



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Detección de infecciones de transmisión sexual por técnicas de biología molecular

Christian Sabater Cabrera^a, Mercedes Rodríguez Pérez^a, Fernando Vázquez^{a,b,c,*} y Luis Otero Guerra^d

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

^bDepartamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^cInstituto Oftalmológico Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^dServicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, España

RESUMEN

Palabras clave:

Biología molecular

Infecciones de transmisión sexual

Cribado de infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual precisan para su control de pruebas diagnósticas rápidas, fiables y que permitan su realización en situaciones de cribado. Las técnicas de biología molecular han supuesto una verdadera revolución diagnóstica. Debido a su elevada sensibilidad, no solo detectan más infecciones, sino que permiten la obtención de muestras poco invasivas que facilitan los programas de cribado y evitan el rechazo de los pacientes a la realización de toma de muestras. La mejora de su especificidad evita en muchos casos la realización de pruebas de confirmación, bajo la premisa del cumplimiento de normas de calidad. También permiten diagnosticar patógenos que las técnicas de cultivo son incapaces de recuperar, y cada vez tenemos plataformas diagnósticas más sencillas, versátiles y en formato múltiple que agilizan el trabajo en el laboratorio e incluso fuera de él.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Detection of sexually transmitted infections using molecular biology techniques

ABSTRACT

Keywords:

Molecular biology

Sexually transmitted infections

Screening assay

Sexually transmitted infections (STI) require rapid, reliable diagnostic tests that can be performed in screening situations. Molecular biology techniques have been a true diagnostic revolution. Due to their high sensitivity, they detect more infections and allow non-invasive sample collection, simplifying screening programs and minimising patient refusal to have samples taken. Improvements in specificity have reduced the need for confirmation tests in many cases, under the premise of compliance with quality standards. They also allow to identify pathogens that culture techniques are unable to recover. Moreover, diagnostic platforms are increasingly simple, versatile and available in multiplex format, facilitating work inside and outside the laboratory.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fvazquez@uniovi.es (F. Vazquez)

Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) suponen a escala global una importante carga de morbilidad y mortalidad. En España se viene asistiendo a un aumento en su incidencia, probablemente debido a la relajación por parte de la población en el uso de medidas de prevención como consecuencia de la pérdida de miedo a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Un pilar muy importante en la lucha contra estas infecciones lo constituyen las pruebas diagnósticas que permiten un abordaje terapéutico etiológico. No obstante, el diagnóstico de las ITS siempre ha sido difícil. Las principales bacterias productoras de ITS o no son cultivables —como ocurre con *Treponema pallidum*— o lo son en cultivos celulares de elevada dificultad técnica y baja sensibilidad, como en el caso de *Chlamydia trachomatis*, o solo se han conseguido en centros muy especializados como *Mycoplasma genitalium*. Otro patógeno de gran relevancia, como *Neisseria gonorrhoeae*, es muy sensible a las condiciones ambientales adversas y su cultivo ofrece falsos negativos. Para complicar aún más las cosas, algunos microorganismos como *Ureaplasma urealyticum* o *Mycoplasma hominis* desempeñan un papel dudoso como productores de enfermedad, recuperándose tanto de pacientes enfermos como sanos. En un porcentaje importante de casos, nunca se conseguía encontrar la etiología del cuadro clínico.

En los últimos años, el uso de las técnicas de biología molecular (TBM) —en especial las basadas en amplificación de ácidos nucleicos (AAN)— han cambiado el diagnóstico de las ITS y las infecciones genitales. Son innumerables las ventajas que aportan, como su elevada sensibilidad y especificidad; permitir usar muestras no invasivas y muestras tomadas por el propio paciente; detectar bajas concentraciones de microorganismos viables o no; poder hacer mejores cribados poblacionales y en muestras extragenitales; la incorporación del diagnóstico de patógenos de difícil o imposible cultivo; la tipificación de microorganismos, o la posibilidad de detectar algunos genes de resistencia¹. Sin embargo, también hay problemas, como la posibilidad de falsos positivos por contaminación; su elevado coste; el empleo de equipos sofisticados, y —aunque parezca una paradoja— el desplazamiento y supresión de técnicas clásicas como el cultivo, que permite la realización de pruebas fenotípicas de susceptibilidad, imprescindibles para orientar el tratamiento de patógenos multirresistentes, como ocurre en el caso del gonococo.

Por todo ello, los laboratorios han de tener estrictos controles de calidad, acreditaciones internacionales como la ISO o Joint Commission, y conocer aspectos como la prevalencia en la población de estos patógenos, ya que poblaciones con baja prevalencia comprometen el valor predictivo.

Respecto a las técnicas disponibles, hemos pasado de las técnicas de hibridación a la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional, y con posterioridad a otras más modernas como la PCR en tiempo real, la PCR múltiple o sistemas más fáciles de realizar como la amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop-mediated isothermal amplification* [LAMP]).

En este trabajo se revisa el uso y aportación de las técnicas de biología molecular al diagnóstico de las ITS, de las que se han excluido el VIH y los virus de las hepatitis que precisan de revisiones específicas.

Infección gonocócica

La infección gonocócica continúa siendo una causa importante de infecciones supuradas, aunque también produce infecciones asintomáticas (especialmente en mujeres). El diagnóstico clásico se realiza mediante el cultivo, que tiene la ventaja de su bajo coste y permite la realización de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se está reemplazando por las técnicas de detección de AAN que son más sensibles, pero cuyo valor predictivo positivo puede ser bajo en poblaciones de baja prevalencia. Ofrecen importantes ventajas frente al

cultivo, como no precisar organismos viables, por lo que las condiciones de transporte y conservación de la muestra son menos estrictas. Su elevada sensibilidad permite su uso tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos, y en muestras no invasivas como la orina de primer chorro del varón o el exudado vaginal. La sensibilidad de la orina en mujeres es menor y no se considera una muestra óptima². Son la prueba de elección en muestras extragenitales de recto y faringe, aunque, debido a los falsos positivos, se recomienda la confirmación con otra técnica frente a una diana diferente². Se han validado varias técnicas dirigidas frente a *N. gonorrhoeae*, solo o asociado a otros patógenos como *C. trachomatis*^{3,4} o en formato múltiple mediante *microarrays*⁵. También se ha desarrollado el sistema LAMP, más rápido, para el ORF1 del gen de la glutamino sintetasa de *N. gonorrhoeae*⁶.

La aparición de especies de *N. gonorrhoeae* multirresistentes ha devuelto protagonismo al cultivo, pero mediante TBM que detectan genes de resistencia se están desarrollando métodos de detección de resistencia a penicilina⁷ (gen *porB*), a ciprofloxacino⁸, a azitromicina⁹ y resistencias múltiples a cefalosporinas, azitromicina, ciprofloxacino y espectinomicina¹⁰. También se describen métodos que directamente desde muestras clínicas determinan resistencia a ciprofloxacino¹¹. Idealmente, los métodos de susceptibilidad deberían reflejar la CMI exacta a los antimicrobianos, pero como la aparición de resistencias se ve afectada por varios genes, es difícil que los métodos moleculares reflejen la CMI. En general son útiles para vigilancia epidemiológica, aunque sería interesante que pudiesen utilizarse en muestras clínicas y en situaciones en las que no es posible el cultivo¹². Las TBM también permiten el genotipado¹.

Infección por clamidias

C. trachomatis es la etiología bacteriana de ITS más frecuente. Afecta fundamentalmente a jóvenes, la mayoría de las veces de forma asintomática, por lo que la infección no es reconocida ni tratada y como consecuencia presenta complicaciones: enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), endometritis, salpingitis, infertilidad o embarazo ectópico. Inicialmente, el diagnóstico se realizaba con técnicas de baja sensibilidad como la inmunofluorescencia, el cultivo celular o la determinación antigénica mediante enzoinmunoanálisis, pero desde hace años se dispone de técnicas de AAN que constituyen el estándar diagnóstico por ser muy sensibles y específicas.

Su elevada sensibilidad permite su empleo en muestras muy diversas, como exudados uretrales o cervicales de pacientes sintomáticos, en los que ya se presupone una importante carga bacteriana, pero también en muestras no invasivas en pacientes asintomáticos, lo que las convierte en una herramienta indispensable en los programas de cribado poblacional¹³. En mujeres la muestra de elección es el exudado vulvovaginal —tanto obtenido por un facultativo como por la propia paciente— que es más sensible incluso que el exudado cervical obtenido mediante espéculo¹⁴. El primer chorro de orina en varones es una muestra tan sensible o incluso mejor que el exudado uretral, con las evidentes ventajas de aceptabilidad por parte del paciente. La muestra debe obtenerse habiendo dejado pasar como mínimo 1 h desde la última micción. La orina no es aceptable en mujeres. Las AAN también son de elección en localizaciones extragenitales. En el caso de muestras rectales, la toma puede tanto ser ciega como mediante proctoscopio, aunque no todas las técnicas comerciales presentan las mismas sensibilidades¹⁵. El problema derivado de la pérdida de sensibilidad (falsos negativos) de algunas técnicas —debido a la incapacidad para detectar la “nueva variante” de *Chlamydia* que presenta una delección en el plásmido diana— ya ha sido solventado por todas ellas mediante la modificación de la diana diagnóstica.

La especificidad de las AAN también es excelente, por lo que en poblaciones de riesgo no es necesario confirmar los resultados positivos con otra técnica frente a otra diana. Solo estaría indicado en casos con implicaciones legales y hay debate acerca de su convenien-

cia en muestras extragenitales. Así, mientras la guía británica no se muestra partidaria¹⁵, sí se aconseja en la guía de los Centers for Disease Control and Prevention¹⁶.

Las TBM también permiten conocer la serovariedad, de interés epidemiológico y especialmente para detectar las serovariedades L, responsables del linfogranuloma venéreo (LGV). Las serovariedades se pueden determinar mediante el análisis PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción) del gen *omp1* o mediante secuenciación¹.

Linfogranuloma venéreo

Producido por *C. trachomatis* serovariedad L1, L2a, L2b y L3. Desde su reemergencia en Europa durante la pasada década, el LGV se ha convertido en endémico en la población de hombres que tienen sexo con otros hombres, y se asocia fuertemente a individuos infectados por el VIH. Cuando la adquisición es genital, suele causar clínica ulcerativa en el lugar de entrada y días o semanas después y, debido a su carácter linfotrópico, adenopatías inguinales. Si la adquisición es rectal, produce un síndrome anorrectal, habitualmente sin adenopatías demostrables a la exploración por no estar accesibles. Existe la infección rectal asintomática.

Son muestras aceptables los exudados de la base de las úlceras, aspirados ganglionares, exudados rectales, faríngeos, uretrales e incluso el primer chorro de orina si se sospecha afectación genital¹⁷.

Para el diagnóstico, los métodos clásicos de cultivo y serología han sido sustituidos por las más sensibles técnicas de AAN, ya que todas las comercializadas para *Chlamydia* detectan las serovariedades del LGV, aunque sin poder diferenciarlas del resto. Realizado este primer paso, las muestras positivas para *Chlamydia* deben estudiarse para determinar si pertenecen a la serovariedad L, lo que habitualmente se realiza en centros de referencia. Existen varias posibilidades, bien mediante amplificación con PCR caseras del gen *omp1* o el *CrP*, seguido de técnicas de tipificación mediante RFLP o mediante secuenciación.

Infecciones por micoplasmas

El papel de los micoplasmas como etiología de ITS siempre se ha discutido debido a su papel comensal en muchos individuos. Además, la principal herramienta diagnóstica era el cultivo y presentaba muchas limitaciones, por lo que la aparición de las técnicas de biología molecular ha supuesto una auténtica revolución. Permiten diferenciar *U. urealyticum* en 2 especies distintas: por un lado *U. parvum* (no implicado en patología), y por otro lado *U. urealyticum* propiamente dicho, responsable de casos de uretritis¹⁸. Aun así, se sigue encontrando *U. urealyticum* en pacientes asintomáticos y la carga bacteriana tiene elevado valor predictivo con la producción de uretritis¹⁹. *M. hominis* también se recupera en el 20-50% de las mujeres asintomáticas sexualmente activas, aunque su papel patógeno está claramente establecido en la vaginosis bacteriana y, con menor fuerza, en casos de endometritis y EIP. Se han comercializado técnicas de PCR en tiempo real que determinan la presencia de *M. hominis*, diferencian las 2 especies de *Ureaplasma* y también son capaces de determinar la presencia de una tercera especie de micoplasma implicada en ITS: *M. genitalium*. No existe ninguna duda sobre el papel patogénico de *M. genitalium* como productor de uretritis²⁰, de la que sería la segunda causa más frecuente solo por detrás de *C. trachomatis*. También se ha demostrado su relación con cervicitis y EIP²¹. El cultivo de *M. genitalium* es muy lento (meses), poco sensible y solo ha podido cultivarse en laboratorios de referencia muy especializados, por lo que a efectos prácticos su presencia solo se puede demostrar mediante técnicas de AAN, que generalmente se basan en la detección del gen de la adhesina *MgPa*. Las muestras apropiadas son las mismas que se emplearían en el caso de *Chlamydia*. La aparición de resistencia a los antimicrobianos (tanto a azitromicina, que se emplea como

primera línea, como a moxifloxacino, que se emplea como segunda línea) constituye un problema. Si fracasan ambos tratamientos, las opciones son doxiciclina o pristinamicina²². Se han descrito técnicas de PCR en tiempo real que estudian la presencia de mutaciones en el gen *rRNA 23S* que determinan resistencia a azitromicina²³ y al gen *ParC* para moxifloxacino²⁴.

Sífilis

El estudio molecular de la sífilis se está implantando cada vez más como un método de diagnóstico en los laboratorios de microbiología y las nuevas guías incluyen este marcador en sus recomendaciones²⁵. Las técnicas moleculares evitan las limitaciones de otros métodos de detección directa, como la microscopía de campo oscuro y la inmunofluorescencia directa, métodos con baja sensibilidad.

El genoma de *T. pallidum* se ha detectado en úlceras genitales, muestras de tejidos, líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre. Es el método de elección para lesiones orales, donde puede haber contaminación con treponemas comensales.

Se han desarrollado distintos métodos de detección de *T. pallidum* basados en amplificación genómica o PCR (simple, anidada, en tiempo real), utilizando como diana distintos genes que codifican lipoproteínas (*bmp*, *tpa47*, *tmpA* o 4D) o genes como *poA*²⁶. Varios estudios muestran concordancia en los resultados²⁷. La PCR de *T. pallidum* presenta una mayor sensibilidad que la microscopía de campo oscuro en el estudio de úlceras genitales en la sífilis primaria²⁸.

La biología molecular también se usa con fines epidemiológicos y se han descrito técnicas basadas en la amplificación y posterior RFLP de los genes *arp* y *tpa*²⁹, como también técnicas de secuenciación. Sin embargo, la capacidad de discriminación es baja, ya que el subtipo 14d predomina en Europa y en muchas partes del mundo²⁵.

Donovanosis o granuloma inguinal

Las TBM se han desarrollado poco en esta infección, excepto para estudios de caracterización del agente causal y su relación con el género *Klebsiella*. Se ha desarrollado un sistema de captura de oligonucleótidos del gen *phoE* de *Klebsiella* con detección colorimétrica³⁰.

Chancroide

Las TBM tienen una sensibilidad del 95%³¹, y actualmente se han diseñado métodos moleculares comerciales en formato múltiple para detección en úlceras que incluye, entre otros patógenos, la sífilis y el herpes genital³². Con las TBM se ha puesto de manifiesto la presencia de este patógeno en úlceras cutáneas extragenitales en regiones tropicales y subtropicales, y que se trata de cepas de la clase I que han divergido recientemente³³.

Infecciones por herpes genital

El virus herpes simplex (VHS) es un virus ADN de doble cadena, ubicuo (afecta a todo tipo de poblaciones), responsable de infecciones orolabiales (asociadas principalmente a VHS-1) y genitales (más frecuentes por VHS-2), aunque ambos virus producen los 2 tipos de patología. La transmisión ocurre por contacto directo con lesiones con replicación activa tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos³⁴. Después de la infección primaria, el virus queda en estado de latencia en los ganglios sensoriales y causa reactivaciones en el huésped, siendo el VHS-2 el que presenta la tasa de recaída más alta en infección genital. Se puede diagnosticar clínicamente cuando las lesiones presentan el patrón de vesículas que evolucionan a úlceras y finalmente costras que curan espontáneamente. Pero en presentaciones atípicas, complicaciones extragenitales, para diferenciarla de otras lesiones ulcerativas, y para genotipar el virus, es necesario el diagnóstico microbiológico. Clásicamente, al ser lesiones con alta

carga viral, el cultivo celular ha sido el “patrón oro”. No obstante, en los últimos años se ha demostrado que las técnicas genómicas aumentan la sensibilidad³⁵ entre un 11 y un 71%, son útiles en todo tipo de muestras (exudados, lesiones, LCR, sangre, humor vítreo) y permiten detectar infecciones subclínicas y con baja carga viral.

Las técnicas moleculares utilizan como dianas secuencias conservadas de genes que codifican proteínas para ADN polimerasa y timidina-cinasa (comunes a VHS-1 y VHS-2), o glucoproteínas de superficie (gG, gD, gI) que permiten discernir entre los 2 tipos de VHS.

Al principio se propusieron varios procedimientos moleculares basados en la detección del genoma por hibridación, y PCR anidadas³⁶, pensadas principalmente para detectar bajas cargas virales. En la actualidad se han sustituido por métodos de mayor rapidez, menor coste económico, menor complejidad intralaboratorio y menor riesgo de contaminación cruzada, como la PCR en tiempo real, que permiten tanto la detección como la cuantificación del virus. Además se ha comprobado que no hay un descenso de la sensibilidad respecto a la PCR anidada^{1,37} y se detectan 50 copias/ml. Se han desarrollado multitud de protocolos para PCR en tiempo real³⁸ que permiten efectuar en el laboratorio un diagnóstico casero, siempre que se disponga de un control positivo interno que detecte la presencia de inhibidores de amplificación y controle la calidad de la preparación de la muestra, y un control negativo. También están disponibles comercialmente. Hay PCR múltiples de cribado de VHS junto con otras ITS³⁹. Otro uso importante de las técnicas moleculares es la detección de resistencias a los antivirales. En pacientes inmunodeprimidos (VIH, trasplantes de órgano sólido o de células hematopoyéticas), la tasa de resistencias es significativa⁴⁰ (3,5-10%) y ha llegado incluso al 36%⁴¹. Este fenómeno se lleva a cabo por mutaciones en los genes *UL-23* (timidina-cinasa) y *UL-30* (ADN polimerasa), que es donde están los segmentos que servirán de diana molecular, para seguidamente secuenciar los amplicones obtenidos y buscar mutaciones causantes de resistencia.

Tricomoniasis

Aunque en países como Estados Unidos hay zonas con alta prevalencia, en Europa y en España su presencia ha disminuido drásticamente en los últimos años, por lo que algunos estudios⁴² indican que el uso de métodos moleculares, con mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales, solo estarían indicados para poblaciones de riesgo con una prevalencia > 2% o en uretritis no gonocócicas persistentes⁴³.

Las TBM fueron en un principio sistemas basados en la hibridación del ADN, como el Affirm VP III (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos) o PCR caseras⁴⁴. Actualmente se dispone de métodos comerciales como la PCR en tiempo real Roche LightCycler (Roche Diagnostics)⁴⁵ o el BD ProbeTec TV Qx Amplified DNA (Becton Dickinson). Cuando se comparan técnicas de AAN con el cultivo, se encuentra que este último solo tiene una sensibilidad del 70%.

El desarrollo de métodos de amplificación como el LAMP ha permitido acercar el diagnóstico a entornos en los que no es posible hacer la PCR convencional. Así, en un estudio reciente con una diana del gen de la actina, esta técnica fue comparable a la PCR convencional y mejor que el cultivo o la PCR múltiple⁴⁶. Otros métodos, como el AmpliVue assay (método de PCR isotérmica dependiente de la helicasa), tienen una sensibilidad del 97,8% y una especificidad del 98,9% cuando se comparan con el Aptima TV⁴⁷. Los paneles de PCR múltiple como Allplex (Seegene) o FilmArray (BioFire) permiten la detección de varios patógenos.

Se están desarrollando nuevos métodos como PCR asimétricas usando cebadores contra el gen *pfoB* que dan menos falsos positivos y que son interesantes para países con pocos recursos⁴⁸.

Un aspecto importante es el origen de la muestra, ya que en mujeres tanto la orina de primer chorro como el exudado vaginal incluso recogido por la propia paciente son válidos; en el varón es conve-

niente recoger, además de la orina, muestras de uretra y semen⁴⁴. El tiempo que se tarda en procesar la muestra desde que se recoge condiciona la sensibilidad de la técnica, incluso para las PCR, y en consecuencia las muestras de orina no deberían permanecer más de 1 h a temperatura ambiente antes de ser procesadas o congeladas⁴⁹.

Para estudios de genotipificación se ha recomendado el uso de técnicas como el RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Estudios recientes usan MLST (*multilocus sequence typing*) con una PCR anillada de muestras directas y encuentran que el genotipo II está más asociado a redes sexuales de alto riesgo⁵⁰.

Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN que representa una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes a nivel global y que infecta a todas las razas, sexos y edades. La mayoría de las infecciones genitales por VPH se adquieren por vía sexual y alrededor del 90% son asintomáticas y transitorias al ser eliminadas por el propio sistema inmune del individuo⁵¹. Sin embargo, en otros casos pueden causar desde verrugas o condilomas hasta distintos tipos de neoplasias como la del cuello del útero⁵² (para cuyo desarrollo es necesario el VPH), vagina, ano⁵³, pene⁵⁴ y cáncer orofaríngeo. Además, cada vez hay más hallazgos de ADN de VPH de alto riesgo en cánceres menos habituales⁵⁵. Debido a las graves consecuencias a largo plazo, es necesario un diagnóstico y un seguimiento de estos pacientes.

Debido a la poca rentabilidad del cultivo y de la serología, se han desarrollado numerosos ensayos para detectar VPH mediante detección genómica en distintos tipos de muestras: exudados vaginales, endocervicales, anales, uretrales, faríngeos y biopsias⁵⁶. Estos ensayos se basan en la amplificación de la diana (PCR), amplificación de la señal o amplificación mediante sondas.

La captura de híbridos es un método basado en la hibridación del ADN viral con sondas ARN; estos híbridos se ponen de manifiesto mediante quimioluminiscencia. Se usan 2 cócteles de sondas: uno de ellos frente a 13 genotipos del VPH de alto riesgo y el otro frente a 5 genotipos de bajo riesgo. Esta técnica posee una sensibilidad inferior a la de la PCR.

Los métodos de amplificación genómica permiten la detección del VPH amplificando la región conservada del gen de la proteína mayor de la cápsida (L1) utilizando cebadores consenso (MY11/MY09, GP5+/6+, SPF10). También se han desarrollado técnicas de amplificación genómica con otras dianas dentro del genoma del VPH como el ARNm de los oncogenes virales E6-E7 (PCR en tiempo real), mediante los cuales se puede obtener información del carácter oncogénico del virus y la progresión de la enfermedad.

Hay una amplia gama de técnicas comerciales disponibles de las cuales solo 5 están aprobadas por la Food and Drug Administration (Hybrid Capture 2®, Digene; Cervista HPV HR® y Cervista HPV16/18®, Hologic que se basan en amplificación de la señal; Cobas HPV Test®, Roche Diagnostics y Aptima HPV Assay® Hologic en amplificación de la diana). Aptima HPV es la única validada con detección de ARNm de E6/E7 en que se observa que su sobreexpresión está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad⁵⁷.

Se han desarrollado técnicas para la caracterización viral una vez detectado el VPH, como la hibridación de los productos de amplificación con sondas específicas para cada tipo viral o la secuenciación, en la que mediante cebadores o dideoxinucleótidos marcados se obtiene la secuencia de bases del genoma viral⁵⁸. También existen ensayos para buscar las distintas variantes del VPH que ayuden a un mejor control y pronóstico de la infección^{59,60}.

Vaginosis

La vaginosis es la causa más frecuente de leucorrea. Para el diagnóstico no se recomienda el cultivo de *Gardnerella vaginalis*, debido a

que se puede recuperar de la vagina del 50% de las mujeres asintomáticas. El diagnóstico se puede basar en los criterios de Amsel que valoran el flujo vaginal (aspecto, pH, olor al añadir KOH y presencia de células clave), o mediante los criterios de Nugent o de Hay/Ison⁶¹ que valoran los morfotipos bacterianos que se observan en la tinción de Gram. Todos estos criterios tienen un amplio margen de subjetividad y, en muchas ocasiones, el resultado pertenece a la categoría de indeterminado. Para solventarlo, se han descrito pruebas de laboratorio tanto basadas en la determinación de actividad enzimática, como mediante técnicas de biología molecular. Un enfoque es determinar la presencia de elevadas concentraciones de *G. vaginalis* en exudados vaginales mediante sondas de ADN (Affirm VP III, Beckton Dickinson) que además determinan la presencia de *Trichomonas vaginalis* y de *Candida*. Por otro lado, se han desarrollado (aunque todavía no se han comercializado) técnicas de PCR en formato múltiple con excelente sensibilidad y especificidad que semicuantifican varios microorganismos implicados en la vaginosis, bien con papel patógeno (*G. vaginalis*, *Atopobium vaginae* y *Megasphaera-1*) o con papel protector, como *Lactobacillus crispatus*⁶².

Candidiasis

En el caso de las vulvovaginitis por *Candida*, el desarrollo de TBM es muy incipiente debido al precio y a la complejidad técnica, frente a la facilidad que presenta el cultivo. Está disponible en el mercado el sistema Affirm VP III que, como ya se ha citado, determina la presencia de *G. vaginalis*, *T. vaginalis* y *Candida* spp.

Otras: sarna y Molluscum

Sarna

Se ha estudiado por TBM en casos de manifestaciones cutáneas atípicas y en búsqueda de resistencia a acaricidas. Se ha usado una PCR cuantitativa de torundas de lesiones de sarna en vez de raspados y mide la disminución del parásito después del tratamiento⁶³.

Molluscum contagiosum

Se ha utilizado para caracterizar los 4 genotipos del virus y en muestras de torundas con una PCR en tiempo real¹.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Vazquez F, Otero L, Melón S, De Oña M. Overview of molecular biological methods for the detection of pathogens causing sexually transmitted infections. *Methods Mol Biol.* 2012;903:1-20.
- Bignell C, Fitzgerald M; Guideline Development Group; British Association for Sexual Health and HIV UK. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS.* 2011;22:541-7.
- Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, Alawattagama A, Hart IJ. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. *Sex Transm Infect.* 2010;86:207-11.
- Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for the Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3236-43.
- Cao B, Wang S, Tian Z, Hu P, Feng L, Wang L. DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases. *PLoS One.* 2015;10:e0133927.
- Edwards T, Burke PA, Smalley HB, Gillies L, Hobbs G. Loop-mediated isothermal amplification test for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples and tolerance of the assay to the presence of urea. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2163-5.
- Buckley C, Trembizki E, Donovan B, Chen M, Freeman K, Guy R, et al. Gonorrhoea Resistance Assessment by Nucleic Acid Detection (GRAND) Study Investigators. Real-time PCR detection of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to penicillin. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3090-5.
- Hemarajata P, Yang S, Soge OO, Humphries RM, Klausner JD. Performance and Verification of a Real-Time PCR Assay Targeting the *gyrA* Gene for Prediction of Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:805-8.
- Trembizki E, Buckley C, Donovan B, Chen M, Guy R, Kaldor J, et al. Direct real-time PCR-based detection of *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA mutations associated with azithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:3244-9.
- Donà V, Kasraian S, Lupo A, Guilarte YN, Hauser C, Furrer H, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melting Analysis for Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2074-81.
- Pond MJ, Hall CL, Miari VF, Cole M, Laing KG, Jagatia H, et al. Accurate detection of *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin susceptibility directly from genital and extragenital clinical samples: towards genotype-guided antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:897-902.
- Low N, Unemo M. Molecular tests for the detection of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae*: when, where, and how to use? *Curr Opin Infect Dis.* 2016; 29:45-51.
- Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F; Chlamydia Primary Care Group. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis.* 2013;13:388.
- Schachter J, Chernesky MA, Willis D, Fine P, Martin D, Fuller D, et al. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis.* 2005;32:725-8.
- Nwokolo NC, Dragovic B, Patel S, Tong CY, Barker G, Radcliffe K. 2015 UK national guideline for the management of infection with *Chlamydia trachomatis*. *Int J STD AIDS.* 2016;27:251-67.
- 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.
- White J, O'Farrell N, Daniels D; British Association for Sexual Health and HIV. 2013 UK National Guideline for the management of lymphogranuloma venereum: Clinical Effectiveness Group of the British Association for Sexual Health and HIV (CEG/BASHH) Guideline development group. *Int J STD AIDS.* 2013;24:593-601.
- Zhang N, Wang R, Li X, Liu X, Tang Z, Liu Y. Are *Ureaplasma* spp a cause of nongonococcal urethritis? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e113771.
- Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *Int J STD AIDS.* 2014;25:294-8.
- Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:498-514.
- Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: A meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2015;61:418-26.
- Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30:1650-16.
- Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bebear C, Pereyre S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1549-55.
- Shimada Y, Deguchi T, Nakane K, Masue T, Yasuda M, Yokoi S, et al. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:255-8.
- 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.
- Heymans R, Van der Helm JJ, De Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2010;48:497-502.
- Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol.* 2012;50:546-52.
- Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavasini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:127-9.
- Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis.* 1998;25:408-14.
- Carter JS, Kemp DJ. A colorimetric detection system for *Calymatobacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect.* 2000;76:134-6.
- Lewis DA, Ison CA. Chancroid. *Sex Transm Infect.* 2006; 82 Suppl 4:iv19-20.
- Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS.* 2016;27:1275-82.
- Lewis DA, Mitjà O. *Haemophilus ducreyi*: from sexually transmitted infection to skin ulcer pathogen. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:52-7.
- Gnann JW Jr, Whitley RJ. Clinical Practice. Genital Herpes. *N Engl J Med.* 2016;375:666-74.
- Ramaswamy M, McDonald C, Smith M, Thomas D, Maxwell S, Tenant-Flowers M, et al. Diagnosis of genital herpes by real time PCR in routine clinical practice. *Sex Transm Infect.* 2004;80:406-10.
- Hidalgo F, Melón S, De Oña M, Do Santos V, Martínez A, Cimadevilla R, et al. Diagnosis of herpetic keratoconjunctivitis by nested polymerase chain reaction in human tear film. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17:120-3.
- Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zwegyberg Würgart B, Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus

- in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol.* 2004;29:120-6.
38. Liu J, Yi J, Chen W, Si S, Yin M, Jin H, et al. Development and evaluation of the quantitative real-time PCR assay in detection and typing or herpes simplex virus in swab specimens from patients with genital herpes. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8: 18758-64.
 39. Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS.* 2016;27: 1275-82.
 40. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:459-72.
 41. Langston AA, Redei I, Caliendo AM, Somani J, Hutcherson D, Lonial S, et al. Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood.* 2002;99:1085-8.
 42. Field N, Clifton S, Alexander S, Ison CA, Khanom R, Saunders P, et al. *Trichomonas vaginalis* infection is uncommon in the British general population: implications for clinical testing and public health screening. *Sex Transm Infect.* 2016. doi: 10.1136/sextrans-2016-052660. [Epub ahead of print].
 43. Horner PJ, Blee K, Falk L, Van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS.* 2016;27:928-37.
 44. Mabey D, Ackers J, Adu-Sarkodie Y. *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect.* 2006;82 Suppl 4:iv26-7.
 45. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 3205-10.
 46. Goo YK, Shin WS, Yang HW, Joo SY, Song SM, Ryu JS, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification targeting actin DNA of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol.* 2016;54:329-34.
 47. Gaydos CA, Hobbs M, Marrazzo J, Schwebke J, Coleman JS, Masek B, et al. Rapid Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* by testing vaginal swabs in an Isothermal Helicase-Dependent AmpliVue Assay. *Sex Transm Dis.* 2016;43:369-73.
 48. Sonkar SC, Sachdev D, Mishra PK, Kumar A, Mittal P, Saluja D. A molecular-beacon-based asymmetric PCR assay for easy visualization of amplicons in the diagnosis of trichomoniasis. *Biosens Bioelectron.* 2016;86:41-7.
 49. Shafir SC, Sorvillo FJ. Viability of *Trichomonas vaginalis* in urine: epidemiologic and clinical implications. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 3787-9.
 50. Van der Veer C, Himschoot M, Bruisten SM. Multilocus sequence typing of *Trichomonas vaginalis* clinical samples from Amsterdam, the Netherlands. *BMJ Open.* 2016;6:e013997.
 51. Bladé AT, Saladrígues MP, Gimferrer MC, Quitllet FA, Ortiz DA, Piqué XC, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Prog Obstet Ginecol.* 2014;57 Supl 1:1-53.
 52. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:342-50.
 53. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer.* 2015;136:98-107.
 54. Alemany L, Cubilla A, Haleb G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol.* 2016;69: 953-61.
 55. Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, Colombo M, Summers G, Figueroa A, et al. The role of human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review. *Int Rev Immunol.* 2014;33:383-401.
 56. Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. 57. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. En: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2016.
 57. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:291-319.
 58. De Oña M, Alvarez-Argüelles ME, Torrents M, Villa L, Rodríguez-Feijoo A, Palacio A, et al. Prevalence, evolution, and features of infection with human papillomavirus: a 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *J Med Virol.* 2010;82:597-604.
 59. Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo KC, Rodríguez-Sánchez IP, Barboza-Cerda MC, Lugo-Trampe JJ, Hernández-Ramírez LC, et al. A PCR-RFLP method for typing human papillomavirus type 16 variants. *J Virol Methods.* 2013;187:338-44.
 60. Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martínez N, Anderson DN, Wheeler CM. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology.* 2005;338:22-34.
 61. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002;78:413-5.
 62. Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2321-9.
 63. Wong SS, Poon RW, Chau S, Wong SC, To KK, Cheng VC, et al. Development of conventional and Real-Time quantitative PCR assays for diagnosis and monitoring of scabies. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2095-102.