

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Pruebas diagnósticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Examen visual con o sin ayuda de lente de aumento: recomendado sin especificar nivel o grado de evidencia. - Tipado de VPH: No es necesario de forma rutinaria - Biopsia: Lesiones dudosas - Prueba del ácido acético: - Citología cervical (en mujeres de más de 25 años) 	<p>No se especifica Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel IIb, Grado B Nivel IV, Grado C</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico de la infección gonocócica

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Toma de muestras:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se evitarán lubricantes vaginales por ser tóxicos para el gonococo - Se investigará la presencia de <i>N. gonorrhoeae</i> en todos los sitios anatómicos con síntomas (exudado y/o dolor) - La toma de recto y faringe en mujeres se realizará si hay una historia de exposición directa - Pueden obtenerse muestras anorectales introduciendo de forma ciega una torunda 2-4 cm en el canal anal y realizando presión lateral - La inoculación directa de las muestras y el uso de torundas con medio de transporte proporcionan resultados aceptables - Las torundas de transporte se almacenarán a 4°C y se transportarán al laboratorio tan pronto como sea posible, preferiblemente en 48 horas - Muestras conjuntivales: tomar con torunda en la parte inferior del párpado y el paciente será examinado por un oftalmólogo 	<p>Nivel II, Grado B Grado C Grado C Nivel III, Grado B Nivel IV Nivel IV Grado C</p>
<p>2. Microscopio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - La tinción de Gram tiene mayor sensibilidad para muestras tomadas con asas de plástico comparado con torundas de algodón - Tinción de Gram exudado uretral masculino alta sensibilidad - La sensibilidad de la tinción de Gram para muestras de recto es baja y no se recomienda - La tinción de Gram de muestras rectales puede ser útil cuando se toman mediante proctoscopio en pacientes sintomáticos 	<p>Nivel III Nivel II, grado B Grado C Nivel III, Grado C</p>
<p>3. Cultivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uso de agar base GC o agar Columbia con sangre chocolatizada o lisada o suplemento no basado en sangre como IsoVitalex (Becton Dickinson) o Vitox (Oxoid) - Si sólo se puede usar un medio es mejor uno selectivo con antimicrobianos como agentes selectivos - Es mejor usar también un medio no selectivo asociado al medio selectivo - En clínicas de ITS, el cultivo es la prueba preferida para uso de rutina - Pueden cultivarse muestras vaginales en niñas prepuberales - Diagnóstico de infección diseminada: se cultivará sangre y líquido articular, además de una muestra genital y otra faríngea - Mujeres heterosexuales asintomáticas en clínicas de ITS: realizar cultivo endocervical (o amplificación de ácidos nucleicos) - Hombres con relaciones sexuales con hombres: realizar toma de uretra, recto y orofaringe si han estado expuestos - Mujeres prostitutas: cultivo de todas las zonas expuestas aunque hayan estado aparentemente protegidas por condones - En abuso sexual en adultos se prefiere el cultivo de todos los sitios expuestos por su alta especificidad (100%) - Cultivo de exudado rectal además de endocervical y uretra en contactos femeninos de individuos con infección gonocócica 	<p>Nivel II, Grado B Nivel II, grado B Grado C Grado C Grado C Nivel III Grado C Grado C Grado C Grado C Grado C</p>
<p>4. Amplificación de ácidos nucleicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se consideran técnicas de diagnóstico presuntivo y si hay una prevalencia baja el valor predictivo positivo puede ser <80% por lo que requieren confirmación mediante cultivo - Mayor sensibilidad (>90%) comparado con cultivos (<60%) en muestras rectales y orofaríngeas, pero no se recomiendan para estas muestras - Muestras no invasivas (orina, vagina o uretra): reservar para mujeres que no sufren examen con espéculo - Recomendado para orina y muestras recogidas de forma no invasiva - La sensibilidad en muestras de orina de mujeres es más baja que para muestras endocervicales - Son adecuadas muestras vaginales o tampones 	<p>Grado C Grado C Grado C Nivel II, Grado B Nivel III Nivel III Grado C</p>
<p>5. Prueba de curación: está recomendada después de tratamiento de infección faríngea</p>	<p>Grado C</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico de la infección por *Chlamydia trachomatis*

Tipo de situación	Nivel de evidencia
1. No están indicadas pruebas de diagnóstico inmediato (en la consulta de ITS), ni serología, ni la prueba de la esterasa leucocitaria	Grado C
2. Amplificación de ácidos nucleicos (AANs): - De elección (por su sensibilidad y especificidad) para muestras de uretra, cérvix y orina (primer chorro)	Grado A
3. Localización: A. Orina: 15-50 ml del primer chorro, cualquier momento del día, al menos 1-2 h tras haber orinado, menor sensibilidad que uretra y cérvix EIA: hombres sintomáticos, no sensible en asintomáticos y no adecuado en mujeres; IFA: adecuado pero no ideal (requiere ser experto); cultivo: no adecuado	Grado C
B. Uretra y cérvix: uso de espéculo, rotar torunda 2 o más veces 15-30 segundos , válidas todo tipo de pruebas	Grado C
C. Faringe: Cultivo IFA: aprobado pero no adecuado para uso en gran número de muestras; AANs: no aprobado pero puede ser de elección sin acceso a cultivo EIA: no aprobado	Grado A Grado C
D. Rectal (mediante proctoscopio) Cultivo IFA: aprobado pero no adecuado para uso en gran número de muestras EIA: no aprobado (falsos positivos con otros microorganismos) AANs: no aprobado pero puede ser de elección sin acceso a cultivo detectan todas las serovariedades incluyendo LGV	Grado A Grado C Grado B, nivel de evidencia III
4. Cribado por grupos de pacientes: A. Mujer heterosexual o embarazada: cérvix o vulvovaginal (clínico o la propia paciente) u orina; hombre heterosexual: uretral u orina; homosexual: uretral u orina.	Grado A
Mujer joven: ofrecer método no invasivo vulvovaginal u orina; hombre joven: ofrecer método no invasivo si rehúsa uretral (orina)	Grado A
B. Contactos y prostitución: igual que A C. Abuso sexual: cultivo de todas las muestras método recomendado (100% especificidad); guía inglesa recomienda también AANs además del cultivo por su sensibilidad, pero escasa disponibilidad en los laboratorios	Grado C
5. Prueba de curación:	-
A. No se recomienda si se da tratamiento estándar	
B. Aconsejable en embarazo con la misma técnica realizada (mínimo 3-5 semanas postratamiento ya que AANs demuestran ADN/ARN residual)	Grado A
6. Búsqueda de otras ITS En todos los pacientes con aislamiento de <i>C. trachomatis</i> se deben buscar otras ITS	Grado C

Evidencias científicas en el diagnóstico de la vaginosis bacteriana

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Se realizará cribado de vaginosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mujeres con exudado vaginal, olor del exudado, o cualquier otro síntoma genital - Mujer con exudado copioso al examen - Mujer con parto pretérmino previo se ofrecerá cribado - Hasta la fecha hay insuficiente evidencia para recomendar el cribado de mujer embarazada asintomática - Hay alguna evidencia para apoyar el cribado y tratamiento de vaginosis de mujer embarazada antes de finalizar el embarazo para reducir endometritis y enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) - Hay ausencia completa de evidencia para informar cualquier decisión de cribado asintomático de mujer no embarazada cuando se tiene en cuenta el resultado de EIP <p>2. Pruebas diagnósticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Criterios clínicos (Amsel): no recomendado - Tinción de Gram (criterios de Ison-Hay o Nugent): recomendado <p>2. Prueba de curación</p> <ul style="list-style-type: none"> - No hay evidencia para recomendar o desestimarla 	<p>Nivel Ia, Grado A Grado A Nivel Ia, Grado A Nivel Ia, Grado A Nivel Ib, Grado B Nivel IV, Grado C</p> <p>No se especifica No se especifica</p> <p>Nivel IV, Grado C</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico de la tricomoniasis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Toma de muestras:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En mujeres la toma con torunda se hará del fondo de saco posterior en el exámen con espéculo - La toma vaginal de la propia paciente proporciona probablemente resultados equivalentes - Muestras de orina (primer chorro) con/sin centrifugación: menor sensibilidad que la toma vaginal - En hombres se mejora la sensibilidad realizando tomas tanto de uretra como de orina (primer chorro) - Muestras del espacio subprepuccial: no han sido validadas <p>2. Cultivo:</p> <p>Cultivo se considera el más sensible y específico, es el método de referencia con el que comparar otras técnicas Medio de Diamond es adecuado y el InPouch es tan sensible como este medio (no incluyen el medio de Rieron pero también es equivalente)</p> <p>3. Otras pruebas diagnósticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - La prueba de aglutinación con látex es rápida, económica y con gran sensibilidad y especificidad - La PCR parece más sensible que el cultivo pero no está claro si son falsos negativos o falsos positivos en cultivo (igual que con clamidias) - No se recomienda el cribado para pacientes asintomáticos - Mujeres con exudado vaginal: investigar la presencia de tricomonas - Parejas de mujeres infectadas se tratarán epidemiológicamente - Cribado de hombres de parejas infectadas podría mejorar el rastreo de contactos en los que fuese positivo - Hombres con síntomas uretrales que persisten después de excluir o tratar infección gonocócica, clamidias o <i>M. genitalium</i> se realizarán pruebas diagnósticas para tricomonas <p>4. Prueba de cura:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Solo se hará en aquellos en que persistan los síntomas después del tratamiento 	<p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel I-II, Grado A Nivel III, Grado B Nivel Ib, Grado A Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel IV, Grado C</p>

Evidencias científicas en el diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>1. Se hará cribado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No se hará cribado en mujeres asintomáticas - Se hará para cualquier episodio - Se tratará a mujeres sintomáticas con microscopía positiva y/o cultivo positivo - El tratamiento de mujeres basado solamente en síntomas es frecuente pero produce sobretratamientos <p>2. Pruebas diagnósticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En servicios de salud sexual se hará microscopía y cultivo - Se harán las tomas del fondo de saco posterior con torunda de algodón - Se hará tinción de Gram o exámen en fresco - Se hará cultivo y diferenciación entre <i>C. albicans</i>/ no <i>albicans</i> - El pH vaginal no es útil (puede estar asociado a vaginosis bacteriana) - Las tomas ciegas pueden ser útiles - Las tomas realizadas por la propia paciente pueden ser útiles - La diferenciación de especies es necesaria si se aíslan más de una vez - El agar cromogénico facilita, si está disponible, la identificación y la existencia de infecciones mixtas y se prefiere para infecciones complicadas - No se recomienda medio líquido, aglutinación por látex o PCR - No está probada la utilidad de pruebas de sensibilidad para candidiasis vulvovaginal complicada - Estaría indicado en mujeres con alteraciones inmunológicas crónicas - Estaría indicado cuando hay repetidos aislamientos de especies de <i>Candida</i> no <i>albicans</i> <p>3. Interpretación y notificación de resultados:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Microscopía: informar ausencia o presencia de blastosporas y/o pseudohifas - Cultivo: negativo, crecimiento escaso (<10 colonias por placa), moderado (entre 10-99) o elevado (≥100) - La microscopía es específica pero poco sensible - El cultivo es sensible pero no específico (no está claro que los síntomas estén asociados con escaso crecimiento de colonias) - <i>C. glabrata</i> suele ser resistente a los azoles y responde peor al tratamiento - Candidiasis vulvovaginal recurrente: 4 o más episodios en un año - Candidiasis vulvovaginal persistente: causada generalmente por especies de <i>Candida</i> no <i>albicans</i> y requiere al menos 2 muestras consecutivas y tratamiento en la primera <p>4. Prueba de cura:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sólo después de tratamiento de candidiasis vulvovaginal persistente - Requiere al menos 2 cultivos negativos separados al menos 1 semana después del tratamiento y con un intervalo de al menos 1 semana entre cultivos 	<p>Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B No se especifica Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel III, Grado B Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p> <p>Nivel IV, Grado C Nivel IV, Grado C</p>

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-ITS-01
RPR (*Rapid Plasma Reagin*) PARA DIAGNOSTICO DE INFECCION POR *Treponema pallidum*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para diagnóstico de infección por <i>T. pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la prueba serológica RPR (*Rapid Plasma Reagin*) que determina de forma macroscópica la presencia de anticuerpos no treponémicos frente a *Treponema pallidum*. Se usa como prueba de cribado en el diagnóstico de la sífilis, así como para determinar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

2. FUNDAMENTO

La prueba emplea el antígeno del VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) que contiene cardiolipina, lecitina y colesterol, estabilizados con EDTA, así como partículas de carbón. El paciente con sífilis produce anticuerpos anti-cardiolipina, que se unen al antígeno del ensayo, formando una red que atrapa a las partículas de carbón, visualizándose la reacción macroscópicamente.

Los anticuerpos del paciente se forman como respuesta a las lipoproteínas o a la cardiolipina presentes en el treponema, así como a los antígenos lipoides del propio paciente expuestos como consecuencia de la infección por *T. pallidum* o también como respuesta al daño tisular en el seno de enfermedades autoinmunes o por el uso de drogas parenterales.

La reacción se efectúa en una tarjeta de superficie plástica, donde se deposita el suero problema y seguidamente el antígeno con las partículas de carbón. Si los anticuerpos están presentes se produce la reacción de floculación. Se determina la presencia tanto de anticuerpos de la clase IgG como de IgM. La reacción puede cuantificarse (titulación), lo que sirve para estudiar la evolución y respuesta al tratamiento. Si existe una disminución significativa (dos diluciones dobles) indicaría que el tratamiento ha sido efectivo. Incrementos en la misma proporción implica fallo en el tratamiento o reinfección. Si no hay una disminución significativa (títulos estables), no significa necesariamente un fracaso terapéutico, y el paciente debe seguir siendo evaluado en el tiempo clínica y serológicamente.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos
- El prospecto del equipo comercializado con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos.

4. MUESTRAS

- Para la realización de esta prueba se requiere sangre total (5 ml) que se centrifugará para obtener el suero.

- La prueba se lleva a cabo preferiblemente sobre muestra de suero, sobre todo si su realización se va a demorar más de 48 horas.
- Los sueros pueden almacenarse en nevera durante una semana. En caso de no realizarse la técnica en una semana, se deberán congelar a -20°C.
- El plasma también es una muestra aceptable, pero la determinación debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible.
- No debe realizarse esta prueba en muestras lipémicas o hemolizadas, ya que pueden dar resultados erróneos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Equipo RPR comercializado. Contiene las tarjetas, los controles, el reactivo con el antígeno, incluyendo partículas de carbón, y las agujas de dispensación.
- Solución salina (Cloruro sódico al 0,9%)
- Agua destilada

6. APARATOS Y MATERIAL

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta.
- Palillos. Normalmente vienen suministrados en el equipo comercializado (ver procedimiento).
- Agitador orbital que permita velocidad de giro de 100 ± 2 rpm.
- Cámara húmeda.
- Reloj temporizador.

7. PROCEDIMIENTO

Ensayo cualitativo:

1. Dejar que los reactivos, controles y muestras alcancen la temperatura ambiente.
2. Rotular cada círculo de la tarjeta de reacción, con la identificación de la muestra o control que se vaya a ensayar.
3. Dispensar 50 µl de cada control o muestra en su círculo correspondiente.
4. Con un palillo, abrir la gota dispensada hasta ocupar, sin sobresalir, todo el círculo de la tarjeta.
5. Agitar para resuspender el vial de reactivos con el antígeno para homogeneizar el contenido.
6. En posición vertical, dejar caer una gota limpia (sin burbujas) sobre la muestra o controles. No mezclar.
7. Colocar la tarjeta en una cámara húmeda, y esta sobre el agitador orbital.
8. Rotar 8 minutos a 100 ± 2 rpm.
9. Con la tarjeta en la mano, rotarla manualmente para una mejor observación de los resultados.
10. A las muestras que en el ensayo cualitativo presenten agregados, se les debe realizar el ensayo cuantitativo.

Ensayo cuantitativo:

1. Preparar las tarjetas para hacer diluciones dobles seriadas desde 1/1 hasta 1/16 (se precisan 5 círculos por suero o control).

Servicio de Microbiología Hospital.....	RPR (Rapid Plasma Reagin) para diagnóstico de infección por <i>T. pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

2. Añadir 50 µl de solución salina a los círculos 2, 3, 4 y 5. Dejar la gota sin abrir a la extensión del círculo.
3. Añadir 50 µl de cada suero o control al círculo 1. Añadir 50 µl de cada suero o control al círculo 2 sobre el salino, y con la misma pipeta, mezclar el suero y el salino mediante la aspiración y dispensación de la mezcla un total de 8 veces, evitando formar burbujas.
4. Transferir de la mezcla del segundo círculo, 50 µl al salino del círculo 3 y mezclar como en el paso anterior.
5. Continuar así de forma sucesiva hasta el círculo.
6. Después de mezclar, tirar 50 µl.
7. Con un palillo, y empezando en el círculo con mayor dilución (el 5 en este caso), abrir la mezcla hasta ocupar sin sobresalir, todo el círculo de la tarjeta. Con el mismo palillo, repetir el proceso en el resto de círculos, desde más, a menos diluido.
8. Agitar para resuspender el vial de reactivos con el antígeno y las partículas de carbón.
9. En posición vertical, dejar caer una gota limpia (sin burbujas) sobre la muestra o controles. No mezclar.
10. Colocar la tarjeta en una cámara húmeda, y esta sobre el agitador orbital.
11. Rotar 8 minutos a 100 ±2 rpm.
12. Con la tarjeta en la mano, rotarla manualmente para una mejor observación de los resultados.
13. Si la mayor dilución permanece positiva (1/16), es preciso hacer más diluciones hasta obtener el punto final.
14. Preparar diluyente: suero no reactivo diluido 1:50 en solución salina al 0,9%.
15. Preparar dilución 1:16 del suero problema en solución salina al 0,9% (0,1 ml suero problema en 1,4 ml de salino). Agitar para homogeneizar.
16. Preparar tarjetas para hacer diluciones dobles seriadas desde 1/16 hasta 1/256 (se precisan 5 círculos por suero o control).
17. Dispensar 50 µl del diluyente en los círculos 2 al 5.
18. Dispensar 50 µl de la predilución 1:16 del suero problema a los círculos 1 y 2, siguiendo los pasos previamente explicados en los puntos del 3 al 12.
19. Al finalizar todas las pruebas, y antes de recoger, separar la aguja del vial de reactivos para proceder a su aclarado con agua destilada, dejando secar al aire. Esto permitirá que en el siguiente ensayo las gotas de reactivo caigan uniformes y sin burbujas. Tapar de nuevo el vial con la aguja y almacenar el reactivo en nevera.

Controles:

- Se incluirán control positivo y negativo en cada ensayo.
- En ensayos cuantitativos, se incluirán controles de título conocido.
- En los cambios de lote, se deben ensayar 6 sueros de título conocido en paralelo dos días consecutivos.

- Controlar la temperatura ambiente. Si es demasiado fría o calurosa (es ideal el rango 23-29°C), puede afectar a la precisión del ensayo.
- La aguja de dispensación del reactivo es otro elemento a controlar, sobre todo después de una caída accidental o si los controles no dan el resultado esperado.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

La lectura de los resultados debe ser inmediata bajo una luz intensa procedente de una lámpara incandescente, y a simple vista, sin microscopio.

- Si se demora la lectura y empieza a secarse, pueden producirse errores en la interpretación.
- La presencia de agregados negros, ya sean bien marcados o pequeños, se considera una reacción positiva.
- La concentración de agregados negros finos rodeados de un área difusa de suspensión, se considera una reacción positiva débil.
- La concentración de carbón suave en el centro del círculo, o la presencia de una suspensión gris suave uniforme que ocupa todo el centro de la prueba, se considera un resultado negativo.
- A las muestras que en el ensayo cualitativo presenten agregados, se les debe realizar el ensayo cuantitativo.
- En ensayos cuantitativos, informar el título correspondiente con la más alta dilución que muestra reactividad, incluso cuando sea mínimamente reactivo (positivo).

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones de cada puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Durante el procedimiento, puede ser causa de error (falso negativo) el dispensar la gota de antígeno sobre el suero no extendido en el círculo de la tarjeta.

Al dispensar el antígeno es importante mantener el vial con la aguja en posición vertical para asegurar que se dispensa con precisión la cantidad de una gota.

Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden dar resultados falsamente positivos, habitualmente a títulos bajos (1/4 o menores).

La técnica de RPR es más sensible que la de VDRL. En ensayos cuantitativos, es positivo a una dilución más alta.

Los títulos del ensayo cuantitativo pueden usarse para seguir la evolución de la respuesta al tratamiento. Un tratamiento efectivo supondrá una caída de los títulos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para diagnóstico de infección por <i>T. pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Los enfermos de sífilis que fueron tratados en periodo latente o tardío, o con historia de varias infecciones sífilíticas, pueden mantener niveles reactivos a bajo nivel durante toda la vida.

Los títulos también pueden ir disminuyendo de forma espontánea a lo largo del tiempo en pacientes no tratados.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden aparecer falsos positivos en muestras de suero o plasma de pacientes usuarios de drogas por vía parenteral, infectados por el VIH, con mononucleosis infecciosa, con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso, lepra, neumonía vírica, hepatitis, embarazo, o que recientemente hayan recibido inmunizaciones víricas.

Pueden dar reacciones falsamente negativas pacientes con sífilis latente o tardía, así como estadios muy precoces de la infección.

Los pacientes Infectados por el VIH pueden presentar títulos bajos o resultados falsamente negativos. Igualmente pueden presentar retraso en el descenso del título después de un tratamiento correcto y sin existir fracaso terapéutico.

Los pacientes infectados por el VIH se deben evaluar en conjunto, tanto con pruebas no treponémicas como treponémicas.

Cuando se emplea la técnica de RPR como prueba inicial de cribado, el resultado positivo debe confirmarse con una prueba treponémica.

El efecto prozona es debido a una elevada concentración de anticuerpos (ocurre en el 1-2% de las sífilis secundaria) y puede ocurrir en muestras no diluidas. Puede aparecer inicialmente en la técnica cualitativa como un resultado “negativo” o débilmente positivo, siendo entonces preciso un ensayo cuantitativo. También puede descartarse efecto zona en las situaciones clínicas de sospecha de sífilis con RPR negativo.

Esta técnica no puede aplicarse en muestras de LCR.

La temperatura ambiente fuera de rango (23-29°C) puede alterar los resultados. Temperaturas inferiores pueden provocar reacciones falsamente negativas o títulos bajos. Temperaturas superiores pueden provocar reacciones falsamente positivas o elevación de los títulos.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Norris SJ, Pope V, Johnson RE, Larsen SA. *Treponema* and other human host-associated spirochetes. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-ITS-02
TPHA (HEMAGLUTINACION) PARA EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR
Treponema pallidum

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	TPHA (hemaglutinación) para el diagnóstico de la infección por <i>T. pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el ensayo TPHA para la detección cualitativa de anticuerpos frente a *Treponema pallidum* en suero o plasma mediante hemaglutinación pasiva.

2. FUNDAMENTO

El ensayo se basa en el empleo de eritrocitos de pollo recubiertos con antígenos de *T. pallidum* (cepa Nichols), que se unen a anticuerpos específicos presentes en el suero o plasma del paciente. Las células se suspenden en un medio que contiene componentes para eliminar las reacciones no específicas.

El suero del paciente se diluye en un reactivo de adsorción, que es un extracto de cultivo de treponemas no patógenos. De esta manera, los posibles anticuerpos que contenga la muestra frente a treponemas no patógenos, quedan fijados e inactivados en este paso.

Las reacciones positivas se muestran mediante aglutinación de las células, y las reacciones negativas mediante la sedimentación de células en forma de botón o pequeño anillo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos
- El prospecto del equipo comercializado con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos.

4. MUESTRAS

- Son válidas las muestras de suero y plasma (5 ml). No es válido el LCR.
- Las muestras no deben contener células de la sangre ni contaminación microbiana.
- Se pueden almacenar en nevera a 4-8°C una semana.
- Para periodos mas largos de almacenamiento, congelar a -20°C.
- No debe realizarse esta prueba en muestras lipémicas o hemolizadas, ya que pueden dar resultados erróneos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Reactivos incluidos en el equipo comercial. Incluye células de prueba, células de control, diluyente y sueros de control positivo y negativo.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Pipetas calibradas.
- Microplacas de 96 pocillos con fondo en U.
- Puntas de pipeta.

7. PROCEDIMIENTO

Prueba cualitativa:

1. Preparar 3 pocillos por muestra: dilución, prueba y control.
2. Diluir las muestras a 1:20.
En el pocillo de dilución, dispensar 190 µl del diluyente comercial y añadir 10 µl de muestra o controles. Mezclar bien.
3. En el pocillo de prueba, añadir 25 µl del diluido del paso 2.
4. En el pocillo de control, añadir 25 µl del diluido del paso 2.
5. Resuspender los viales con las células de prueba y de control.
6. Añadir 75 µl del vial "células de prueba" al pocillo de prueba.
7. Añadir 75 µl del vial "células de control" al pocillo de control.
8. Mezclar bien agitando 2 minutos.
9. Incubar a temperatura ambiente (15-30°C) en una superficie sin vibración durante 45 minutos.
10. Proceder a la lectura.

Prueba cuantitativa:

1. Se necesitan 17 pocillos por muestra: 1 de dilución, 8 de prueba (fila 1) y en paralelo 8 de control (fila 2).
2. Diluir las muestras a 1:20.
En el pocillo de dilución, dispensar 190 µl del diluyente comercial y añadir 10 µl de muestra o sueros control. Mezclar bien.
3. Dejando el primer pocillo de prueba vacío, añadir 25 µl de diluyente a los otros 7 de la fila 1.
4. Proceder del mismo modo en la fila 2.
5. Añadir 25 µl de la muestra diluida (paso 2) al pocillo 1 y al 2 de la fila 1 (de prueba).
6. Desde el pocillo 2, mezclar con la pipeta mediante aspiraciones y dispensaciones sucesivas y pasar 25 µl al pocillo 3. Continuar del mismo modo haciendo diluciones dobles sucesivas hasta el último pocillo, de donde se descartarán los últimos 25 µl de exceso.
7. Repetir los pasos 5 y 6 en la fila 2 (de control).
8. Resuspender los viales con las células de prueba y de control.
9. Añadir 75 µl del vial "células de prueba" a los 8 pocillos de prueba (fila 1).
10. Añadir 75 µl del vial "células de control" a los 8 pocillos de control (fila 2).
11. Mezclar bien.
12. Incubar a temperatura ambiente (15-30°C) en una superficie sin vibración durante 45 minutos.
13. Proceder a la lectura.

Controles:

- Siempre realizar el ensayo con células sensibilizadas (pocillo prueba) y sin sensibilizar (pocillo control).
- Si se observa aglutinación con las células no sensibilizadas, repetir la prueba en modo cuantitativo.

Servicio de Microbiología Hospital.....	TPHA (hemaglutinación) para el diagnóstico de la infección por <i>T. pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- Incluir controles positivos y negativos en cada ensayo.
- En la prueba cuantitativa incluir siempre un control positivo de título conocido, que suele estar incluido en el equipo comercial.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

Después de la incubación, los patrones de lectura permanecen estables durante 3 horas si no se manipula la placa, pero se aconseja que en el último paso de incubación a temperatura ambiente, se realice un seguimiento de la aglutinación cada 15 minutos aproximadamente para efectuar la lectura en el momento óptimo de aglutinación de los controles.

Se considera resultado "No reactivo" (negativo) cuando se observa un botón compacto en el centro del pocillo, sin agujero o con un mínimo agujero central.

Si se observa botón de células no aglutinadas con un agujero central pequeño, debe repetirse el ensayo, y si el resultado es idéntico, considerar el resultado como "No reactivo".

El resultado es "Reactivo" (positivo) cuando se observa aglutinación en todo el pocillo y también cuando se observa un botón de células sin aglutinar formando un círculo, y células aglutinadas por fuera y por dentro del círculo. En el pocillo control no debe de haber aglutinación.

Si se observa aglutinación en el pocillo "prueba", pero también aglutina el pocillo "control", realizar para esa muestra un ensayo cuantitativo.

En el ensayo cuantitativo se compara el título obtenido en la fila de prueba y el obtenido en la de control. Si el título es al menos dos diluciones dobles mayor con células sensibilizadas (fila de prueba) que con células sin sensibilizar (fila de control), se considera resultado "Reactivo". No se informa el resultado del título.

Si no hay diferencias significativas de título entre el ensayo con células sensibilizadas y sin sensibilizar, se debe informar como "Resultado no concluyente."

En el ensayo cuantitativo, el título es la dilución más alta en la que se observe aglutinación.

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones de cada puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las fuentes más frecuentes de errores son: la suciedad en los pocillos de la placa de microdilución, lo que altera el patrón de depósito de las células, los errores de pipeteo y las vibraciones durante el tiempo de incubación previo a la lectura.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los títulos obtenidos mediante la cuantificación no guardan relación con la progresión de la enfermedad ni con la fase clínica de la enfermedad, ni sirven para evaluar la respuesta al tratamiento.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Baron EJ, Cassell GH, Eschenbach DA, Greenwood JR, Harvey SM, Madinger NE, Paterson EM, Waites KB 1993. Cumitech 17ª, Laboratory diagnosis of female genital tract infections. Baron EJ (coordinador). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
3. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 1-21.
4. Norris SJ, Pope V, Johnson RE, Larsen SA. *Treponema* and other human host-associated spirochetes. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-ITS-03
DETECCION CUALITATIVA DE *Chlamydia trachomatis* MEDIANTE INMUNOENSAYO

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección cualitativa de <i>Chlamydia trachomatis</i> mediante inmunoensayo	PNT-ITS-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir un método rápido para diagnosticar la infección por *Chlamydia trachomatis* mediante el Clearview Chlamydia MF (Unipath), una técnica rápida de inmunoensayo para la detección cualitativa directa de antígenos de *Chlamydia trachomatis*.

2. FUNDAMENTO

Chlamydia spp. es un patógeno intracelular que causa diferentes enfermedades en el hombre. *Chlamydia trachomatis* es en la actualidad la causa más frecuente de ITS en Estados Unidos. Si esta infección no se diagnostica o no se trata adecuadamente pueden aparecer infecciones crónicas y secuelas graves.

En el hombre puede ser responsable de cuadros de uretritis, epididimitis, proctitis y proctocolitis. En la mujer origina cervicitis, endometritis, proctitis y proctocolitis. La infección crónica del tracto genital femenino puede conllevar la aparición de diferentes patologías: enfermedad inflamatoria pélvica, salpingitis, embarazo ectópico, infertilidad, peritonitis y perihepatitis. Es importante recordar que el diagnóstico clínico de esta infección en la mujer no es fácil.

Esta prueba permite detectar antígeno de *Chlamydia* en la orina (varones) o en el exudado endocervical de pacientes infectadas por este microorganismo.

Los antígenos de *Chlamydia* se extraen con un reactivo de específico para este fin a partir de la muestra tomada con un hisopo o del sedimento de orina por calentamiento a 80°C. Una vez extraídos los antígenos, se añade este extracto sobre la tira absorbente en la ventana diseñada para poner la muestra. La tira absorbente contiene microesferas de color marcadas con anticuerpos monoclonales frente al lipopolisacárido género-específico de *Chlamydia*.

El extracto moviliza las microesferas que se desplazan hacia la cinta de prueba fijada en el soporte. Dicha cinta contiene una zona de anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia* inmovilizados en la ventana de resultados. En el caso de que el extracto contenga antígenos de *Chlamydia*, éstos se mezclarán con los anticuerpos unidos a las microesferas de color y los anticuerpos inmovilizados en la ventana de resultados. Se observará la aparición de una línea bajo la ventana de resultados que indica la presencia de antígenos de *Chlamydia* en el extracto. Si no hay antígenos presentes, la ventana de resultados permanecerá vacía.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

- El prospecto del equipo comercializado con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos del sistema Clearview, Chlamydia MF (Unipath).

4. MUESTRAS

Las muestras clínicas utilizadas son: exudado endocervical en la mujer y orina en el varón. La calidad de las muestras obtenidas es muy importante por lo que el exudado endocervical requiere que la técnica de recogida sea enérgica y minuciosa y que proporcione material celular y no sólo líquidos orgánicos.

Muestras endocervicales:

- Utilizar únicamente el equipo de toma de muestras de Clearview, Chlamydia para mujeres.

- Debe usarse primero una torunda para retirar el exceso de mucosidad exocervical que se desechará. La segunda torunda debe insertarse en el canal endocervical (lo que permite recoger células epiteliales columnares que constituyen el reservorio principal de estos microorganismos) y hacer girar firmemente la torunda entre 10-30 segundos. La torunda debe retirarse evitando su contaminación con células vaginales.

- Depositar esta torunda en el tubo de transporte y marcar con la identificación del paciente y la fecha. Las muestras pueden transportarse al laboratorio en condiciones ambientales. No deben utilizarse medios de transporte. Si la muestra no va a ser procesada en el plazo de 1 día desde su obtención, se debe conservar refrigerada (2-8°C) hasta un máximo de 5 días. No congelar.

Muestras de orina masculina:

- Al paciente se le debe advertir que no orine durante, al menos, una hora antes de realizar la toma de la muestra. Se deben tomar aproximadamente 20-30 ml de la porción inicial de la micción, en un recipiente limpio y seco.

- Si la muestra no va a ser procesada dentro de las 6 horas siguientes a su obtención, se habrá de conservar refrigerada entre 2-8°C hasta un máximo de 5 días. No congelar.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los suministrados por el fabricante:

- Reactivo de extracción
- Control positivo

Conservación y fechas de caducidad

La caja de reactivos se conservará a una temperatura entre 2-8°C. No se utilizarán los reactivos después de su fecha de caducidad y ningún material continuará usándose cuando se observen signos de su deterioro.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Fuente de calor de 80°C
- Equipo de recogida de muestras de Clearview Chlamydia para mujeres
- Envases de aluminio individuales (suministrados por el fabricante)

Servicio de Microbiología Hospital	Detección cualitativa de <i>Chlamydia trachomatis</i> mediante inmunoensayo	PNT-ITS-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

- Tubos de extracción (suministrados por el fabricante)
- Tubos de plástico de 30 ml para centrifugación con fondo en "V" para las muestras de orina masculinas

7. PROCEDIMIENTO

Todos los reactivos y muestras clínicas deben estar a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.

Procedimiento de extracción:

A) Muestras endocervicales:

- Añadir el reactivo 1 al tubo de extracción limpio, hasta la línea que figura en el mismo. Sumergir la torunda en el reactivo 1 y agitar al menos durante 5 segundos. Colocar el tubo de extracción que contiene la torunda en la fuente de calor a 80°C y dejar de 10 a 12 minutos.
- Retirar el tubo de extracción de la fuente de calor. Rotar la torunda en el tubo de extracción durante al menos 5 segundos. Escurrir el líquido de la torunda presionándola contra el borde del tubo de extracción, y posteriormente sacar la torunda con suavidad. Desechar la torunda. Dejar enfriar el extracto durante al menos 5 minutos a temperatura entre 18 y 30°C.
- El extracto puede conservarse a temperatura entre 18 y 30°C durante un máximo de 3 horas sin que ello afecte los resultados de la prueba.

B) Muestra de orina masculina:

- Mezclar por inversión la muestra de orina. Transferir 10 ml de la muestra de orina a un tubo de centrifugación y añadir 10 ml de agua destilada. Centrifugar la muestra a 3000xg durante 15 minutos. Recoger cuidadosamente el líquido sobrenadante y desechar. Mantener invertido el tubo y quitar los residuos de líquido sobrenadante del borde del tubo con papel secante.
- Con una pipeta, tomar 0,6 ml del reactivo de extracción en el tubo de centrifugación. Mezclar en "vortex" durante un tiempo mínimo de 30 segundos. Transferir el sedimento resuspendido a un tubo de extracción limpio. Colocar en la fuente de calor y calentar a 80°C durante 10-12 minutos.
- Retirar el tubo de extracción del calefactor. Dejar enfriar la muestra durante, al menos, 5 minutos a una temperatura entre 18 y 30°C.
- El extracto puede conservarse a temperatura entre 18 y 30°C durante un máximo de 3 horas sin que ello afecte los resultados de la prueba.

Realización de la prueba (para ambas muestras)

- Sacar el dispositivo de Clearview Chlamydia MF de su envase y colocar sobre una superficie plana. Tapar el tubo de extracción con el gotero adjunto y aplicar 5 gotas de extracto a la ventana de la muestra. Debe aparecer una línea en la ventana de control 15 minutos después de añadir el extracto, lo que indica que la prueba se ha realizado correctamente.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

- Se debe leer la prueba 15 minutos después de añadir el extracto a la ventana de la muestra.
- La aparición de una línea en la ventana de control transcurridos 15 minutos indica que la prueba ha

funcionado correctamente. En caso de que no aparezca línea alguna se deberá repetir la prueba utilizando una nueva unidad de Clearview Chlamydia MF. El extracto sobrante puede utilizarse para este propósito si lleva preparado menos de 3 horas. Alternativamente, se puede obtener una nueva muestra siguiendo el procedimiento de toma de muestras descrito anteriormente.

- El resultado positivo se indica con la aparición de una línea en la ventana de resultados transcurridos 15 minutos. Puede producirse una diferencia de intensidad entre las líneas de las ventanas de resultados y control, pero esto no afectará a la interpretación de los resultados.

-El resultado negativo se indica cuando no aparece línea alguna en la ventana de resultados transcurridos 15 minutos del tiempo de lectura.

Controles:

El sistema Clearview Chlamydia MF proporciona un sistema de control integral. La aparición de una línea en la ventana de control nos indica que la prueba se ha desarrollado correctamente y por tanto se pueden interpretar los resultados obtenidos.

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones de cada puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Pueden obtenerse resultados falsamente negativos cuando la muestra no se ha tomado bien o su conservación ha sido inadecuada.
- También se pueden obtener resultados falsamente negativos cuando la cantidad extraída del antígeno es inferior a la sensibilidad de la prueba.
- Los resultados de las pruebas en mujeres deben ser estables durante un tiempo máximo de 20 minutos tras aplicar el extracto a la ventana de la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba Clearview Chlamydia MF debe utilizarse exclusivamente para muestras endocervicales y muestras de orina masculinas. No está validada la realización de esta prueba con otros tipos de muestras.
- La prueba no diferencia entre entre microorganismos viables y no viables.
- Se recomienda la realización de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos de *Chlamydia* en la muestra si el resultado de la prueba Clearview Chlamydia MF es negativo y persisten los síntomas clínicos.

12. BIBLIOGRAFIA

Servicio de Microbiología Hospital	Detección cualitativa de <i>Chlamydia trachomatis</i> mediante inmunoensayo	PNT-ITS-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-ITS-04
CULTIVO DE *Neisseria gonorrhoeae*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el método de trabajo para el cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*.

Es un documento de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Neisseria gonorrhoeae es un diplococo gramnegativo específico de humanos y que se transmite fundamentalmente por vía sexual. En el hombre puede ser responsable de cuadros de uretritis, epididimitis, proctitis y proctocolitis. En la mujer origina cervicitis, endometritis, proctitis y proctocolitis. La infección crónica del tracto genital femenino puede conllevar la aparición de diferentes patologías: enfermedad inflamatoria pélvica, salpingitis, embarazo ectópico, infertilidad, peritonitis y perihepatitis. Además puede producir infección gonocócica diseminada (IGD) como artritis, meningitis y endocarditis, y también se pueden producir conjuntivitis o infección de piel.

El cultivo del gonococo se puede realizar:

- En medios no selectivos y no inhibitorios, como el agar chocolate enriquecido con un suplemento de vitaminas, aminoácidos y otros factores nutritivos.
- En medios selectivos que contienen antimicrobianos como el agar Thayer-Martin, Martin-Lewis o medio New York City. El agar Thayer-Martin modificado permite el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* a partir de muestras faríngeas, exudados genitales, y otras muestras que contengan microbiota mixta. Este medio está compuesto por GC medium (medio para gonococo) suplementado con sangre calentada, extracto de levadura, isovitalax y los antimicrobianos vancomicina, colistina, trimetoprim, y nistatina, para inhibir a bacterias grampositivas, gramnegativas (incluyendo casi todas las *Neisserias* saprofitas) y levaduras.

Las ventajas del cultivo frente a otros métodos de detección es su alta sensibilidad y especificidad, su bajo coste y su utilidad para diferentes tipos de muestras. El cultivo permite aislar el microorganismo para la realización de pruebas adicionales. Sus inconvenientes son la necesidad de un transporte adecuado para mantener la viabilidad del microorganismo y que requiere un mínimo de 24-72 horas para obtener el crecimiento del gonococo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. MUESTRAS

Las muestras clínicas utilizadas para cultivo son principalmente el exudado endocervical en la mujer y el uretral en el varón. También se cultivan exudados

faríngeo y anal, en su caso y muestras de sangre y líquido articular.

Muestras endocervicales: antes de obtener la muestra, se debe utilizar una esponja o torunda para eliminar todas las secreciones exocervicales. Posteriormente se debe insertar una segunda torunda 1-2 cm en el canal endocervical que se rotará contra la pared del mismo 2 o más veces (entre 10-30 segundos). La torunda se retirará sin tocar la superficie vaginal y se introducirá en un medio de transporte apropiado etiquetado con los datos del paciente.

Los exudados vaginales solamente se utilizarán para cultivo de gonococo en mujeres sometidas a histerectomía, en las que se realizará la toma en el fórnix posterior.

Muestras uretrales: preferiblemente se debe obtener la muestra antes de orinar. Se insertará la torunda en la uretra (1-2 cm en mujeres, 2-4 cm en hombres) y se rotará más de 2 veces.

Muestras anales: se insertará la torunda pasando el esfínter anal, girándola de lado a lado, dejar 10-30 segundos y extraer. Si está contaminada con heces descartar y repetir la toma con otra torunda.

Para muestras faríngeas y de zonas estériles se seguirán las normas de recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Torundas de plástico o alambre con la zona distal de rayón, dacrón o alginato cálcico con medio de transporte tipo Stuart-Amies.
- Las torundas de carbón pueden ser beneficiosas para neutralizar la toxicidad de la muestra pero el carbón puede interferir en la realización de la tinción de Gram por lo que habitualmente no se recomiendan.
- Medios de transporte comerciales tipo JEMBEC o Transgrow
- Placas con medio de cultivo sólido: agar chocolate enriquecido y agar Thayer-Martin (TM)/Martin-Lewis (ML)/New York City (NYC). Los antimicrobianos añadidos en cada medio son:
 - vancomicina: 3 mg/L (TM); 4 mg/L (ML); 2 mg/L (NYC)
 - colistina: 7,5 mg/L (TM); 5,5 mg/L (NYC)
 - trimetoprim lactato: 5 mg/L (TM); 3 mg/L (NYC)
 - nistatina: 13,5 mg/L (TM); anisomicina: 20 mg/L (ML); anfotericina B: 1,2 mg/L (NYC)
 - Reactivos de la tinción de Gram

Conservación y fechas de caducidad:

Los hisopos con medio de transporte se deben conservar en un lugar seco y oscuro a una temperatura entre 15-20°C. El almacenamiento prolongado, o en lugares calurosos, provoca la desecación del medio por evaporación del agua, con la consecuente pérdida de calidad.

No se deben utilizar hisopos que presenten una disminución excesiva del medio. No se utilizarán las torundas después de su fecha de caducidad o en las que se observen signos de deterioro.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

Las placas con medio se deben conservar en lugar oscuro y seco a 6-12°C. Evitar congelación y sobrecalentamiento. No abrir las bolsas que contienen las placas hasta que éstas se vayan a utilizar.

Se recomienda que las placas se atemperen antes de la inoculación con la muestra.

Controles de calidad

- Agar chocolate:

Color chocolate.

crecimientos obtenidos después de 24-48 horas de incubación a 35 ± 2°C en atmósfera enriquecida en CO₂.

Microorganismo	Crecimiento
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	Excelente
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Excelente
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 35056	Excelente

- Agar TM, ML y NYC:

Color chocolate.

Crecimientos obtenidos después de 24-72 horas de incubación a 35 ± 2°C en atmósfera enriquecida en CO₂.

Microorganismo	Crecimiento
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	Bueno a excelente
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Bueno a excelente
<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970	Bueno a excelente
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibido
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	Inhibido
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Inhibido

6. APARATOS Y MATERIAL

- Asas de siembra
- Estufa de CO₂ (35°C) o jarras de CO₂
- Portaobjetos para la tinción de Gram
- Mechero Bunsen o incinerador de asas
- Soporte para tinciones
- Reactivos de la tinción de Gram:
 - Cristal Violeta

- Lugol
- Alcohol-acetona al 50%
- Safranina

- Recipiente para lavar
- Cronómetro
- Tiras de Pathotec® Citocromo Oxidasa o similar

7. PROCEDIMIENTO

7.1. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS.

Se recogerán las muestras según las guías establecidas y con las torundas reseñadas anteriormente.

7.2. MANTENIMIENTO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.

Para mantener la viabilidad del gonococo durante el transporte es preferible inocular directamente en un medio selectivo y en otro no selectivo (si la muestra es de un sitio estéril) e incubar a 35°C con 5% CO₂.

Si se va a realizar el transporte a un laboratorio local es más crítico el enriquecimiento con CO₂ que la temperatura (el gonococo puede permanecer a temperatura ambiente en 5% de CO₂ hasta 5 horas sin pérdida de viabilidad y también permanece viable a temperatura de 4°C).

Si el transporte se va a realizar a un laboratorio remoto se enviará en un medio de transporte comercial (JEMBEC o Transgrow) previa incubación 18-24 horas antes del transporte. No se debe demorar el transporte más de 48 horas.

7.3. TINCIÓN DE GRAM DIRECTO DE LA MUESTRA.

Se debe realizar la tinción de Gram del exudado uretral. Se observa con el objetivo de x100 con aceite de inmersión durante al menos 2 minutos, buscando la presencia de leucocitos PMNs (núcleo rosa y citoplasma sin color). Generalmente se observarán >4-5 leucocitos PMNs por campo de inmersión. La realización de la tinción de Gram de la orina requiere la centrifugación de los 10 ml primeros de la micción y la observación del sedimento, en el que generalmente se observarán al menos 10 leucocitos PMNs por campo.

7.4. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS.

Después de 48-72 horas de incubación se observarán las colonias de color grisáceo a las que se aplicará la identificación presuntiva. Para diferenciar morfológicamente las distintas especies de *Neisseria* se subcultivarán las colonias en agar chocolate y se incubarán 24 h en atmósfera con 5% de CO₂ (Tabla 1).

Tabla 1. Diferenciación morfológica de las colonias de especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*

Especie	Tamaño	Pigmento	Lisa/ Rugosa	Consistencia	Comentario adicional
<i>M. catarrhalis</i>	G	No o G	L	Friable en "disco de goma"	Opaca, se puede tomar intacta de la superficie del agar
<i>N. gonorrhoeae</i>	P	B-G	-	Bordes lisos irregulares	Convexas, translúcidas, brillantes. Hasta 5 tipos diferentes por placa
<i>N. meningitidis</i>	M	G a B	L	Húmedas, mucoides (capsulares)	Tinte verdoso bajo la colonia
<i>N. cinerea</i>	P	B-G	-	Algo granular	Translúcida
<i>N. flavescens</i>	M	A	L	-	Opaca
<i>N. lactamica</i>	P	No/ A	L	-	Transparente
<i>N. mucosa</i>	G	B-G/Ap	-	Mucoide por la cápsula	Translúcida
<i>N. polysaccharea</i>	P	B-G/Ap	-	-	Translúcida, sobreelevada
<i>N. sicca</i>	G	No	R	Aspera y seca	Adherente
<i>N. subflava</i>	M	Av/A	L	-	Bordes enteros

Tamaño: G (Grande), M (Mediano), P (Pequeño); Pigmento: B-G (blanco- grisáceo), G (gris), B (Blanco), A (Amarillo), Ap (Amarillo pálido), Av (Amarillo verdoso).

Diferenciación de las colonias:

- *N. gonorrhoeae*: varían en diámetro desde 0,5 a 1 mm (cepas AHU, que requieren arginina, hipoxantina y uracilo, pueden tener 0,25 mm).
- *N. meningitidis*: miden 1-2 mm y son más planas que *N. gonorrhoeae*. Los serogrupos A y C pueden ser mucosas.
- *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. kochii* y *K. denitrificans*: colonias parecidas a *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.
- *N. catarrhalis* (color rosa), *N. subflava* (color amarillo), *N. sicca* y *N. mucosa*: miden 1-3 mm diámetro.
- *N. Catarrhalis*: colonias que resbalan por el agar con el asa ("colonias en "disco de goma")
- La pigmentación y opacidad es más pronunciada en agar sangre que en agar chocolate.

Temperatura de crecimiento: también es importante para la diferenciación de las distintas especies:

- Crecen a 35-37°C (*M. catarrhalis* crece bien a 28°C)
- Crecimiento a 22 °C en agar sangre o agar chocolate: no crece *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *N. cinerea*)
- Crecimiento a 42°C se utiliza para diferenciar especies de *Moraxella*
- Crecimiento en agar Mueller-Hinton a temperatura ambiente para ver pigmento marrón en especies de *Moraxella*

Patrones de crecimiento en medios sólidos (agar chocolate, agar Thayer-Martin o similar, agar nutritivo, agar McConkey). El cultivo se realizará mediante siembra por agotamiento en el medio correspondiente:

- Las cepas de *N. lactamica*, *K. denitrificans* y algunas de *N. subflava* *bv. perflava*, *N. cinerea*, *N.*

polysaccharea y *M. catarrhalis* crecen en los medios selectivos. El medio NYC permite el crecimiento de *Ureaplasma urealyticum*. Las cepas AHU de *N. gonorrhoeae* son sensibles a la vancomicina y no crecen en medios con este antibiótico (estas cepas son poco frecuentes), y también se pueden inhibir por el trimetropim (cepas todavía menos frecuentes).

- En agar nutritivo a 35°C crecen las cepas de *Neisseria* saprófitas, *M. catarrhalis* y *K. denitrificans*
- El agar McConkey se utiliza para diferenciar especies de *Moraxella*

- La identificación presuntiva se realiza observando la morfología de la colonia (color grisáceo), la tinción de Gram (diplococos gramnegativos), prueba de la oxidasa positiva (líquida o en tiras de papel) y la prueba de la catalasa positiva (peróxido de hidrógeno al 3%). *N. gonorrhoeae* da la prueba del superoxol, con peróxido de hidrógeno al 30%, fuertemente positiva (+++).

- La identificación definitiva se realiza con las pruebas de la identificación presuntiva y con una o más técnicas que demuestren los patrones de utilización de carbohidratos (por ejemplo, el sistema APINH) y las características inmunológicas o perfiles enzimáticos de los microorganismos. Preferiblemente se deben utilizar dos métodos distintos para la identificación (utilización de carbohidratos e inmunológico). Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos también tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Las placas de cultivo se deben leer a las 48-72 horas de incubación. La presencia de colonias sospechosas con las pruebas de identificación presuntiva y posteriormente definitivas indican la presencia de gonococo en las muestras.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

- Tinción de Gram del exudado: se debe notificar la presencia del número de leucocitos PMNs por campo de inmersión y si hay o no diplococos gramnegativos intracelulares.

- Identificación presuntiva: se debe notificar el crecimiento de un microorganismo compatible con *Neisseria gonorrhoeae* pendiente de identificación definitiva

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones de cada puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Pueden obtenerse resultados falsamente negativos cuando la muestra no se ha tomado bien o su conservación ha sido inadecuada.

- Las torundas de algodón son inhibitorias para el gonococo.

- Las placas deben incubarse en atmósfera de aproximadamente un 5% de CO₂ en un ambiente saturado de humedad.

- El nivel de recuperación del gonococo en medios de transporte sin nutrientes a temperatura ambiente es del 100% a las 12 horas y de más del 90% a las 24 horas.

- Es preferible utilizar dos torundas, una para cultivo y otra para exámen microscópico (en su defecto puede inocularse un porta con el exudado directamente en la consulta).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La tinción de Gram del exudado es rápida y tan sensible como el cultivo en uretritis sintomática en hombres, pero es poco sensible en otras localizaciones.

- Entre un 3-10% de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* se inhiben a una concentración de 3 mg/L de vancomicina y también algunas son sensibles al trimetoprim, aunque actualmente estas cepas son muy poco frecuentes.

- Debe realizarse una identificación utilizando dos métodos diferentes, por ejemplo, uno bioquímico como el sistema APINH y otro inmunológico, debido a que algunos aislados son prolina iminopeptidasa negativos y pueden dar códigos de identificación erróneos.

- Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos pueden dar falsos positivos al dar reacciones cruzadas con otras especies de *Neisseria*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.

2. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria*

gonorrhoeae infections--2002. MMWR 2002; 51(RR-15):1-38.

3. Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. Clin Microbiol Rev. 1988; 1:415-431.

4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

5. Sarafian SK, Knapp JS. Molecular epidemiology of gonorrhoea. Clin Microbiol Rev. 1989; 2 (Suppl):S49-S55.

**PNT-ITS-05
CULTIVO Y SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE MICOPLASMAS GENITALES
MEDIANTE EL SISTEMA COMERCIAL Mycoplasma IST 2**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo y sensibilidad a los antimicrobianos de micoplasmas genitales mediante el sistema comercial Mycoplasma IST 2	PNT-ITS-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo del documento es describir un método para realizar el cultivo, el recuento semicuantitativo, la identificación y la sensibilidad a los antimicrobianos de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* de origen urogenital que utiliza el sistema comercial Mycoplasma IST 2 (bioMerieux).

Es un documento de consulta para el personal de laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

Los micoplasmas se caracterizan por su pequeño tamaño y su pequeño genoma. Esto condiciona su limitada capacidad biosintética, por lo que carecen de pared celular y requieren esteroides en el medio para su crecimiento. La ausencia de pared condiciona su labilidad ambiental, y su resistencia intrínseca a los beta-lactámicos. Pueden crecer en medios acelulares, pero estos deben aportar los elementos indispensables para su metabolismo. Debido a sus especiales requerimientos, el transporte y cultivo deben realizarse en medios específicos. El sistema Mycoplasma IST 2 contiene un caldo selectivo y una galería con substratos específicos (urea, arginina, distintas concentraciones de antibióticos y un indicador de pH) y permite determinar la presencia de *Ureaplasma urealyticum* y de *Mycoplasma hominis*, aproximar su concentración, y estudiar la sensibilidad frente a nueve antibióticos. La distribución de las 22 cúpulas de la galería es la siguiente:

- 1.- Es el indicador de crecimiento.
- 2.- Contiene lincomicina. Selectiva para *U. urealyticum*.
- 3.- Contiene eritromicina. Selectiva para *M. hominis*.
- 4 y 5.- Efecto dilución. Permiten el recuento ($\geq 10^4$ ucc/ml)
- 6 a 22.- Ensayan la sensibilidad a 9 antibióticos: doxiciclina, josamicina, ofloxacino, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, claritromicina y pristinamicina.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- El procedimiento Operativo de Mantenimiento de Equipos.
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos
- El prospecto del equipo comercializado con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos.

4. MUESTRAS

- Las condiciones de la muestra están descritas en el procedimiento "Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003".

- Efectuar la toma de la muestra antes de la administración de antibióticos.
- La prueba se realiza sobre muestras uretrales, vaginales y semen. Es importante que las muestras procedentes de mucosas contengan células.
- Aunque carente de validación por parte del fabricante, en muchos laboratorios se ensayan también muestras de orina.
- Preferiblemente y lo antes posible después de la toma, se debe dispensar la muestra en el vial R1 del equipo para remitir al laboratorio este vial ya inoculado. Si ello no fuera posible, la inoculación del vial R1 se realizará en el laboratorio.
- En el caso de muestras en torundas, resuspender el contenido en el vial R1.
- En el caso de muestras líquidas se transferirán 200 µl con pipeta al vial R1.
- En el caso de semen, realizar una predilución al 1/10 en suero fisiológico antes de inocular.
- En el vial R1 los micoplasmas permanecen viables 5 horas a temperatura ambiente y 48 horas refrigerados a 2- 8°C.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Equipo de reactivos proporcionados por el fabricante. Contiene:
 - 25 viales R1 con caldo para el transporte y almacenamiento
 - 25 viales R2 con liofilizado de caldo urea-arginina para el cultivo.
 - 25 galerías con cúpulas para identificación y para la sensibilidad a los antimicrobianos de los micoplasmas.
- Aceite de parafina

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa bacteriológica de 35°C
- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta.

7. PROCEDIMIENTO

1. Después de la toma de la muestra, desprender el contenido de la torunda o la muestra líquida (200 µl) en el vial R1. Si esto no se ha realizado en la consulta y en el laboratorio se recibe la muestra, se procederá a la inoculación en el laboratorio de forma inmediata.
2. Homogeneizar.
3. Transferir 3 ml de R1 al vial R2 (caldo urea-arginina).
4. Homogeneizar con vortex hasta conseguir que el liofilizado de R2 se disuelva completamente.
5. Dispensar 55 µl del caldo R2 en las cúpulas de la galería (R3). En el vial R2 quedará caldo urea-arginina sobrante que se incubará.
6. Añadir dos gotas de aceite de parafina a cada cúpula de la galería.
7. Colocar la tapa de la galería.
8. Incubar el resto del caldo urea-arginina y la galería durante 48 horas a 36°C ± 2°C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo y sensibilidad a los antimicrobianos de micoplasmas genitales mediante el sistema comercial Mycoplasma IST 2	PNT-ITS-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

Controles

- La cepa recomendada para el control de calidad es *Ureaplasma urealyticum* ATCC 27813.
- Realizar dos subcultivos en el caldo R2 urea-arginina con incubación intermedia antes de inocular la galería con 15-30 µl de R2.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS Ver la figura 2 del documento científico

- Caldo R2 urea-arginina: leer a las 24 horas. Si es negativo, reincubar 24 horas más.

Color amarillo: resultado negativo

Color rojo: resultado positivo.

Si el caldo permanece limpio : *Ureaplasma urealyticum*

Si el caldo muestra opalescencia: *Mycoplasma hominis*.

- Galería:

A las 24 horas: leer solamente la cúpula 4 (*U. urealyticum* $\geq 10^4$ ucc/ml)

- Resultado positivo (color rojo) indica *U. urealyticum* en recuento $\geq 10^4$ ucc/ml.

- Resultado negativo (color amarillo). Indicaría que en el caso de que la galería fuese a las 48 horas positiva para *U. urealyticum*, el recuento sería $\leq 10^4$ ucc/ml.

Leer a las 48 horas el resto de cúpulas. El cambio de color de naranja a rojo, significa crecimiento.

- La cúpula 1 debe virar si algún resultado es positivo.

- Cambios de color en las cúpulas 2 y 4, indican presencia de *U. urealyticum*, en recuento superior o inferior a 10^4 ucc/ml en función del crecimiento en la cuarta cúpula en la lectura de 24 horas.

- Las cúpulas 3 y 5 se interpretan de igual modo pero para *Mycoplasma hominis*. La cúpula del recuento, se lee a las 48 horas exclusivamente.

- Cada antibiótico esta depositado a dos concentraciones críticas distintas en dos pocillos. Crecimiento en los dos indica resistencia. Ausencia de crecimiento en los dos indica sensibilidad. Crecimiento en el de concentración más baja y ausencia de crecimiento en el de concentración más elevada, se interpreta como un resultado intermedio.

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones de cada puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- La cúpula 1 debe virar si algún resultado es positivo. Si el resultado es negativo, no se debe proceder a la lectura del resto de cúpulas.

- Si se siembran muestras de semen sin prediluir, se obtienen resultados positivos inespecíficos (todas las cúpulas positivas). Realizar siempre la predilución 1/10 en suero fisiológico recomendada por el fabricante.

- Es posible observar cambio de color indicativo de crecimiento en el caldo R2 urea-arginina y ausencia de crecimiento en la galería. Esto se explicaría por un inóculo muy pequeño incapaz de producir cambio de pH en las cúpulas.

- Las cúpulas de la galería no identificadas, no contienen substrato, y por consiguiente nunca deben ser valoradas.

- Resultado esperable del control de calidad con la cepa *Ureaplasma urealyticum* ATCC 27813: debe obtenerse resultado positivo para *U. urealyticum*, negativo para *M. hominis*, y resultado intermedio en la sensibilidad a ofloxacino. En el caso de ciprofloxacino se obtendrá crecimiento a la concentración menor (1 mg/L) y crecimiento variable en la concentración mayor (2 mg/L).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Tanto *M. hominis* como *U. urealyticum* se encuentran en las mucosas del tracto genital de individuos sanos. El significado clínico de su aislamiento desde muestras procedentes de estas mucosas puede ser en ocasiones problemático. Como regla general, los recuentos elevados se asocian con mayor probabilidad a situaciones patológicas. En el caso de uretritis en varones, si los recuentos son inferiores a 10^4 ucc/ml es poco probable que tengan significación clínica. Los aislamientos que procedan de localizaciones estériles tienen siempre significación clínica.

- Nunca se debe considerar un resultado negativo antes de 48 horas de incubación.

- El recuento proporcionado por esta prueba es solamente indicativo. La determinación exacta precisa subcultivos en agar.

- El ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos se realiza sin ajustar el inóculo bacteriano, por lo que existe un efecto inóculo, más pronunciado en el caso de la tetraciclina y la doxiciclina. Con inóculos bajos puede haber falsas sensibilidades.

- Si el resultado de las cúpulas de identificación es positivo tanto para *U. urealyticum* como para *M. hominis*, no se deben valorar los resultados de las cúpulas de sensibilidad.

- En el caso que se obtuviese crecimiento en la cúpula con mayor concentración de un antibiótico, y ausencia de crecimiento en la cúpula con menor concentración del mismo antibiótico, el resultado carece de sentido y el ensayo debe repetirse.

- El sistema Mycoplasma IST comparado con la microdilución en caldo, se correlaciona bien para las

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo y sensibilidad a los antimicrobianos de micoplasmas genitales mediante el sistema comercial Mycoplasma IST 2	PNT-ITS-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

tetraciclinas, pero peor para el resto de antimicrobianos. El inóculo tiene una gran influencia sobre el resultado, por lo que cuando se realizan las pruebas de sensibilidad utilizando como inóculo la propia muestra, los errores son importantes, obteniéndose valores de CMI dos o más diluciones superiores.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Instrucciones técnicas del fabricante. Mycoplasma IST
2. BioMerieux. Marcy-l'Etoile. Francia.
2. Waites BK, Rikihisa Y, Taylor-Robinson D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección del ADN del virus del papiloma humano (VPH) mediante captura de híbridos	PNT-ITS-06	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

La presencia de ciertos tipos del virus del papiloma humano (VPH) en el aparato genital femenino se asocia a varias enfermedades como condiloma, papulosis bowenoide, neoplasia intraepitelial cervical, vaginal y vulvar, además de adenocarcinoma. En general, se acepta que el VPH se transmite por contacto sexual y que los tipos de VPH de alto riesgo son un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de cáncer cervicouterino.

Como infección de transmisión sexual, la expresión clínica más común de la infección por HPV es el condiloma acuminado y en este contexto, el diagnóstico es fundamentalmente clínico. Sin embargo, en ciertos tipos de pacientes (mujeres mayores o colectivos determinados), así como en las infecciones subclínicas (lesiones blanquecinas tras la aplicación de ácido acético) y/o mujeres con verrugas genitales externas, podría estar indicada la investigación del ADN de VPH en muestras cervicales. Bajo estas consideraciones se redacta este procedimiento.

2. FUNDAMENTO

La investigación del ADN del VPH se realiza mediante un ensayo de captura de anticuerpos con hibridación y amplificación de la señal, y posterior detección por quimioluminiscencia en microplaca. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda específica de ARN del VPH. Los híbridos ADN-ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca recubiertos con anticuerpos específicos para los híbridos ADN-ARN. Los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina y se detectan con un sustrato quimioluminiscente. La luz emitida por el sustrato sensible a la enzima se mide en unidades relativas de luz (RLU) y se detectan en un luminómetro. La intensidad de luz emitida indica la presencia o ausencia de ADN diana en la muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología (PNT-RTP-01) SEIMC 2003.
- Manual de instrucciones del equipo comercial Test Hybrid Capture 2 (hc2) para la detección del ADN del HPV suministrado por el fabricante (Digene Corporation USA).
- Normas de bioseguridad.
- Gestión de residuos.

4. MUESTRAS

El equipo está diseñado y aprobado para el estudio de muestras o biopsias cervicouterinas. Las muestras cervicouterinas se recogerán y transportarán utilizando el cepillo cervical DNAPap o el cepillo cervical HC (ambos con escobillón cervical y medio de transporte de muestras). Si se va a

realizar una exploración por colposcopia, las muestras deben recogerse antes de la aplicación del ácido acético o el yodo. Las muestras pueden conservarse un máximo de dos semanas a temperatura ambiente. En el laboratorio las muestras deben conservarse a 2-8°C si el ensayo va a realizarse en una semana. Cuando esa circunstancia no sea posible pueden conservarse a -20°C durante 3 meses.

Pueden procesarse biopsias de 2-5 mm de diámetro recién recogidas y añadidas a un medio de transporte. Se pueden enviar por transporte urgente a 2-30°C y conservarse a -20°C hasta el momento de analizarlas.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los suministrados por el fabricante:

- Cepillo cervical HC o DNAPap.
- Equipo HC2 HPV Digene (ref. 5196-1330).

6. APARATOS Y MATERIAL

Equipos y accesorios de uso general:

- Baño a 65 ± 2 °C
- Microcentrífuga.
- Micropipetas de canal único con ajuste variable 20-200 µl y 200-1000 µl.
- Pipeta de repetición con desplazamiento positivo.
- Pipeta de 8 canales con ajuste variable 25-200 µl.
- Puntas de pipetas desechables (25 y 500 µl).
- Puntas de pipetas con filtro desechables (20-200 µl y 200-1000 µl).
- Puntas de pipeta desechables para pipeta de repetición (25 y 500 µl).
- Microplaca con fondo en U.
- Parafilm® o equivalente
- Guantes sin talco.

Equipos y accesorios del sistema:

- Luminómetro de microplacas Digene 2000.
- Agitador rotatorio I del sistema Hybrid Capture.
- Incubador de placas I del sistema Hybrid Capture.
- Lavador automático de placas I del sistema Hybrid Capture.

7. PROCEDIMIENTO

Preparación de reactivos

1. Añadir 5 gotas de colorante ("dye") a la botella del reactivo de desnaturalización y agitar vigorosamente (estable 3 meses a temperatura ambiente).

2. Diluir las sondas A y B utilizando material estéril y rotular previamente con arreglo al siguiente cuadro:

N° tiras	Diluyente (ml)	Sonda (µl)
1	0,292	11,7
2	0,583	23,3
3	0,875	35,0
6	1,750	70,0
9	2,600	105,0
12	3,500	140,0

3. Solución de lavado: diluir 100 ml de solución de lavado concentrada en 2,9 litros de agua destilada. Para evitar posibles contaminaciones reconstituir 50 ml de solución de lavado. Se lavará previamente el envase con agua destilada y la cánula primero con lejía diluida y luego con agua destilada.

4. Los reactivos de detección 1 y 2 están listos para usar. No devolver el líquido sobrante al vial. Se prepararan en el contenedor 700 µl por tira.

Protocolo del ensayo

1. Desnaturalización.

a. Agitar las muestras en vortex y preparar la gradilla de tubos según el siguiente esquema de trabajo:

	Muestra (µl)	Desnatar (µl)
Control positivo A (CAL LOW)	200	100
Control positivo B (CAL LOW)	200	100
Control negativo (2 tubos)	200	100
Control de calidad bajo (QC LOW)	130	65
Control de calidad alto (QC HIGH)	130	65
Muestras	130	65

b. Colocar en baño a 65°C durante 45 minutos.

2. Hibridación.

a. Repartir en un placa con fondo en U para la sonda A: 3 controles negativos, 3 controles positivos, 1 QC LOW, 1 QC HIGH y las muestras. Repetir el esquema para la sonda B.

b. Dispensar 25 µl de sonda A y B

c. Añadir 75 µl de muestras y controles desnaturalizados según la tabla previa

d. Sellar con hoja adhesiva y colocar en el agitador rotatorio 3 minutos. Comprobar que vira a amarillo (si no es así añadir unas gotas de la sonda correspondiente).

e. Incubar a 65°C durante 1 hora.

3. Captura de híbridos.

a. Transferir el contenido de los pocillos a la microplaca de captura con una pipeta multicanal.

b. Sellar con hoja autoadhesiva.

c. Incubar en agitación rotatoria (1.100 rpm) durante 1 hora.

4. Revelado.

a. Añadir 75 µl de reactivo de detección 1 (rosa) con pipeta multicanal.

b. Sellar con hoja autoadhesiva.

c. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

d. Desechar el contenido con pipeta multicanal y sacudir firmemente la placa invertida sobre papel de filtro hasta que no quede líquido en los pocillos.

e. Lavar 6 veces pocillo a pocillo con solución de lavado.

f. Cambiar de guantes al terminar de lavar

g. Sacudir firmemente la placa invertida sobre papel de filtro hasta que no quede líquido en los pocillos.

h. Dejar reposar la placa invertida durante 5 minutos.

i. Añadir 75 µl de reactivo de detección 2 (amarillo) y cubrir.

j. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos (en ningún caso después de 30 minutos).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Lectura de resultados:

1. Leer la microplaca en el luminómetro de microplacas DML 2000. El protocolo de software específico permite introducir la información del ensayo directamente.

Expresión de resultados:

1. Todos los valores de RLU de las muestras deben convertirse en un cociente del valor de corte correspondiente. Los valores de RLU/CO y los resultados positivos/negativos de todas las muestras se incluyen en el informe de análisis del DML 2000.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección del ADN del virus del papiloma humano (VPH) mediante captura de híbridos	PNT-ITS-06	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Interpretación de los resultados:

1. Un valor de corte de 1 pg/ml en el test equivale a 100.000 copias de VPH /ml o 5.000 copias de VPH por ensayo.
2. Las muestras con cocientes RLU/CO $\geq 1,0$ con la sonda de bajo riesgo se consideran "positivas" para uno o más de los tipos 6, 11,42,43 ó 44 de VPH.
3. Las muestras con cocientes RLU/CO $\geq 1,0$ con la sonda de alto riesgo se consideran "positivas" para uno o más de los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ó 68 de VPH.
4. Si el cociente RLU/CO de una muestra está próximo pero es inferior a 1,0 y existe sospecha de una infección por VPH de alto riesgo, se debe considerar el uso de otros métodos de ensayo o repetir el test para esa muestra.
5. La muestras con cocientes RLU/CO $\leq 1,0$ con las dos sondas de alto o bajo riesgo, se consideran "negativas" o "sin ADN del VPH detectable" para los 18 tipos de VPH evaluados. No hay ADN de VPH en la muestra o bien, los niveles de ADN de VPH son inferiores al límite de detección del ensayo.

Control de calidad:

1. El equipo incluye muestras de control de calidad.
2. Introducir los números de lote y fechas del caducidad de los controles en el DML 2000.
3. Los controles deben incluirse en cada prueba y el valor RLU/CO de cada control debe estar dentro de los rangos aceptables para que se considere válido, si no fuera así el ensayo se debe repetir.
4. No se deben comunicar los resultados si la prueba no ha resultado válida.

9. RESPONSABILIDADES

Las descritas en el manual general de organización del laboratorio y en las descripciones del puesto de trabajo.

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado y con entrenamiento específico.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El resto de muestra no utilizado se debe conservar sin desnaturalizar a -20°C para posibles repeticiones u otras pruebas alternativas o complementarias.

El cepillo cervical DNAPap o HC no debe utilizarse para recoger muestras en gestantes.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prevalencia de infección por VPH en una población puede afectar a la eficacia. El valor predictivo positivo disminuye cuando se estudian poblaciones con baja prevalencia o bajo riesgo de infección.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección, niveles muy bajos de infección o errores en la toma de muestra pueden originar un falso negativo.

Si existen altas concentraciones de crema antimicótica, gel anticonceptivo u otros productos de higiene vaginal en el momento de recoger la muestra, existe la posibilidad de falsos negativos si los valores del cociente RLU/CO estuvieran cerca del punto de corte de la prueba.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Arbyn M, Paraskeva E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: Triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005; 99:7-11.
2. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32:43-51.
3. Sra KK, Torres G, Rady P, T. Hughes K, Payne DA, Tying SK. Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:749-765.