

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



24^a.

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

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Fernando Vázquez Valdés

Autores

Juan Carlos Galán Montemayor
José Antonio Lepe Jiménez
Luis Otero Guerra
Judit Serra Pladevall
Fernando Vázquez Valdés



ISBN: 978-84-09-07783-0

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Galán Montemayor JC, Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Serra Pladevall J, Vázquez Valdés F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 2018. 24a. Vázquez Valdés F (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2018

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

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

Coordinador:

Fernando Vázquez Valdés^{1,2}

Autores:

Juan Carlos Galán Montemayor³

José Antonio Lepe Jiménez⁴

Luis Otero Guerra^{2,5}

Judit Serra Pladevall^{2,6}

Fernando Vázquez Valdés^{1,2}



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias; Área de Microbiología, Facultad de Medicina; Instituto Universitario Fernández Vega (IUFV) y Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO) e Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo.

² Grupo de Estudio de Infecciones de Transmisión Sexual (GEITS) de la SEIMC

³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Madrid.

⁴Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

⁵Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo.

⁶Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron; Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR); Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Abreviaturas usadas en este documento:

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
CDC: *Center for Disease Control and Prevention*
CE: Mercado Unión Europea
CLIA: Quimioluminiscencia
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMV: Citomegalovirus
CT: *Chlamydia trachomatis*
E: Especificidad
ECDC: *European Center for Diseases Prevention and Control*
EDO: Enfermedad de declaración obligatoria
EIA: Enzimoimmunoensayo
EPI: Enfermedad Pélvica Inflamatoria
FDA: Food and Drug Administration
GV: *Gardnerella vaginalis*
HD: *Haemophilus ducreyi*
HSH: Hombres que tienen relaciones sexuales con hombres
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
ITS: Infecciones de transmisión sexual
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LGV: Linfogranuloma venéreo
LOS: Lipooligosacáridos
MALDI-TOF: *Matrix-assisted laser desorption/ Ionization –Time of Flight –Mass Spectrometry*
MG: *Mycoplasma genitalium*
MH: *Mycoplasma hominis*
mL: Mililitro
Mab: Monoclonal antibody
MAMEF: Tecnología *microwave accelerated metal enhanced fluorescence*
NG: *Neisseria gonorrhoeae*
NGS: *Next generation sequencing*
NM: *Neisseria meningitidis*
OMP: Proteína de membrana externa
OMS: Organización Mundial de la Salud
PMN: Leucocitos polimorfonucleares
POCT: *Point-of-care-test*
RPR: *Rapid plasma reagin*
S: Sensibilidad
SPS: Polianetolsulfonato de sodio
TA: Temperatura ambiente
TAAN: Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
TP: *Treponema pallidum*
TPHA: *Treponemal pallidum hemagglutination assay*
FTA: *Fluorescent treponemal assay*
TK: Timidin-kinasa
TV: *Trichomonas vaginalis*
UNG: Uretritis no gonocócica
UNGNC: Uretritis no producidas ni por CT ni por NG

UP: *Ureaplasma parvum*
UU: *Ureaplasma urealyticum*
VA: Vaginitis aerobia
VB: Vaginosis bacteriana
VDRL: *Venereal disease research laboratory*
VEB: Virus Epstein-Barr
VHA: Virus de la hepatitis A
VHB: Virus de la hepatitis B
VHC: Virus de la hepatitis C
VHS: Virus del herpes simple
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH: Virus del papiloma humano
VVZ: Virus varicela zoster

Procedimientos de Microbiología de la SEIMC relacionados con este documento:

- 1. Recogida, transporte y conservación de las muestras
- 1a. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras
- 1b. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología
- 2. Serología de las hepatitis víricas
- 2a. Serología de las hepatitis víricas
- 6. Diagnóstico microbiológico de la infección por VIH
- 6a. Diagnóstico microbiológico de la infección por VIH
- 6b. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH
- 8. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus
- 8a. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus
- 13. Microbiología de la infección perinatal
- 24. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales (PNT-ITS-3; PNT-ITS-5, PNT-ITS-6)
- 40. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp.
- 44. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas
- 50. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas
- 54. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio
- 57. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano
- 59. Microbiota

Documentos de Consenso:

Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes (marzo 2017). Grupo de expertos del Grupo de Estudio de SIDA de la SEIMC (GESIDA), Secretaría del Plan Nacional sobre el SIDA (SPNS), Grupo de Estudio de ITS de la SEIMC (GEITS), Grupo Español para la Investigación de las Enfermedades de Transmisión Sexual de la Academia Española de Dermatología y Venerología y de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Ministerio de Sanidad, servicios sociales e igualdad. <https://www.seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/geits/pcientifica/documentos/geits-dc-ITS-201703.pdf>

SEIMC:

- Guía de recomendaciones para el diagnóstico precoz del VIH en el ámbito sanitario
- Documento de consenso sobre las infecciones de transmisión sexual en personas infectadas por el VIH (septiembre 2010)
- Infecciones de transmisión sexual

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	7
	1.1. Epidemiología.....	7
	1.2. Consideraciones clínicas y síndromes.....	8
2.	Recogida de las muestras.....	10
	2.1. Aspectos generales.....	10
	2.2. Medios de transporte y recogida de las muestras.....	10
	2.3. Tipos de muestras.....	10
3.	Transporte y conservación de las muestras.....	13
4.	Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología.....	14
5.	Procesamiento de las muestras.....	14
	5.1. Inoculación.....	14
	5.2. Pruebas rápidas para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual (ITS).....	15
	5.3. Procedimientos específicos de detección de los patógenos causales de las ITS.....	19
	5.3.1. Microbiota vaginal.....	19
	5.3.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19
	5.3.3. <i>Chlamydia trachomatis</i>	21
	5.3.4. Micoplasmas genitales.....	23
	5.3.5. Sífilis (<i>Treponema pallidum</i>).....	24
	5.3.6. Donovanosis.....	31
	5.3.7. Chancroide.....	31
	5.3.8. Herpes genital.....	32
	5.3.9. Linfogranuloma venéreo.....	34
	5.3.10. Vaginosis bacteriana y vaginitis aerobia.....	34
	5.3.11. Candidiasis genital.....	36
	5.3.12. Tricomoniasis.....	37
	5.3.13. Papilomavirus humanos (verrugas genitales) (VPH).....	38
	5.3.14. Proctocolitis por patógenos entéricos.....	39
	5.3.15. Proctocolitis por protozoos.....	39
	5.3.16. Otros patógenos y cuadros clínicos.....	39
	5.3.17. ITS en niños.....	41
6.	Interpretación e información de los resultados.....	41
7.	Test de curación de las ITS.....	45
8.	Bibliografía.....	45
9.	Anexos:	
	Anexo I. Aproximación diagnóstica (algoritmos etiológicos) al paciente con ITS y otras infecciones genitales	47
	Anexo II. Evidencias científicas del diagnóstico de las ITS.....	61
	Anexo III. Consejo para realizar una prueba diagnóstica en las ITS según tipo de población...68	

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-ITS-01. RPR (*Rapid Plasma Reagin*) para diagnóstico de la infección por *Treponema pallidum*
PNT-ITS-02. TPHA. Hemaglutinación para diagnóstico de la infección por *Treponema pallidum*
PNT-ITS-03a. Detección molecular de *Chlamydia trachomatis*, genotipo de linfogranuloma venéreo y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real
PNT-ITS-04. Cultivo y métodos de sensibilidad para *Neisseria gonorrhoeae*
PNT-ITS-07. Detección molecular del VHS en muestras anogenitales

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un problema de Salud Pública a nivel mundial tanto en términos de morbilidad como mortalidad, debido a las complicaciones y secuelas que pueden producir si no se diagnostican y se tratan rápida y correctamente. Tanto es así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una estrategia global para la reducción de las ITS entre 2016 y 2021.

Existen más de 30 bacterias, virus y parásitos que se transmiten por contacto sexual. Ocho de estos patógenos son los principales agentes etiológicos de ITS. De estos ocho, cuatro causan infecciones curables [sífilis, gonorrea, infección por *Chlamydia trachomatis* (CT) y tricomoniasis] y cuatro infecciones virales incurables [hepatitis B, virus del herpes simple (VHS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del papiloma humano (VPH)].

En este documento se tratarán las principales ITS, así como otras infecciones genitales que estrictamente no se transmiten por contacto sexual pero que se procesan de la misma forma. También se incluyen ITS tratadas con más profundidad en otros documentos (hepatitis, VIH, virus Zika) así como patógenos entéricos y protozoos intestinales que también pueden ser transmitidos por contacto sexual.

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Según la OMS, se calcula que cada año se producen en el mundo 357 millones de nuevas ITS, siendo las tres principales la infección por CT, *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Treponema pallidum* (TP).

La infección por CT es la principal ITS bacteriana a nivel mundial y en continuo aumento año tras año. La OMS estimó, en 2012, alrededor de 131 millones de nuevas infecciones por año en el mundo. En Europa las cifras son de 187 casos por 100.000 habitantes. Sin embargo, esas cifras son probablemente inferiores a las reales, ya que la mayoría de las infecciones por CT son asintomáticas. El patrón epidemiológico para la infección urogenital no invasiva está mayoritariamente asociado a jóvenes heterosexuales de edades comprendidas entre 20 y 24 años.

Los casos de linfogranuloma venéreo (LGV) han estado, tradicionalmente, asociados a áreas tropicales. Sin embargo, desde 2003, la epidemiología de

esta infección ha cambiado, alcanzando una distribución más amplia. Las tasas de infección por los serovares invasivos de CT son poco orientativas, pero están en continuo aumento. En algunas series alcanzan hasta el 10% de las infecciones por CT, pero en otros casos su detección es anecdótica. Esta disparidad es consecuencia por un lado de la escasa implementación de los sistemas de genotipado para la detección de los serovares L1-L3 (infradiagnóstico), y por otro lado al cribado sistemático en poblaciones con prácticas sexuales de alto riesgo en centros especializados (sobreestimación), ya que el patrón epidemiológico de dicha infección son hombres que tienen sexo con hombres (HSH), de entre 35 y 44 años y fuertemente asociado a la infección por el VIH.

La infección gonocócica es la segunda ITS de etiología bacteriana más prevalente, después de la infección por CT. Según datos del *European Center for Diseases Prevention and Control* (ECDC), en 2014 se notificaron 66.413 nuevos casos de infección por NG en 27 países europeos, lo que representa una tasa de 20 casos por 100.000 habitantes y un incremento del 53% respecto el año 2008. El grupo de edad entre 15 y 24 años fue el que presentó mayor prevalencia. Los casos diagnosticados en HSH representaron el 65% de todos los casos detectados en hombres. En España, según los datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en 2013 se declararon 3.315 casos de gonococia, que representa una incidencia de 7,12 casos por 100.000 habitantes, con un incremento continuo desde el año 2008.

Las infecciones por TP en España han experimentado según datos de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO), un incremento desde el año 2000, si bien a partir de 2011 las cifras se han estabilizado. En 2015 se declararon 3.693 casos con una tasa 7,96 casos por 100.000 habitantes. El principal grupo afectado es el de HSH.

Además, el herpes genital es la primera causa de úlceras genitales y se calcula que más de 500 millones de personas viven infectadas por este virus. El VPH se estima que produce 290 millones de infecciones diagnosticadas por presencia de ADN viral, 27 millones de condilomas genitales, 27 millones de lesiones de bajo grado y 1,5 millones de lesiones de alto grado. Este virus es también el causante del cáncer cervical, que es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres. En 2008, se estimaron 529.000 nuevos

casos de cáncer cervical a nivel mundial.

Otros agentes etiológicos de ITS menos frecuentes son *Mycoplasma genitalium* (MG), que se encuentra en el 10-35% de las uretritis no producidas ni por CT ni por NG (UNGNC) en varones. *Ureaplasma urealyticum* (UU) es causa del 5-10% de las uretritis no gonocócicas (UNG) agudas, pero no es necesariamente patógeno en todos los casos en los que se detecta.

La donovanosis, producida por *Klebsiella granulomatis*, se considera una ITS tropical con casos esporádicos y es endémica en India, Papúa-Nueva Guinea, Sudamérica, Vietnam, Australia y el sur de África.

La epidemiología de la infección por *Haemophilus ducreyi* (HD) es pobremente entendida y no se incluye en las ITS curables según la OMS. Actualmente además de úlceras genitales, es una causa frecuente de úlceras cutáneas crónicas en zonas tropicales en el sur del Pacífico, sudeste asiático y África.

La epidemiología de *Trichomonas vaginalis* (TV) no es tan conocida, pero se estima que a nivel global supone cerca de la mitad de las ITS curables. De todas formas, hay diferencias y fluctuaciones que oscilan entre el 3,2% en población general en los EEUU hasta el 7,5-25% en clínicas de planificación familiar o <1% en Europa. Es más frecuente en mujeres entre los 40-49 años. En hombres suele ser asintomática y supone el 10-12% de las UNG.

Otras infecciones genitales que estrictamente no se transmiten por contacto sexual pero que se procesan de la misma forma son la vaginosis bacteriana (VB) y la candidiasis genital. La VB tiene una prevalencia que se sitúa en torno al 29% en Estados Unidos, donde es la primera causa de vaginitis. Actualmente se dan argumentos para considerarla al menos de transmisión sexual. En Europa las tasas publicadas suelen ser inferiores, entre el 4% y el 14% según los países. La mayoría de casos de VB se dan en mujeres entre 15 y 44 años, mientras que la incidencia es muy baja tanto en mujeres prepúberales como en posmenopáusicas. La candidiasis genital es la segunda causa más común de vaginitis en mujeres en edad fértil.

Las epidemias recientes de infecciones por arbovirus que por primera vez han afectado a extensos grupos poblacionales como la infección por virus

Ébola en 2014 o Zika en 2015-2016 han puesto de manifiesto la posible de transmisión de estos virus por vía sexual, aumentando la lista de agentes infecciosos asociados a ITS. El virus Zika fue descrito en 1947 en monos de Uganda y 5 años más tarde se describió el primer caso en humanos. Sin embargo, durante 50 años sólo se habían descrito casos esporádicos en regiones de África y Asia. No es hasta 2007, cuando se describe un brote por Zika en la Micronesia, seguido de un segundo brote más extenso en 2013-2014 en la Polinesia francesa, hasta la gran explosión en Sudamérica (con epicentro en Brasil) en 2015-16. Asimismo, en el oeste de África (entre Guinea, Liberia, Nigeria, Senegal y Sierra Leona) en 2014 tuvo lugar un brote epidémico sin precedentes causado por el virus Ébola y desde aquí se describieron casos importados y autóctonos por primera vez fuera de África, incluyendo España. Este brote epidémico generó una gran alarma social, debido a unas muy altas tasas de mortalidad. La infección por el virus Ébola se asocia a cuadros de fiebre hemorrágica, transmitido por sudor, saliva, orina o sangre de individuos enfermos, pero el brote de 2014 sirvió para demostrar que la transmisión sexual también era posible.

1.2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y SÍNDROMES

Para el diagnóstico de las ITS, se aconseja una aproximación sindrómica, de forma que según el síndrome clínico del paciente, se utilizarán unas determinadas herramientas y técnicas microbiológicas u otras. Las ITS se clasifican en (Tablas 1A y 1B y Anexo I. Algoritmos diagnósticos):

A. Infecciones ulcerativas. Las causas más frecuentes de estas infecciones son el VHS y TP (agente causal de la sífilis o lúes); otros agentes etiológicos menos frecuentes son HD, CT serovariedades L1, L2, L3 (agente causal del LGV), y más excepcionalmente, *K. granulomatis* (antes denominado *Calymmatobacterium granulomatis*, agente causal de la donovanosis o granuloma inguinal).

B. Infecciones supurativas. Incluye básicamente uretritis, cervicitis y proctitis. La uretritis gonocócica está producida por NG; y la UNG puede estar causada por diferentes agentes etiológicos como CT, MG y UU. Otros agentes menos frecuentes causantes de UNG son VHS, TV, organismos levaduriformes, TP, VPH, *Adenovirus*, *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, enterobacterias y microorganismos asocia-

dos a la VB. En el caso de la cervicitis, los principales agentes etiológicos son CT, NG y MG. Otros microorganismos de la microbiota vaginal, como bacterias anaerobias, estreptococos, estafilococos, *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* pueden producir infección del trato genital superior. Las infecciones mixtas son frecuentes. Los principales agentes causales de la proctitis son NG, CT (D-K), CT (L1, L2, L3), TP y VHS. El papel de MG está actualmente en discusión.

C. Vulvovaginitis. Estrictamente no se considera una ITS excepto en el caso de TV, aunque puede estar relacionada en el caso de la VB. El agente etiológico más frecuente son diferentes especies del género *Candida*, que causan la candidiasis vulvovaginal. La VB es otra entidad muy frecuente, se trata de una disbacteriosis, resultado del reemplazamiento de los lactobacilos productores de H₂O₂ (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*) por altas concentraciones de *Gardnerella vaginalis* (GV), bacterias anaerobias (*Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp.), MH, UU y numerosos anaerobios difíciles de cultivar o no cultivables (géneros *Megasphaera*, *Lachnospira*, *Sneathia*, etc), sin reacción inflamatoria. La vaginitis causada por TV en nuestro entorno es poco frecuente. La vaginitis aeróbica es otra disbacteriosis causada por sobrecrecimiento de ciertos patógenos como *Streptococcus*

pyogenes, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *H. influenzae* y con abundantes polimorfonucleares. Otros agentes causales de vulvovaginitis son: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., NG, CT, VHS y citomegalovirus (CMV), y en niñas prepúberales, los oxiiuros.

D. Infecciones parasitarias. En este grupo se encuentra la escabiosis, causada por *Sarcoptes scabiei* y la pediculosis causada por *Phthirus pubis*.

E. Infecciones verrugosas o pseudotumorales. Incluye las infecciones causadas por el VPH y por *Molluscum contagiosum*.

F. Otras. Otros agentes causales de ITS son: los virus de las hepatitis (A, B, C), el VIH, CMV y virus de Epstein-Barr; infección por el virus Zika y el virus Ébola y, finalmente, infecciones por patógenos entéricos (géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter*) y protozoos intestinales (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y microsporidios).

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.

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

Impresión clínica	Agentes etiológicos habituales en ITS	Otros microorganismos implicados/ Comentarios
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>M. hominis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> ,
Bartolinitis (glándulas de Bartolino)/ Esquenitis (glándula de Skene)	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	Anaerobios, bacilos gramnegativos, estreptococos, <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>
Cervicitis	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , VHS, <i>M. genitalium</i> <i>T. vaginalis</i>	Microorganismos de la microbiota vaginal como estreptococos, estafilococos, <i>E. coli</i> y <i>H. influenzae</i> . Infecciones mixtas.
EPI (salpingitis)	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> <i>M. genitalium</i>	Microorganismos de la microbiota vaginal como estreptococos, estafilococos, <i>E. coli</i> y <i>H. influenzae</i> . Anaerobios y <i>G. vaginalis</i> . Infecciones mixtas.
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>	Enterobacterias, <i>M. tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Candida</i> spp., virus de las paperas

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

Impresión clínica	Agentes etiológicos habituales en ITS	Otros microorganismos implicados/ Comentarios
Oftalmia neonatorum	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> VHS	Microorganismos de la microbiota vaginal como estreptococos, estafilococos, <i>E. coli</i> y <i>H. influenzae</i>
Prostatitis	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> <i>M. genitalium</i> * <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) *Causa de UNG, pero faltan evidencias
Úlceras genitales con linfadenopatía	<i>T. pallidum</i> , <i>H. ducreyi</i> , <i>C. trachomatis</i> (LGV), <i>K. 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>S. agalactiae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Adenovirus</i> , enterobacterias
Uretritis femenina (y síndrome uretral)	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> * <i>U. urealyticum</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. saprophyticus</i> *Faltan evidencias
Vaginosis bacteriana	-	<i>Prevotella</i> spp., <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> y numerosos anaerobios fastidiosos o no cultivables (géneros <i>Megasphaera</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Sneathia</i> , etc)
Vulvovaginitis	<i>T. vaginalis</i>	<i>Candida</i> spp., enterobacterias, <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , VHS, <i>S. agalactiae</i> , <i>Haemophilus</i> spp.

2. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

2.1 ASPECTOS GENERALES

La adecuada toma y transporte de las muestras es un factor clave en el rendimiento de las técnicas microbiológicas. Los microorganismos implicados en las ITS suelen ser de crecimiento fastidioso, por lo que las técnicas que solamente detectan microorganismos viables pueden dar resultados falsos negativos si no se siguen de forma estricta las normas de recogida y transporte de las muestras.

2.2. MEDIOS DE TRANSPORTE Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Para el diagnóstico de una ITS, el tipo de muestra a recoger dependerá de la edad, sexo, prácticas sexuales y manifestaciones clínicas del paciente. Cada laboratorio puede emplear sistemas de torundas y contenedores específicos que dependen del tipo de muestra, el tipo de determinación que se va a realizar y de las recomendaciones del fabricante. En muchos casos se recogerán varias muestras para diferentes

técnicas (microscopía, cultivo, biología molecular) cada toma debe realizarse sobre una zona previamente no muestreada, rotando la torunda durante unos segundos.

Con independencia de los aspectos relacionados con la seguridad del paciente, estas muestras pueden tener trascendencia legal. Por tanto, las muestras microbiológicas obtenidas deben ser etiquetadas con el nombre del paciente y/o un identificador único, el tipo de muestra y la fecha y hora de la toma. Además, es muy importante verificar que las etiquetas identificativas de muestra y solicitud coincidan.

2.3. TIPOS DE MUESTRAS

En las Tablas 2A y 2B se detallan las condiciones de toma de muestra en función de la localización de la infección.

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

Localización	Condiciones de toma de muestra	Forma de toma de la muestra	Torundas y Contenedores	Comentarios
Anal/rectal	Anoscopia (pacientes sintomáticos)	Emplear un anoscopio sin lubricar humedecido con agua. Tomar las muestras bajo visualización directa de las lesiones.	Cultivo <i>N. gonorrhoeae</i> : torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies con carbón activado. TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	En HSH y VIH positivos con diarrea tomar una muestra adicional para estudio de microorganismos entéricos. Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Anal/rectal	Toma sin visualización	Insertar la torunda 2-3 cm en el canal anal. Presionar lateralmente para evitar la materia fecal y favorecer la obtención de células epiteliales columnares, Rotar la torunda durante 10-30 segundos. Si se objetiva contaminación fecal visible, desechar la torunda y obtener nueva muestra.	Cultivo NG: torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies con carbón activado. TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	En HSH y VIH positivos con diarrea tomar una muestra adicional para estudio de patógenos entéricos. Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Cérvix	Exocervix	Utilizar un espéculo no lubricado para visualizar el cérvix. Limpiar el moco cervical con una torunda seca y descartarla. Raspar con la torunda las lesiones o úlceras sospechosas.	TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	Son adecuadas para el diagnóstico del virus del herpes simple (VHS). Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Cérvix	Endocervix	Utilizar un espéculo no lubricado para visualizar el cuello uterino. Limpiar el moco cervical con una torunda seca y descartarla. Insertar la torunda 2-3 cm en el canal cervical y rotar durante 5-10 segundos.	Cultivo NG: torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies y carbón activado. TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	En mujeres hysterectomizadas, tomar muestra de orina para TAAN o una toma vaginal para cultivo o TAAN. En prepuberales, tomar muestra del vestíbulo vaginal para cultivo o AANs. Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Uretra	En hombres, la toma de muestra se realiza en la uretra esponjosa. En la mujer, la uretra se localiza entre el clítoris y el introito vaginal.	Hombres: -Usar torundas finas con varilla de alambre. -Si hay secreción, o aparece a la presión, recoger en la torunda. -En ausencia de secreción, insertar 2-3 cm una torunda fina y rotar 5-10 segundos. Mujeres: -Limpiar con gasa estéril o torunda. -Estimular la secreción mediante masaje de la uretra contra la sínfisis del pubis a través de la vagina.	Cultivo NG: torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies y carbón activado. TAAN: torundas específicas	El paciente no debe haber orinado en las 2 horas previas a la realización de la toma de la muestra. Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Faringe	Pilares tonsilares, faringe posterior y zonas ulceradas, inflamadas o con exudado purulento.	Utilizar depresor lingual para una correcta visualización y rotar la torunda 5-10 segundos.	TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	No contaminar con microbiota de mucosas y lengua. Enviar la muestra refrigerada (4°C).

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

Localización	Condiciones de toma de muestra	Forma de toma de la muestra	Torundas y Contenedores	Comentarios
Lesiones genitales características de sífilis primaria	Lesiones en área genital	Limpia la lesión con una gasa estéril empapada con solución salina estéril, apretar suavemente la base de la lesión hasta que se obtenga un líquido claro, 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. Para TAAN, tomar la muestra con torunda o el material aspirado y depositarlo en un medio de transporte para virus.	Para microscopía de campo oscuro, depositar la muestra en un portaobjetos y observar inmediatamente al microscopio. TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	No adecuado para lesiones orales o rectales. Para TAAN, enviar la muestra refrigerada (4°C).
Úlcera genital	Se limpiará la superficie de la lesión con una gasa humedecida en suero salino estéril. Evitar aplicación previa de antisépticos.	Si hay una vesícula, aspirar el contenido con jeringa. En ausencia de vesículas, frotar vigorosamente la base con la torunda (sin hacer sangrar).	Cultivo HD: torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies Cultivo viral: torundas y medio de transporte para virus. TAAN: torundas específicas y contenedores específicos.	En el caso de sospecha de linfogranuloma venéreo (LGV) se puede realizar una punción de la adenopatía. Enviar la muestra refrigerada (4°C).
Vagina		Visualizar la zona mediante la colocación de espéculo sin lubricante. Tomar la muestra de la zona donde el exudado sea más abundante. En ausencia de exudado tomar la muestra del fondo del saco vaginal posterior.	Para cultivo, emplear torundas de dacrón o rayón con medio de transporte tipo Stuart-Amies. TAAN: torundas específicas.	El exudado vaginal es óptimo para la recuperación de <i>Candida</i> spp., TV. Cuando se sospeche la infección por NG o CT, se debe realizar la toma de exudado endocervical (excepto en mujeres histerectomizadas en las que se realiza la toma en el fornix posterior). Para TAAN, enviar la muestra refrigerada (4°C).
Sangre total	Miembros superiores, preferiblemente vena cefálica o mediana.	Desinfectar la zona donde se va a realizar la punción venosa. Extraer dos series de hemocultivos. Obtener de 5-10 mL de sangre total por vial.	Viales de hemocultivo	Los hemocultivos son positivos en el 10-30% de los pacientes con gonocemia.
Suero	Miembros superiores, preferiblemente vena cefálica o mediana.	Desinfectar la zona donde se va a realizar la punción venosa, obtener de 5-10 mL de sangre total	Tubo de vacío con separador de suero	Realizar serología de sífilis y VIH a todos los pacientes con sospecha de ITS.
Orina	Micción espontánea,	Micción espontánea. Obtener 10 mL de orina de la porción inicial.	Tubo de vacío para orina sin conservantes	Exclusivamente para técnicas de TAAN. La recolección de volúmenes superior a 20 mL diluye la muestra y puede afectar a la sensibilidad de los estudios. Enviar la muestra refrigerada (4°C).

NOTA: el semen no es una muestra adecuada para el estudio de las ITS, además para el diagnóstico molecular tiene muchos inhibidores y puede complicar el diagnóstico

3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los principales agentes infecciosos implicados en las ITS son no cultivables como TP, fastidiosos (CT) o muy sensibles a las condiciones de transporte y conservación (TV o NG). Por lo tanto, esta es una de las etapas más críticas en el proceso de aislamiento e identificación de los agentes infecciosos relacionados con ITS que puede dar lugar a resultados falsos negativos. En la era pre-TAAN, la opción óptima era la inoculación directa de la muestra en un medio de cultivo, pero este escenario idóneo era pocas veces realizable. Por ello, el desarrollo de las TAAN ha ido progresivamente instaurándose como el método de referencia para el diagnóstico de las ITS, ya que las condiciones de transporte y conservación de las muestras no son tan estrictas. Si bien la estabilidad del material biológico dependerá del tipo de ensayo comercial empleado, previamente a la toma de muestra se deberá consultar con el fabricante sobre las condiciones de almacenaje y transporte. En ocasiones es necesario disponer de microorganismos viables, por lo que el cultivo es altamente recomendable en dos escenarios muy concretos: conocer los perfiles de resistencia antibiótica de algunos microorganismos y para propósitos médico-legales.

En esta sección se describen conceptos generales. Entre las medidas generales que condicionan el rendimiento óptimo, se debe recordar que cualquier toma debe realizarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. También que se debe evitar el uso de antisépticos o lubricantes ya que pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. Además, hay que asegurarse de que los hisopos y medios de transporte no contengan sustancias inhibitorias de las TAAN. Por último, dependiendo de la estrategia o propósito del diagnóstico (cultivo, serología o TAAN) deben seguirse unas recomendaciones más o menos estrictas ya que no todos los tipos de muestras sirven para todas las estrategias (por ejemplo, la muestra de exudado vaginal puede servir para técnicas TAAN específicas para gonococo, pero no para el cultivo). Cuando la estrategia es la detección molecular, el transporte y conservación de muestras es menos estricto, siempre que en cada caso se sigan las indicaciones de los fabricantes. Sin embargo, es necesario tener cuidado cuando el diagnóstico se base en detección de ARN (por ejemplo en algunas plataformas para detección de CT o VPH), ya que es

menos estable que el ADN. En ese escenario, las muestras biológicas deben inocularse en medios de transporte que lleven estabilizantes, como PreservCyt® o Thinprep. En esas condiciones las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente (TA) hasta 60 días, pero la no utilización de medios con estabilizantes invalidaría la prueba diagnóstica basada en detección de ARN. La estrategia basada en serología, tradicionalmente no ha requerido condiciones estrictas y bastaba 1 mL de suero para el diagnóstico de agentes infecciosos como TP, VIH o virus hepatotropos (VHA, VHB o VHC) que una vez centrifugada la sangre (tubo de 5 mL de sangre con gel separador), el suero se podía guardar a temperatura de 4°C por 4-5 días. En estos casos, lo más importante era separar el suero, sin mucha dilación. Sin embargo, los nuevos algoritmos diagnósticos para detección del VIH o virus hepatotropos que combinan técnicas serológicas con técnicas moleculares implican la necesidad de acortar los tiempos de separación de suero, para evitar posibles degradaciones del ARN (caso de VIH o VHC). Finalmente, la estrategia basada en cultivo es la que requiere condiciones más estrictas para evitar fracasos de aislamiento bacteriano o discrepancias entre TAAN y cultivo, de especial relevancia en casos de agresiones sexuales. En la infección por NG es especialmente importante el estudio de la sensibilidad antibiótica, para lo que es necesario microorganismos viables. Los hisopos podrán introducirse en un medio de transporte no nutritivo (como Stuart o Amies con carbón activado) o un medio nutritivo (como Transgrow, GonoPak o InTray GC). En el primer caso, la tasa de recuperación de organismos viables es máxima si el medio de Stuart o Amies se conserva entre 2-8°C antes del transporte al laboratorio. Si esto no fuera posible o el tiempo hasta inoculación en medios de cultivo fuera >24h se recomiendan medios nutritivos. En este caso, se alcanza la máxima supervivencia cuando las muestras en el medio de transporte se preincuban a 37°C/24 h antes del transporte al laboratorio, pero el tiempo de envío al laboratorio no debe ser superior a 72 horas.

El diagnóstico de ITS es sindrómico, es decir que la toma de muestra dependerá de la presentación clínica pero también de la historia del paciente (edad, sexo, comportamiento sexual o cirugías como histerectomía...). Sin embargo, hay situaciones que pueden estar asociadas a varios agentes infecciosos (por ejemplo, úlceras genitales), pueden exis-

tir coinfecciones (muy frecuente la coinfección por NG y CT) o tratarse de portadores asintomáticos (frecuente en las infecciones extragenitales, como orofaringe). En estos casos las TAAN tienen una gran ventaja ya que muchos medios de transporte son genéricos para múltiples microorganismos y las plataformas actuales permiten un cribado de múltiples agentes en un único ensayo; mientras que el cultivo debe ser muy específico de cada especie, como el de NG o VHS. Sin embargo, pese a la generalización de las TAAN frente a múltiples dianas, estas pueden presentar baja sensibilidad

para un determinado microorganismo, o bien pueden tener menor sensibilidad que las estrategias TAAN frente a un solo microorganismo. Un ejemplo es la detección de MG ya que su carga bacteriana es 100 veces inferior que la de CT, por lo que si se emplean medios muy diluidos, se pueden obtener resultados falsos negativos, aun habiendo conservado y transportado la muestra en condiciones adecuadas.

En la Tabla 3 se detallan la temperatura de conservación y el tiempo máximo de envío al laboratorio.

Tabla 3. Transporte y tiempo óptimo de transporte

Agente	Transporte y tiempo de transporte óptimo
CT	TA, 2 días (para cultivo refrigerar a 4°C y <2 h)
EPI	Frasco de hemocultivo TA, 30 minutos a 1 h
Granuloma inguinal	TA, 2 h
HD	TA (envío inmediato al laboratorio)
Levaduras	TA, 2 h (examen en fresco), 12h (cultivo), ADN (7 días)
LGV	TA, 2 h (envío inmediato si se realiza cultivo celular); 2 días o refrigerada si TAAN
NG	Refrigerado, TA y cultivo (≤ 1 h). TAAN (2 días)
Piojos	TA, 1h
Sarna	TA, 1h
TP	TA, campo oscuro (envío inmediato), serología (2 h)
TV	TA, salino (30 minutos- óptimo a 2 h), cultivo (envío inmediato), antígeno (24 h) y TAAN (7 días)
VB	TA, salino (2 h), tinción de Gram (12 h), TAAN (7 días)
VHS	TA, si cultivo y >2 h refrigerar la muestra
VPH	TA, 48 h

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

Las muestras deben recibirse en el laboratorio de Microbiología debidamente identificadas, de lo contrario se rechazarán. Antes de su procesamiento, el microbiólogo debe determinar si la muestra enviada es adecuada para el examen solicitado, y si el recipiente y el volumen son adecuados. Igualmente se debe de hacer una valoración general del tipo de muestra enviada, las determinaciones solicitadas y el diagnóstico referido, para decidir el procesamiento más adecuado que permita el mayor rendimiento diagnóstico posible, en ocasiones ampliando las determinaciones solicitadas y en otros casos, restringiéndolas.

5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

5.1. INOCULACIÓN

Los patógenos causantes de ITS son en muchas ocasiones organismos frágiles y de crecimiento fastidioso en los medios de cultivo. Las TAAN, y especialmente los cultivos pueden dar resultados falsos negativos si no se realiza de forma adecuada la recogida de la muestra, así como su transporte, almacenamiento y procesamiento.

Para minimizar estos factores, en consultas especializadas de ITS que estén alejadas del laboratorio, pueden disponer de medios de cultivo para su inoculación directa en la consulta, e incluso tener una pequeña estufa, lo que aumenta el rendimiento

en la recuperación de NG en caso de uretritis. Otra posibilidad es localizar físicamente la consulta de ITS en las inmediaciones o en el propio Servicio de Microbiología, con lo que se podría realizar la siembra de los medios en el mismo momento de la toma. También, ante una sospecha de uretritis, y para valorar la presencia de leucocitos PMNs en el exudado, puede obtenerse una torunda exclusiva para este fin, que se rueda sobre un porta y se envía al laboratorio para su tinción (azul de metileno modificado o tinción de Gram) y examen al microscopio. Ya en el laboratorio, el personal técnico debe disponer de algoritmos claros para el procesamiento de las muestras. Cuando se realice cultivo, este debe ser prioritario en el tiempo respecto de otras determinaciones.

Los medios se deben inocular comenzando por el medio más general hasta el más selectivo. El cultivo en agar chocolate debe sembrarse junto con el medio Thayer-Martin o similar debido a que algunos gonococos pueden inhibirse por la vancomicina que contiene el medio. En el caso de muestras de exudados vaginales y uretrales se requieren dos torundas por muestra para una mejor recuperación de los microorganismos buscados o por si se requiere realizar cultivo y otra técnica; las placas de cultivo 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.

En las nuevas guías IDSA y ASM del 2018, en el caso de EPI, las muestras de endocérvix, dilatación o curetaje, tienen limitada utilidad en la búsqueda de *Actinomyces* spp. ya que es parte de la microbiota normal. En el caso de los DIU sólo se buscará *Actinomyces* spp. si se produce una infección en la inserción del mismo o si se ha dejado más tiempo del recomendado (5 años) y por ello el clínico deberá comunicar esta situación al personal del laboratorio para realizar el cultivo en caso de que se requiera.

El cribado basado en muestras agrupadas o “pool” de muestras ha tenido tanto defensores como detractores. Los trabajos que han explorado esta estrategia diagnóstica se han circunscrito a países con bajos recursos económicos o a intereses económicos de empresas del sector del diagnóstico *in vitro* que buscan aumentar los márgenes de beneficios. A fin de reducir costes se ha propuesto la

realización de “pool” de orinas en los cribados de CT, pero aunque se ha observado que presentan buena sensibilidad y especificidad, no se realizan habitualmente. Estos escenarios se describen en poblaciones con baja incidencia de infecciones por CT y NG. Así en la India se redujeron >50% los costes de reactivos al analizar en un mismo ensayo muestras agrupadas de orina de diferentes pacientes (5 muestras por ensayo) y se observaron menores tasas de inhibición por el efecto dilución de los potenciales inhibidores. La S y E fueron del 96,1% y 96,5%, respectivamente.

Otro “pool” consiste en juntar las muestras de faringe, recto y orina del mismo paciente en el caso de HSH, pero se ha encontrado entre el 5-9% menos de sensibilidad. Aunque podría ser una solución coste-eficaz este procedimiento puede comprometer la S y E, máxime en sitios anatómicos como zonas extragenitales con una baja prevalencia de NG y CT, a lo que hay que añadir el riesgo de falsos positivos causados por otras especies de *Neisseria* en el caso de NG. Además, se debería repetir la TAAN en cada muestra por separado en el caso de que el “pool” sea positivo, por lo que se tendrían que incluir dos torundas para cada zona anatómica. En opinión de los expertos de este procedimiento, mientras que las plataformas no estén perfectamente validadas para muestras extragenitales, la utilización de muestras agrupadas para cribado poblacional podría contribuir más a la confusión, especialmente con NG en muestra faríngea. Por ello y a falta de evidencias fuertes parece prudente no realizar el “pool” aunque en países con pocos recursos podría ser una solución coste-eficaz sin comprometer demasiado la S y E.

5.2. PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS ITS

Para contribuir al control de las ITS es fundamental disponer de pruebas diagnósticas ya que facilitan un tratamiento etiológico rápido y específico. La demora en el diagnóstico condiciona tratamientos mal dirigidos o ausentes, por lo que es primordial emplear pruebas que proporcionen dentro de lo posible, resultados inmediatos y evitar así nuevos contagios al interrumpir la cadena de transmisión. Se ha demostrado mediante modelos, que emplear una prueba rápida con una sensibilidad del 63%, consigue tratar más pacientes infectados, que esperar el resultado de una prueba muy

sensible realizada en el laboratorio a expensas de que el paciente acuda a una segunda consulta a recoger el resultado y ser tratado en consecuencia. Además, con tratamientos bien dirigidos se evita la aparición de resistencias y se reduce el coste.

Las principales técnicas rápidas que se pueden realizar en un laboratorio de alta resolución son pruebas de microscopia (tinción de Gram en una uretritis, campo oscuro en una úlcera) y sobre todo las TAAN, especialmente PCR en formato múltiple frente a los principales patógenos, con resultados en 1-2 horas. La comercialización de técnicas que permitan determinar de forma rápida y en monotest la presencia de genes de resistencia constituirá el siguiente objetivo.

También puede conseguirse diagnóstico rápido mediante la realización de pruebas en el lugar de atención del paciente (*point-of-care-test*, POCT). Se pueden definir las POCT como las pruebas diagnósticas que permiten que, en la misma visita, se realice el diagnóstico, se indique el tratamiento y que idealmente, para su realización no se necesite personal entrenado ni fuente de electricidad para equipamiento asociado (que no precise nevera, centrifuga, microscopio ni lector). Las pruebas POCT deben cumplir los requisitos ASSURED establecidos por la OMS: *Affordable* (económico), *Sensitive* (sensible), *Specific* (específico), *User-friendly* (uso amigable, pocos pasos y mínimo entrenamiento), *Rapid and robust* (rápido y robusto, resultados en < 30 min), *Equipment-free* (sin equipos), *Deliverable to end-users* (disponible para usuarios finales).

Si bien el futuro de las pruebas POCT parece prometedor en base a nuevas tecnologías como las microfluídicas y las *microwave accelerated metal enhanced fluorescence* (MAMEF), en la actualidad solo se dispone de técnicas comercializadas para el diagnóstico del VIH y la sífilis. Las pruebas disponibles para otros patógenos no alcanzan la sensibilidad y especificidad proporcionada por las técnicas TAAN disponibles en los laboratorios.

Estas pruebas se deben valorar con cautela, pues no sólo la sensibilidad es muy importante, sino que además hay que tener en cuenta que una baja prevalencia influye de forma muy importante sobre el valor predictivo. Así una prueba de cribado con una

sensibilidad del 95% y especificidad del 95%, aplicado a una población con una prevalencia del 1%, produciría aproximadamente 60 positivos por cada 1.000 individuos estudiados, lo que supone que 50 serían falsos positivos, y un paciente no sería diagnosticado. En este caso, aunque el valor predictivo negativo fuese >99,9%, el valor predictivo positivo sería de solo el 20%. Por tanto, la distribución generalizada de pruebas diagnósticas rápidas para su realización fuera del laboratorio debe de valorarse con sumo cuidado. En la Tabla 4 se expone la sensibilidad y especificidad de estas pruebas.

Recursos en internet de algunas de estas pruebas rápidas:

Examination of Vaginal Wet:

<https://www.youtube.com/watch?v=8dgeOPGx6YI>

5-Minute Wet Mount:

https://brooksidepress.org/Products/ed2/Video/wet_mount_video.htm

Análisis participativo en el reconocimiento de imágenes:

<http://www.fba.org.ar/proeco/>

APGO Educational series in women's health issues:

<https://www.youtube.com/channel/UCB67eiHQz-qqLUBHrDjzYdtQ>

SEMERGEN:

<https://es.slideshare.net/CFB/habilidades-del-medico-de-familia-en-el-diagnostico-de-las-vulvovaginitis>

Gram

<https://www.youtube.com/watch?v=BWwun-qhwsg>
<https://www.youtube.com/watch?v=FceD8FFhuew>

Tabla 4. Pruebas de diagnóstico rápido de las ITS

Microorganismo/ síndrome	Prueba	S (%)	E (%)	Comentario
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Inmunocromatografía	82-84	98	No recomendado
	AAN GeneXpert CT/NG	97-99	>99	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gram endocervix	45-65	90-99	Tinción de Gram no recomendada en faringe y recto
	Gram uretra (con clínica)	90-95	95-99	
	Gram uretra (asintomático)	50-75	85-87	
	TAAN GeneXpert CT/NG	98-100	99,9	
<i>Treponema pallidum</i>	Microscopía campo oscuro	39-81	82-100	No en lesiones orales y rectales. La S depende de microscopista
	Inmunofluorescencia directa	90-95	>98	
	RPR (Ac no treponémicos)	73-100 98	79-98	Requiere confirmación Comparado con EIA
	Chembio DPP Assay POCT		100	
Herpes simplex	Tinción Tzanck	Variable 70-90	No E >95	Depende del número de viriones en las lesiones
	Inmunofluorescencia directa			
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Tinción directa Wright-Giemsa	<50	50-70	
		Donovanosis	40-50	<50
Vaginosis bacteriana	Examen en fresco			
	Tinción de Gram (Nugent)			
	Tinción de Gram (Ison-Hay)	70-90	95-100	
	pH	60-80	95-100	
	Sonda ADN (Affirm VPIII)	96-97	90	
	Rapid pH- Amine FermCard	75-80	60-70	
	Rapid PIP (<i>G. vaginalis</i>)	>90	>99	
<i>Candida spp.</i>	BVBluesystem	80-90	85-90	
	Examen en fresco	80-85	90-92	
	Examen con KOH 10%	91,7	97,8	
	Sonda ADN (Affirm VPIII)	40-60	>99	
	Examen en fresco/ Tinción de Gram	54-80	96	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Examen en fresco/ Tinción de Gram	85-90	>99	
	Aglutinación con látex	62-92	99-100	70% comparado con PCR
	OSOM Tricho Rapid Test	95	100	
	80-94	95		
VIH	Chembio DPP Assay POCT	99,8	100	En sangre capilar

S: sensibilidad; E: especificidad

Es difícil hacer recomendaciones concretas respecto a pruebas rápidas a implementar, debido a que los escenarios son distintos en cada centro de trabajo. Factores como la cercanía o lejanía de las diferentes consultas, la prevalencia de infección en la población, la frecuencia en el transporte de las muestras o el disponer de recursos humanos y materiales apropiados, condicionan la elección de la técnica concreta. En la Tabla 5 se expone la realidad actual y la opinión de los expertos de este documento sin que sean exhaustivas las pruebas a realizar.

Tabla 5. Niveles asistenciales y pruebas diagnósticas de ITS

Nivel	Pruebas diagnósticas	Comentario
Oficinas de Farmacia	VIH	Actualmente la pueden realizar los propios pacientes en las farmacias
Consulta de Atención Primaria	Medición del pH vaginal	<p>Usar tiras reactivas capaces de medir variaciones de pH de 0,5 (ACI- LIT® pH 0-6 MERCK). Material recogido, una vez extraído el espéculo, en la rama inferior que no sea una muestra vaginal del fondo de saco vaginal posterior, ya que éste puede tener el pH elevado por la presencia de moco cervical.</p> <p>Si no se dispone de espéculo vaginal se introduce una tira de indicador de pH con ayuda de los dedos de la mano en las caras laterales de la vagina a medio camino entre el cérvix y el introito.</p> <p>Se define como pH vaginal elevado si es > 4,5 y ocurre en: vaginosis bacteriana, vaginitis por TV y las infecciones mixtas; también por otros factores como moco cervical con sangre, semen, duchas vaginales y en la vaginitis atrófica. Las vaginitis candidiásicas tienen un pH < 4,5.</p> <p>Un pH normal descarta las vaginitis que cursen con pH elevado, y en la práctica nos sitúa ante una vaginitis candidiásica.</p>
	Test de las aminas	Se realiza añadiendo KOH al 10% en el material recogido en la rama inferior del espéculo oliéndolo posteriormente. Si no se dispone de espéculo se puede realizar extendiendo la muestra en un portaobjeto, obtenida con una torunda previamente introducida en la vagina, oliéndola después de añadir unas gotas de KOH al 10%.
	Métodos comerciales que combinan ambas pruebas: -FemExam (descatalogado en España)	Menos sensible y específico que los criterios de Amsel: pH S: 88% y E: 64% (utiliza un punto de corte de pH 4,7) y para aminas S:40% y E:95%
	-QuickVue Advance G. vaginalis	Detección de prolina iminopeptidasa que indica presencia de 2×10^7 ufc de GV en secreción vaginal sin diluir
	-OSOM BVBLUE	Detecta altas concentraciones de sialidasa (niveles 7,8 U) en 10 minutos en muestras vaginales
	Microscopía: -Exudado uretral -Exudado vaginal -Criterios de Nugent y Hay-Ison	Aunque es un método rápido y da una información muy útil, la realidad es que el médico de Atención Primaria normalmente no dispone de microscopio o no dispone de tiempo para su realización
Servicio de Urgencias	Microscopía GenXpert NG/CT VIH rápida (carga viral) o VIH-sífilis	La realidad en nuestro medio es que no se realizan estas pruebas en Urgencias y se derivan al laboratorio
Consulta de ITS o Consulta de pruebas rápidas	Todas las de Atención Primaria. Microscopía	Aunque teóricamente en la consulta de ITS se pueden realizar todas las pruebas señaladas para Atención Primaria, sólo en las consultas mejor dotadas se dispone de microscopio y capacidad para hacer tinciones básicas. El facultativo tiene que tener la formación y experiencia para llevar a cabo el examen e interpretación de la extensión.
	GenXpert NG/CT	Permite el tratamiento etiológico de las infecciones por CT y NG. En caso de resultados negativos, permite clasificar a las uretritis como UNGNC
	VIH rápida carga viral	
Servicio de Microbiología	Todas las pruebas habituales. Microscopía de campo oscuro Amplio abanico de técnicas moleculares de POC (incluyendo carga viral de VIH o VHC) de apoyo a los servicios de Urgencias	Precisa equipos y personal dispuestos a dar respuesta inmediata a las solicitudes de las consultas.

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

5.3.1. Microbiota vaginal

Durante años y con las técnicas diagnósticas disponibles, ni la composición, ni la dinámica de las diversas poblaciones bacterianas vaginales o cervicales, estuvieron bien caracterizadas. Era ampliamente conocido que *Lactobacillus* spp. era el microorganismo predominante en la vagina premenopáusica, en concentraciones de 10⁷-10⁸ ufc/g de flujo; que existían aproximadamente 35 especies, siendo las más frecuentes *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus jensenii*. También que la mayoría de las mujeres albergaban en la vagina a una sola especie de *Lactobacillus* en un momento dado y se demostró que esta colonización era transitoria ya que 2/3 de las mujeres perdían o adquirían diferentes especies de *Lactobacillus* a lo largo de un periodo de 8 meses, aunque la colonización por lactobacilos productores de H₂O₂ era más permanente.

Lactobacillus spp. protege a la vagina frente a la colonización por patógenos, interfiriendo la adherencia de estos al epitelio vaginal al bloquear sus receptores por mecanismos de exclusión o desplazamiento e inhibiendo su multiplicación mediante la producción y excreción H₂O₂, ácido láctico y bacteriocinas. Aun así, no todas las cepas de *Lactobacillus* spp. expresan estas propiedades con la misma intensidad, sino que existen enormes diferencias entre especies e incluso entre cepas de una misma especie. Otro mecanismo con el que *Lactobacillus* spp. podría prevenir la infección consiste en una inmunomodulación. Se ha comprobado que las células vesicales coestimuladas por ciertas cepas de *Lactobacillus* spp. y *E. coli* muestran un aumento de la expresión de TLR4, lo que da lugar a un aumento de la activación de la proteína NF-kappaB y el subsiguiente incremento de la secreción de TNF, amplificando así la respuesta inmune.

El conocimiento del microbioma se ha visto considerablemente ampliado tras la aplicación de las técnicas moleculares de secuenciación masiva, especialmente las de segunda generación, también conocidas como “next generation sequencing” (NGS). Su utilización, particularmente en el gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (gen

ADNr 16S), y las herramientas de análisis masivo de datos (técnicas meta-ómicas) (ver Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 59), han permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos. Uno de los primeros estudios en describir la microbiota vaginal, usando tecnología de secuenciación masiva, analizó 400 mujeres de diferentes etnias en edad fértil e identificó hasta 5 comunidades tipo con un predominio claro de las especies previamente enumeradas o de un incremento en la proporción de bacterias anaerobias estricta. Todo ello demuestra que la microbiota cervico-vaginal es altamente compleja y heterogénea y que no es una población estática, sino en estado dinámico, donde los tipos y niveles de poblaciones fluctúan continuamente dentro de un entorno cambiante. Aunque la colonización de la vagina se inicia con el nacimiento, la microbiota es escasa durante la infancia, y es con la primera menstruación, y gracias al aumento de la humedad vaginal y a la secreción de nutrientes, cuando empieza a establecerse una microbiota vaginal definitiva. La composición de este ecosistema está influenciada por distintos factores tanto endógenos (como la edad, el ciclo menstrual o el embarazo) como exógenos, como las relaciones sexuales, el uso de antibióticos, tampones y anticonceptivos.

Varios estudios, mediante técnicas de secuenciación, han establecido una relación entre la microbiota vaginal y distintas patologías, como la vaginosis bacteriana (VB), las infecciones del tracto urinario y las relacionadas con la salud reproductiva, el embarazo y el recién nacido, pero son pocos los trabajos que establecen una relación entre la microbiota vaginal y las ITS.

5.3.2. *Neisseria gonorrhoeae*

La toma de muestra, así como el transporte y el procesamiento de esta, es especialmente importante en la infección gonocócica, sobre todo para el cultivo, ya que NG es muy sensible a las condiciones ambientales. Actualmente los escobillones flocados en medio de transporte líquido tipo Stuart-Amies con carbón activado, presentan un alto porcentaje de recuperación, ya que las cortas fibras dispuestas de forma perpendicular, garantizan una absorción máxima de la muestra y una buena elución en el medio líquido de transporte. Por otro lado, durante mucho tiempo se ha pensado que la supervivencia del gonococo era superior

a temperatura ambiente en comparación a la refrigeración y muchos libros de texto ofrecen recomendaciones contradictorias. En estudios recientes, se demuestra que la conservación y supervivencia del gonococo es muy superior si los escobillones con medio de transporte se mantienen refrigerados (4 °C).

a) Examen microscópico, mediante tinción de Gram o azul de metileno. La observación a x1000 aumentos de ≥ 2 PMN por campo y diplococos gramnegativos (Figura 1), permite hacer un diagnóstico rápido de uretritis gonocócica con una buena sensibilidad (>95%) y especificidad (III, C). En cambio, la sensibilidad de la tinción de Gram en varones asintomáticos, en exudados endocervicales y en exudados rectales y faríngeos es baja, por lo que no es una herramienta útil para descartar estas infecciones. Se debe hacer siempre detección de NG en UNG ya que pueden ser mixtas y en el caso de Gram equívocos (diplococos extracelulares o atípicos) en el 25% de los casos hay crecimiento de NG en cultivo. En el caso de la tinción con azul de metileno (mezcla de azul de metileno y violeta de genciana, 4 partes de azul de metileno por una de violeta de genciana), la ventaja es que requiere sólo 10-15 segundos frente a los 4 minutos de la tinción de Gram y que se observa mejor la morfología, pero no las características tintoriales.

b) Cultivo. El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento e identificación del microorganismo en cultivo (ver PNT-ITS-04). Además es la única prueba diagnóstica que permite realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana, por lo que es esencial para detectar y monitorizar las resistencias antimicrobianas. El cultivo es adecuado para muestras endocervicales, uretrales, rectales, primera micción de orina, faríngeos y conjuntivales. Además es la técnica recomendada en el caso de infección persistente o sospecha de fracaso terapéutico. Se recomienda el uso de medios selectivos (III, B). Las placas se deben incubar durante 24-72 horas a una temperatura de 35-37°C y con un atmósfera al 5% de CO₂. Las técnicas de identificación varían mucho en función de la disponibilidad del laboratorio. Una herramienta muy utilizada en la actualidad y que presenta una buena sensibilidad y especificidad, es la espectrometría de masas (MALDI-TOF).

El cultivo es el único método que permite estudiar la eficacia del tratamiento antibiótico. Aunque las TAAN no están aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) como test de curación, éstas se pueden utilizar, teniendo siempre en cuenta que se puede estar detectando ADN residual de la primoinfección. En el caso de la infección gonocócica, se recomienda esperar dos semanas desde la finalización del tratamiento, para realizar un test de curación mediante TAAN.

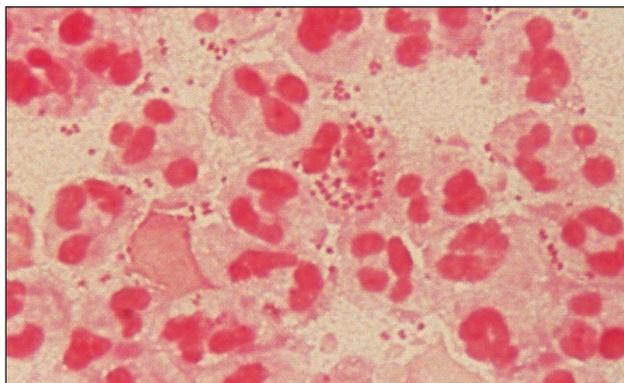
Ante la sospecha de infección diseminada es necesario extraer una muestra de sangre para realizar hemocultivos. Estos deben contener una concentración de polianetolsulfonato de sodio (SPS) no superior al 0,025%, ya que el gonococo es sensible a este compuesto. Pueden subcultivarse solamente en agar chocolate. Las muestras de líquidos estériles (LCR, articular) deben centrifugarse (>1 mL) a 1500xg durante 15 minutos y cultivar el sedimento.

c) TAAN. Actualmente son las recomendadas para la detección de las infecciones urogenitales en mujeres y varones con y sin síntomas, ya que se ha demostrado que son coste-eficaces.

La ventaja de estas técnicas es que detectan microorganismos no viables, aumentando así la sensibilidad y facilitando la recogida, transporte y procesamiento de las muestras. Esta alta sensibilidad ha permitido el uso de muestras menos invasivas, como la primera micción de orina en los varones y el frotis vaginal en las mujeres. Esto facilita la auto-toma de la muestra por parte del paciente, procedimiento utilizado en muchos casos en el cribado. Es importante remarcar que la sensibilidad de las TAAN en orina de mujeres, puede ser un 10% inferior que en los exudados vaginales. En muestras extragenitales, la especificidad de estas pruebas es inferior, pudiendo dar falsos positivos, por lo que ante la sospecha de que se trate de un falso positivo, se debe repetir con otro método. Aunque se ha recomendado el diagnóstico de faringe y recto en HSH, también se recomienda en pacientes heterosexuales debido a la transmisión por sexo oral, práctica cada vez más extendida.

d) Otros: la serología y los enzimoimmunoensayos carecen de utilidad para el diagnóstico de la infección gonocócica.

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



e) Pruebas de sensibilidad. El tratamiento de la gonorrea es complicado debido a la habilidad que ha presentado NG de desarrollar resistencia a los antimicrobianos utilizados a lo largo de los años. Es por esta razón que la monitorización de la sensibilidad antimicrobiana de este microorganismo es una medida esencial. Se considera que el tratamiento empírico debe curar >95% de los casos de gonorrea, por lo que es básico conocer la sensibilidad antimicrobiana de NG a nivel local.

El método de dilución en agar se considera la técnica de referencia para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), sin embargo, el método de difusión con tiras en gradiente de antibiótico (como Etest) es una alternativa aceptable para la determinación de la CMI en la rutina del laboratorio, siempre que se utilicen los medios de cultivo adecuados siguiendo las recomendaciones del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). El método de difusión con discos presenta en cambio resultados más aleatorios principalmente para diferenciar los aislados sensibles de aquéllos con sensibilidad disminuida, particularmente con los betalactámicos. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) propone el medio agar GC con 1% de un suplemento definido que contiene en g/L: vitamina B 12 (0,01), L glutamina (10), adenina (1), clorhidrato de guanina (0,03), ácido para-aminobenzoico (0,013), L-cisteína (1,1), glucosa (100), NAD (0,25), cocarboxilasa (0,1), nitrato férrico (0,02) y clorhidrato de tiamina (0,003). El antibiograma debe acompañarse además de la prueba cromogénica de nitrocefina para detectar la posible producción de betalactamasa, lo cual implicará resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, con independencia de su resultado de sensibilidad in vitro, mientras que las cefalospo-

rinas no se ven afectadas por este mecanismo (ver Procedimiento de Microbiología Clínica nº 38).

f) Tipificación de NG. Aporta información epidemiológica relevante, cómo dinámicas poblacionales, identificación de redes de transmisión, estudios de subpoblaciones, estudios de fracasos terapéuticos, estudios de contactos, etc. Existen métodos fenotípicos, como la auxotipificación y la determinación de serovariedades, que requieren un largo tiempo de procesamiento y los reactivos disponibles son caros; y los métodos genotípicos: PFGE, AFLP, y secuenciación.

5.3.3. *Chlamydia trachomatis*

a) Aunque la infección por CT se puede diagnosticar por cultivo, ensayos de inmunofluorescencia directa o serología, el método de elección son las TAAN que han supuesto la gran revolución tecnológica en la mejora del diagnóstico de las infecciones por CT, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Las otras estrategias diagnósticas ya no se recomiendan. Se han aprobado varias estrategias TAAN para diferentes plataformas comerciales. Por otra parte, también existen diferencias en las dianas seleccionadas para aumentar la sensibilidad. Las primeras aproximaciones se basaron en detectar un fragmento del plásmido críptico que está en aproximadamente 10 copias/célula. Sin embargo, la identificación de la denominada variante sueca (nvCT), que porta una delección en el plásmido críptico que afectaba al fragmento usado por varios sistemas comerciales, supuso un infra-diagnóstico por acumulación de falsos negativos. Este hallazgo, supuso que las nuevas versiones de las plataformas comerciales llevaran 2 dianas, bien en plásmido y cromosoma o bien ambas en el plásmido. La última aproximación diagnóstica para detectar CT se ha basado en detectar ARN de las subunidad 23S del ARNr, tanto una como dos dianas, que aumenta aún más la sensibilidad. En un futuro próximo se implementarán las TAAN en *point-of-care* que se describen en el apartado 5.2 de este procedimiento.

La detección de las variantes de CT relacionadas con el LGV ha quedado reservado para centros de referencia o grupos de investigación. Sin embargo, aunque infrecuente en la población general, la situación epidemiológica requiere disponer de técnicas moleculares para la correcta identificación de estas variantes, ya que el tratamiento antibiótico

es más prolongado que el tratamiento de una infección por variantes no invasivas. Algunas compañías de diagnóstico microbiológico ya ofertan la posibilidad de identificar estas variantes. La mayoría de las estrategias diagnósticas se basan en la defecación de una delección de 36 nucleótidos en el gen *pmpH*.

b) Tipo de muestra. El tipo de muestra recomendado para la detección molecular de CT es la muestra de orina en el varón (20 mL, al menos 1h después de la última micción) y la muestra vaginal en la mujer (realizado por un profesional o bien auto-toma), aunque también pueden realizarse procedimientos más invasivos obteniendo muestra de uretra o endocérvix. Aunque estas técnicas moleculares aún no están validadas para determinar la presencia de CT en muestras extragenitales como faringe y recto, son ampliamente utilizadas en estas muestras.

c) Toma de muestra y medio de transporte. En el caso de los procedimientos invasivos, se introduce un hisopo de plástico o alambre 2-3 cm en la uretra o 1-2 cm en el canal endocervical, seguido de rotación para coleccionar cantidad suficiente de células epiteliales. La cabeza del hisopo debe ser de rayón o dacrón, ya que otros materiales pueden inhibir el posible crecimiento del microorganismo, si se quisiera cultivar. Los hisopos floculados son los más utilizados. Una vez realizada la toma, ésta se debe conservar en un medio de transporte adecuado, como UTM (*universal transport medium*) y conservar a 4°C antes del envío al laboratorio o a -70°C si el envío se demora >24 h.

d) Tipo de cribado. No existen unas recomendaciones claras sobre el cribado y el nivel de generalización del mismo. Como se comentaba en el apartado de epidemiología, en Europa probablemente hay un infradiagnóstico de las infecciones por CT, observándose una gran disparidad en las tasas de infección entre países con sistemas de vigilancia activa y aquellos que utilizan sistemas de detección basados exclusivamente en el diagnóstico diferencial en pacientes sintomáticos. Recordemos que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, por lo que el diagnóstico no solo debería centrarse en los casos sintomáticos. En el otro extremo, los pocos países que llegaron a implementar sistemas de cribado poblacional no encontraron una justificación riesgo-beneficio y desescalaron los programas de cribado. Hoy en día,

la propuesta más extendida es el cribado a grupos de riesgo, donde sí se ha demostrado una justificación riesgo-beneficio. Esta estrategia sugiere tanto el diagnóstico a todas las personas sintomáticas y sexualmente activas, como el cribado en individuos asintomáticos que incluye mujeres ≤ 25 años, embarazadas, o mujeres que tienen varias parejas sexuales o si han sido diagnosticadas de otra ITS recientemente. CT se detecta en localización anorectal en el 8,4% de las mujeres y de estas, todas tienen infección urogenital. El cribado en hombres no está recomendado excepto en población de hombres que tengan sexo con hombres (HSH), (cribado rectal y/o uretral dependiendo de sus prácticas sexuales) o hubieran sido recientemente diagnosticados de una ITS. La presencia de CT en recto de HSH es 3-19,5% y en faringe entre 0,5-2,3%. Todos aquellos pacientes con diagnóstico positivo que sean tratados deberían ser evaluados para garantizar la erradicación de la bacteria en un tiempo entre 3-6 meses.

e) Fracaso del tratamiento. La mayoría de los aparentes fracasos de tratamiento son consecuencia de reinfecciones, falta de adherencia o re-exposición a la misma fuente. No se han descrito aun mecanismos de resistencia a tetraciclinas en CT.

f) Genotipado. Conocer el genotipo de las cepas de CT causantes de una determinada infección en nuestro entorno, ha tenido tradicionalmente un carácter más académico que clínico. Sin embargo, tanto la epidemia de LGV, como el mayor conocimiento de la biología de este microorganismo, hace cada vez más útil y conveniente que los laboratorios puedan ofertar esta determinación en su cartera de servicios. El estudio genotípico más demandado es para identificar las cepas de LGV, ya que el tratamiento antibiótico necesario para su erradicación es más extenso que una infección por CT no-LGV (15 días de doxiciclina y 5 días, respectivamente). Varias compañías de diagnóstico *in vitro* ya ofrecen en su panel diagnóstico de ITS, la diferenciación de LGV de otras infecciones por CT (Ver PNT-ITS-3a). Ninguno de los TAAN ha sido aprobado por la FDA para úlceras genitales.

Por otra parte, el genotipado de las cepas urogenitales de CT, se ha basado tradicionalmente en la secuenciación del gen *ompA* (estrategias de PCR en tiempo real), que codifica para la principal proteína de membrana externa de CT. Sin embargo, los trabajos de epidemiología molecular de los úl-

timos años han revelado que este gen es altamente intercambiable entre diferentes genotipos y no diferencia entre los diferentes patotipos de CT. Por tanto, la clasificación genotípica basada únicamente en este gen puede inducir a errores de genotipado. La combinación entre los genes *pmpH* y *ompA*, es la estrategia más sencilla para la mejor asignación de genotipos.

5.3.4. Micoplasmas genitales

Los micoplasmas son las bacterias más pequeñas de vida libre y se caracterizan por no tener pared bacteriana. La capacidad de algunos micoplasmas de poder ser cultivados en medios inanimados, permitió su aislamiento desde el tracto urogenital tanto en individuos sintomáticos como en asintomáticos, por lo que su papel patógeno siempre fue controvertido.

a) Las TANN han aportado información muy relevante. Permiten diferenciar lo que mediante el cultivo se identificaba como UU, en dos especies distintas: *Ureaplasma parvum* (UP), no implicado en patología, y UU propiamente dicho, responsable de cuadros de uretritis pero que también se encuentra en pacientes asintomáticos. Diversos trabajos indican que la carga bacteriana elevada es un factor predictivo positivo de uretritis.

También mediante TAAN se ha podido establecer el papel etiológico de MG, organismo muy difícil de cultivar, y que es responsable tanto de casos de uretritis como de cervicitis, endometritis y EPI. Se considera que es la segunda causa de uretritis no gonocócica en el varón, y esto convierte a las técnicas diagnósticas genómicas en imprescindibles. Existen pocas alternativas terapéuticas, siendo la azitromicina el tratamiento de elección. Doxiciclina es menos eficaz, con sólo un 30-40% de curación microbiológica.

MH se ha relacionado con vaginosis, EIP y endometritis. Se puede cultivar en medios específicos, aunque cada vez se generaliza más el empleo de TAAN.

b) *M. genitalium*. Para su diagnóstico, además de los exudados cervicales y uretrales obtenidos por el facultativo, se puede emplear la orina de primera micción tanto en varones como en mujeres,

así como la auto-toma de un exudado vaginal. Aunque en varones se cita en la literatura que es más sensible la muestra de orina que el exudado uretral, cuando se recoge la muestra para varios patógenos la muestra uretral puede ser más conveniente. En mujeres es más sensible el exudado vaginal que la orina. Se deben obtener muestras anales si se quiere diagnosticar esta localización. Para los exudados el medio de transporte es el UTM (válido para CT, *Mycoplasma* spp. y virus).

El único método diagnóstico útil son las TAAN. Existen técnicas comerciales y caseras, y en ambos casos es importante que los laboratorios validen estas técnicas y participen en programas de evaluación externa.

Debido a la elevada frecuencia de resistencias en nuestro país, siempre que sea posible se debe determinar la presencia de mutaciones que confieren resistencia a macrólidos, las más frecuentes en las posiciones A2058 y A2059 (numeración de *E. coli*) del gen 23S ARNr. Puede realizarse de forma casera mediante secuenciación, aunque ya existen sistemas comerciales.

Se han descrito mutaciones en las posiciones S83 y D87 (numeración de MG) de la región QRDR del gen *parC* que confieren resistencia a moxifloxacino, que a día de hoy son menos frecuentes pero no despreciables. Las mutaciones en *gyrA* parecen tener menor importancia.

c) Test de curación. Debido a la elevada prevalencia de resistencias a macrólidos, el test de curación es obligado en todos los casos. La muestra no se debe obtener hasta pasadas 3 semanas de finalización del tratamiento aunque no existe consenso entre las guías que varían entre 2 semanas y 4-6 semanas después del tratamiento.

d) *Ureaplasma urealyticum*. La muestra inicial de orina y el exudado uretral transportado en medio UTM son aceptables en casos de uretritis. Existen ensayos comercializados basados en las TAAN para el diagnóstico, y en alguno de ellos de formato múltiple se puede determinar la presencia tanto de UU como de UP, MH y MG. El cultivo presenta muchas limitaciones, pues precisa mantener la viabilidad de los micoplasmas mediante medios de transporte específicos (4SP), la inoculación en caldos selectivos y la siembra en medio agar A8 o en

galerías comerciales. El tiempo de incubación es como mínimo de 48 h. El cultivo de micoplasmas fue objeto de revisión en la anterior edición de este procedimiento (ver Procedimiento SEIMC nº 24; 2ª edición, 2007).

e) *M. hominis*. Al igual que en el caso de UU, existen técnicas comercializadas para su cultivo que fueron revisadas en la edición previa de este procedimiento, pero en la actualidad se dispone de TAAN en formato multiplex.

5.3.5. Sífilis (*Treponema pallidum*)

El diagnóstico puede ser directo (detección de *T. pallidum* en las lesiones, adenopatías, tejidos o LCR) o indirecto basado en la detección de anticuerpos. La detección directa proporciona el diagnóstico definitivo de sífilis y es especialmente útil en lesiones sospechosas en individuos serológicamente no reactivos.

a) La microscopía de campo oscuro de las muestras de úlceras o de lesiones exudativas cutáneas, proporciona el diagnóstico inmediato mediante la visualización de los treponemas móviles. La muestra ideal es el exudado seroso de lesiones activas. No son válidas las muestras hemáticas ni de origen oral ni anal. Para la obtención de la muestra, las lesiones activas se deben limpiar cuidadosamente con un hisopo estéril y solución salina estéril para eliminar costras y restos. Mediante una torunda o una gasa estéril hay que provocar una leve abrasión de la lesión para producir exudado seroso. En ocasiones hay que presionar la base de la úlcera para que se produzca. El exudado se recoge directamente sobre el portaobjetos, o bien mediante un tubo capilar o un asa bacteriológica. Se puede añadir una gota de suero salino para homogeneizar, y seguidamente cubrir con un cubreobjetos. Tiene como principales inconvenientes que la observación ha de ser inmediata a la recogida (<30 minutos), se precisa disponer de un microscopio de campo oscuro y de un microscopista experto, ya que es un método laborioso y subjetivo en el que el resultado negativo no excluye la infección.

b) Las técnicas de PCR están desplazando al campo oscuro en el diagnóstico de la sífilis primaria y en muchos laboratorios se considera el test de elección. Las técnicas de PCR permiten estudiar lesiones extragenitales donde puedan existir

treponemas comensales, así como también en tejidos, LCR, humor vítreo o líquido amniótico. También tienen interés en el diagnóstico de la sífilis congénita y en la neurolúes.

No se recomienda su realización en sangre por la existencia de sustancias inhibitoras. Para realizar esta prueba se pueden utilizar muestras frescas o congeladas. Existen formatos comerciales, no validados para todos los tipos de muestras, por lo que es fundamental el empleo de los controles de validación correspondientes. Se considera que la PCR del LCR tiene escaso valor para el diagnóstico de neurosífilis debido a su baja sensibilidad y especificidad.

c) Técnicas de inmunofluorescencia directa, de hibridación in situ o las tinciones argénticas: están en desuso.

d) Es posible la tipificación de los treponemas mediante técnicas de RFLP o de secuenciación, e incluso es posible determinar la presencia de mutaciones en el 23S ARNr que confieren resistencia a macrólidos, pero todas ellas se emplean con fines de investigación.

e) El diagnóstico indirecto serológico proporciona un diagnóstico presuntivo.

Las pruebas no treponémicas, también llamadas reagínicas, detectan anticuerpos frente a una combinación de cardiolipina, lecitina y colesterol que se forman como respuesta al daño en las membranas celulares que provocan las espiroquetas. No son por tanto anticuerpos específicos pero son un indicador muy útil de la actividad de la enfermedad. Las pruebas treponémicas detectan anticuerpos específicos frente a *T. pallidum*. De todos modos, ninguna prueba serológica es capaz de diferenciar la sífilis de las trepanomatosis no venereas (pian, pinta y bejel).

e1) La primera prueba no treponémica disponible fue el test de Wassermann, que metodológicamente era una fijación del complemento y ya no se emplea. Siguen teniendo todo el interés el VDRL y el RPR, que detectan una mezcla de anticuerpos IgG y IgM, son técnicas manuales y no permiten la automatización, si bien hay algún intento de automatización descrito en la literatura. Son sencillas, baratas, sensibles y además permiten la semicuantificación mediante la determina-

ción del título. Se positivizan a los 10-15 días después de la aparición del chancro (unas 6 semanas después de la infección). Por eso su sensibilidad en la sífilis primaria ronda el 78-86%, mientras que en la sífilis secundaria es del 100%. En la sífilis latente permanece cercana al 100% y disminuye en la terciaria 71-86% (Tabla 6).

El VDRL es una microfloculación, debe observarse al microscopio (100x) y las muestras aceptables son suero y LCR (en este último hay que evitar la contaminación con sangre o suero). El RPR es una macrofloculación que puede valorarse sin microscopio debido al empleo de carbón para fijar los antígenos. Se emplea en suero y en plasma, y sus títulos suelen ser superiores a los del VDRL.

Estas técnicas cuantitativas ayudan a establecer la fase de la enfermedad y en algunos casos pueden ser útiles para indicar tratamiento, como sería el caso de un paciente que se reinfecta y en el que se demuestra un incremento en el título. En general, títulos >16 indican enfermedad activa y sería preciso iniciar el tratamiento, si bien esta decisión ha de tomarse a la luz de los hallazgos clínicos, infecciones previas y posibles tratamientos previos. Títulos iguales o inferiores a 16 no excluyen la infección activa, especialmente si existe clínica compatible o los tratamientos previos no están documentados.

También permiten hacer seguimiento de la respuesta al tratamiento. La caída del título después del tratamiento es variable y depende de factores como la fase de la enfermedad, su duración y el título inicial, pero la regla general considera que en una sífilis temprana el título debería de caer 4 veces a los 6 meses. En el caso de una sífilis tardía, o después de múltiples episodios de infección, la caída del título es más lenta y puede estabilizarse a títulos bajos (VDRL <8, RPR <16). La comparación de títulos entre distintas muestras debe realizarse en paralelo y con la misma técnica. En pacientes con enfermedades autoinmunes puede persistir el título a pesar de un tratamiento correcto.

Los falsos positivos se estiman en un 0,2-0,8% de los casos, y pueden ser transitorios, habitualmente con títulos bajos, en respuesta a condiciones que cursan con una activación policlonal de linfocitos B, como ocurre en las inmunizaciones y en las infecciones agudas por virus de la hepatitis A, B, C, sarampión, VEB, varicela, *Mycoplasma pneu-*

moniae, malaria y durante la gestación. Los falsos positivos de duración superior a 6 meses, suelen presentar títulos elevados y se producen en enfermedades crónicas que cursan con daño tisular crónico, como la fiebre reumática, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, diabetes, adicción a drogas intravenosas y otras) (Tabla 7). Pueden existir falsos negativos debido al efecto prozona (especialmente en casos de sífilis secundaria), y para evitarlo, se aconseja diluir los sueros.

e2) Las pruebas treponémicas incluyen TPHA, FTA, Inmunoblot, EIA y quimioluminiscencia (CLIA). El test de inmovilización treponémica (TPI) ya no se usa debido a que es difícil de estandarizar y requiere treponemas vivos. Las técnicas treponémicas son técnicas cualitativas, más específicas y precoces que las no treponémicas (positivas a la 1-2 semanas de aparecer el chancro) y permanecen positivas de por vida incluso en infecciones tratadas, por lo que no deben emplearse como marcadores de actividad ni para la valoración del éxito del tratamiento. La mayoría detectan tanto IgM como IgG, si bien es posible determinar la presencia de IgM mediante formatos específicos de FTA, Inmunoblot y EIA, pero su sensibilidad es baja y no ayudan a determinar la fase de la enfermedad. Son útiles para el diagnóstico de la sífilis congénita.

El TPHA es una hemaglutinación pasiva que emplea eritrocitos sensibilizados con extracto de *T. pallidum*. El suero se diluye con un sorbente que contiene treponemas no patógenos. Si el suero contiene anticuerpos específicos anti *T. pallidum* se forma un agregado de eritrocitos cubriendo el pocillo, mientras que si no los contiene, los eritrocitos se depositan en la base del pocillo microtiter en U. Las reacciones falsas positivas son posibles pero menos frecuentes que en las pruebas no treponémicas y se pueden producir en presencia de anticuerpos anti-eritrocitos, en enfermedades autoinmunes y en conectivopatías, entre otras. La prueba FTA ha dejado de usarse en muchos laboratorios debido a que es muy laboriosa.

En la mayoría de los laboratorios se emplean técnicas de EIA o CLIA, debido fundamentalmente a la automatización que se consigue con autoanalizadores que permiten ensayar números muy elevados de muestras, por lo que se han convertido en la prueba de cribado inicial. Detectan anticuerpos totales (IgG y IgM). La muestra a ensayar es suero. Tienen una elevada sensibilidad y especificidad.

f) Algoritmos diagnósticos (Figuras 2 y 3). En la mayoría de los laboratorios de cierto tamaño se emplea el denominado algoritmo reverso, que se inicia con una prueba treponémica automatizada, EIA o CLIA. El resultado negativo, en el contexto de cribado excluye la infección y en el contexto de un paciente con sospecha diagnóstica debe repetirse la extracción y el ensayo a las 6 semanas. El resultado positivo ocurre tanto en personas con enfermedad antigua correctamente tratada como en pacientes no tratados con enfermedad activa, siendo más sensible que las pruebas no treponémicas para detectar la sífilis de reciente adquisición. En poblaciones de baja prevalencia, detecta falsos positivos. Debe confirmarse con otra prueba treponémica distinta, y en muchos laboratorios se emplea la técnica de TPHA, que parece mejor en el caso de resultados discordantes que el FTA. Si la segunda prueba treponémica es también positiva, hay que realizar una prueba no treponémica para conocer el título basal que determina la actividad y frente al que se comparan los controles de tratamiento. Esta prueba no treponémica se puede realizar en una segunda muestra del paciente. Hay que emplear suero diluido y sin diluir para evitar el efecto prozona. Si la segunda prueba treponémica no es positiva, puede plantearse la confirmación con un inmunoblot IgG. El algoritmo reverso de los CDC emplea como segunda prueba el RPR mientras que el de los ECDC recomienda otra prueba treponémica, ambos algoritmos parecen tener la misma utilidad en poblaciones de baja prevalencia.

El denominado algoritmo tradicional fue empleado en la mayoría de los laboratorios antes de la aparición de pruebas automatizadas. Actualmente se sigue usando en laboratorios de pequeño tamaño y en ciertos países. Se inicia con una prueba no treponémica (RPR o VDRL) idealmente cuantificada. Sólo detecta sífilis activa. El resultado positivo se confirma con una prueba treponémica.

g) Las pruebas diagnósticas a pie del enfermo (POCT) deben de ser capaces de proporcionar el diagnóstico sin necesidad de equipamiento adicional (neveras, centrifugas o microscopios), y tienen especial relevancia en la estrategia de la OMS para la eliminación de la sífilis congénita y la transmisión vertical de sífilis y VIH. En la actualidad existen técnicas que detectan tanto anticuerpos treponémicos como no treponémicos que son útiles en el contexto de países y situaciones ca-

rentes de infraestructuras sanitarias, permitiendo de forma simultánea realizar el cribado e iniciar el tratamiento. No tienen sentido en nuestro entorno, en el que disponemos de laboratorios capaces de realizar diagnósticos mucho más precisos.

h) Neurosífilis. El examen del LCR debe realizarse cuando exista sospecha clínica neurológica, oftálmica u ótica, en la sífilis terciaria cardiovascular y gomas, y ante un fracaso terapéutico. La definición de neurosífilis asintomática depende de la valoración en el LCR de las proteínas, células y anticuerpos no treponémicos y treponémicos, sin que exista una definición de consenso. La valoración del LCR en pacientes asintomáticos podría estar indicada en 3 situaciones: pacientes VIH con sífilis tardía y $CD4 \leq 350/mm^3$ y/o títulos en suero de VDRL/RPR $>1:32$; en caso de fracaso serológico y en caso de tratamiento alternativo (tetraciclinas) durante una sífilis tardía. La serología del LCR debe valorarse junto con la clínica, y sirve para apoyar el diagnóstico clínico, puesto que el diagnóstico de certeza es histológico. Es muy importante que la muestra no esté contaminada con sangre. La técnica de elección es el VDRL, pues es más sensible (se calcula que es sensible en un 40% de los casos) que el RPR, pero aun así, ambos son poco sensibles, por lo que un resultado negativo no excluye neurosífilis (falsos negativos). Un resultado positivo en ausencia de contaminación hemática se considera indicativo de neurosífilis en una sífilis tardía, pero en una sífilis precoz (<1 año) el significado no está tan claro. El resultado negativo de una prueba treponémica (idealmente FTA) en LCR hace muy improbable una neurosífilis, aunque no excluye el diagnóstico. Por el contrario, el resultado positivo puede tener problemas de especificidad por la presencia de anticuerpos en LCR como consecuencia de alteraciones en la barrera hematoencefálica en el contexto de procesos que nada tengan que ver con la sífilis. Por último, tampoco las técnicas de PCR son aquí de gran ayuda debido a su baja sensibilidad y especificidad en esta muestra, aunque al no haber un patrón oro se cree que la sensibilidad de la PCR está infraestimada pero no es el test adecuado para esta condición.

i) Control de tratamiento. El objetivo es detectar posibles reinfecciones o fallos en el tratamiento. En el caso de una sífilis primaria o secundaria, se recomienda realizar una evaluación serológica

a los 3, 6 y 12 meses. El título debería de caer 4 veces (dos diluciones) en 6 meses. Pero hasta en un 20% de los pacientes tratados no se logra esta reducción en el título hasta pasado un año, y algunos pacientes permanecen con títulos bajos y estables (serofast). Si no se objetiva una disminución de cuatro veces el título inicial a los 12 meses, estaría indicado el examen del LCR. La negativización de las pruebas no treponémicas después del tratamiento se considera el mejor test de curación. Las pruebas treponémicas pueden permanecer positivas de por vida.

En el caso de una sífilis latente, puede no producirse la respuesta serológica no treponémica.

Se considera fracaso terapéutico o reinfección si la sintomatología primaria o secundaria permanece o reaparece a las dos semanas del tratamiento, y si se objetiva un incremento de dos diluciones del título de anticuerpos no treponémicos. En estos casos se debe evaluar el LCR para descartar neurolúes y poder así decidir la pauta de tratamiento más adecuada.

Tabla 6. Fases de la sífilis y sensibilidad de las pruebas diagnósticas

Fase	Duración	Sensibilidad pruebas serológicas (%)					Comentario
		VDRL	RPR	EIA / CLIA*	TPHA	FTA	
Incubación	10-90 días (media 21)	-	-	-	-	-	Periodo entre el contacto y el chancro.
Primaria	3-8 semanas	78	86	97	76	84	Chancro en el lugar de la infección. Resolución espontánea.
Secundaria	3-12 semanas	100	100	100	100	100	Un 25% de los no tratados desarrolla signos a las 4-10 semanas de aparecer el chancro.
Latencia temprana	1 ^{er} año	95	98	100	100	100	Serología positiva sin evidencia clínica.
Latencia tardía y terciaria	> 1 ^{er} año o duración indeterminada	71	73	94	94	96	La diferenciación en un año es arbitraria. 1 año es criterio de IUSTI**.

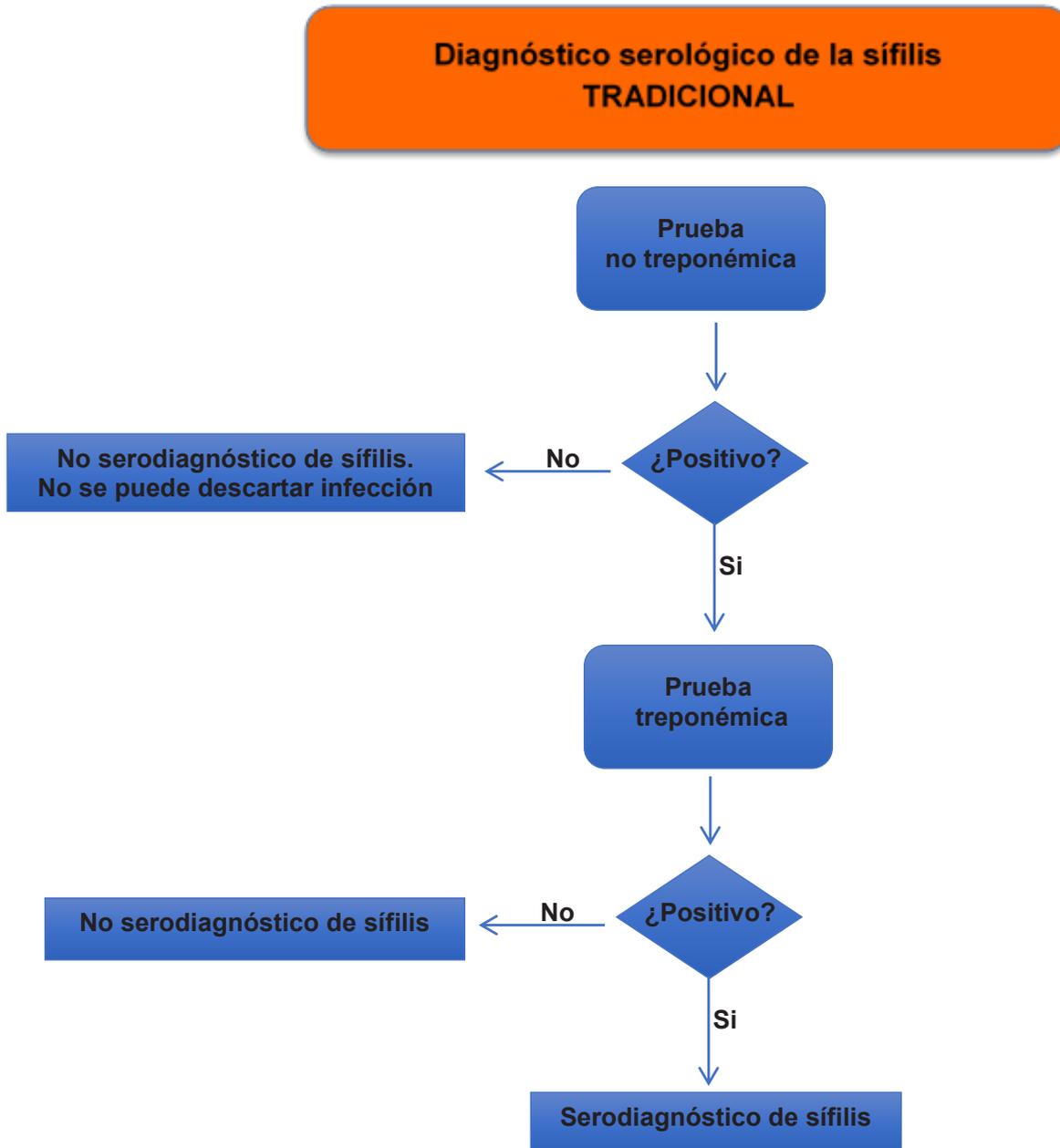
* La sensibilidad puede variar en función del ensayo comercial utilizado.

**International Union against Sexually Transmitted Infection.

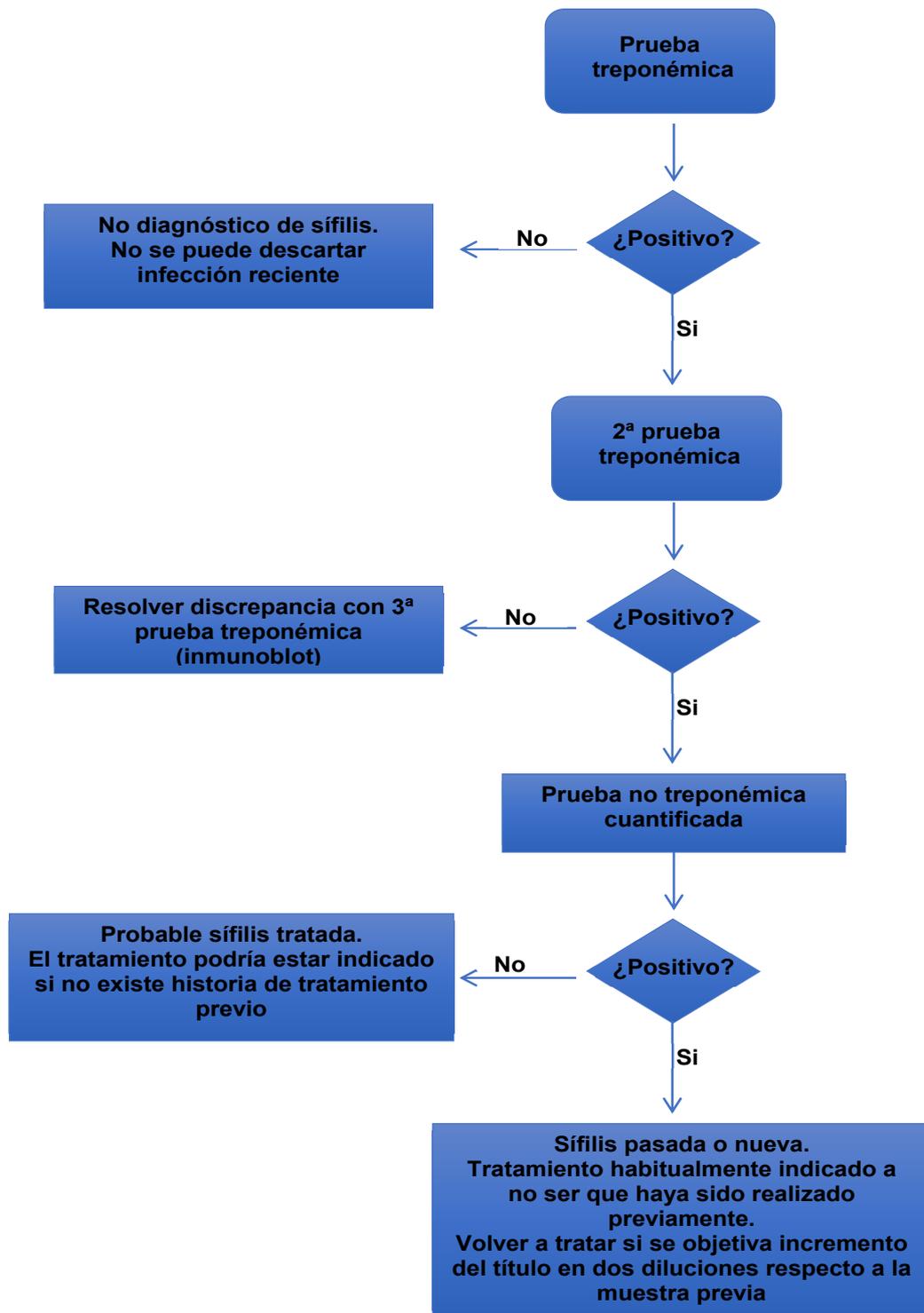
Tabla 7. Falsos positivos de las pruebas diagnósticas de la sífilis

Prueba		Falsos positivos
No treponémicas		
(a títulos bajos)	Permanecen <6 meses	Activación policlonal transitoria de linfocitos B Vacunaciones Hepatitis A Hepatitis B Hepatitis C Sarampión Virus Epstein Barr Varicela <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Paludismo Infecciones del tracto respiratorio superior Infarto agudo de miocardio reciente Gestación
(títulos bajos o elevados)	Permanecen >6 meses	Fiebre reumática Daño tisular crónico Adicción a drogas intravenosas Edad extrema Leucemia Linfoma Mieloma múltiple Lupus eritematoso sistémico Gammapatías Diabetes Síndrome anti-fosfolípidos Reacciones alérgicas graves Lepra Hepatitis crónica Infección VIH
Treponémica		Fiebre reumática Lupus eritematoso Adicción a drogas intravenosas Diabetes Edad extrema Gestación Enfermedad de Lyme (FTA)

Figuras 2 y 3. Algoritmos diagnósticos de la sífilis.



Diagnóstico serológico de la sífilis REVERSO



5.3.6. Donovanosis

Infección producida por *Klebsiella granulomatis* (anteriormente denominado *Calymmatobacterium granulomatis*).

El diagnóstico se realiza mediante:

a) Microscopía directa del raspado, torunda o impronta de las lesiones: ver los cuerpos de Donovan con tinción de Giemsa, Leishman, Wright o Warthin-Starry. Es el método más rápido y fiable. Rotar una torunda firmemente por la úlcera y después rotar en la superficie de un portaobjetos. El uso previo de antibióticos hace difícil el diagnóstico. Baja a moderada sensibilidad.

b) Biopsias: mejor en casos atípicos, crónicos y para excluir procesos tumorales, viendo los cuerpos de Donovan teñidos con Giemsa o plata. Se obtiene una biopsia (en sacabocados) de la lesión y preferiblemente se debe fijar con formalina. Requiere personal entrenado debido a que los cuerpos de Donovan pueden ser escasos. Moderada a baja sensibilidad.

Cuerpos de Donovan: inclusiones de bacilos bipolares con aspecto de imperdible y potencial cápsula en 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 1–2 µm y pueden estar encapsulados o carecer de cápsula.

c) Tinción de Papanicolau: puede ser útil en zonas endémicas.

d) 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.

e) Cultivo: difícil y laborioso por lo que no se realiza de forma rutinaria. Puede cultivarse en sistemas de cocultivo con monocitos y más fácilmente usando un medio de cultivo para *Chlamydia* spp. modificado, pero su rendimiento no es adecuado. Se puede hacer en monocapas de células HEP-2 con medio de RPMI (suplementado con suero fetal bovino, NaHCO₃, vancomicina y penicilina).

f) Molecular: ningún método molecular está

aprobado por la FDA. 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*.

g) Serología: no tiene valor

5.3.7. Chancroide

Infección causada por *Haemophilus ducreyi*.

El diagnóstico se realiza mediante:

a) Clínico: la precisión diagnóstica sólo es del 30-80% y hay úlceras genitales mixtas con otros patógenos.

b) Microscopia: útil cuando hay una gran carga de microorganismos en forma de vagones de tren o encadenados o de bandada de peces. Su S es baja 5-63% y su E 51-99%. Puede dar falsos positivos. No se recomienda para su diagnóstico.

c) Cultivo: técnicamente difícil y en las mejores condiciones tiene una sensibilidad del 75-80% (III, B). Es el patrón oro, pero es menos sensible que la PCR. Se debe recoger la muestra limpiando previamente con salino fisiológico estéril y luego usar una torunda de alginato cálcico, dacrón o algodón (ninguna parece ser mejor que otra) de la úlcera. Se toma material de la base de la úlcera o de los bordes después de eliminar el pus superficial con una torunda de algodón. *H. ducreyi* sobrevive de 2 a 4 horas en la torunda si se mantiene a 4°C. Un método alternativo es colocar la torunda en un medio como el de Amies o Amies con carbón activado y enviarla lo antes posible al laboratorio (antes de las 4 h). Otro medio de transporte es medio de tioglicolato con hemina. Para bubones se recoge con aguja y jeringa aspirando el material purulento desde una zona de tejido normal para reducir la contaminación. La recuperación de HD es menor de bubones intactos que de la base de la úlcera o de bubones abiertos. Lo ideal es inocular la muestra directamente. No parece una ventaja usar el medio de transporte comparado con la inoculación directa, en dos medios de cultivo al lado del paciente. Lo ideal es un medio bifásico debido a que las cepas difieren en su capacidad de crecimiento: agar gonococo suplementado con 2% de hemoglobina bovina y 5% de suero bovino y suplementado con 1% de IsovitaleX (ya no está disponible el

medio CVA comercializado por Gibco Lab), 3 μ /mL de vancomicina para prevenir el crecimiento de grampositivos, y el segundo agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo lisada al 5%, 1% de Isovitalax y 3 μ /mL de vancomicina. Una modificación igualmente eficaz es sustituir el suero bovino fetal por carbón activado al 0,2% que es más barato. Algunas cepas de HD son sensibles a la vancomicina pero se prefiere, a pesar de ello, incluirla en los medios. Los medios se incuban en 5% CO₂ a temperatura de 33-35°C (es crítico que no supere los 35°C) y en ambiente húmedo un mínimo de 72 h. El aislamiento mejora si se pone en condiciones de microaerofilia (en una jarra de anaerobiosis sin catalizador pero con dos sobres generadores de CO₂ y H₂). Debido a que el laboratorio no dispone habitualmente de estos medios, los clínicos deben preguntar si es posible prepararlos en 2-3 h.

H. ducreyi es un microorganismo asacarolítico y no se identifica bioquímicamente de forma fácil en el laboratorio. Sus colonias son tostadas o color canela y amarillentas autoadherentes y se pueden empujar enteras sobre la superficie del agar. Son oxidasa positiva, catalasa negativa y requieren el factor nutricional X (hemina) para crecer (mediante el test de la porfirina positiva) y no requieren NAD (factor V). Actualmente la identificación se puede realizar mediante MALDI-TOF.

Los controles de calidad con cepas de HD enviadas a los laboratorios tienen valor limitado debido a que los aislados de laboratorio están más adaptados al crecimiento que aislados frescos. El procesamiento de estos controles debe realizarse en paralelo junto con las muestras problema en medios preparados en el momento. Si esto no es posible, se deben procesar mediante PCR.

d) Inmunofluorescencia (detección de antígenos): es una técnica con mayor sensibilidad que el cultivo y útil en zonas de alta prevalencia que utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la OMP (proteína de membrana externa de 29 KDa) o también mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales frente a los lipooligosacáridos (LOS).

e) PCR: puede haber inhibidores en las muestras de las úlceras y puede ser necesario un paso previo, que es muy laborioso, con extracción fenol-cloroformo, para realizar una PCR múltiple. La

muestra se puede enviar en un recipiente estéril seco, y si el envío al laboratorio se demora, se congelará la muestra a -70°C. No se requiere ningún medio de transporte específico a no ser que lo indique el método comercial de PCR. Hay PCRs caseras y algunas comerciales como una PCR múltiple para HD, TP y HS (III, B) y otras no bien validadas todavía. La S de la PCR es del 95%.

f) Serología: enzimoimmunoensayo (usando antígeno de células enteras sonicadas, o LOS u OMP. No es útil para el diagnóstico, la respuesta es lenta y da reacciones cruzadas con otras especies de *Haemophilus*. Se utilizan en estudios epidemiológicos. La S es del 55-100% y la E 23-96%.

g) Biopsia de tejido: no es diagnóstico, podría ser útil para diagnosticar úlceras atípicas.

h) Antibiograma: se puede realizar por dilución en agar o mediante tiras en gradiente (Etest) pero no se realiza de rutina debido a que no hay métodos estandarizados ni criterios interpretativos.

i) Los *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) debido a la dificultad diagnóstica han propuesto el diagnóstico probable si un paciente tiene úlceras dolorosas genitales y se ha excluido sífilis y herpes (IV, C).

j) No se recomienda realizar el test de curación.

5.3.8. Herpes genital y otras lesiones por el grupo herpes

a) Estudios virológicos. La confirmación en todos los pacientes con sospecha clínica de herpes genital, debe realizarse utilizando métodos diagnósticos que detecten directamente el virus en las muestras genitales (Ib, A).

Las muestras adecuadas para el estudio virológicos son variadas e incluyen principalmente raspados de vesículas cutáneas, exudados de úlceras genitales o de mucosa rectal en el caso de proctitis (Ib, A). En ausencia de lesiones externas: exudado uretral (hombre), exudado cervical o uretra (mujer), orina (hombres y mujeres), exudado vulvar/vaginal (niñas prepúberes) y exudado vaginal (mujeres con histerectomía). En general los mejores resultados se obtienen a partir de lesiones vesiculares, aunque las lesiones primarias producen mejores resultados que las recurrentes.

La detección molecular del VHS mediante PCR en tiempo real (qPCR) actualmente se considera el método de diagnóstico de elección (Ib, A). Las distintas variantes de qPCR permiten simultáneamente la detección y el tipado del VHS en un solo paso en base al análisis de las diferentes temperaturas de fusión de los amplicones específicos de VHS-1 y 2. En comparación con el cultivo celular, es más sensible y específica (Ib, A) y aumenta los porcentajes de detección de VHS en muestras mucocutáneas en un 11-71%.

Actualmente el diagnóstico molecular del herpes molecular tiene dos enfoques, el primero dirigido por la clínica con el empleo de qPCR (hay más de 15 equipos comerciales con marcado CE-IDV) o una aproximación sindrómica en el contexto del diagnóstico de la úlcera genital (dado que el virus herpes simplex sólo es responsable del 50-80% de los casos de los casos de úlcera genital) mediante qPCR multiplex donde además del diagnóstico de la infección por el VHS se incluyen formatos de qPCR dúplex y triplex (incluso protocolos que involucran hasta 5 dianas moleculares) con el objetivo de incluir en el diagnóstico diferencial otros microorganismos como HD, CT serovar L, TP o VVZ.

El cultivo celular actualmente no se considera el método de referencia para el diagnóstico del VHS, aunque todavía se usa en algunos centros. 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. En ocasiones, puede requerirse cultivo celular para determinar la sensibilidad antiviral y generar suficientes virus para estudios de transmisión.

El estudio de resistencia a los antivirales, se enmarca dentro del concepto de fracaso del tratamiento clínico y se define como la falta de respuesta al tratamiento antiviral (generalmente aciclovir/valaciclovir) después de 10 días. En tales casos, debe sospecharse infección por una cepa de VHS resistente y realizar pruebas de resistencia fenotípica y/o genotípica. La ventaja principal de la genotipificación es que se realiza directamente sobre la muestra del paciente, lo que hace innecesario el aislamiento del virus en cultivo celular. Dependiendo de la carga de virus, los resultados pueden estar disponibles en menos de dos días, lo cual es muy importante para la toma de decisiones clínicas. Las pruebas de resistencia genotípica generalmente implican la amplificación y secuenciación de los genes de la timidina-kinasa (TK) y ADN polimerasa y su comparación con cepas de referencia sensibles (generalmente HSV-1 X14112 y HSV-2 HG52 Z86099). La resistencia a aciclovir/valaciclovir/famciclovir casi siempre se asocia con mutaciones no sinónimas en el gen TK y menos frecuentemente en el gen de la ADN polimerasa.

No se recomiendan los métodos de detección de antígenos virales, como el análisis de inmunofluorescencia directa, el inmunoensayo enzimático y la tinción de Tzanck y Papanicolaou, excepto en entornos de recursos extremadamente limitados (Ib, A).

b) Serología tipo-específica: los estudios serológicos no se recomiendan de forma rutinaria para el diagnóstico en pacientes asintomáticos (IV, C) pero pueden ser útiles en casos de enfermedad genital recurrente cuando los métodos de detección directa de virus han sido negativos (III, B) y para las parejas sexuales de pacientes con herpes genital (sobre todo gestantes), ya que las parejas sero-discordantes pueden recibir consejo sobre estrategias para reducir el riesgo de infección (Ib, A).

Aunque las técnicas de western-blot o inmuno-blot son las pruebas serológicas de elección (sensibilidad 97% y especificidad >98%), no se utilizan de rutina al ser complejas en su realización y no existir oferta de equipos comerciales. Debido a lo anterior, el diagnóstico serológico está basado en el empleo de técnicas de enzimo-inmunoensayo capaces de detectar anticuerpos tipo-específicos IgG frente a las glucoproteínas gG1 y gG2 (III, B). Las pruebas de IgM no se recomiendan en el diagnós-

tico de rutina y los estudios de aivez generalmente no están disponibles de forma comercial. Dado que los equipos comerciales tienen una sensibilidad muy diferente para VHS-2 y VHS-1, las tasas de seroprevalencia del VHS, la presencia de factores de riesgo para el herpes genital y la historia clínica influyen en el valor predictivo positivo de la serología tipo-específica y deben guiar la interpretación de los resultados (III, B). Las especificidades de las pruebas ELISA pueden mejorarse elevando el valor del índice para interpretar la positividad de la prueba y comprobando los valores intermedios con una prueba confirmatoria alternativa (IIa, B).

Es necesario distinguir en genitales las lesiones por VHS de las producidas por VVZ, ya que generalmente son, en el último caso, reactivaciones del VVZ que recuerdan VHS y es importante su diferenciación debido a que el tratamiento antiviral requiere dosis más altas en el caso de VVZ, a la posibilidad de recurrencias y a la posibilidad en las reactivaciones de transmisión de una varicela por vía sexual en el caso de una pareja sin antecedentes de haberla pasado.

Además también se han observado lesiones ulcerativas por virus de Epstein-Barr.

5.3.9. Linfogranuloma venéreo

El diagnóstico del LGV se incluye en el apartado de *C. trachomatis*.

5.3.10. Vaginosis bacteriana y vaginitis aerobia

A. Vaginosis bacteriana (VB): el diagnóstico se establece fundamentalmente por los signos clínicos y las características del flujo vaginal, y puede confirmarse por criterios objetivos microscópicos en la tinción de Gram del exudado vaginal.

a) Los criterios clínicos de Amsel están basados en la presencia de tres de los siguientes síntomas o signos: a) flujo vaginal fino, homogéneo, blan-

co, 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 (células *clue*) en montajes en fresco (microscopio x40).

b) La tinción de Gram se considera actualmente el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de la VB, ya que presenta una sensibilidad del 62 al 100% y una especificidad del 79 al 100%. La tinción de Gram se evalúa con distintos criterios, por ejemplo, los de Hay/Ison o Nugent (Tabla 9), en los que se asignan distintos grados en función de la proporción relativa de bacilos grampositivos con morfología de *Lactobacillus* y de cocos y bacilos Gram- variables (como *GV*, *A. vaginae*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Peptostreptococcus* spp.) y de bacilos gramnegativos curvados (como *Mobiluncus* spp.) (Figura 4).

c) Por su baja sensibilidad y especificidad, la citología cervical teñida por el método de Papanicolaou carece de utilidad en el diagnóstico de la VB. Debido a la naturaleza microbiológica compleja de la VB y a la falta de un único microorganismo causante, no se recomienda realizar el cultivo de *GV*. La tinción de Gram y los nuevos ensayos de diagnóstico del microbioma vaginal son más específicos que el cultivo o las sondas de ADN para *GV*.

B. Vaginitis aerobia (VA): todavía no se ha investigado suficientemente la incidencia y la prevalencia de la VA y se desconoce la causa de esta. La VA se diferencia de la VB en que existe inflamación y presencia abundante de leucocitos en la vagina, de aquí su denominación de vaginitis. En cambio se asemeja a la VB en que es una disbacteriosis. Los síntomas incluyen inflamación, flujo amarillo y dispareunia vaginal. El pH vaginal suele incrementarse por encima de 6 y la prueba de KOH es negativa. Hay presencia de microbiota predominante como *E. coli*, *S. agalactiae* o *S. aureus* que presentan los criterios de Hay/Ison o los criterios AV de Donders (≥ 5).

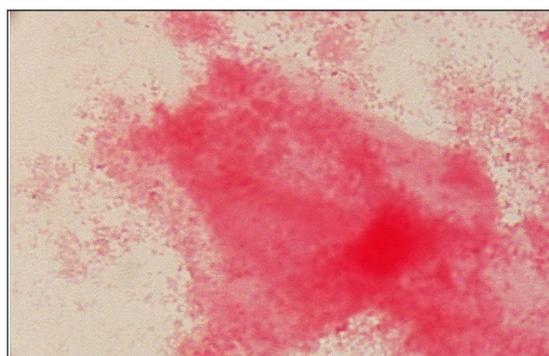
Tabla 8. Diagnóstico diferencial de las principales causas de vaginitis.

Vaginitis bacteriana	Candidiasis	Tricomoniasis
Aproximadamente 50% asintomáticas Exudado con olor a pescado	Sintomatología 10-20% asintomáticas Prurito Dolor vulvar Exudado vaginal sin olor Dispareunia Signos clínicos	10-50% asintomáticas Prurito Disuria Dolor en abdomen bajo (poco frecuente)
Secreción vaginal homogénea, delgada, de color blanquecino-grisáceo y que se adhiere a las paredes vaginales Ausencia de vaginitis	Eritema vulvar Fisuras vulvares Lesiones cutáneas satélite Edema vulvar	Eritema vulvar Vaginitis Exudado vaginal espumoso y amarillento

Tabla 9. Interpretación de la tinción de Gram según criterios de Nugent y de Hay/Ison

Criterios de Nugent		
Morfología	Recuento / campo inmersión	Puntuación
Bacilos grampositivos con morfología de <i>Lactobacillus</i>	>30	0
	5-30	1
	1-4	2
	<1	3
	0	4
Bacilos gramnegativos con morfología de <i>Gardnerella</i> y <i>Bacteroides</i>	>30	4
	5-30	3
	1-4	2
	<1	1
	0	0
Bacilos Gram-variables curvados	>5	2
	<1-4	1
	0	0
Interpretación: Puntuación 0-3 Normal; 4 – 6 Intermedio; 7 – 10 Vaginosis bacteriana		
Criterios de Hay/Ison		
Grado	Morfología	
1. Normal	Predominio de bacilos grampositivos con morfología de <i>Lactobacillus</i>	
2. Intermedio	Flora mixta con algún <i>Lactobacillus</i> y también bacilos gramnegativos tipo <i>Gardnerella</i> o <i>Mobiluncus</i>	
3. Vaginosis bacteriana	Predominio de <i>Gardnerella</i> y/o <i>Mobiluncus</i> . Pocos o ningún <i>Lactobacillus</i>	

Figura 4. Tinción de Gram de exudado vaginal mostrando las típicas células clave de vaginosis bacteriana



5.3.11. Candidiasis genital

La candidiasis genital afecta principalmente a mujeres en forma de candidiasis vulvovaginal, y ocasionalmente a hombres en forma de balanitis o balanopostitis. Un aspecto importante a considerar es que la candidiasis genital puede aparecer de forma concomitante a otras ITS.

La candidiasis vulvovaginal, es la segunda causa más común de vaginitis en mujeres en edad fértil y no suele tener la consideración de ITS, ya que las especies de *Candida* forman parte de la microbiota vaginal normal; sin embargo, se puede transmitir por esta vía. Los síntomas clínicos de la enfermedad son inespecíficos y pueden asociarse con otras enfermedades e infecciones vaginales. El prurito vulvar y la sensación de ardor son los síntomas característicos en la mayoría de las mujeres, a menudo acompañadas de dolor e irritación que conducen a dispareunia y disuria. La exploración, generalmente revela eritema vulvar y una secreción vaginal de color blanco y aspecto grumoso. Según su forma de presentación se clasifica no complicada (episodios sintomáticos únicos o infrecuentes) o complicada o recurrente (4 o más episodios en 12 meses).

En el hombre, la balanitis y la balanopostitis pueden adquirirse a través del contacto sexual directo con parejas que presentan candidiasis vulvovaginal y por tanto tienen consideración de ITS. Los signos y síntomas clínicos son inespecíficos en muchas ocasiones, aunque los pacientes generalmente refieren ardor local y prurito, y la exploración muestra vesículas en el glande que luego se desarrollan en parches de exudado blanquecino.

La candidiasis genital, está producida principalmente por *Candida albicans* aunque otras especies del género *Candida* aparecen en el 10–20% de los pacientes con candidiasis genital recurrente. *Candida glabrata* es la especie *no-albicans* predominante en la candidiasis genital junto a *C. albicans*.

a) Aunque el diagnóstico de la candidiasis genital puede realizarse de forma sindrómica, la microscopía y el cultivo en medios selectivos (agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol-gentamicina) (Figura 5) son el estándar diagnóstico en pacientes sintomáticos aunque la sensibilidad y especificidad de la microscopía es aproximadamente del 60-70% en comparación con las técnicas de cultivo.

La diferenciación entre especies *albicans/no-albicans* es aconsejable en la candidiasis genital no complicada y obligatoria si se sospecha la presencia de una candidiasis recurrente, aunque la evidencia (III, B) no lo aconseja en la no complicada. No obstante, actualmente es fácil la diferenciación de especies mediante MALDI-TOF.

La especiación a partir del cultivo se puede realizar mediante pruebas de fermentación o asimilación de carbohidratos o, como se ha indicado anteriormente, mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). El uso de medios cromogénicos permite la diferenciación de las principales especies de *Candida* manteniendo la sensibilidad respecto al cultivo en medio de Sabouraud, aunque algunos estudios encuentran una disminución de aproximadamente un 10% en la sensibilidad del medio cromogénico cuando se emplea este enfoque.

b) Con independencia de lo anterior, existen aproximaciones moleculares a la detección y especiación de especies de *Candida* directamente en muestras genitales. Las sondas de hibridación de ADN presentan sensibilidades similares al cultivo. Las TAAN, aunque no muy implantadas en la actualidad, muestran un aumento moderado en la sensibilidad respecto al cultivo y es probable que reemplacen a las sondas de hibridación de ADN.

c) No está aconsejado el estudio de sensibilidad a los antifúngicos de forma rutinaria para el manejo de la candidiasis genital, de forma que en la candidiasis recurrente el tratamiento está dirigido por la especie de *Candida* aislada.

Figura 5. Agar Sabouraud con crecimiento de *Candida* spp.



5.3.12. Tricomoniasis

El diagnóstico de la infección por *Trichomonas vaginalis* se realiza mediante:

a) Microscopia:

- Examen en fresco: es de fácil realización, rapidez y bajo coste, pero presenta una escasa sensibilidad (entre el 44-68%) dependiendo del observador, aunque tiene una especificidad del 98%, la temperatura por debajo de 22°C y el retraso en la observación de 10-30 minutos disminuye la sensibilidad drásticamente. 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 primero a 100x y después a 400x para confirmar. El uso de solución de salino- glucosa a pH 6,0 preserva los trofozoitos hasta 6 horas.

- Tinciones: se usan varias como tinción de Gram, Giemsa, naranja de acridina o Papanicolau, pero su sensibilidad es baja en comparación con los métodos moleculares. La tinción de Papanicolau con tecnología líquida aumenta la sensibilidad a 60-96% y la E al 98-100% pero el valor predictivo positivo es bajo en sitios con baja prevalencia.

b) Cultivo (IIB, B): requiere numerosos nutrientes en el medio como carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos, hierro y vitaminas. Se realiza en los caldos de Roiron y de Diamond. 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. En mujeres es positivo en los 3 primeros días, pero en hombres requiere más días de incubación. Actualmente ya no es el método de elección al tener una sensibilidad del 44-75% en mujeres y del 40-56% en hombres frente a la PCR. En varones el cultivo puede infraestimar el número de pacientes con tricomoniasis, y es mayor su S en orina que en muestra uretral. Si se realiza exclusivamente cultivo de orina o de exudado uretral se diagnostican el 67% de los casos, con lo que es mejor combinar el sedimento de orina y la torunda uretral (III, B). En mujeres sirven las torundas del fornix posterior, torundas vaginales tomadas por el propio paciente o la orina (II, B). 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 del modo siguiente:

- 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.

Si se utiliza orina para cultivo debe procesarse en 30 minutos y mantener mientras tanto a 37°C para que no haya pérdida de viabilidad. En el caso de la PCR, se debe congelar a las 2h si está a 37°C y en 1 hora si se ha mantenido a temperatura ambiente. 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 e incubación. El medio InPouch TV test, tiene la ventaja de aumentar la viabilidad del protozoo hasta 21 días y presenta una estabilidad a temperatura ambiente de hasta 6 meses. Se revisa la presencia de TV en la cámara superior de la bolsa. Puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 48 h antes de mantenerse a 37°C.

c) Pruebas rápidas: sondas genéticas comerciales (Affirm VP III, Becton-Dickinson) (aprobado FDA y CE pero considerado de complejidad moderada) que detectan la presencia de *Candida* spp., GV y TV en muestras vaginales con una sensibilidad y especificidad para TV del 83% y 100% respectivamente en comparación con el cultivo y el examen en fresco. Además, poseen la ventaja de ofrecer un resultado fiable a los 45 minutos-1 hora.

d) POCT: inmunocromatografía de flujo capilar (OSOM *Trichomonas* rapid test. Genzyme Diagn.) (aprobado por la FDA) en 30 minutos, y el XenoS-trip-Tv (Xenotope Diagnostic), TV latex *agglutination* test de Kalon en 10 minutos (no aprobado por la FDA y CE). La S de estos métodos es del 40-95% y la E del 92-100%. La S baja en poblaciones con baja prevalencia y puede haber falsos positivos, por lo que es necesario confirmar el resultado de estas pruebas.

e) TAAN (IIB, B): es la técnica de elección. Presenta una sensibilidad del 70% en algunos estudios pero

no se utiliza 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 mejora la precisión y elimina la necesidad de un procesamiento postamplificación y ofrece una sensibilidad del 90,1% y una especificidad del 100%. La detección en el primer chorro de orina aumenta la sensibilidad tanto en hombres como en mujeres. También se ha desarrollado una amplificación isotérmica (LAMP) casera. En general, la PCR no está aprobada por la FDA para varones (excepto la de algunas compañías de diagnóstico) mientras que, si lo están para orina, vaginal y endocervical en mujeres. La sensibilidad de la PCR es del 89-98% y en general mejora el rendimiento si se combina la toma de varias muestras como orina, uretra y pene. Existen actualmente formatos de detección combinados con otros patógenos.

La estabilidad del ADN de TV para PCR es mayor (hasta 30 días) cuando la muestra se mantiene a 4°C (sólo es estable 3 días sin medio conservante). A temperatura ambiente también se mantiene 30 días con conservante siempre que éste se añada en la primera hora después de la recogida de la muestra.

f) Test de curación: deben ser negativos tras 2 semanas, y sólo están recomendados si persisten síntomas o si hay recurrencias (IV, C). Como actualmente se realiza el diagnóstico con PCR, esta es la técnica que se utilizarían para realizar el test de curación.

g) La precisión de las pruebas ofrecidas a través de internet es variable. En varones la recogida por el propio paciente es mejor cuando se realiza con torunda a partir de exudado de pene que con una muestra de orina.

h) Nuevos métodos: hay técnicas de PCR basadas en *beacon* con *primers* frente al gen *pfoB* en torundas endocervicales secas (detecta 3-4 TV/ mL). Los sistemas comercializados son el *Presto(plus) Assay* y el *TIB MOLBIOL LightMix Kit Trichomonas vaginalis Assay* sobre torundas secas.

i) Tipificación: RFLP del gen de la actina y detección de virus de *Trichomonas* (Familia *Totiviridae*, género *Trichomonasvirus*), de difícil realización. El más robusto es el MSLT que requiere cultivo de la muestra para tener suficiente carga de ADN, aunque la realización de una PCR anillada elimina este

problema. Hay dos genotipos, el genotipo I es el más frecuentemente infectado por virus y el tipo II asociado a resistencia a metronidazol.

j) Serodiagnóstico: los antígenos lisados tienen mayor sensibilidad y especificidad que la α -actinina para ELISA. No se utiliza para el diagnóstico.

5.3.13. Papilomavirus humanos (verrugas genitales) (VPH)

El diagnóstico de las verrugas genitales en el paciente inmunocompetente es fundamentalmente clínico ya que las lesiones son suficientemente características y 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, ureteroscopia o anoscopio puede ser útil en algunas situaciones, pero no es necesario en la práctica clínica rutinaria.

La biopsia simple (con estudio histopatológico y molecular) puede ser necesaria como apoyo diagnóstico y debe ser considerada en las siguientes circunstancias:

a) Presencia de lesiones atípicas (lesiones pigmentadas, induradas, adheridas al tejido subyacente, hemorrágicas o ulceradas).

b) Lesiones en pacientes inmunodeprimidos (incluidos los infectados con el VIH).

c) Lesiones que no responden o empeoran durante el tratamiento estándar.

En estos casos, el diagnóstico microbiológico de las infecciones por VPH, se realiza por los mismos métodos moleculares utilizados en el cribado del carcinoma de cérvix.

Con independencia de lo anterior, es necesario explorar a las mujeres con verrugas anogenitales para descartar la presencia de lesiones a nivel del cérvix mediante citología, técnicas moleculares y colposcopia debido al riesgo de desarrollo de neoplasia cervical. Este estudio debería realizarse en base a lo especificado el procedimiento SEIMC para el estudio del VPH en muestras genitales.

(<https://www.seimc.org/contenidos/documentos-cientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia57.pdf>)

5.3.14. Proctocolitis por patógenos entéricos

La observación de leucocitos PMNs mediante tinción de Gram del exudado anorectal es una herramienta útil y rápida. A todos los pacientes con factores de riesgo se les deberían realizar las pruebas adecuadas para detección de NG, CT (y LGV si CT positivo), VHS y TP, ya que son los principales causantes de proctitis. Ante la sospecha de una proctocolitis causada por enteropatógenos, el coprocultivo es el método adecuado para el aislamiento de *Shigella* spp., *Salmonella* spp. o *Campylobacter* spp. Las pruebas moleculares para la detección de estos patógenos cada vez son más utilizados ya que presentan mayor sensibilidad que el cultivo.

5.3.15. Proctocolitis por protozoos

La detección de estos patógenos por métodos convencionales o por PCR se describe en otros procedimientos de la SEIMC (ver Procedimientos SEIMC nº 30; 2008 y nº 35; 2009).

5.3.16. Otros patógenos y cuadros clínicos

(Ver también Anexo I. Algoritmos diagnósticos)

a) Balanopostitis: cultivo subprepuccial de *Candida* spp., *S. pyogenes*, *S. aureus*, GV y anaerobios, PCR para TV y VHS y serología para sífilis.

b) Bartolinitis: cultivo y PCR del pus.

c) Ectoparásitos:

- *P. pubis* (ladillas): visualización del parásito y/o huevos y visualización al microscopio si es necesario

- *S. scabiei* (sarna): clínico, dermatoscopia, tomografía de coherencia óptica. Diagnóstico definitivo identificando los ácaros, huevos o material fecal (*scybala*) de los raspados cutáneos de los surcos mediante un escalpelo y poner en un porta con KOH al 10%. Alternativamente, se puede aplicar una gota de aceite mineral para sacar el ácaro a la superficie y después coger el aceite con el escalpelo y pasarlo a un porta. Un resultado negativo al microscopio no descarta la sarna. Otro método es aplicar tinta china negra o azul en las zonas sospechosas de tener surcos y luego lavar con alcohol para eliminar la tinta de la superficie. También se puede detectar el parásito mediante ELISA o PCR para detectar ADN del parásito.

d) EPI: búsqueda de microorganismos CT, NG, MG, TV y VIH, VB, enterobacterias y otros bacilos gram-negativos y cocos grampositivos

e) Epididimoorquitis: tinción de Gram/ azul de metileno de exudado uretral (mismos criterios que uretritis), cultivo convencional exudado uretral y TAAN de exudado uretral/ chorro de inicio de la micción.

f) Eskenitis: cultivo y PCR para NG, CT, VB y microbiota asociada.

g) Infecciones oculares (conjuntivitis): CT, NG y MG (algunas publicaciones lo encuentran también en esta localización, está en discusión).

h) *Molluscum contagiosum*: clínica, dermatoscopia y raramente biopsia en lesiones atípicas. La PCR casera no es de uso rutinario en los laboratorios.

i) Parásitos en semen que se conoce su transmisión sexual: *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* (animales), y *Toxoplasma gondii* (animales).

j) Proctitis: cultivo y PCR

k) Prostatitis: cultivo y PCR. Papel incierto en asociación con nanobacterias y presencia de UU

l) Uretritis no gonocócica: existe una gran diversidad de microbioma en la uretra y es variable de persona a persona. En el 35% de las UNG no se detecta ningún microorganismo de los considerados patógenos, por ello estudios caso-control ayudan a valorar distintos microorganismos que se encuentran en casos sintomáticos. Se ha visto que microorganismos de los géneros *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Comomonas*, *Escherichia*, *Paracoccus* y *Arthrobacter* son en general contaminantes. En la Tabla 10 se exponen algunos y su posible significado.

Las UNG por adenovirus pueden suponer hasta un 16% de las UNG no CT y producen disuria, meatitis y/o conjuntivitis. En menos del 40% se observan ≥ 5 PMNs y puede haber presencia de monocitos que orientan el diagnóstico.

Puede plantear diagnóstico diferencial la esquistosomiasis vesical que cursa con hemospermia o disuria.

Tabla 10. Otros microorganismos encontrados en uretritis y su posible significado

Microorganismo	Papel en UNG	Comentario
<i>Enterococcus</i>	Ninguno	Posible ITU con síntomas y signos de uretritis Posible transferencia en sexo rectal
<i>Finegoldia</i> (<i>Peptostreptococcus</i>)	Ninguno	Sólo refleja sexo vaginal sin protección
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Incierto	No claro si es transferencia pasiva desde vagina o verdadera colonización
<i>Haemophilus influenzae</i> y <i>H. parainfluenzae</i>	En algunos casos	Puede indicar sexo oral
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Incierto	
<i>Mycoplasma hominis</i>	Incierto	
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Ninguno	Se ha visto en pacientes VIH positivos
<i>Ureaplasma parvum</i>	Incierto	Alta carga bacteriana puede ser significativo de UNG crónica
<i>Pasteurella multocida</i>	Posible	Contactos sexuales con animales

l) Vaginitis: el papel de *Weeksella virosa* no se ha confirmado como de transmisión sexual.

m) Virus en semen que se conoce su transmisión sexual: virus Ebola-Marburg, GB C (antes denominado virus de la hepatitis G), hepatitis C y B, Zika, CMV, Epstein-Barr, herpes 8, herpes 1 y 2, VIH, virus linfoma células T humano 1.

n) Virus Ebola: al tratarse de un virus ARN de nivel 4, el diagnóstico de laboratorio requiere instalaciones de alto nivel de bioseguridad.

o) Virus hepatotropos emergentes asociados a transmisión sexual: la hepatitis C (VHC) no se transmite eficientemente a través del contacto sexual. Sin embargo, varios trabajos sugieren transmisión sexual del VHC en personas VIH+, ya que el virus puede encontrarse en mayor frecuencia en el semen de individuos VIH+ (37,8%) que en el de individuos VIH- (18,4%). La presencia de carga viral en semen tiene correlación con la carga viral en plasma ya que no parece que el virus se replique en leucocitos genitales. Con las nuevas estrategias diagnósticas y de tratamiento de la hepatitis C, el mayor riesgo de transmisión estaría asociado más a infección aguda especialmente HSH y VIH positivos.

Se recomienda el cribado serológico de VHC en la evaluación inicial de personas recientemente diagnosticadas de VIH, y este cribado debería realizar-

se al menos una vez al año o más frecuentemente dependiendo de circunstancias específicas (prácticas de riesgo con múltiples parejas, diagnóstico de otras ITS o alta incidencia local de VHC). En casos de sospecha de infección aguda se recomendaría un estudio de carga viral en plasma ya que el periodo de seroconversión es de 8-9 semanas, momento en que podría aumentar las probabilidades de transmisión. Sin embargo, el cribado en semen no está recomendado ya que la presencia en esta muestra es errática y dependiente de la carga viral en plasma.

Ante un diagnóstico de VIH o cualquier ITS, el cribado serológico debería incluir también VHB, ya que el riesgo de infección por VHB es mayor en personas que tienen sexo sin protección, múltiples parejas, antecedentes de ITS o HSH y usuarios de drogas. La mayor concentración de VHB es en sangre y aunque puede detectarse en semen, saliva o secreciones vaginales siempre es a baja concentración, por lo que no se recomienda el estudio de VHB en muestras genitales.

Para una mayor información sobre el diagnóstico de virus hepatotropos recomendamos la lectura del Procedimiento SEIMC nº 50 (2014).

p) Virus Zika: el diagnóstico se puede realizar por PCR en tiempo real o mediante estudio serológico. La elección de una estrategia diagnóstica u otra,

o incluso el tipo de muestra más conveniente está condicionada por el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. La detección molecular es específica y por tanto definitiva de un diagnóstico de infección por virus Zika; en cambio, la serología puede dar reacciones cruzadas con otros flavivirus, por lo que debe considerarse como caso sospechoso hasta confirmación, bien por otra técnica como el test de neutralización, seroconversión de IgG o incremento de 4 veces la IgG. El diagnóstico de confirmación de casos autóctonos debe realizarse en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid). Los tipos de muestras para el diagnóstico molecular del virus Zika son suero, orina o semen. El tiempo medio de eliminación del virus es menor en saliva, suero (1 semana), después en orina (2 semanas) y más prolongado en semen, donde además la viremia es más alta. Sin embargo, la serie publicada más amplia que analiza el aclaramiento del virus revela que en orina se aclara antes que en suero (8 *versus* 14 días). La presencia del virus Zika puede detectarse también en otras localizaciones, como saliva o exudado vaginal, pero el rendimiento es muy pobre.

q) **Vulvitis:** búsqueda fundamentalmente de TP, VHS y *Candida* spp.

5.3.17. ITS en niños

La detección de una ITS en niños prepuberales o un adolescente no sexualmente activo puede ser evidencia de abuso sexual. La prevalencia de ITS entre los niños que sufren un abuso sexual es de aproximadamente 5-8%. Sin embargo, la prevalencia puede variar según los hallazgos de la exploración, el entorno social y el agente infeccioso.

La decisión de realizar un estudio de ITS a un niño con sospecha de abuso sexual debe realizarse de forma individualizada y debería plantearse si los padres lo solicitan o concurren las siguientes circunstancias: presencia de signos o síntomas de ITS, la existencia de una ITS en hermanos u otros niños de su ambiente social, la sospecha de que el abusador tiene una ITS o alta probabilidad de padecerla y la evidencia de penetración genital.

Dependiendo de la sospecha del microorganismo causante de la posible ITS, las muestras que deberían ser tenidas en consideración son las mismas que en adultos, con la excepción de que en las niñas, no se realizan habitualmente tomas endocervicales, sino tomas de muestra vulvar y vaginal con torunda.

Sin embargo, existen peculiaridades diagnósticas de las ITS en los niños prepuberales, respecto al tiempo de los estudios, métodos a emplear y significado de las positividades de los estudios:

a) Los niños con sospecha de abuso sexual, pueden acudir a urgencias o ser evaluados semanas o meses después del abuso y esto influye en el abordaje de estudio de las posibles ITS.

b) Es importante considerar el periodo de incubación de las distintas infecciones a la hora de plantear el estudio microbiológico. Los estudios microbiológicos de NG, CT y TV, deberían realizarse dos semanas después del incidente y siempre y cuando no se haya instaurado tratamiento antibiótico profiláctico en la evaluación inicial. El estudio serológico del VIH debería plantearse a distintos tiempos: en el momento de la consulta, y, a las 6, 12 y 24 semanas posteriores.

c) No hay un consenso respecto al empleo de TAANs frente al cultivo. En general, se aceptan las TAANs en orina y muestras vaginales para CT y NG en niñas prepúberes. Sin embargo, no hay estudios que avalen el uso de estas técnicas en muestras de orina en niños prepúberes, ni en localizaciones extragenitales como el recto y faringe en niñas y niños. No existe tampoco evidencia suficiente para recomendar el uso de TAANs en el diagnóstico de TV en niños prepúberes.

d) La importancia de la positividad de una prueba en la evaluación del abuso sexual infantil varía según el microorganismo detectado. Las que son específicas de contacto sexual incluyen: infección por NG y TP, y en el caso del virus VIH o TV siempre que se haya excluido la adquisición perinatal. El resto: VHS, verrugas genitales, y CT, se consideran ITS menos específicas en el contexto del abuso sexual al poseer otras formas de infección.

e) Debido a las implicaciones médico legales se recomienda que todas las muestras positivas por TAANs sean conservadas adecuadamente en el laboratorio por si fueran necesarias nuevas determinaciones. Lesiones genitales que recuerden VHS se confirmará que no sea VVZ con presentación atípica.

f) Respecto a MG, otros micoplasmas y *Molluscum contagiosum*, no hay evidencia para su interpretación en niños y solo deberían ser consideradas si hay otros indicadores de abuso sexual.

6. INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Microscopía

Examen en fresco

- Informar la presencia o ausencia de leucocitos, levaduras o trofozoitos de TV.

Tinción de Gram

- Informar la presencia o ausencia de levaduras, leucocitos y la presencia o ausencia de diplococos Gram-negativos intracelulares.
- Informar la presencia o ausencia de células clave o si la microscopía sugiere VB en base a los criterios de Nugent o de Hay/Ison.

B) Cultivo

- Informar el aislamiento de microorganismos clínicamente significativos, en su defecto informar el no aislamiento de microorganismos específicos (por ejemplo, NG) o microbiota normal (no debe informarse la ausencia de NG en muestras vaginales ya que no es la muestra de elección).

C) Sensibilidad antibiótica

- Informar la sensibilidad antibiótica en base a criterios EUCAST o CLSI.

D) Métodos moleculares

- Informar los resultados de las pruebas en base a lo siguiente:
 - Detectado: para un resultado reactivo confirmado de la prueba.
 - No detectado. para un resultado no reactivo de la prueba.
 - Indeterminado: cuando un resultado reactivo no puede ser confirmado.
 - Inhibitorio: cuando la presencia de inhibidores dentro de la muestra impide la amplificación por TAAN.

Antes de la validación definitiva de los informes, habría que considerar una serie de aspectos que podrían acompañar al informe en forma de comentarios:

- Las muestras rectales, la orina de mujeres embarazadas y la orina de mujeres en la tercera semana después de la menstruación pueden contener altos niveles de inhibidores (es probable que las hormonas desempeñen un papel en esta inhibición) y por esto inhibir el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, lo que puede causar resultados falsos negativos. Por lo tanto, se recomienda verificar que existe un control de inhibición en las pruebas (aunque muchos de los sistemas comerciales actuales pueden eliminar sustancias inhibidoras durante el proceso de extracción). Lo anterior, podría afectar a la sensibilidad de la prueba y debería indicarse.

- Aunque la detección de NG por TAAN es más sensible que el cultivo, el cultivo permite la identificación confirmatoria y el estudio de la sensibilidad antibiótica. Por ello, se debería recomendar realizar un cultivo en todos los casos de positividad mediante TAAN.

- La detección del VHS mediante cultivo presenta una sensibilidad menor que las pruebas de TAAN si las vesículas o úlceras están en fase de cicatrización.

- Las pruebas de TAAN en el caso de MG, pueden presentar problemas de sensibilidad en algunos equipos comerciales debido a que son infecciones de baja carga bacteriana.

- Las pruebas de TAAN que utilizan ensayos dúplex o múltiple, pueden presentar una inhibición competitiva, lo que podría afectar a la sensibilidad de la prueba.

En las Tablas 11A y 11B se expone la opinión de los integrantes en la elaboración de este documento sobre la conveniencia de informar o no un determinado patógeno en función de la localización anatómica basado en evidencias si las hay o en la opinión como expertos teniendo en cuenta que en algunos casos no hay guías claras al respecto.

Tabla 11A. Conveniencia de informar un patógeno según su localización anatómica

Microorganismo	Localización	Método	Comentario
CT	Todas	Cultivo	Informar
CT	Orina (varones)	TAAN	Informar, es la muestra de elección
CT	Orina (mujeres)	TAAN	Informar, no es la muestra de elección por menor sensibilidad
CT	Vaginal, endocervical, uretral	TAAN	Informar
CT	Rectal	TAAN	Informar, genotipado LGV
CT	Orofaringea	TAAN	Informar. Asintomático o paucisintomático: Puede ser fuente de transmisión por sexo oral
CT	Exudado de adenopatía (si está presente)	TAAN	Informar, genotipado LGV
GV	Pene	TAAN / Cultivo	Informar, comentario de posible valor en balanitis
GV	Uretral varones	TAAN /Cultivo	Informar, comentario de su valor de portador
Levaduras	Orofaringea/rectal	Cultivo-TAAN	No informar
Levaduras	Genital	Cultivo	Informar, especiar dependiendo de recursos, no realizar estudio de sensibilidad antifúngicos de rutina
Micoplasmas: MG	Orina (varones)	TAAN	Informar. Pueden presentar problemas de sensibilidad en algunos equipos comerciales debido a que son infecciones de baja carga bacteriana
MG	Orina (mujeres)	TAAN	Informar, es menos sensible que la muestra vaginal
MG	Uretral, vaginal, endocervical, endometrial	TAAN	Informar, pueden aparecer problemas de sensibilidad en algunos equipos comerciales debido a que son infecciones de baja carga bacteriana
MG	Faríngeo	TAAN	No informar/ Controvertido
MG	Rectal	TAAN	Informar, controvertido en asintomáticos
MH	Faríngeo	TAAN / Cultivo	No informar
MH	Recto	TAAN / Cultivo	No informar
MH	Resto de muestras Muestra noble en mujeres (EPI)	TAAN / Cultivo	No informar Informar
UP	Todas	TAAN	No informar
UU	Faríngeo	TAAN /cultivo	No informar
UU	Recto	TAAN /cultivo	No informar
UU	Vaginal/Orina	TAAN /cultivo	No informar/ IUSTI no recomienda cribado, sólo en hombres con alta carga bacteriana y habiendo excluido otras causas
UU	Uretral	TAAN /cultivo	Informar (aunque la mayoría es colonización y tampoco se recomienda en algunas guías)

Tabla 11B. Conveniencia de informar un patógeno según su localización anatómica

Microorganismo	Localización	Método	Comentario
NG	Todas	cultivo	Informar, realizar siempre estudio de sensibilidad antibiótica
NG (mujeres)	Orina	TAAN	Informar, en caso de negatividad reseñar que su sensibilidad es inferior a otras muestras genitales
NG (varones)	Orina	TAAN	informar, muestra recomendada en hombres asintomáticos
NG	Vaginal, endocervical, uretral	TAAN	informar
NG	Rectal	TAAN	Informar, confirmar con un segundo método molecular previamente
NG	Orofaringea	TAAN	Informar, confirmar con un segundo método molecular previamente
NM	Faringeo	Cultivo	No informar/ Ver Procedimiento SEIMC Infecciones TRS 2006: informar si se cultiva en abundancia o si se solicita expresamente
NM	Uretral/ Vaginal	Cultivo	Informar
TV	Faringeo	TAAN	No informar
TV	Rectal	TAAN	No informar
TV	Vaginal, uretral	Microscopía	Informar, la sensibilidad se estima en 51-65%
TV	Vaginal, uretral	Cultivo	Informar, la sensibilidad se estima en 75-96%
TV	Orina, vaginal, endocervical, uretral	TAAN	Informar, sensibilidad y especificidad del 95-100%
VHS	Anogenital	Cultivo	Informar, método menos sensible que TAAN si las vesículas o úlceras están en fase de cicatrización
VHS	Anogenital	TAAN	Informar
VHS	Suero	Serología tipo específica	La presencia o ausencia de anticuerpos tipo-específicos puede ayudar a determinar si la infección es primaria o recurrente
Predominio de <i>E. faecalis</i> , <i>S. agalactiae</i> , enterobacterias, <i>S. aureus</i> , etc	Vagina	Cultivo	Informar sin antibiograma Poner comentario de crecimiento predominante y su papel en vaginitis aeróbica

7. TEST DE CURACIÓN DE LAS ITS

En la Tabla 12 se exponen las recomendaciones del test de curación de las ITS según diferentes organizaciones.

Tabla 12. Test de curación de ITS e infecciones genitales

Microorganismo	Test de curación	Fuente
HD (Chancroide) CT*	No se recomienda No recomendado de rutina, persiste ADN 3-5 semanas después del tratamiento	CDC BASHH**
	Recomendado 3-4 semanas después de finalizar el tratamiento. Si se adelanta, pueden obtenerse falsos positivos de bacterias no viables cuando se realiza por técnicas moleculares	CDC
Donovanosis	No se recomienda	Guía australiana
LGV	No se recomienda en tratamiento de 21 días	IUSTI
<i>M. genitalium</i> **	Como CT Debido a la elevada prevalencia de resistencias a macrólidos, el test de curación es obligado en todos los casos. La muestra no se debe obtener hasta pasadas 3 semanas de finalización del tratamiento aunque no existe consenso entre las guías que varían entre 2 semanas y 4-6 semanas después del tratamiento	CDC IUSTI
NG*	Se recomienda en todos los casos. No antes de pasadas dos semanas de completar el tratamiento	BASHH
Sífilis	El test de curación es la negativización de los anticuerpos no treponémicos. Realizar serología a los 3, 6 y 12 meses. Y cada 6 meses hasta negativización o serofast.	BASHH, IUSTI
TV	>2 semanas	BASHH

* El test de curación para CT y NG para la nueva guía IDSA y ASM de 2018 no se recomienda a menos que haya persistencia de síntomas o en el embarazo y pacientes de riesgo en el cribado a los 3-12 meses

** *British Association for Sexual Health and HIV*

** Se recomienda por algunos autores el test de curación en recto después del tratamiento debido a que el tratamiento con azitromicina tiene poca efectividad

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bignell C, Unemo M; European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2013; 24: 85-92.
2. Canadian Guidelines on Sexually Transmitted Infections – Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections. Disponible en: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/infectious-diseases/sexual-health-sexually-transmitted-infections/canadian-guidelines/sexually-transmitted-infections.html>. Acceso el 20 de abril de 2018.
3. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 2007. Procedimientos en Microbiología Clínica. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentos-cientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc_procedimientomicrobiologia24.pdf. Acceso el 1 de abril de 2018.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2014. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013.pdf>. Acceso el 1 de junio de 2018.

5. Grupo de Expertos del Grupo de Estudio de SIDA de la SEIMC (GESIDA), Secretaría del Plan Nacional sobre el SIDA (SPNS), Grupo de Estudio de ITS de la SEIMC (GEITS), Grupo Español para la Investigación de las Enfermedades de Transmisión Sexual de la Academia Española de Dermatología y Venerología y de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las Infecciones de Transmisión Sexual en adultos, niños y adolescentes. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2017.

6. Infectious diseases laboratory test directory. CDC2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/cdc-lab-tests.pdf>. Acceso el 2 de agosto de 2018.

7. John Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potočnik M, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014; 28:1581-93.

8. Lacey CJ, Woodhall SC, Wikstrom A, Ross J. 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013; 27:e263-70.

9. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH et al. A Guide to utilization of the Microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018; 67: e1-e94.

10. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. Meng Z, editor.

PLOS ONE. 2015;10: e0143304.

11. Papp R, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. *MMWR Recomm Rep*. 2014; 63 (RR-02): 1-19.

12. Patel R, Kennedy OJ, Clarke E, Geretti A, Nilssen A, Lautenschlager S, et al. 2017 European guidelines for the management of genital herpes. *Int J STD AIDS*. 2017; 28:1366-79.

13. Seña AC, Hsu KK, Kellogg N, Girardet R, Christian CW, Linden J, et al. Sexual assault and sexually transmitted infections in adults, adolescents, and children. *Clin Infect Dis*. 2015; 61 (Suppl 8):S856-64.

14. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* 2015; 64 (No. RR-3):1-135.

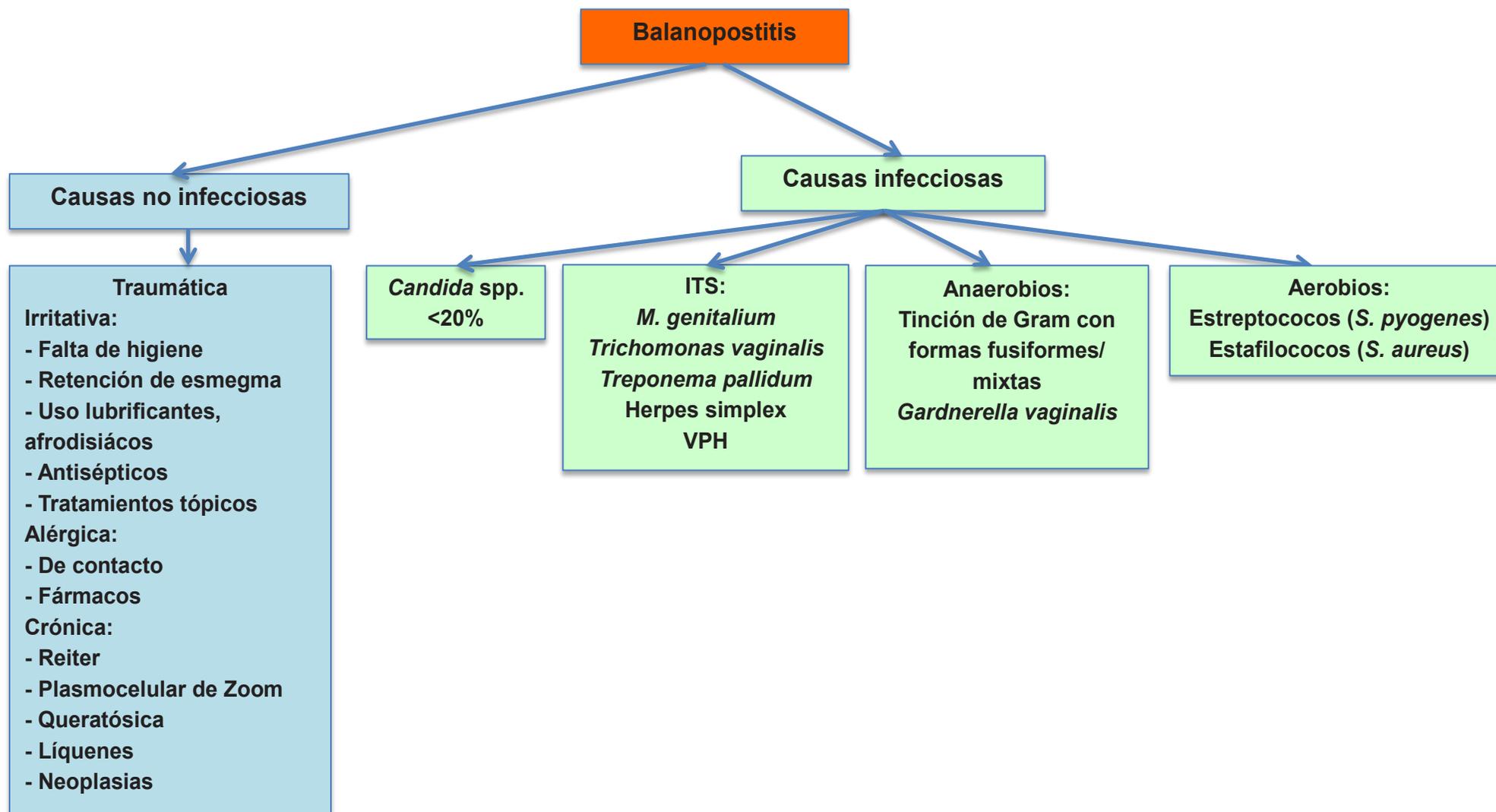
15. Sherrard J, Donders G, White D, Jensen JS; European IUSTI. European (IUSTI/WHO) guideline on the management of vaginal discharge, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011; 22: 421-9.

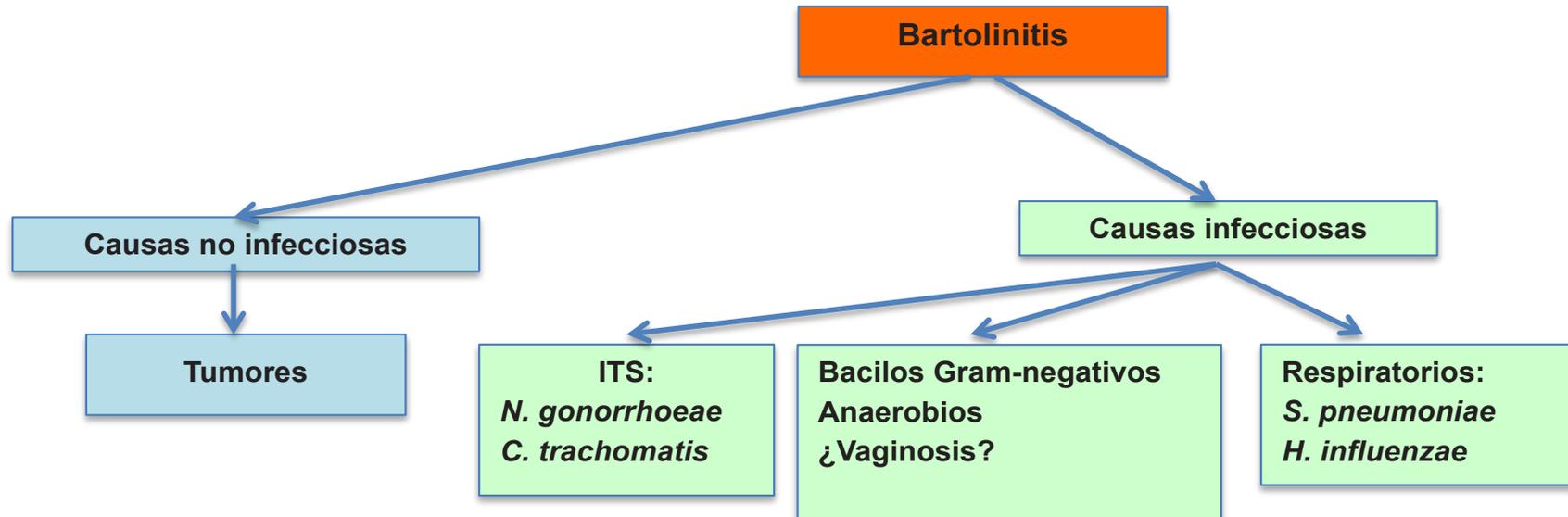
16. Unemo, M. Ballard, R. Ison, C. Lewis, D. Ndowa, F. Peeling, R. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus World Health Organization; 2013.

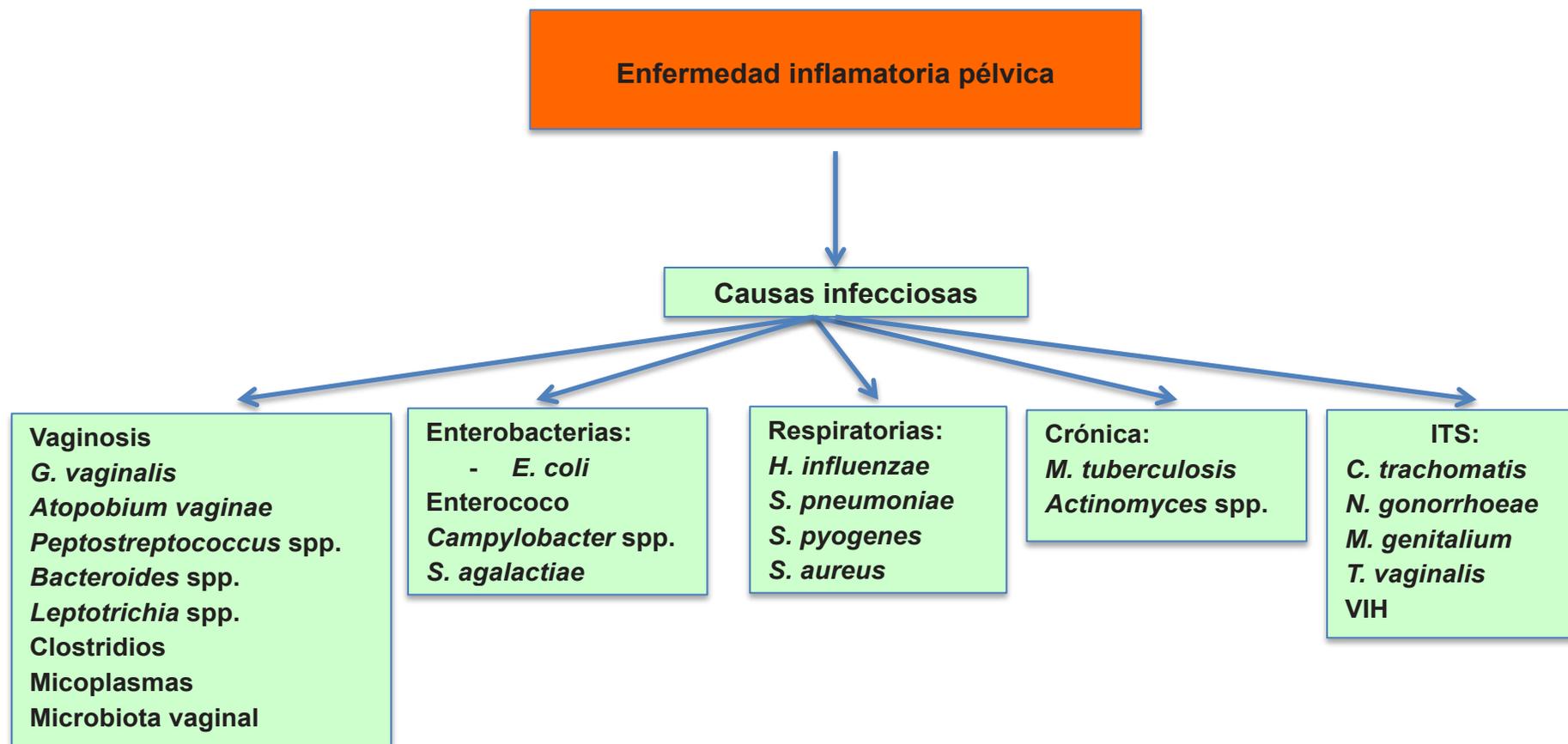
17. World Health Organization. Global health sector strategy on sexually transmitted infections, 2016-2021. Towards ending STIs; 2016. Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/ghss-stis/en/apps.who.int/iris/bits-tream/10665/.../1/who-rhr-16.09-eng.pdf>. acceso el 2 de agosto de 2018.

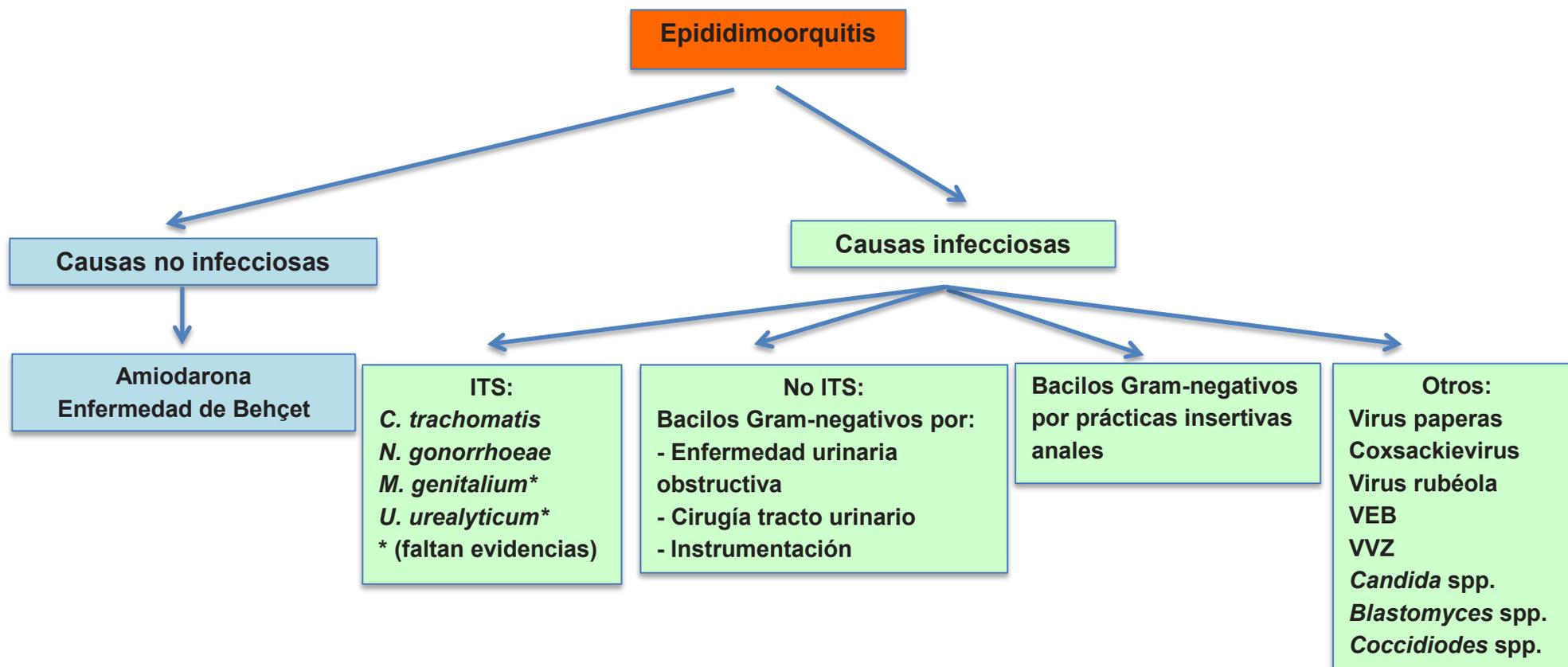
10. ANEXOS

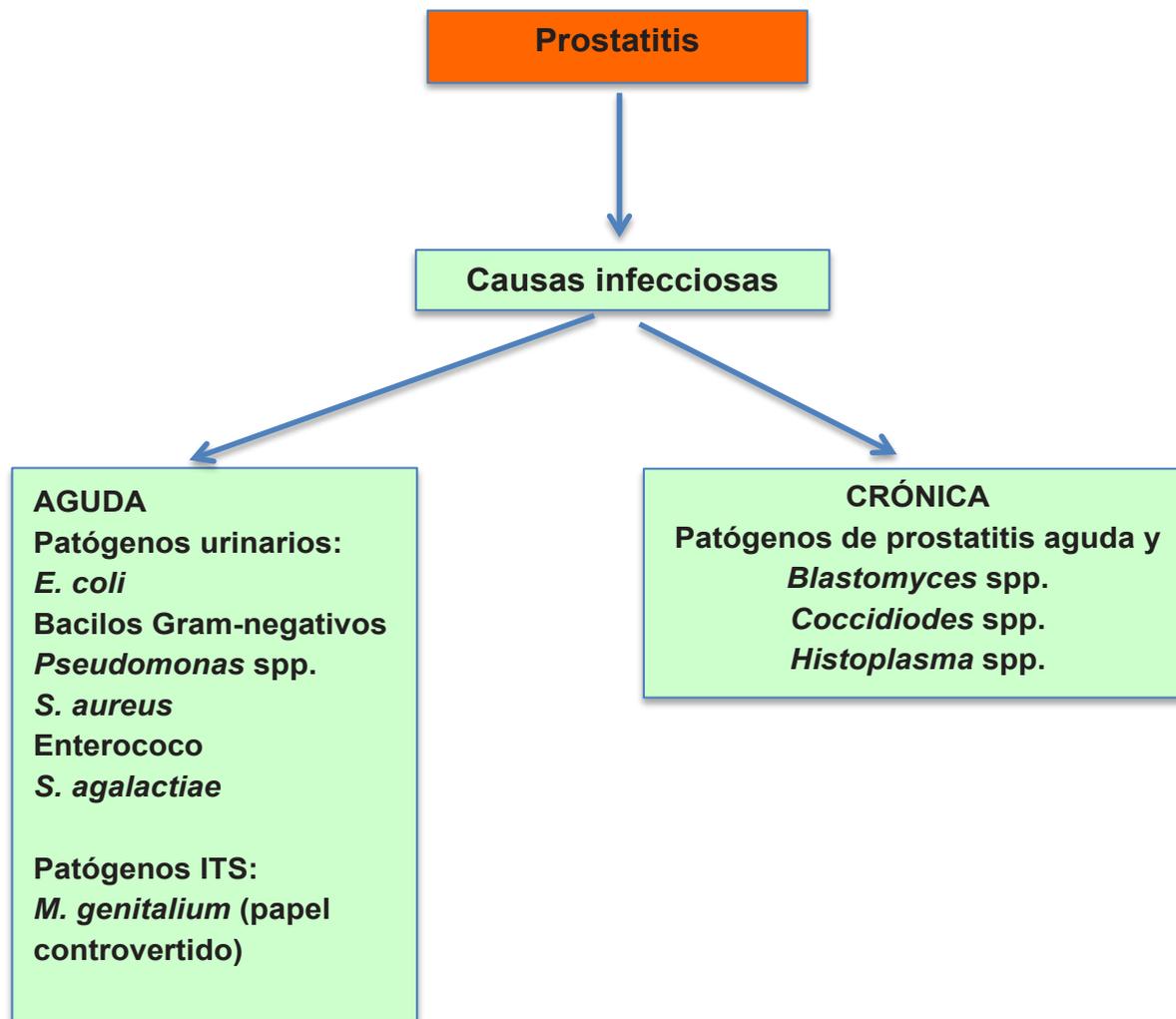
Anexo I. Aproximación diagnóstica (algoritmos etiológicos) al paciente con ITS y otras infecciones genitales (teniendo en cuenta que ocasionalmente puede aparecer algún otro no incluido en la mayoría de estudios)

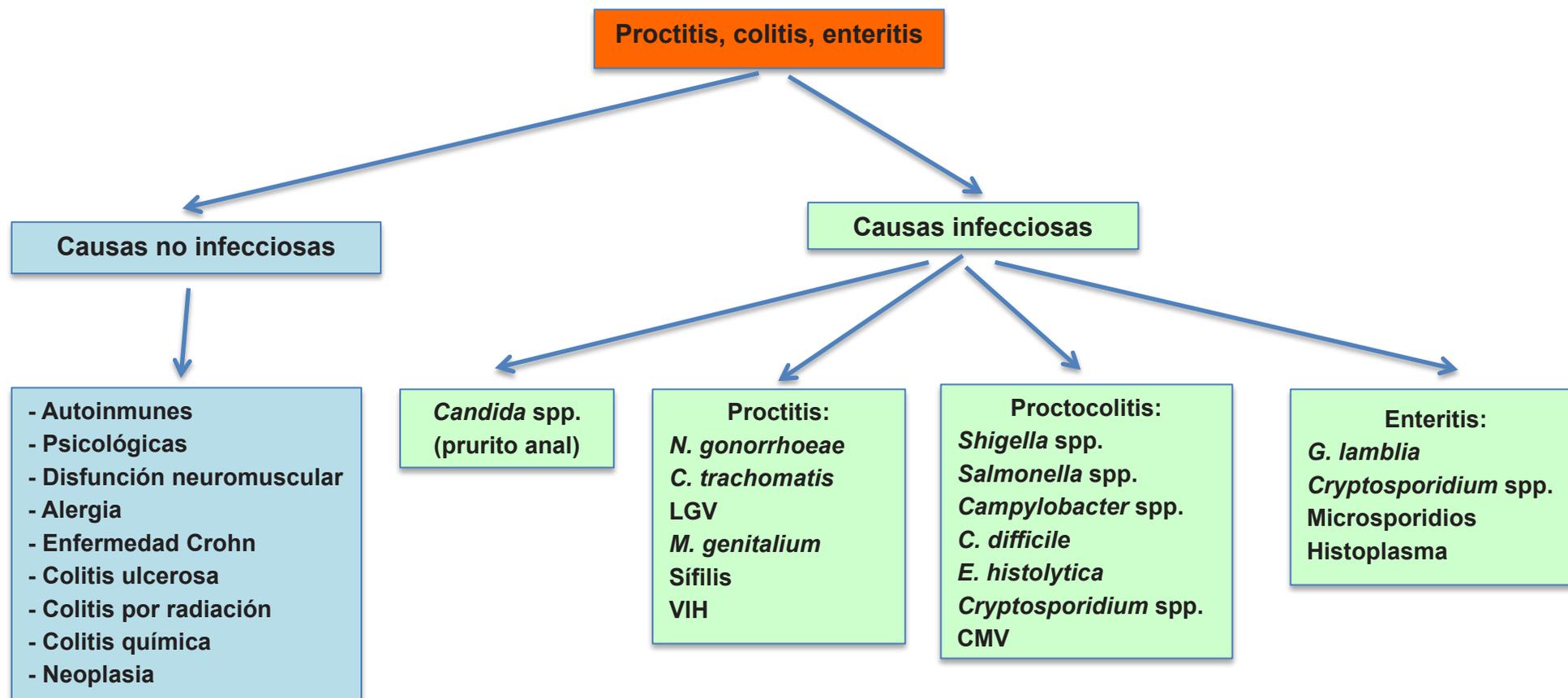


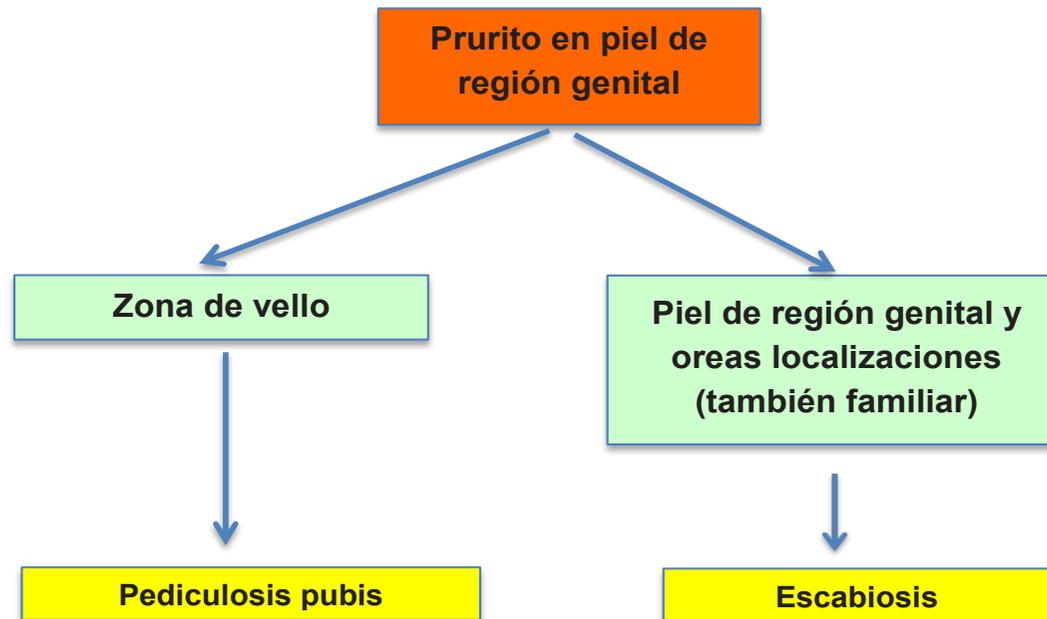


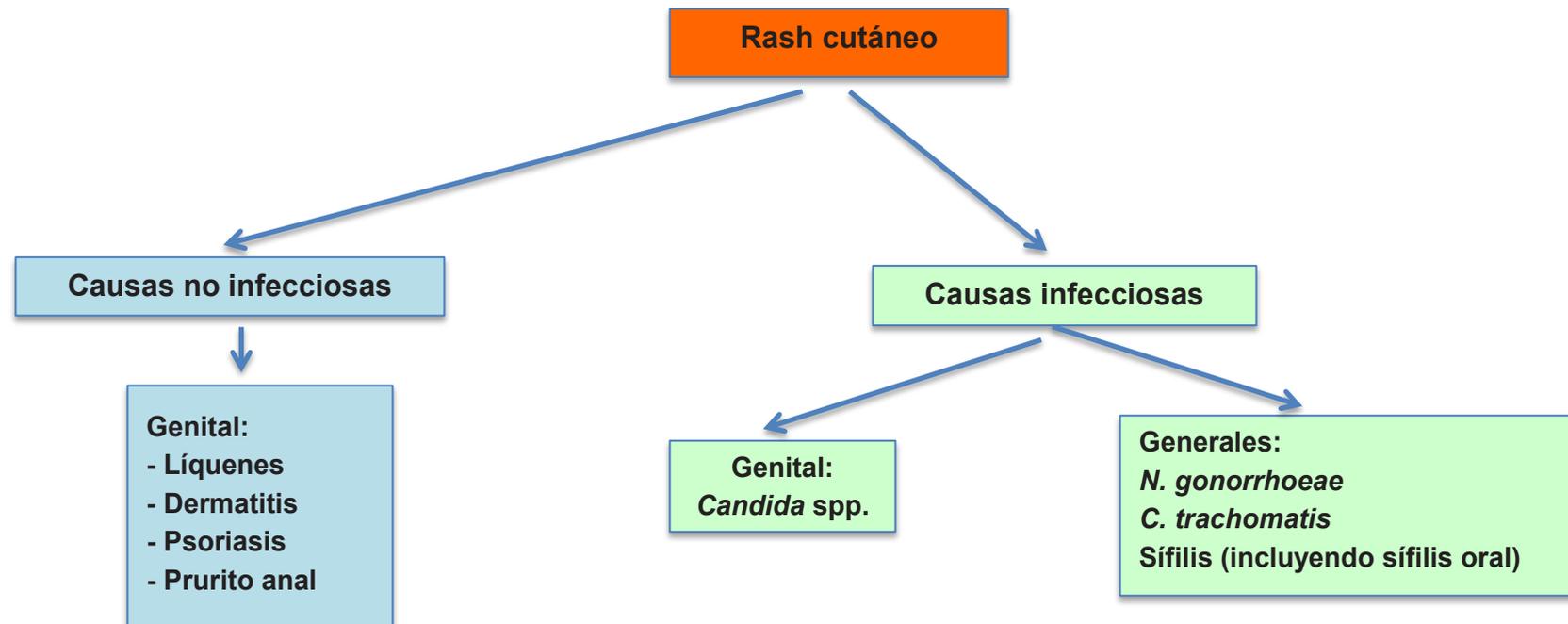


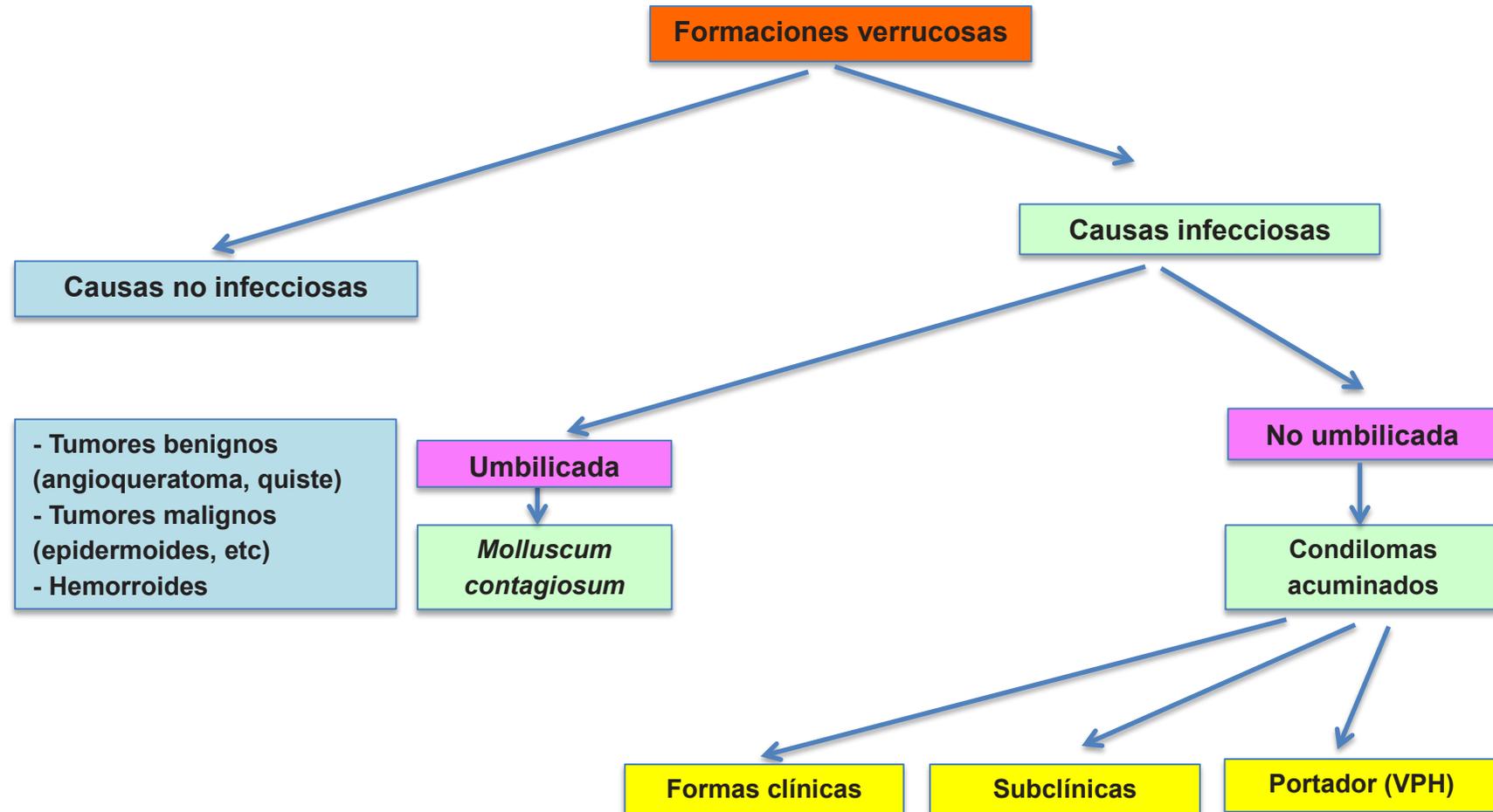


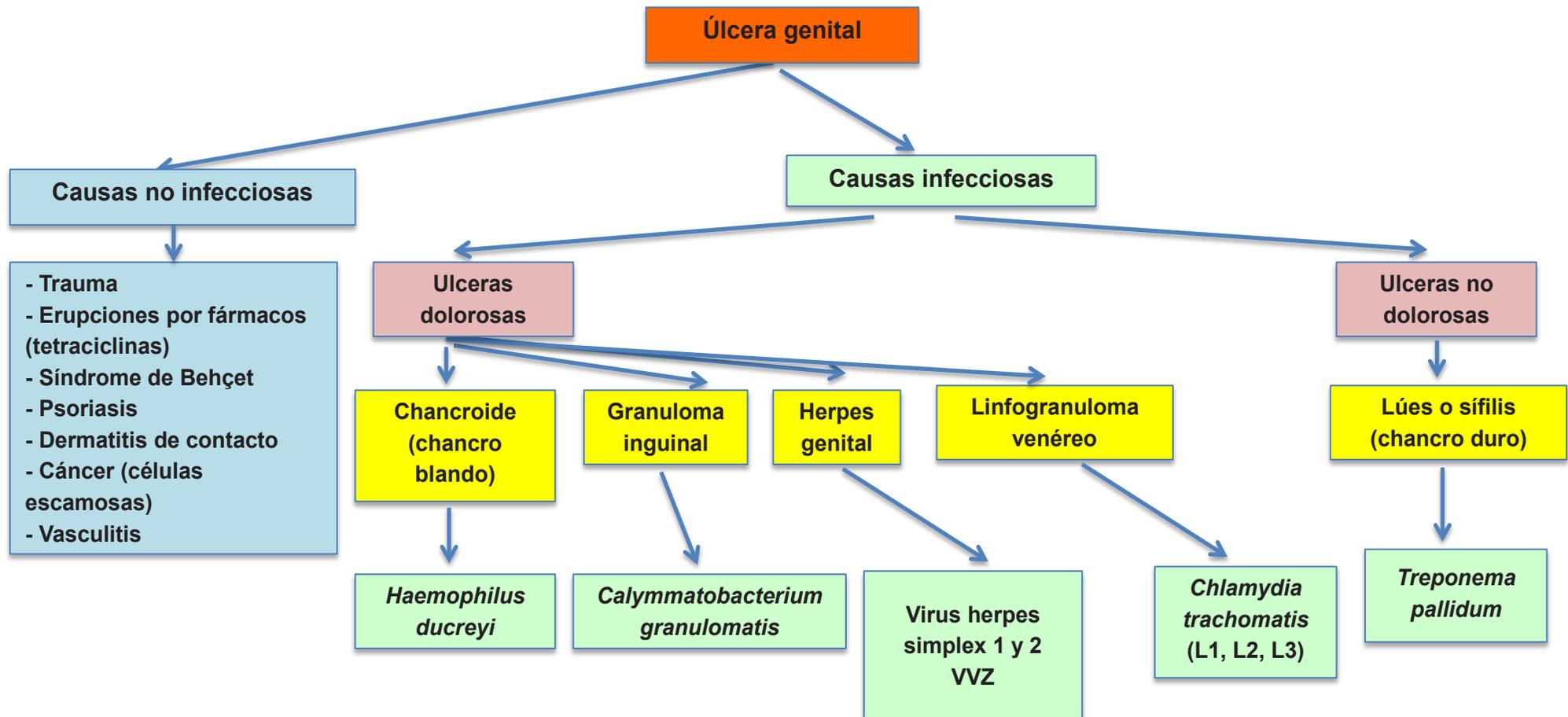




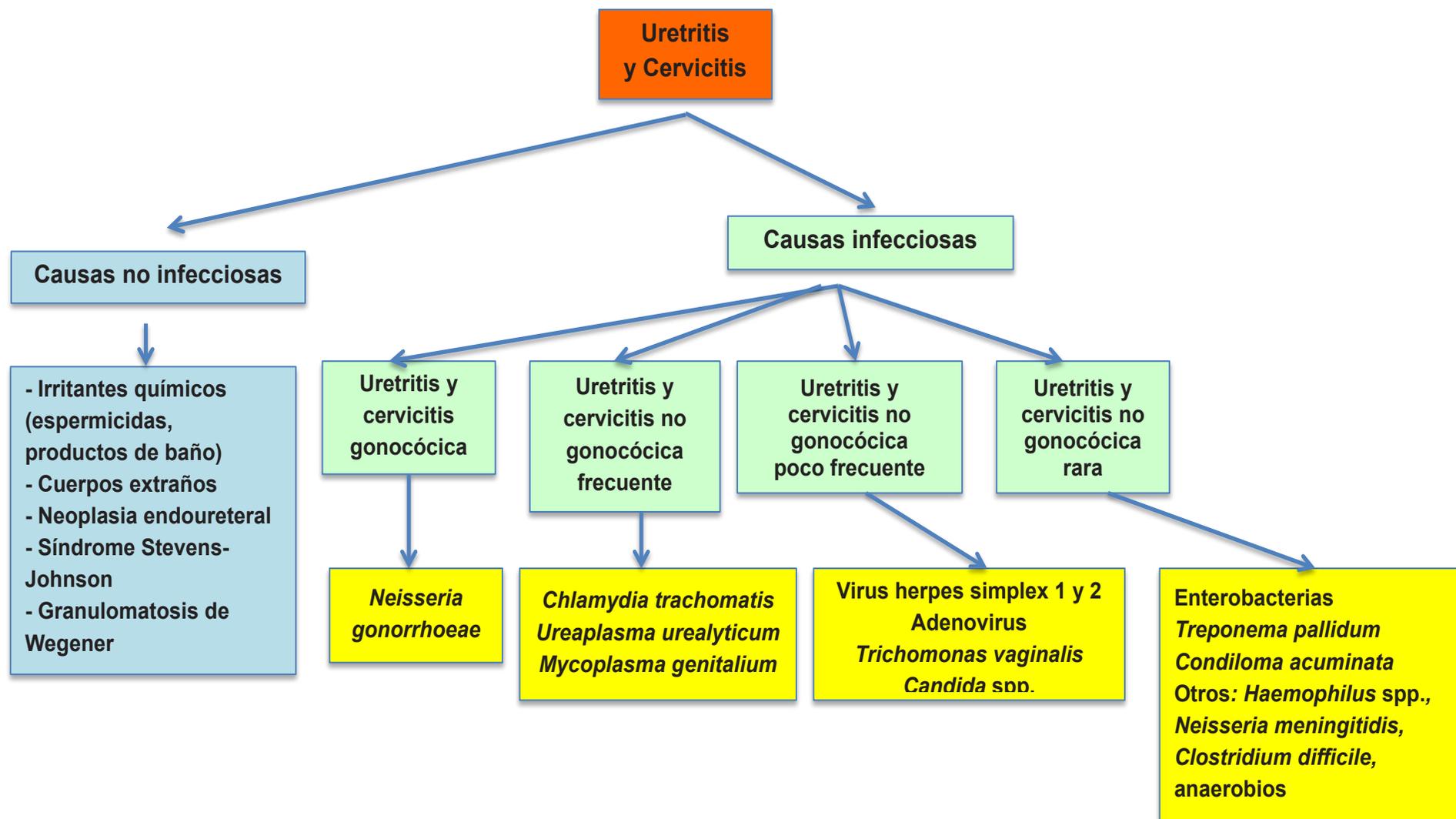




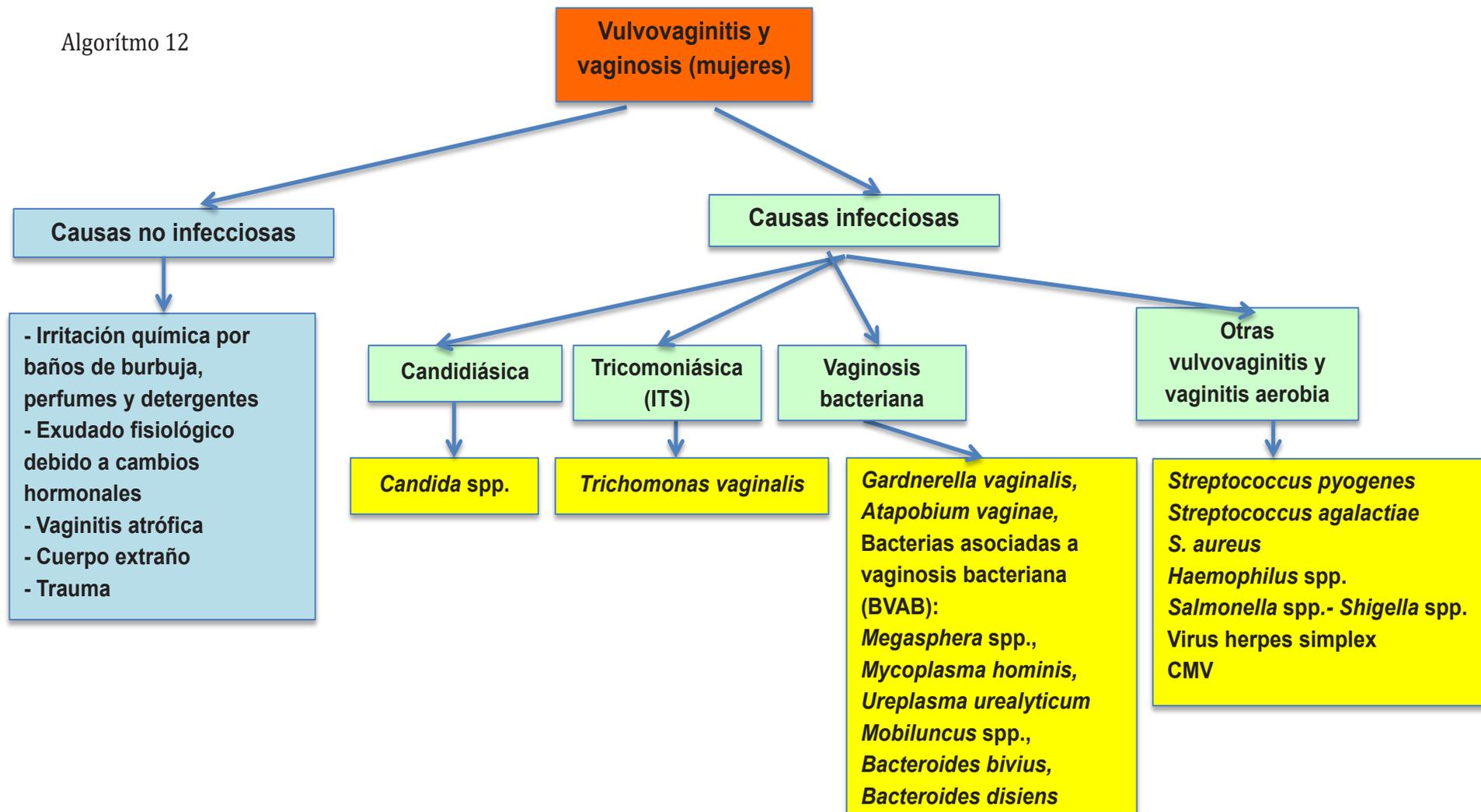


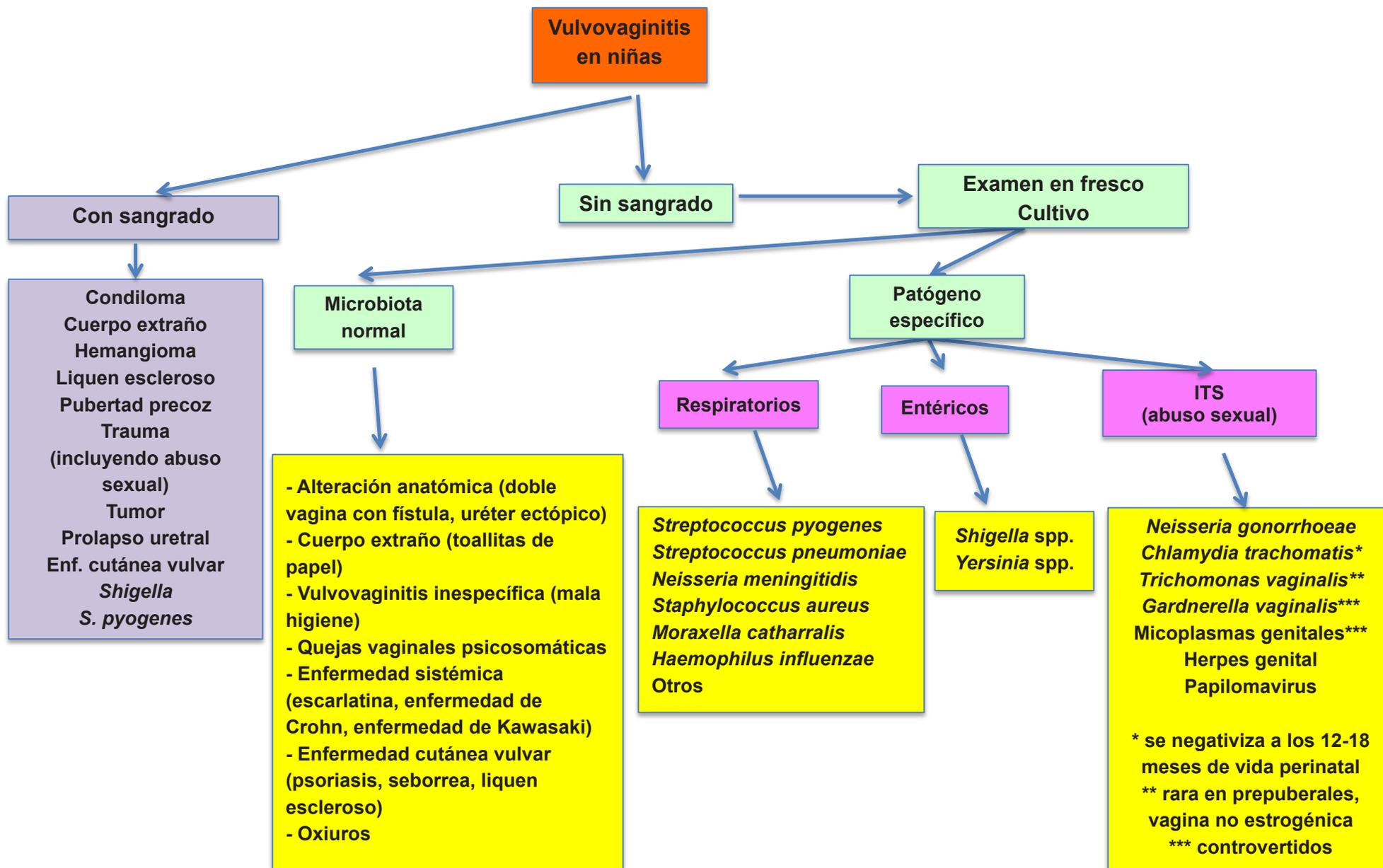


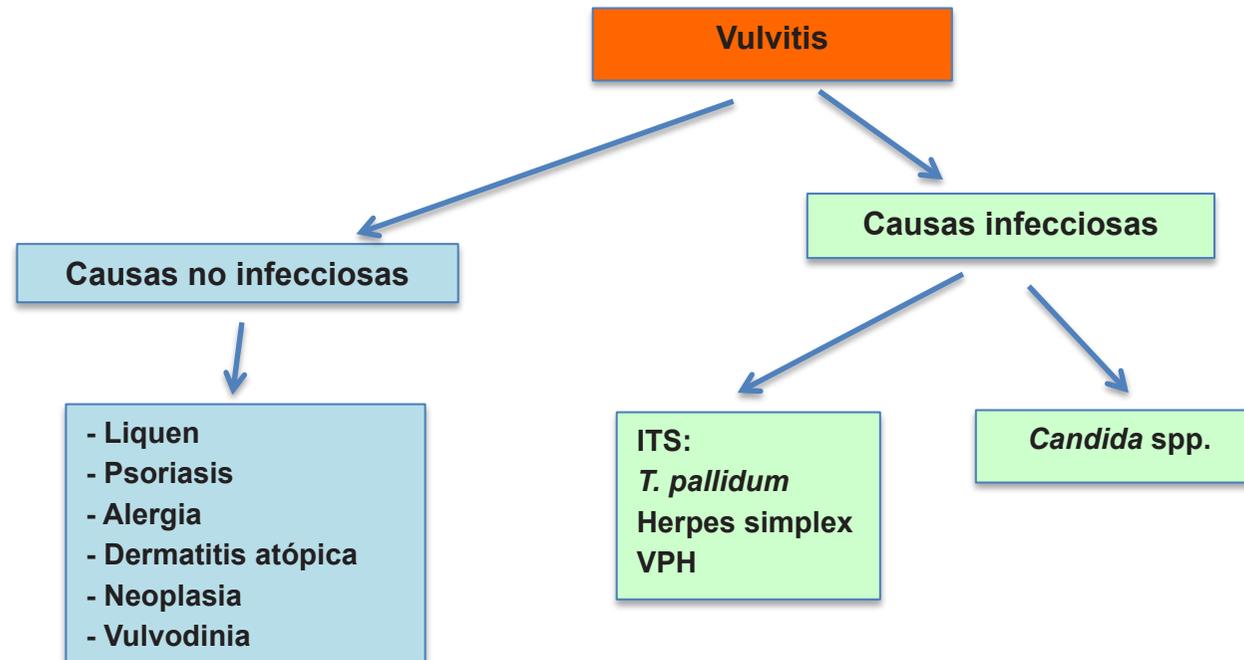
Algoritmo 11



Algoritmo 12







Anexo II. Evidencias científicas del diagnóstico de las ITS

Niveles de evidencia:

Ia	Evidencia obtenida de meta-análisis de ensayos controlados y aleatorizado
Ib	Evidencia obtenida de al menos un ensayo controlado y aleatorizado.
IIa	Evidencia obtenida de al menos un estudio bien diseñado, pero no aleatorizado.
Evi- IIb	Evidencia obtenida de al menos un estudio bien diseñado quasi-experimental.
III	Evidencia obtenida de un estudio no experimental descriptivo bien diseñado, como estudios de comparación, correlación o casos control.
IV	Evidencia obtenida de comités de expertos, opiniones y/o experiencia clínica de personas de reconocida experiencia.

Grado de recomendación:	
A:	Niveles de evidencia Ia, Ib
B:	Niveles de evidencia IIa, IIb, III
C:	Evidencia IV

Sistema GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation)

Grado de Recomendación	Riesgos / beneficios	Calidad de la evidencia	Trascendencia
1A Recomendación fuerte Evidencia de alta calidad	Los beneficios claramente superan al los riesgos y las cargas, o viceversa	Evidencia consistente basada en ensayos bien realizados, aleatorizados y controlados o evidencias abrumadoras de otro tipo. Investigaciones adicionales es poco probable que cambien nuestra confianza en la estimación del beneficio y riesgo	Recomendación fuerte, se puede aplicar a la mayoría de los pacientes en la mayoría de las circunstancias y sin reservas
1B Recomendación fuerte Evidencia de calidad moderada	Los beneficios claramente superan al los riesgos y las cargas, o viceversa	Evidencia basada en ensayos aleatorizados y controlados con limitaciones importantes (resultados inconsistentes, con defectos metodológicos, indirectos o poco precisos) o evidencias muy fuertes de otro tipo. Investigaciones adicionales (si se realizan) es probable que tengan impacto en la confianza en el beneficio y riesgo estimado	Recomendación fuerte, probablemente sea aplicable a la mayoría de los pacientes
1C Recomendación fuerte Evidencia de baja calidad	Los beneficios parecen superar a los riesgos y las cargas o viceversa	Evidencia basada en estudios observacionales, experiencia clínica no sistematizada, o basada en ensayos aleatorizados y controlados, pero con defectos graves. Cualquier estimación del efecto es incierto	Recomendación relativamente fuerte que podría cambiar cuando se disponga de evidencias de mayor calidad
2A Recomendación débil Evidencia de alta calidad	Beneficios muy equilibrados con los riesgos y cargas	Evidencia consistente basada en ensayos bien realizados, aleatorizados y controlados o evidencias abrumadoras de otro tipo. Investigaciones adicionales es poco probable que cambien nuestra confianza en la estimación del beneficio y riesgo	Recomendación débil, la mejor acción puede cambiar dependiendo de las circunstancias, pacientes o valores sociales
2B Recomendación débil Evidencia de calidad moderada	Beneficios muy equilibrados con los riesgos y cargas, con incertidumbres en la estimación de beneficios, riesgos y cargas	Evidencia basada en ensayos aleatorizados y controlados con limitaciones importantes (resultados inconsistentes con defectos metodológicos, indirectos o poco precisos) o evidencias muy fuertes de otro tipo. Investigaciones adicionales (si se realizan) es probable que tengan impacto en la confianza en el beneficio y riesgo estimado	Recomendación débil Enfoques alternativos probablemente sean mejores en algunos pacientes en determinadas circunstancias
2C Recomendación débil. Evidencia de baja calidad	Incertidumbre en la estimación de beneficios, riesgos y cargas; los beneficios pueden estar muy equilibrados con los riesgos y las cargas	Evidencia basada en estudios observacionales, experiencia clínica no sistematizada, o basada en ensayos aleatorizados y controlados pero con defectos graves. Cualquier estimación del efecto es incierto	Recomendación muy débil; otras alternativas pueden ser igualmente razonables

Candidiasis, vaginosis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI)

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>Candidiasis En las mujeres sintomáticas se debe realizar microscopía y el cultivo Se debe tomar un hisopo vaginal del fórnix anterior para: .- Examen de Gram o fresco .- Sembrar directamente en medio para hongos. En cuadros no complicados identificar a nivel de <i>C. albicans</i> / <i>C. no albicans</i></p> <p>Vaginosis Se recomiendan los criterios de Hay/Ison para el diagnóstico de vaginosis No cultivar GV para el diagnóstico de la vaginosis: presente en 50% de las mujeres normales En estudios de investigación, una alta concentración de GV se asocia con la presencia de VB</p> <p>EPI Ante sospecha EPI, buscar NG, CT y MG en el tracto genital inferior: respalda el diagnóstico de EPI y modifica el tratamiento</p>	<p>Nivel III, Grado C Nivel III Grado B Nivel III Grado B Nivel III Grado B</p> <p>Grado C Nivel IIa</p> <p>Nivel IIa</p> <p>1B</p>

Chancroide

Tipo de situación	Nivel de evidencia
<p>Diagnóstico definitivo: identificación de HD por cultivo. Sin embargo, las TAAN son más sensibles (el cultivo tiene una sensibilidad del 75% en el mejor de los casos). Se han descrito PCR caseras con la ventaja de detectar simultáneamente otros patógenos como TP y el VHS.</p>	<p>Nivel III, Grado B</p> <p>Nivel III, Grado B</p>

Chlamydia trachomatis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
El diagnóstico de infección tanto genital como extragenital de CT se debe realizar usando TAAN	Nivel IIa, Grado B
Las mujeres con síntomas de proctitis deben tratarse de la misma manera que los hombres	Nivel IV, Grado C
Indicaciones para realizar pruebas diagnósticas: <ul style="list-style-type: none"> - Factores de riesgo: edad <25 años, nuevo contacto sexual en el último año, más de un compañero sexual en el último año - Síntomas o signos de uretritis en hombres - Secreción cervical o vaginal con factor de riesgo para ITS - Epididimo-orquitis aguda en un hombre <40 años o con factores de riesgo para ITS - Dolor pélvico agudo y / o síntomas o signos de EPI - Proctitis / proctocolitis - Conjuntivitis purulenta en un neonato o adulto - Neumonía neonatal atípica - Personas diagnosticadas con otras ITS - Contacto sexual con personas con una ITS o EIP - Interrupción del embarazo - Cualquier intervención o manipulación intrauterina 	Nivel IV, Grado C
Para el diagnóstico se recomiendan pruebas AAN debido a su sensibilidad, especificidad y rapidez	Nivel I, Grado A
La prueba diagnóstica se debe realizar en la primera consulta, pero si el contacto de riesgo fue hace menos de dos semanas, se debe repetir la prueba de AAN dos semanas después de la exposición	Nivel IV, Grado C
Para el adecuado rendimiento de las TAAN, es fundamental seguir las recomendaciones del fabricante sobre recolección, transporte, almacenamiento de muestras, controles internos, positivos, negativos y controles de inhibición y la participación en un programa de evaluación de calidad externa	Nivel I, Grado A
Usar TAAN capaces de detectar todas las variantes conocidas (como la variante sueca (nvCT), e investigar cualquier variación significativa inexplicable en la incidencia local o en tasa de positividad	Nivel I, Grado A
Las muestras de primera elección recomendadas para el diagnóstico de infecciones urogenitales con TAAN son la orina de primer chorro en varones (20 ml de muestra obtenidos pasada 1 hora de la micción previa) y en mujeres torundas vulvovaginales obtenidas tanto por personal sanitario como mediante auto-toma	Nivel I, Grado A
Debido a una sensibilidad subóptima, la orina de primer chorro en mujeres solo se debe usar si no se pueden obtener otras muestras	Nivel II, Grado B
El diagnóstico TAAN en muestras extragenitales, confirmar los resultados positivos con otro ensayo	Nivel II
En muestras rectales de HSH, genotipar los positivos para LGV, independientemente de la presencia de síntomas anorrectales	Nivel II, Grado B
No se recomienda realizar pruebas diagnósticas sobre muestras de semen	Nivel II, Grado B
Si TAAN no disponibles, la detección de Ac. IgM apoya el diagnóstico de enfermedad invasiva, como la LGV y neumonía neonatal	Nivel I, Grado A
Se recomienda la prueba anual de CT en clínicas de ITS o de salud sexual para todas las mujeres y hombres jóvenes sexualmente activos (<25 años de edad), y se debe considerar para HSH	Nivel IIa, Grado B
En mujeres y hombres jóvenes (<25 años de edad) positivos para CT se debería de repetir la prueba en 3-6 meses	Nivel III, Grado C
No se recomienda el uso rutinario de un test de curación en pacientes tratados con regímenes recomendados de primera línea, pero debe realizarse en el embarazo, en infecciones complicadas, si los síntomas persisten, si se han administrado regímenes de segunda línea o de tercera línea, y si se sospecha el incumplimiento de la terapia o la reexposición	Nivel IV, Grado C
Cuando esté indicado el test de curación mediante TAAN este debe realizarse cuatro semanas después de la finalización de la terapia	Nivel III, Grado B

Herpes genital

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Si baja probabilidad de herpes genital, confirmar el resultado positivo de Ac. anti VHS-2 mediante muestra repetida o ensayo diferente	Nivel III, Grado B
Si sospecha de herpes genital, hacer confirmación diagnóstica directa del virus mediante toma con hisopos de la base de la lesión	Nivel Ib, Grado A
En primer episodio de herpes genital, tipificar VHS-1 / VHS-2 para orientar el consejo y tratamiento	Nivel III, Grado B
No se recomienda determinación viral directa rutinaria en asintomáticos, ya que es poco probable que se obtenga la confirmación del estado del portador (eliminación viral intermitente)	Nivel Ib, Grado A
La detección del ADN del VHS es la prueba de oro para el diagnóstico. Es más sensible y específico que el cultivo celular	Nivel Ib, Grado A
Los métodos de detección de antígenos virales, como el análisis de inmunofluorescencia directa, el inmunoensayo y las tinciones de Tzanck y Papanicolaou, ya no se recomiendan, excepto en entornos de recursos extremadamente limitados (Ib, A)	Nivel Ib, Grado A
La serología VHS tipo específica puede ser útil en los siguientes grupos:	
- Antecedentes de enfermedad genital recurrente o atípica cuando los métodos de detección directa de virus han sido negativos	Nivel III, Grado B
- Primer episodio de herpes genital, donde la diferenciación entre infección primaria y reactivación guía el consejo y manejo	Nivel III, Grado B
- Parejas sexuales. Las parejas serodiscordantes pueden recibir consejo sobre estrategias para reducir el riesgo de infección	Nivel Ib, Grado A
- Gestantes asintomáticas con antecedentes de pareja con herpes genital	Nivel IIIb, Grado B
La especificidad del EIA se puede mejorar elevando el valor del índice para interpretar la positividad y repitiendo todos los resultados intermedios con una prueba confirmatoria	Nivel IIa, Grado B
Diagnóstico de la infección anorrectal: usar TAAN, ya que es más sensible que el cultivo	Nivel IIa, Grado B

Hombres que tienen sexo con hombres (HSH)

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Las TAAN son las pruebas de elección para la detección de infecciones rectales por clamidia y gonococo	Nivel IIa, Grado B
Con las instrucciones adecuadas, la autotoma rectal para TAAN de NG y CT es una alternativa aceptable, viable y válida	Nivel IIa, Grado B
Ofrecer la determinación del VHC a los HSH asintomáticos y VIH negativos cuando existan factores de riesgo (por ejemplo, sexo asociado con traumatismo o lesión, drogadicción o LGV rectal)	2B
Ofrecer al menos una vez al año la determinación del VHC a los varones en los que esté indicado la prueba trimestral de VIH y a los que se administra PrEP	2B
Realizar anualmente la determinación de VHC a los HSH que sean VIH positivos, y siempre que exista sospecha clínica	1C
Las pruebas de VIH se deben ofrecer a los HSH en cualquier circunstancia	1B
Ampliar la posibilidad de realizar rutinariamente pruebas de VIH a HSH fuera de las consultas de ITS	1C
Los HSH deben de disponer de pruebas POCT para VIH fuera del entorno sanitario	1B

Linfogranuloma venéreo

Tipo de situación	Nivel de evidencia
En varones VIH positivos, pero no en negativos, se recomienda la tipificación rutinaria de LGV en las infecciones por <i>Chlamydia</i> tanto sintomática como asintomática y de cualquier localización	2C
No se considera necesario una prueba de curación para LGV si se completa el tratamiento recomendado de 21 días de doxiciclina	Nivel IV, Grado C
Si está indicado, se debe realizar una prueba de curación a las 2 semanas después de completar el tratamiento de LGV para evitar la detección de ADN / ARN de CT no viables	Nivel IV, Grado C

Mycoplasma genitalium

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Las TAAN en muestras clínicas son los únicos métodos útiles para el diagnóstico	Nivel III, Grado B
Algunos medios de transporte pueden disminuir la sensibilidad en ensayos caseros y debe ser evaluado	Nivel III, Grado B
En los pacientes infectados deben buscarse otras ITS (CT, NG, sífilis, VIH y TV)	Nivel IV, Grado C
Ante sospecha de transmisión vertical, observar al RN buscando signos de conjuntivitis e infección del tracto respiratorio	Nivel IV, Grado C
Realizar test de curación rutinaria en todos los pacientes (alta prevalencia de resistencia a los macrólidos)	Nivel III, Grado B
Las muestras para los test de curación se deben obtener no antes de pasadas 3 semanas desde el inicio del tratamiento	Nivel III, Grado B
No se recomienda la determinación rutinaria en HSH asintomáticos	2C

Neisseria gonorrhoeae

Tipo de situación	Nivel de evidencia
En varones sintomáticos con secreción uretral, la presencia en la tinción de Gram o con azul de metileno de diplococos en el interior de PMN ofrece buena sensibilidad ($\geq 95\%$) y especificidad como prueba diagnóstica rápida	Nivel III, Grado C
La microscopía tiene baja sensibilidad ($\leq 55\%$) en varones asintomáticos y en la infección endocervical ($\leq 55\%$) y rectal ($\leq 40\%$), por lo que no puede recomendarse como una prueba de exclusión en estas situaciones	Nivel III, Grado C
En las mujeres la orina no es una muestra adecuada pues tienen menor sensibilidad que las torundas genitales	Nivel II, Grado B
Para el cultivo proporcionan resultados aceptables la siembra directa y el uso de medios de transporte	Nivel IV
El cultivo es barato, específico, permite la confirmación y pruebas de susceptibilidad. Mantener la capacidad de cultivar es esencial monitorizar las resistencias. Se recomiendan medios de cultivo selectivos que contengan antimicrobianos	Nivel III, Grado B
En pacientes con gonococia o en riesgo de presentarla, realizar de forma rutinaria el cribado de otras ITS	Nivel III, Grado C
En mujeres se debe valorar la obtención de muestras rectales y faríngeas cuando hay antecedentes de exposición directa	Nivel IV, Grado C
Para el diagnóstico de la gonococia rectal la muestra puede obtenerse mediante torunda ciega o bajo visión directa con proctoscopio	Nivel III, Grado C
Las TAAN con VPP $< 90\%$ precisan confirmación con otra TAAN frente a una diana diferente	Nivel III, Grado B
TAAN en muestras extragenitales: evaluar en el propio laboratorio. Los positivos se confirman con otra TAAN frente a diana diferente	Nivel IIb, Grado B
Se recomienda prueba de curación en todos los casos	Nivel IV, Grado C
Pruebas de curación en asintomáticos: se pueden realizar con TAAN pasadas 2 semanas desde la finalización del tratamiento, y si el resultado es positivo, se debería de hacer cultivo y pruebas de susceptibilidad antes de administrar otro tratamiento	Nivel IV, Grado C

Sarna, ladillas

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Sarna Prueba de curación: 2 semanas después de la finalización del tratamiento mediante examen microscópico	Nivel IV, Grado C
Ladillas Confirmar la eficacia del tratamiento 1 semana después de su finalización mediante la búsqueda de piojos o liendres	Nivel IIa, Grado B

Sifilis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Realizar microscopía de campo oscuro del chancro siempre que exista disponibilidad de equipo y personal	2A
Determinar mediante PCR la presencia de TP en aquellas lesiones en las que se pueda esperar que esté presente	1A
La prueba serológica de elección para el cribado es EIA/CLIA, preferiblemente determinando tanto IgG como IgM	1B
Todos los HSH deben de ser evaluados para la sífilis	1B
Los resultados de cribado positivos se deben de confirmar con otra prueba treponémica (no FTA) y con una segunda muestra	1B
A los resultados de cribado positivos se les debe realizar cuantificación mediante VDRL o RPR	1A
Repetir una serología negativa de sífilis:	1B
.- a las 6 y 12 semanas después de un contacto aislado de alto riesgo	
.- a las 2 semanas después de que el estudio de chancros por campo oscuro o PCR haya sido negativo	
A todos los pacientes con sífilis se les debe hacer cribado de otras ITS incluyendo al VIH	1A
El diagnóstico y tratamiento de la sífilis es idéntico para pacientes VHI positivo y negativo	1B
Control de tratamiento, obtener suero a los 1, 3 y cada 6 meses. Idealmente, realizar siempre la misma prueba no treponémica y en el mismo laboratorio Controlar hasta que negativice o los títulos se mantengan bajos (1:1 - 1:4, durante 1 año y en ausencia de riesgo)	Nivel IV, Grado C

Trichomonas vaginalis

Tipo de situación	Nivel de evidencia
Toma de muestras en mujeres	Nivel III, Grado B
.- Hisopo del fórnix posterior con espéculo.	
.- Las autotomas vaginales con hisopo es probable que den resultados equivalentes	
.- La orina se emplea con TAAN	
En varones el cultivo uretral y del primer chorro de orina diagnostican el 60-80% de los casos, y ambas muestras de forma simultánea aumentarían significativamente la tasa de diagnóstico mediante microscopía o cultivo	Nivel III, Grado B
Pruebas de curación: sólo si permanece sintomático después del tratamiento o si los síntomas vuelven a aparecer	Nivel IV, Grado C
POCT de TV	Nivel IIb, Grado B
El cultivo tiene mayor sensibilidad que la microscopía y puede detectar TV en varones	Nivel IIb, Grado B
Las TAAN ofrecen la mayor sensibilidad, son de elección si hay recursos para ello y se convierten en la "prueba de oro"	Nivel IIb, Grado B
No se recomienda el cribado de TV en individuos asintomáticos	Nivel I, Grado A

Uretritis no gonocócica

Tipo de situación	Nivel de evidencia
En las uretritis no gonocócicas asintomáticas no se recomienda la realización de pruebas diagnósticas	Nivel III, Grado B
En las uretritis sintomáticas y aquellas con una secreción visible, evaluar la presencia de uretritis mediante la demostración de leucocitos PMN	Nivel IV, Grado C
Si hay secreción uretral, se puede recoger esta sin hacer una toma intrauretral	Nivel IV, Grado C
Paciente sintomático con frotis uretral normal, recomendar volver para una nueva toma matinal sin haber orinado en toda la noche	Nivel IV, Grado C
La orina de primer chorro puede examinarse para filamentos, y si están presentes, teñir y si ≥ 10 PMNL / campo 1000x, indica uretritis	Nivel III, Grado B
La sensibilidad del frotis uretral depende del tiempo desde última micción. Se desconoce el tiempo óptimo. 2-4 horas es convencional	Nivel IV, Grado C
Toma uretral para determinar presencia de PMN: usar asa de plástico o hisopo de algodón, que se introducen 1 cm en la uretra. El asa de plástico es menos doloroso que el hisopo de Dacrón, que a su vez es menos doloroso que un hisopo de rayón	Nivel IIb, Grado A
Si hay secreción uretral, se prefiere su recogida a la toma del exudado uretral	Nivel IV, Grado C

Anexo III. Consejo para realizar un test diagnóstico según tipo de población (Guías australianas, excepto donde se indica los CDC americanos) (Hay variaciones en otras guías y debe ser considerado tentativo de patógenos a buscar en estas poblaciones)

Población	Comentario
Abuso sexual:	
- CT	Test de cualquier orificio que ha sufrido penetración. Considerar muestras recogidas por el propio paciente Cribado inicial y repetir después de 2 semanas o más pronto si sintomático
- NG	TAAN son altamente sensibles y pueden detectar infección temprana Test de cualquier orificio que ha sufrido penetración. Considerar muestras recogidas por el propio paciente Cribado inicial y repetir después de 2 semanas o más pronto si sintomático TAAN son altamente sensibles y pueden detectar infección temprana Si TAAN positivo tomar una torunda en el sitio o sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
-Hepatitis B	Test basal, repetir Ag HBs a las 6 y 12 semanas, si anti-HBs negativo Considerar Ig Hepatitis B si no es inmune, no historia de vacunación o estado desconocido. Se dará en las 72 horas de la exposición y vacuna de hepatitis B en 14 días Asegurar que se completa el esquema de vacunación
- Sífilis	Según protocolo de sífilis
- TV	Cribado inicial y repetir 2 semanas después o más temprano si síntomas TAAN son altamente sensibles y pueden detectar infección temprana
- VIH	Test basal y seguido por test a la 6 y 12 semanas Las muestras y sus resultados pueden ser presentadas legalmente Considerar profilaxis postexposición si se ve en las 72 horas de exposición
Adolescentes:	
- CT, VHB, Sífilis, VIH	No recomendado cribado de CT en España aunque si en otros países Hacer cribado oportunístico CDC en primera visita recomiendan solo CT, NG y VIH Vacunación si VHB negativo
Usuarios de drogas:	
- CT	Considerar muestras recogidas por el propio paciente
- NG	Considerar muestras recogidas por el propio paciente Si TAAN positivo tomar una torunda en el sitio o sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento Se prefieren los cultivos para muestras de zonas no genitales
- Hepatitis A	Vacunar si no está inmune
- Hepatitis B	Tiene riesgo, si no vacunado, vacunar si no inmune Se recomienda test después de completar la vacunación
- Hepatitis C	Se mirará su estado serológico Se recomienda test anual No se considera una ITS excepto en pacientes VIH positivos con sexo anal Si Ac. positivos, realizar TAAN para excluir hepatitis crónica
- Sífilis	Según protocolo de sífilis
Embarazadas:	CDC: VIH, TP, HBsAg, CT, NG, VHC y no se recomiendan para vaginosis, TV, VHS-2
Hombres que tienen relaciones sexuales con hombres:	CDC: VIH, TP, NG, CT
Mujeres que tienen relaciones sexuales con mujeres:	
- CT	Transmisión no común
- NG	Transmisión no común
- Sífilis	Ver periodo ventana e historia No datos, realizar test si pareja positiva
- TV	No
- Vaginosis bacteriana	No
- VIH	Ver periodo ventana e historia Transmisión no común, realizar test si pareja positiva
- VHB	Vacunación si negativa

Población	Comentario
Mujeres y hombres trabajadores del sexo:	
- CT	Considerar muestra recogida por el paciente
- NG	Considerar muestra recogida por el paciente
	Si ANN positivo tomar una muestra con torunda de los sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
	Los cultivos son preferidos para sitios no genitales
- Hepatitis A	Vacunar si no inmune
	Es innecesario más test después de completar la vacunación
- Hepatitis B	Vacunar si no inmune
	Considerar test después de vacunación de la hepatitis B
- Hepatitis C	Si Ac. positivo, test de TAAN hepatitis C para determinar si tiene hepatitis C crónica
- Sífilis	Si sospecha protocolo de sífilis
- VIH	Repetir el test si el paciente estuvo expuesto en las 12 semanas previas (periodo ventana)
Parejas de VIH positivo:	
- CT	Considerar muestra recogida por el paciente
- NG	Considerar muestra recogida por el paciente
	Si TAAN positivo tomar una muestra con torunda de los sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
	Los cultivos son preferidos para sitios no genitales
- Hepatitis A	Vacunar si no inmune
- Hepatitis B	Vacunar si no inmune
	Títulos anti-HBs se chequearán regularmente y el conviviente recibirán recuerdos para mantener anti-HBs >10
- Hepatitis C	Si ac positivo, test de TAAN hepatitis C para determinar si tiene hepatitis C crónica
- Sífilis	Si sospecha protocolo de sífilis
Personas en centros penitenciarios:	
- CT	Considerar muestra recogida por el paciente
- NG	Considerar muestra recogida por el paciente
	Si TAAN positivo tomar una muestra con torunda de los sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
	Los cultivos son preferidos para sitios no genitales
- Hepatitis A	Vacunar si no inmune
- Hepatitis B	Vacunar si no inmune
	Considerar test después de vacunación de la hepatitis B
- Hepatitis C	Si Ac.positivo, test de TAAN hepatitis C para determinar si tiene hepatitis C crónica
- Sífilis	Si sospecha protocolo de sífilis
- VIH	Repetir el test si el paciente estuvo expuesto en las 12 semanas previas (periodo ventana)
Refugiados e inmigrantes nuevos:	
- CT	Ofrecer si riesgo debido a asalto sexual o sexo sin protección. Considerar muestra recogida por el paciente
- NG	Ofrecer si riesgo debido a asalto sexual o sexo sin protección
	Considerar muestra recogida por el paciente
	Si TAAN positivo tomar una muestra con torunda de los sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
	Los cultivos son preferidos para sitios no genitales
- Hepatitis B	Vacunar si no inmune
	Considerar test después de vacunación de la hepatitis B sólo en VIH positivo y pareja sexual o contactos caseros
- Sífilis	Si sospecha protocolo de sífilis
-VIH	Repetir el test si el paciente estuvo expuesto en las 12 semanas previas (periodo ventana)
Personas transgénero:	
- CT	Considerar muestra recogida por el paciente
- NG	Considerar muestra recogida por el paciente
	Si TAAN positivo tomar una muestra con torunda de los sitios relevantes para cultivo antes del tratamiento
	Los cultivos son preferidos para sitios no genitales
- Sífilis	Si sospecha protocolo de sífilis
- VIH	Repetir test si paciente expuesto en las 12 semanas previas (periodo ventana)
- VHA	Vacunar si no inmune
- VHB	Vacunar si no inmune

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 02	Página 1 de 6

PNT-ITS-01

RPR (*Rapid Plasma Reagin*) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Treponema pallidum*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2007	Edición inicial
02	2018	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 02	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO 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 para determinar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, y en algunos algoritmos como prueba de cribado en el diagnóstico.

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 una floculación negra que puede verse macroscópicamente. Cuando no hay presencia de anticuerpos no se produce aglutinación. Se determina la presencia tanto de anticuerpos de la clase IgG como 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 eficaz. Incrementos en la misma proporción implican 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

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC 2017. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 2014. 10 a. Pérez Saénz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores) SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protolos/microbiologia>.
3. Gestión de residuos.
4. Prospecto del equipo comercializado con las instrucciones del fabricante presente en cada caja de reactivos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 02	Página 3 de 6

4. MUESTRAS

- Para la realización de esta prueba se requiere sangre total (5 ml) que se centrifugará para obtener el suero. No se requiere ninguna preparación especial del paciente.
- La prueba se lleva a cabo preferiblemente sobre muestra de suero, sobre todo si su realización se va a demorar más de 48 horas. Es la muestra preferida para realizar cuantificación.
- Los sueros pueden almacenarse en nevera a 4°C 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%)

6. APARATOS Y MATERIAL

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

7. PROCEDIMIENTO

7.1. 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 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.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>) para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 6

7.2. 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).
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 5.
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 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 1,5 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.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	TPHA. Hemaglutinación para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición N° 02	Página 1 de 4

PNT-ITS-02

TPHA. Hemaglutinación para el diagnóstico de la infección por *Treponema pallidum*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2007	Edición inicial
02	2018	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	TPHA. Hemaglutinación para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición N° 02	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO 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 aviares 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. 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

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC 2017. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 2014. 10 a. Pérez Saénz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores) SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Gestión de residuos.
4. 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 más 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:

1. Células de prueba: suspensión de eritrocitos aviares cubiertos con antígenos de *T. pallidum*.
2. Células de control: suspensión de eritrocitos aviares.
3. 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.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	TPHA. Hemaglutinación para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición N° 02	Página 3 de 4

7. PROCEDIMIENTO

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. Mezclar con la pipeta.
7. Añadir 75 µL del vial "células de control" al pocillo de control. Mezclar con la pipeta.
8. Incubar a temperatura ambiente (15-30°C) en una superficie sin vibración durante 45 minutos.
9. Proceder a la lectura visual.

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 con el Procedimiento de absorción de reacciones no específicas.
- Incluir controles positivos y negativos en cada ensayo.

Procedimiento de absorción de reacciones no específicas:

Se aplica cuando se observa aglutinación tanto con las células de prueba como con las de control.

1. Mezclar 190 µL de células de control resuspendidas y 10 µL de muestra o controles.
2. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.
3. Centrifugar a un mínimo de 1500xg durante 3 minutos.
4. Añadir 25 µL del sobrenadante a dos pocillos.
5. Resuspender y añadir al primer pocillo 75 µL de células de prueba.
6. Resuspender y añadir al primer pocillo 75 µL de células de control.
7. Incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 45 minutos.
8. Leer e interpretar

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN 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.
- 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 haber aglutinación.
- Si se observa aglutinación en el pocillo "prueba", pero también aglutina el pocillo "control", realizar el procedimiento de absorción de reacciones no específicas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	TPHA. Hemaglutinación para el diagnóstico de la infección por <i>Treponema pallidum</i>	PNT-ITS-02	
		Edición N° 02	Página 4 de 4

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

Esta prueba no sirve para evaluar la respuesta al tratamiento.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ballard R, Hook EW III. Syphilis . In: Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, eds. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 2013: 107-129.
2. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 1-21.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>C. trachomatis</i> , genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 1 de 5

PNT-ITS-03a

Detección molecular de *C. trachomatis*, genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2018	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>C. trachomatis</i> , genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito es definir la estrategia diagnóstica para la detección de ADN de los serovares L1-L3 de *Chlamydia trachomatis* causante LGV y las coinfecciones por genotipos invasivos (LGV) y no invasivos de CT (serovares D-K) en muestras genitourinarias, rectales o faríngeas mediante amplificación de ácidos nucleicos por PCR en tiempo real.

El procedimiento se aplica en muestras biológicas previa demostración de la presencia de CT en la muestra biológica a estudio.

2. FUNDAMENTO

Chlamydia trachomatis (CT) es un patógeno intracelular altamente prevalente en nuestro entorno. Si bien no existen datos oficiales sobre la tasa de incidencia en España, basándonos en los datos de los países de nuestro entorno, la infección por CT es la infección bacteriana más frecuente en las ITS. Por otra parte, el linfogranuloma venéreo (LGV) es una enfermedad de transmisión sexual causada por los genotipos invasivos L1, L2 y L3 de CT. Tradicionalmente se ha considerado una enfermedad endémica en África, Latinoamérica y Asia. Los casos detectados en Europa se consideraban casos importados, pero desde 2003 se han descrito casos autóctonos de LGV por todos los países europeos, Estados Unidos y Australia. Algunos métodos comerciales basados en la detección molecular de *C. trachomatis* diferencian LGV de otros serovares de *C. trachomatis* de transmisión sexual (serovares D-K). Sin embargo, no existen estrategias que permitan identificar infecciones por más de un genotipo y el escenario actual sugiere alta proporción de coinfecciones.

Los sistemas comerciales para la detección molecular de CT se basan en la detección de dianas en plásmido críptico y/o ADNr. Por otra parte el diagnóstico de infección por LGV se basa en la delección interna de 36 pb del gen *pmpH*. En este documento se describe un procedimiento diagnóstico de segundo nivel, una vez que se demuestre la presencia de CT en la muestra biológica a estudio en hombres que tienen sexo con hombre tengan síntomas o no.

El procedimiento propuesto es una PCR en tiempo real usando sondas TaqMan, siguiendo el protocolo propuesto por Morré y cols. en 2005 y posteriormente revisado por Schaeffer y cols. en 2008, para detectar LGV. Para detectar presencia de otras CT además de LGV, el protocolo propuesto es el descrito por Rodríguez y cols en 2015.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC. 2017. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 2014. 10 a. Pérez Saénz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores) SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>C. trachomatis</i> , genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

4. MUESTRAS

Las muestras validadas por los CDC son exudados uretrales y cervicales; sin embargo está ampliamente extendido el uso de las técnicas moleculares para detección de CT y/o LGV en muestras faríngeas o rectales tomadas con torundas de dacrón. Las condiciones para la recogida y el transporte deben contemplar:

- Respetar las normas descritas en el procedimiento de recogida y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología.
- En el caso de muestras recogidas con torunda, garantizar la recogida suficiente de células epiteliales. Una vez tomada la muestra introducir la torunda en un medio de transporte adecuado para CT.
- Identificar correctamente el tubo (código empleado) y los tubos que se deriven de los procesos subsiguientes: extracción de ácidos nucleicos y PCR.
- Si no se puede procesar inmediatamente, se recomienda no prolongar la conservación a 4°C más de 24 horas. En caso necesario conservar las muestras a -70°C para períodos más prolongados.
- El material genético una vez extraído debe procesarse. En caso de que no pueda procesarse de inmediato, se puede conservar a -20°C.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

a) - Sistema de extracción de ácidos nucleicos (automática o manual).

b) - Master mix: TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems).

c) - Control interno de amplificación (CI): Existen dos alternativas para definir un CI

1) **Presencia desconocida de CT en la muestra**. Se amplificará mediante sonda Taqman específica un fragmento del gen que codifica para la proteína GAPDH de origen humano.

Primer F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'

Primer R: 5'-ATGGGATTTCCATTGATGAC AAG-3'

Sonda: FAM-5'-TGGCACCGTCAAGGCTGA GAACG-3' TAMRA

(Adaptado de Schaeffer y col. 2008).

2) **Presencia conocida de CT en la muestra**. Se utilizará el gen *ompA*, como control interno.

Primer F: 5'-GGTTTCGGCGGAGATCCT-3'

Primer R: 5'-AGTAACCCATACGCATGCTGAT-3'

Sonda: FAM-5'-CTTGCACTTGGTGTGACGC -3' TAMRA

d) - Reactivos específicos para amplificar el gen *pmpH* de LGV Las secuencias de primers y sonda específicos para los genotipos L1-L3 de *C. trachomatis* están basados en la delección de interna de 36 bp proceden de la publicación de Schaeffer y cols. en 2008.

Primer F: 5'-CTGTGCCAACCTCATCATCAA-3'

Primer R: 5'AGACCCTTTCCGAGCATCACT-3'

Sonda: FAM-5'-CCGCCTGCTCCAACAGTT AGTGATG- 3'-BHQ1

Reactivos específicos para amplificar el gen *pmpH* de No-LGV

Primer F: 5'- CTATTGTGCCAGCATCGACTC -3'

Primer R: 5'- AGACCCTTTCCGAGCATCACT-3'

Sonda: FAM-AGCTCCTGCTGCTTCAAGCTCTTTA-3'-BHQ1

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>C. trachomatis</i> , genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

6. APARATOS Y MATERIAL

- Agitador orbital tipo vórtex.
- Termociclador: la técnica está validada para el sistema ABI 7500 Fast de Applied Biosystems. En caso necesario puede ser adaptada a otros sistemas teniendo en cuenta las modificaciones oportunas en el marcaje de las sondas adaptándolas a los sistemas ópticos de cada termociclador.
- Cabina de seguridad.
- Pipetas automáticas de volumen variable.
- Tubos de plástico de fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- Puntas con filtro de diferentes calibres.
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction plates

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

- El procesamiento de las muestras se realizará en campana de bioseguridad.
- Las muestras tomadas en torunda se homogeneizarán utilizando un vortex en 1-2 ml de medio de transporte.
- La extracción de ácidos nucleicos se realizará a partir de alícuotas de 500 μ L del medio de transporte, según se detalle en el procedimiento habitual de trabajo del laboratorio correspondiente. Como ejemplo de sistema de extracción automática podemos citar el EasyMag de BioMerieux y como ejemplo de sistema manual el Quiamp Mini kit de Quiagen. Aunque seguramente otros sistemas de extracción manual y automática sean igualmente eficientes.

7.2. AMPLIFICACIÓN

La reacción se hace en un volumen final de 25 μ L, con 12,5 μ L de TaqMan Fast Universal PCR Master MIX (2x), 0,15 μ M de cada primer, 0,1 μ M de la sonda (tanto para la reacción de genotipado como para el control), y 5 μ L de ADN extraído de la muestra.

- El protocolo de amplificación es de 2 minutos a 50°C, 1 minuto a 95°C, y 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (programar la lectura del termociclador en este paso). Todas las reacciones de amplificación están diseñadas para las mismas condiciones de PCR.

Controles:

- Además de una reacción del control de extracción y amplificación por muestra, incluir en cada ensayo un control negativo de la master mix añadiendo 5 μ l de agua en lugar de muestra y un control positivo que garantice la calidad óptima de los reactivos y del material genético eluido.
- Al ser las sondas del control interno y diana de amplificación marcadas con la misma sonda FAM, no pueden ser empleadas en un mismo tubo de amplificación. Se puede plantear una mejora cambiando los fluoróforos para que todas las dianas puedan amplificarse en un solo tubo.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresarán en términos cualitativos de positivo o negativo.

Si no amplifica ni la diana ni el control, la reacción no es válida y se debe repetir el procedimiento.

La amplificación del control negativo indicaría una contaminación. Esta circunstancia invalida el resultado obtenido y es necesario repetir el procedimiento desde la extracción del material genético.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>C. trachomatis</i> , genotipo de LGV y detección de coinfecciones por dos o más genotipos mediante PCR en tiempo real	PNT-ITS-03a	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio o Servicio/Unidad de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del laboratorio o Unidad de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La sensibilidad de la técnica depende en gran medida de una correcta toma de muestra y de una buena extracción de ácidos nucleicos.
- Al no tratarse de una técnica comercial aprobada para diagnóstico "in vitro", este procedimiento debe ser validado y sometido a los controles adecuados en cada laboratorio de Microbiología. Los resultados obtenidos se deben interpretar junto con la información clínica del paciente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA, Peña AS. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1311-2.
2. Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:56.
3. Rodríguez-Domínguez M, González-Alba JM, Puerta T, Menéndez B, Sánchez-Díaz AM, Cantón R, del Romero J, Galán JC. High prevalence of co-infections by invasive and non-invasive *Chlamydia trachomatis* genotypes during the Lymphogranuloma Venereum outbreak in Spain. *PLoS One.* 2015; 10:e0126145.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 1 de 8

PNT-ITS-04

CULTIVO Y ANTIBIOGRAMA DE *Neisseria gonorrhoeae*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2007	Edición inicial
02	2018	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente procedimiento es describir la metodología a seguir para el cultivo y el antibiograma 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 patógeno exclusivo del ser humano que se transmite fundamentalmente por vía sexual. En el hombre causa cuadros de uretritis, epididimitis y proctitis. En la mujer origina cervicitis, endometritis y proctitis. 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: 1. En medios no selectivo como el agar chocolate enriquecido con un suplemento de vitaminas, aminoácidos y otros factores nutritivos. 2. 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, isovitalex 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 son su alta sensibilidad y especificidad, su bajo coste y su utilidad para diferentes tipos de muestras. Además el cultivo permite aislar el microorganismo para la realización de pruebas adicionales, como por ejemplo el estudio de sensibilidad antimicrobiana. 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.

El gonococo ha sido capaz de desarrollar resistencias a todos los antibióticos que se han utilizado para su tratamiento. Actualmente, la ceftriaxona administrada juntamente con azitromicina, es el tratamiento de elección, sin embargo también se han detectado aislados de gonococo con sensibilidad "*in vitro*" disminuida a las mismas, e incluso también fracaso terapéutico. Por ello, desde hace años es inexcusable realizar un antibiograma a todos los aislados de *N. gonorrhoeae*. El método de dilución en agar se considera el método de referencia para la determinación de la CMI, sin embargo el método de difusión con tiras de gradiente de antibiótico es una alternativa aceptable para la determinación de la CMI en la rutina del laboratorio.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC 2017. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. 2011. 38. Navarro F (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC 2011. Disponible en: http://www.seimc.org/documentoscientificos.php?mn_MP=3&mn_MS=358
3. Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 3 de 8

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 faríngeos y rectales y muestras de sangre y líquido articular ante la sospecha de infección diseminada.

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 rectales: 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 (Procedimiento SEIMC n° 1b; PNT-RTPM-01) SEIMC 2017.

Las muestras se rechazarán cuando estén mal identificadas y/o las condiciones de conservación sean inadecuadas (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado).

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. CULTIVO

- Torundas de plástico o alambre con la zona distal de rayón, dacrón o alginato cálcico.
- Torunda (flocada o no) con medio líquido de transporte (Amies con carbón activado).
- Las torundas con carbón pueden ser beneficiosas para neutralizar la toxicidad de la muestra aunque el carbón puede interferir en la realización de la tinción de Gram.
- Las torundas de algodón no se recomiendan.
- Medios de transporte comerciales líquidos o semisólidos.
- Placas con medio de cultivo sólido:
 - a) medios no selectivos como agar chocolate enriquecido;
 - b) medios selectivos como agar Thayer-Martin (TM), Martin-Lewis (ML), New York City (NYC).
 Los antimicrobianos añadidos en dichos medio selectivos 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)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 4 de 8

- nistatina: 13,5 mg/L (TM); anisomicina: 20 mg/L (ML); anfotericina B: 1,2 mg/L (NYC)
- Reactivos de la tinción de Gram

5.2. ANTIBIOGRAMA

- Agar GC con 1% de un suplemento definido (Isovitalex) que contiene en g/L: vitamina B 12 (0,01), Lglutamina (10), adenina (1), clorhidrato de guanina (0,03), ácido para-aminobenzoico (0,013), L-cisteína (1,1), glucosa (100), NAD (0,25), cocarboxilasa (0,1), nitrato férrico (0,02) y clorhidrato de tiamina (0,003).
- Prueba cromogénica de nitrocefina para detectar la posible producción de betalactamasa.
- Tiras de gradiente de concentración de antibióticos.

Nota: el medio MHF (EUCAST) no está validado para la determinación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a antimicrobianos.

5.3. CONSERVACIÓN Y FECHAS DE CADUCIDAD

Las torundas 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 torundas 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.

Las placas con medio de cultivo 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.

5.4. CONTROLES DE CALIDAD

Es necesario aplicar controles de calidad en el cultivo de gonococo ya que los medios comerciales y los procedimientos de cultivo varían en su selectividad y sensibilidad.

- Agar chocolate: color chocolate. Valorar crecimiento obtenido después de 24-48 horas de incubación a 35 ± 2°C en atmósfera enriquecida en 5% de CO₂.

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 5 de 8

- Agar TM, ML y NYC: color chocolate. Valorar crecimiento obtenido después de 24-72 horas de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera enriquecida en 5% de CO_2 .

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

- Agar GC con IsoVitaleX: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. CULTIVO

- Asas de siembra
- Estufa de CO_2 (35°C) o jarras de CO_2
- 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 o fucsina
- Reactivos de la tinción de azul de metileno:
 - Azul de metileno (4 partes) más violeta de genciana (1 parte)
 - Agua destilada
- Tiras de Pathotec® Citocromo Oxidasa o similar
- Sistema de identificación bacteriana, ya sea por reacciones bioquímicas (API, Enterotube, Oxi/Ferm Tube, RapID systems, MicroScan, Vitek, etc.) o por espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- Disco Cefinase (Prueba rápida de β -lactamasa)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 6 de 8

6.2. ANTIBIOGRAMA

- Caldo para la preparación de un inóculo estándar.
- Placas con medio de cultivo GC+Isovitalex.
- Un dispositivo fotométrico para determinar la turbidez de la suspensión de inóculo.
- Cultivo de control: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226.
- Tiras de gradiente de antibiótico.
- Dispositivo o pinzas para dispensar las tiras de gradiente de antibiótico.
- Estufa de CO₂ (35°C) o jarras de CO₂

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CULTIVO

Tras 48-72 horas de incubación se observarán las colonias de color grisáceo a las que se aplicará la identificación presuntiva.

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 API NH) y las características inmunológicas o perfiles enzimáticos de los microorganismos. Actualmente la espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una herramienta muy útil para la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos también tienen una elevada sensibilidad y especificidad.

7.2. ANTIBIOGRAMA

Una vez identificado y aislado el microorganismo, se realizará un subcultivo en agar chocolate. A partir de este subcultivo de 24 horas, se preparará una suspensión del microorganismo con una turbidez equivalente a la del patrón 0,5 de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente entre 1 y 2 x 10⁸ UFC/mL. Se sumergirá una torunda estéril en el inóculo correctamente diluido y se hará rodar firmemente varias veces contra la pared interna superior del tubo para exprimir el líquido en exceso. Se inoculará toda la superficie del agar GC+ Isovitalex de la placa tres veces, girando la placa 60 grados cada vez para obtener una inoculación uniforme. Se volverá a colocar la tapa de la placa y se mantendrá la placa a temperatura ambiente durante 3 – 5 min, pero no más de 15 min, para permitir que la humedad de la superficie se absorba antes de aplicar las tiras impregnadas de fármaco. Se aplicaran las tiras empleando técnicas asépticas. A los 15 min después de aplicar las tiras, se invertirán e incubarán las placas durante 20-24 h a 35°C en atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono al 5-7%.

A partir de una colonia también se debe realizar la prueba rápida de β-lactamasa (disco Cefinase) para evaluar la utilidad clínica de penicilina.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 7 de 8

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

1. En la tinción de Gram del exudado se debe notificar el número de leucocitos PMNs por campo de inmersión y si hay o no diplococos gramnegativos intracelulares.
2. En el cultivo, si a las 48- 72 horas de incubación no se observa crecimiento compatible con *N. gonorrhoeae*, se debe informar cómo negativo.
3. Si se observan colonias sospechosas, una vez confirmadas las pruebas de identificación presuntiva, se debe notificar el crecimiento de un microorganismo compatible con *Neisseria gonorrhoeae* pendiente de identificación definitiva. Una vez confirmada la identificación definitiva del microorganismo, se debe informar cómo tal y proceder a la realización del antibiograma.
4. Se informará el valor de CMI así como su interpretación de los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de la infección gonocócica.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación por parte de los servicios implicados, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Pueden obtenerse resultados falsamente negativos cuando la toma de muestra o su conservación no ha sido la adecuada.
- Las torundas de algodón inhiben el crecimiento del gonococo.
- Las placas deben incubarse en atmósfera de aproximadamente un 5% de CO₂ en un ambiente saturado de humedad.
- Es preferible utilizar dos torundas, una para cultivo y otra para examen microscópico (en su defecto puede inocularse un porta con el exudado directamente en la consulta).
- Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida.
- La tinción de Gram del exudado es una técnica 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 a trimetoprim, aunque actualmente estas cepas son muy poco frecuentes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Cultivo y antibiograma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PNT-ITS-04	
		Edición N° 02	Página 8 de 8

- 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. Alternativamente se puede realizar la identificación mediante MALDI-TOF.
- Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos pueden dar falsos positivos debido a 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. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Twenty-Second Informational Supplement, 32: 100 - 102 [Internet]. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1: 50 - 53 [Internet]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_8.1.pdf
4. Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. Clin Microbiol Rev. 1988; 1:415-431.
5. 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.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular del virus del herpes simplex en muestras anogenitales	PNT-ITS-07	
		Edición N° 01	Página 1 de 4

PNT-ITS-07

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLEX EN MUESTRAS ANOGENITALES

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2007	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular del virus del herpes simplex en muestras anogenitales	PNT-ITS-07	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la detección de ácidos nucleicos del virus del herpes simplex (VHS) en muestras anogenitales.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que realicen el estudio molecular de pacientes que presenten lesiones vesiculares o ulcerativas sospechosas de infección por el VHS.

2. FUNDAMENTO

Los métodos basados en TAANs para la detección del VHS en muestras anogenitales, están diseñados para detectar cualitativamente y diferenciar VHS-1 y VHS-2, empleando distintos objetivos moleculares (ARNm o ADN) y utilizando distintos sistemas de amplificación: qPCR (PCR en tiempo real), TMA (real-time transcription mediated amplification), SDA (*strand displacement amplification*), LAMP (*loop-mediated isothermal DNA amplification*) o HDA (*helicase-dependent amplification*). Estos sistemas detectan regiones conservadas de los genes que codifican la glucoproteína B o la ADN polimerasa.

Muchos de estos sistemas se integran en distintas plataformas de diagnóstico sindrómico de úlceras anogenitales que detectan además, del VHS-1 y VHS-2, *H. ducreyi*, *C. trachomatis* Serovar L, *T. pallidum* y virus varicela-zoster.

Algunos de estos sistemas requieren un paso previo de extracción manual o automatizada, aunque otros emplean plataformas que integran el proceso de extracción como parte del proceso diagnóstico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC. 2017. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 2014. 10 a. Pérez Saénz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores) SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Gimeno C (Coordinadora). Camaró M, Catalá V, Gimeno C, Martínez R, Olmos P. Validación y verificación de los métodos microbiológicos. 2013. 48. Gimeno C (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores) SEIMC 2013. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

La muestra adecuada para el estudio del VHS es el material procedente de vesículas o úlceras localizadas en el área anogenital. En mujeres, principalmente vulva, vagina, exocérvix o área perianal. En hombres; glándula, diáfisis del pene o área perianal.

Para la toma de muestras se debe utilizar una torunda fina preferiblemente con punta de dacrón, montada en un mango flexible.

La obtención de la muestra se realiza mediante el levantamiento de la parte superior de la vesícula (por ejemplo, con una aguja) y frotando la lesión con la torunda para obtener células epiteliales (y líquido). Para

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular del virus del herpes simplex en muestras anogenitales	PNT-ITS-07	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

las úlceras, raspar suavemente la base de la lesión con la torunda para obtener células epiteliales.

Es preciso prestar especial atención a las condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras. Después de la toma, la muestra debe colocarse de inmediato en viales que contengan un medio de transporte para virus (medio de transporte universal o cualquier sistema comercial adecuado proporcionado o recomendado por el fabricante de la técnica).

El envío de las muestras puede realizarse a temperatura ambiente si va a ser inmediato, y refrigerado si va a sufrir demora.

Las muestras pueden conservarse a refrigeradas a 2-8°C hasta 7 días después de la toma, pero si el procesamiento se va a demorar más de una semana deben congelarse a -70°C.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se utilizarán los reactivos, controles y demás productos suministrados el fabricante de la técnica. No se utilizarán materiales que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse los equipos adecuados para cada técnica siguiendo las indicaciones del fabricante. Los sistemas de extracción y amplificación pueden ser genéricos (compatibles) o exclusivos para una determinada TAAN.

Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible.

- Centrífugas.
- Agitadores.
- Pipetas y micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Material plástico desechable (punta de pipetas, tubos, etc).
- Guantes acetonitrilo o similares

7. PROCEDIMIENTO

Al existir distintos métodos comerciales para la determinación del VHS con marcado CE, es aconsejable seguir el protocolo y recomendaciones que proporcionan los fabricantes.

En los casos que sea necesario un proceso de extracción de ácidos nucleicos previo, se deben de emplear los métodos que los fabricantes recomiendan, ya que son los que han sido validados para el uso con dichos protocolos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se aplican las siguientes definiciones:

a) Durante la fase analítica

Reactivo: resultado positivo inicial de etapa interna pendiente de validación clínica.

No reactivo: resultado negativo pendiente de validación clínica.

Indeterminado: el resultado no es claramente positivo o negativo. Se requieren pruebas adicionales.

b) Durante la fase post-analítica

Detectado: resultado reactivo confirmado y validado.

No detectado: resultado no reactivo confirmado y validado.

Indeterminado: resultado reactivo que no puede ser confirmado.

Inhibitorio (o no válido): presencia de inhibidores dentro de la muestra que impide la amplificación. Se requiere una muestra adicional.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección molecular del virus del herpes simplex en muestras anogenitales	PNT-ITS-07	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología Molecular que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. Como recomendación general, deberán evitarse, en lo posible las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones en el manejo de las muestras.
- Se debe diseñar un flujo de trabajo unidireccional, que debe iniciarse en el área de extracción o preparación de las muestras para después pasar al área de amplificación o detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- Utilizar controles positivos y negativos en cada ensayo con idea de poder interpretar adecuadamente los resultados.
- Revisar los resultados del control interno para poder valorar que el desarrollo de la técnica ha sido correcto.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento de las técnicas.
- Tomar las medidas necesarias para la conservación o desecho de las muestras después de su estudio.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micro-pipetas, y de las superficies de trabajo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El empleo de muestras para los que la técnica no ha sido validada, puede provocar resultados inconsistentes.
- La posibilidad de falsos negativos depende de la calidad de la muestra y de la extracción, así como de los procesos de transporte o conservación inadecuados.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Hofstetter AM, Rosenthal SL, Stanberry LR. Current thinking on genital herpes. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27:75-83.
2. Johnston C, Corey L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: Diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:149-61.
3. LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virology.* 2014;11:83.
4. Patel R, Kennedy OJ, Clarke E, Geretti A, Nilsen A, Lautenschlager S, Green J, Donders G, van der Meijden W, Gomberg M, Moi H, Foley E. 2017 European guidelines for the management of genital herpes. *Int J STD AIDS.* 2017;28:1366-79.
5. Sauerbrei A. Optimal management of genital herpes: current perspectives. *Infect Drug Resist.* 2016;9:129-41.