

---

# Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual y el virus de la inmunodeficiencia humana

---

PID\_00259600

Victoria González  
Juliana Reyes-Urueña

---

Tiempo mínimo de dedicación recomendado: 3 horas

---



**Victoria González**

**Juliana Reyes-Urueña**

# Índice

<b>1. Recogida y transporte de las muestras biológicas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual.....</b>	<b>5</b>
1.1. Aspectos generales .....	5
1.2. Tipos de muestras .....	5
1.2.1. Exudado rectal .....	5
1.2.2. Exudado endocervical .....	6
1.2.3. Exudado uretral .....	6
1.2.4. Exudado balano-prepucial .....	6
1.2.5. Exudado faríngeo .....	6
1.2.6. Exudado de úlceras .....	6
1.2.7. Exudado vaginal .....	7
1.2.8. Suero .....	7
1.3. Transporte y conservación de las muestras .....	8
<b>2. Técnicas microbiológicas para el diagnóstico de las ITS.....</b>	<b>9</b>
2.1. Técnicas de diagnóstico directo .....	9
2.1.1. Examen directo .....	9
2.1.2. Aislamiento en cultivo .....	11
2.1.3. Estudio de sensibilidad antibiótica .....	14
2.2. Técnicas de diagnóstico indirecto .....	19
2.2.1. Técnicas de detección de antígenos .....	19
2.2.2. Técnicas de detección de anticuerpos. Serología .....	21
2.3. Técnicas de biología molecular .....	31
2.4. Técnicas de diagnóstico rápido (POC test: <i>point-of-care tests</i> ) .....	36
<b>Glosario.....</b>	<b>41</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>42</b>



# **1. Recogida y transporte de las muestras biológicas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual**

En este apartado se expondrán los aspectos generales relacionados con el diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (ITS), los principales tipos de muestras, así como el transporte y la conservación de estas.

## **1.1. Aspectos generales**

En el diagnóstico microbiológico de las ITS se deben tener presentes los seis principios generales de la recogida de muestras para estudios microbiológicos:

- 1) Las muestras deben recogerse en los medios de transporte adecuados y en condiciones de máxima asepsia.
- 2) La muestra debe ir etiquetada con el nombre del paciente, el servicio solicitante, el tipo de muestra y la fecha de recogida.
- 3) Se debe recoger una cantidad de muestra adecuada, ya que las muestras con escaso volumen pueden conducir a errores diagnósticos.
- 4) Las muestras deben ser recogidas previamente a la instauración del tratamiento antibiótico.
- 5) Las muestras siempre han de ir acompañadas de la petición realizada por el médico que atiende al paciente. En la petición se ha de indicar: servicio y médico solicitante, motivo de consulta y enfermedad de base del paciente, si la hubiera.
- 6) El envío de las muestras al laboratorio de microbiología se debe realizar lo antes posible para asegurar la supervivencia de los microorganismos de difícil crecimiento y para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota normal.

## **1.2. Tipos de muestras**

### **1.2.1. Exudado rectal**

Para la recogida de este tipo de muestras, se ha de introducir por el recto una torunda de algodón con medio Stuart-Amies si se sospecha de una infección por *Neisseria gonorrhoeae*, o una torunda de alginato cálcico o dacrón si la sos-

pecha es de infección por *Chlamydia trachomatis*. Las torundas se han de rotar por las criptas rectales durante unos 10-30 segundos aproximadamente, evitando el contacto con materia fecal.

### **1.2.2. Exudado endocervical**

Antes de obtener una muestra del endocérvix es necesario limpiar las secreciones vaginales y el moco con una torunda seca. Posteriormente, se ha de comprimir suavemente el cérvix con el espéculo y se utilizarán dos torundas. Una de ellas se empleará para el cultivo de *Neisseria gonorrhoeae* y otros microorganismos aerobios, y la otra torunda se utilizará para la detección de *Chlamydia trachomatis* mediante técnicas de biología molecular.

### **1.2.3. Exudado uretral**

En la toma de exudados uretrales es importante que el paciente no haya orinado en las dos horas previas a la recogida de la muestra. Si hay secreción abundante, esta se puede recoger directamente con una torunda haciendo presión sobre la uretra. En cualquier otro caso se introducirán suavemente por la uretra unas torundas finas con varilla de alambre, de alginato cálcico o dacrón, realizando un movimiento de rotación. Posteriormente, se extraerá la torunda y se introducirá en el medio de transporte tipo Stuart-Amies.

### **1.2.4. Exudado balano-prepucial**

Esta muestra se ha de recoger pasando una torunda estéril de algodón con medio Stuart-Amies por el surco balano-prepucial.

### **1.2.5. Exudado faríngeo**

Para la obtención de esta muestra se ha de utilizar un depresor lingual y una torunda. La torunda se frotará por la faringe posterior y por las zonas que estén inflamadas o ulceradas. Esta muestra se recogerá en los casos de sospecha de infección por *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*.

### **1.2.6. Exudado de úlceras**

Previamente a la recogida de exudados de úlceras genitales, se ha de limpiar la superficie con una gasa humedecida en suero salino.

En función de la sospecha clínica, la recogida del contenido de las úlceras se realizará de la siguiente manera:

- 1) Para ulceraciones con sospecha de infección por virus herpes (VHS), se tiene que romper la vesícula y recoger el líquido con una torunda estéril, o bien aspirar el líquido y, posteriormente, raspar la base de la vesícula con un bisturí y recogerla con una torunda de dacrón frotando fuerte sobre la vesícula. En el

caso de vesículas con costra, esta se ha de retirar cuidadosamente con la ayuda de un bisturí y después humedecer una torunda en solución salina estéril y frotarla vigorosamente sobre la lesión, con el fin de evitar el sangrado. Con el material obtenido se puede realizar una extensión sobre un porta para tinción por inmunofluorescencia directa (IFD) o bien la detección del DNA del VHS por técnicas de biología molecular.

2) Para las úlceras con sospecha clínica de infección por *Haemophilus ducreyi* se utilizará una aguja para aspirar el líquido de la úlcera, irrigar con solución salina e introducir el contenido en un medio de transporte que contenga hemina, tioglicolato con L-glutamina, fracción V de albúmina bovina y vancomicina. En este medio la supervivencia de este microorganismo oscila entre 24 horas y 7 días a 4 °C.

3) Si la sospecha clínica es de sífilis, primero se emparará la úlcera en solución salina con una gasa estéril. Se ha de apretar suavemente la lesión para que salga el líquido. La úlcera se debe tocar con un portaobjetos; asimismo se debe poner encima un cubreobjetos y se debe observar inmediatamente con el microscopio de campo oscuro.

4) En los casos de sospecha de infección por *Klebsiella granulomatis* (donovanosis) es preferible que las muestras se recojan por debajo de la superficie de la lesión. En este caso, se pueden recoger muestras de biopsia o raspado del borde de la lesión o muestras del tejido granulado, las cuales se pueden recoger con un bisturí o escalpelo. Es muy importante que la zona de la úlcera se limpie con solución salina estéril.

5) En el caso de sospecha de infección por el serovar L de *Chlamydia trachomatis*, causante del linfogranuloma venéreo (LGV), se debe aspirar el líquido de la adenopatía inguinal y extenderlo sobre un portaobjetos para hacer una tinción de inmunofluorescencia directa (IFD). Esta muestra se podrá utilizar también para la detección del serovar L mediante técnicas de biología molecular.

### **1.2.7. Exudado vaginal**

Para recoger un exudado vaginal es necesario un espéculo. Es recomendable recoger el exudado de la zona donde sea más abundante o, en su caso, del fondo de saco vaginal posterior. Este tipo de muestra es óptimo para la detección de candidas y *Trichomonas vaginalis*. Pero frente a la sospecha de infección por *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae* la muestra de elección es un exudado endocervical.

### **1.2.8. Suero**

Las muestras de suero se recogerán para el diagnóstico de ITS causadas por *Treponema pallidum*, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC). Para recoger las muestras de

suero se debe descontaminar la piel y recoger la muestra en tubos con gel separador. Posteriormente, y para separar el suero, las muestras se centrifugarán a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.

### **1.3. Transporte y conservación de las muestras**

Las muestras se deben enviar al laboratorio lo antes posible. Especialmente las muestras recogidas para el estudio de infección por *Neisseria gonorrhoeae*, debido a la sensibilidad de este microorganismo a los cambios de temperatura. Cuando las muestras no pueden procesarse de inmediato, los escobillones (para cultivo convencional) se deben conservar en medio de transporte tipo Amies o Stuart y mantenerse a temperatura ambiente. Las muestras para la detección de antígenos o anticuerpos mediante técnicas de enzimoinmunoensayo (EIA) o para técnicas de biología molecular deben recogerse siguiendo las instrucciones recomendadas por cada fabricante. Las muestras de orina son aceptables para estos estudios.

Una vez las muestras hayan sido procesadas, es recomendable conservarlas, según el tipo de muestra, a temperatura ambiente, refrigeradas o congeladas un tiempo mínimo (aproximadamente 5 días), por si hay cualquier problema durante su procesamiento o en la interpretación de los resultados.



## 2. Técnicas microbiológicas para el diagnóstico de las ITS

En este apartado se clasificarán las técnicas microbiológicas para el diagnóstico de las ITS, dependiendo de si son de diagnóstico directo, indirecto, rápido o de biología molecular.

### 2.1. Técnicas de diagnóstico directo

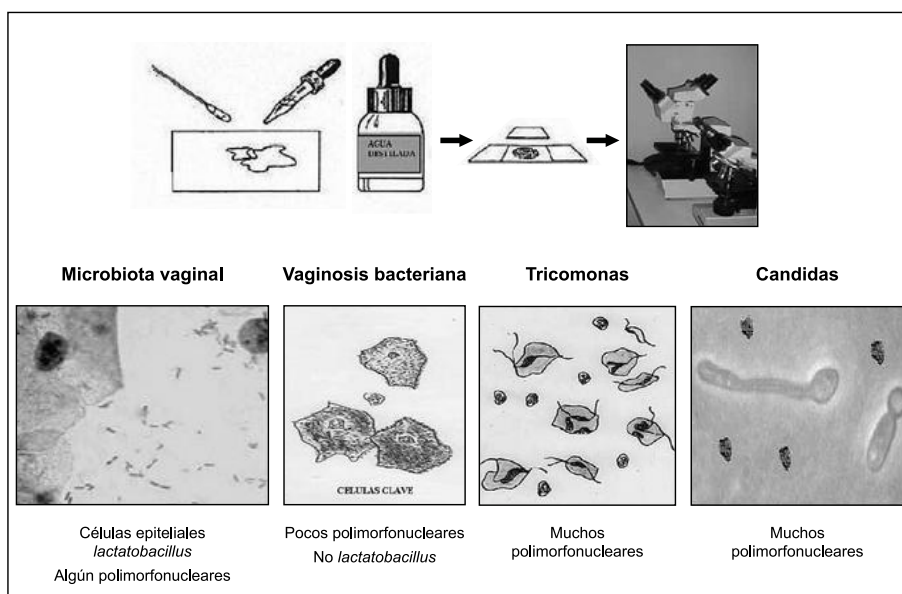
#### 2.1.1. Examen directo

##### Examen en fresco y tinción de Gram

El examen microscópico en fresco es una técnica rápida, fácil y de bajo coste, que permite observar con elevada sensibilidad microorganismos como tricomonas, levaduras y *Gardnerella vaginalis*.

El examen en fresco con microscopía de campo oscuro es el método de diagnóstico más rápido y directo en la fase primaria, secundaria y congénita precoz de la sífilis. La muestra ideal es el exudado de las lesiones (chancro sifilítico), ya que contiene una gran cantidad de treponemas. Antes de recoger la muestra, se debe lavar la zona con suero fisiológico. Posteriormente, la muestra se extiende en el portaobjetos y se observa con el microscopio. El treponema aparecerá moviéndose en espiral, con una ondulación característica.

Figura 1. Procedimiento esquemático de un examen en fresco



La tinción de Gram es la más utilizada de todas las tinciones bacteriológicas. Es una técnica que permite la observación nítida de las bacterias, su diferenciación morfológica: formas redondeadas (cocos), formas alargadas (bacilos) y su clasificación en grampositivas o gramnegativas. Las bacterias grampositivas, debido a su alto contenido en ácidos teicoicos y a la poca cantidad de lípidos de su pared, retienen el cristal violeta y son impermeables a la decoloración; en cambio, las bacterias gramnegativas tienen un alto contenido lipídico en su pared y son muy permeables al decolorante.

Los pasos que hay que seguir para realizar una tinción de Gram son los siguientes:

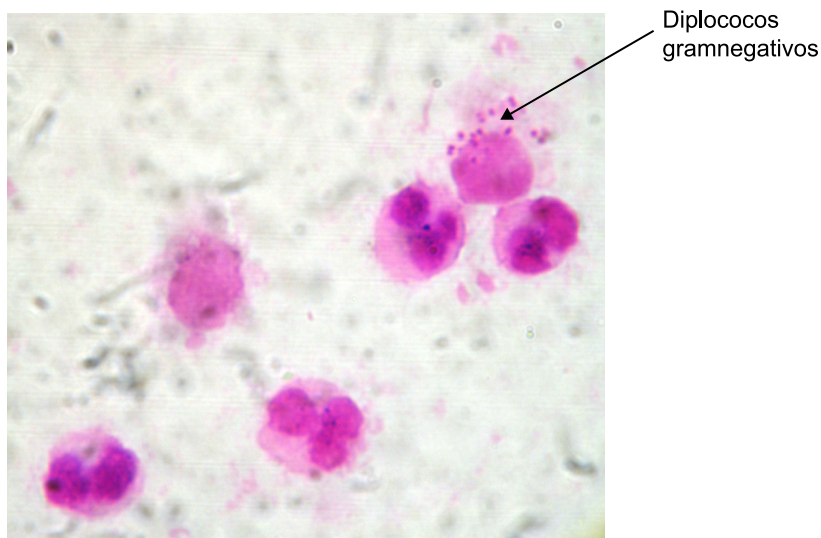
- 1) Extender la preparación sobre un portaobjetos.
- 2) Secar la preparación a temperatura ambiente o en la estufa a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Fijar con metanol durante 5 minutos.
- 4) Colocar el portaobjetos en la gradilla de tinción.
- 5) Cubrir la preparación con cristal violeta durante 1-2 minutos.
- 6) Decantar el colorante y lavar con agua.
- 7) Cubrir con solución de lugol durante 1-2 minutos.
- 8) Decantar y lavar con agua.
- 9) Decolorar con alcohol o acetona hasta que se desprenda el colorante (aproximadamente 15 segundos).
- 10) Decantar y lavar con agua.
- 11) Cubrir con fucsina diluida durante 1 min o 1 min 30 s.
- 12) Decantar.
- 13) Lavar.
- 14) Secar a temperatura ambiente o en la estufa a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 15) Observar al microscopio a 1000X con aceite de inmersión. Las bacterias grampositivas se tiñen de color azul y las gramnegativas de color rosa.

En el caso de las ITS, la tinción de Gram nos puede ser de ayuda para el diagnóstico de una uretritis gonocócica en el varón, al observarse en Gram de un exudado uretral diplococos gramnegativos intracelulares (figura 2). En cambio, la

presencia de células inflamatorias, en ausencia de diplococos gramnegativos y cultivo negativo para gonococo, establece el diagnóstico de una uretritis no gonocócica. La tinción de Gram para exudados endocervicales y rectales es poco específica, por lo que se debió realizar el diagnóstico mediante cultivo. Hay algunas bacterias que, debido a las características de su pared bacteriana, no se tiñen bien, de manera que no podemos definir si son grampositivas o gramnegativas, por ejemplo: *Mobiluncus* spp., algunas especies de micobacterias, *Corynebacterium* spp., *Gardnerella* spp., *Clostridium* spp.

En estos casos, la observación de la morfología bacteriana con el microscopio podría sugerir de qué microorganismo se trata.

Figura 2. Tinción de Gram. Diplococos gramnegativos



Fuente: foto de un exudado vaginal cedida por la Dra. Gema Fernández Rivas. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

### 2.1.2. Aislamiento en cultivo

En los medios de cultivo (líquidos o sólidos), las bacterias se multiplican y es necesario esperar entre 18 y 24 horas para visualizarlas formando lo que se denomina colonias bacterianas en las placas de medio de cultivo sólido. El aislamiento de las bacterias en medios de cultivo permite su posterior identificación y el estudio de sensibilidad antibiótica. En general, todas las bacterias necesitan unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su desarrollo (fuente de energía, de carbono, de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos, vitaminas, factores o aminoácidos esenciales y agua).

En los medios líquidos, los nutrientes se encuentran disueltos. Los medios sólidos están constituidos por una base de agar, que es un polímero vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas y que forma un gel al enfriarse. El cultivo sobre medios sólidos permite diferenciar las colonias bacterianas. El uso de un medio de cultivo u otro dependerá del tipo de muestra y del patógeno que queramos identificar. Así pues, para el cultivo de levaduras (cándidas) puede utilizarse el medio Sabouraud con o sin antibiótico, o alter-

nativamente puede utilizarse un medio cromogénico, que permite identificar de forma presuntiva, por el aspecto y el color de las colonias, las especies de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (figura 3).

Figura 3. Medio cromogénico para cándidas. Las colonias azules corresponden a *Candida albicans* y las blancas a *Candida spp.*



Fuente: foto realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

Las levaduras pueden crecer también en agar chocolate o agar sangre, con un aspecto característico de la colonia en forma estrellada (figura 4).

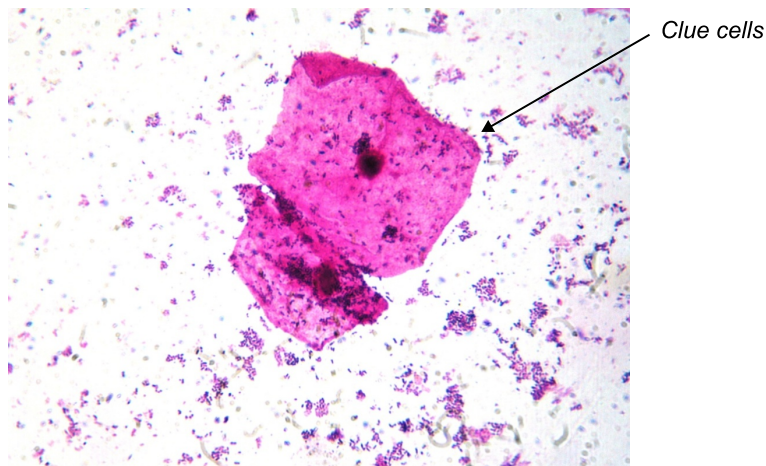
Figura 4. Crecimiento de levaduras en agar chocolate



Para el cultivo de las tricomonas se utiliza el medio semisólido Roiron o el medio líquido Diamond. Estos cultivos son fáciles de sembrar y suelen positivizarse entre las 24 y 48 horas.

*Gardnerella vaginalis* es un bacilo grampositivo causante de la vaginosis bacteriana, entidad que no está considerada una ITS. Esta bacteria rompe las células epiteliales, lo que provoca cambios en su estructura (fenómeno conocido con el nombre de *clue cells*). Este microorganismo puede cultivarse en agar sangre y en una atmósfera aerobia (figura 5).

Figura 5. Observación de *clue cells* en una tinción de Gram



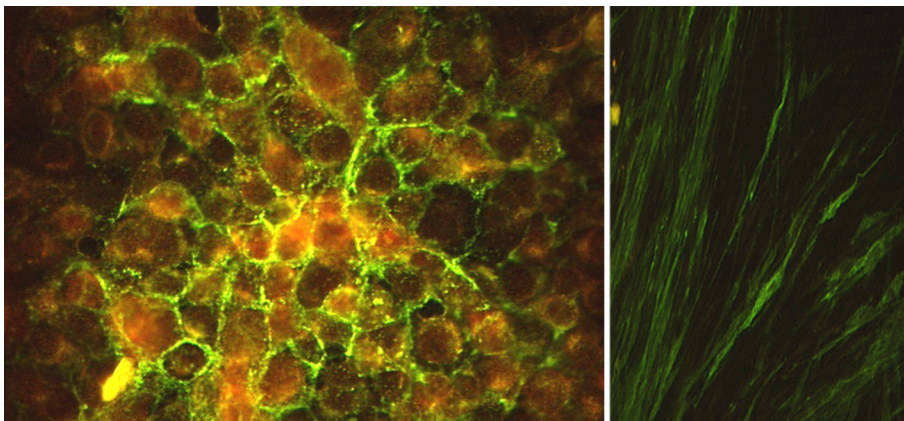
Fuente: foto de un exudado vaginal cedida por la Dra. Gema Fernández Rivas. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

La identificación presuntiva de *Neisseria gonorrhoeae* se realiza mediante cultivo, tanto en medios no selectivos como el agar chocolate, como en medios selectivos como el agar Thayer-Martin. Este medio de cultivo contiene sangre calentada, extracto de levadura, isovitalax y antibióticos: vancomicina, colistina, trimetropin y nistatina. Estos impiden el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas (incluyendo las *neisserias saprofitas*) y las levaduras. El cultivo tiene una elevada sensibilidad y especificidad. Además, permite mantener el microorganismo vivo para estudios de sensibilidad antibiótica. Estos medios de cultivo se han de incubar en ambiente húmedo, con un 5 % de CO<sub>2</sub> y a 37 °C. El cultivo debe examinarse cada 24 horas durante 72 horas.

El diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* no suele realizarse por cultivo, sino por técnicas de biología molecular, las cuales tienen una elevada sensibilidad y especificidad.

El cultivo celular es una técnica sensible y específica para el diagnóstico microbiológico de la infección por virus herpes. Este virus puede crecer en aproximadamente 24-48 horas y en diversas líneas celulares como, por ejemplo, Vero o MRC-5 (figura 6).

Figura 6. Cultivo de VHS-2 en *shell vial* de células MRC-5 teñido con anticuerpos monoclonales (A). Cultivo de VHS-2 en células Vero (B)



Fuente: fotos cedidas por la Dra. Águeda Hernández. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

### 2.1.3. Estudio de sensibilidad antibiótica

#### Aspectos generales

El estudio de sensibilidad antibiótica es una de las tareas más importantes de un laboratorio de microbiología. Se realiza con antibiogramas, con los que se evalúa la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado. La concentración mínima necesaria de un antibiótico para inhibir el crecimiento de una bacteria se conoce con el término «concentración mínima inhibitoria» (CMI).

Cada laboratorio de microbiología establecerá, según su estructura, demanda asistencial y política de antibióticos, unos esquemas de trabajo que aseguren la correcta realización del estudio de sensibilidad antibiótica y posterior información de su resultado.

En los estudios de sensibilidad antibiótica, es necesario emplear cepas de control de calidad para asegurar la exactitud y fiabilidad de la metodología utilizada. Estas cepas de control (denominadas con las siglas ATCC) se han de mantener congeladas (-70 °C) en medios adecuados para su conservación, con la finalidad de preservar su viabilidad. Para resembrarla debe utilizarse un asa y rascar sobre la superficie del material congelado. Posteriormente, se incubará durante 18-20 horas a 35 °C y se realizará una nueva resiembra. Los controles de calidad deben realizarse cada nuevo lote de medio de cultivo para hacer el antibiograma y cada nuevo lote de antibióticos.

A continuación, detallaremos los métodos básicos más utilizados para el estudio de la sensibilidad antibiótica, así como los criterios de interpretación.

## Métodos de difusión

1) **Método de disco-difusión en agar.** Este método se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antibiótico, el cual se difunde por el agar. Esta técnica consiste en:

a) Coger 2 o 3 colonias con un asa a partir de una placa de cultivo y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mac Farland en suero fisiológico.

b) Empapar en esta suspensión un escobillón, exprimiéndolo por las paredes para eliminar el exceso de líquido.

c) Frotar con el escobillón toda la superficie del medio de la placa en tres direcciones para que la siembra sea homogénea.

d) Dejar secar sobre la superficie inoculada durante aproximadamente 10 minutos, reposando la placa sobre la poyata con la tapa ligeramente abierta.

e) Depositar los discos de antibióticos con dispensador, distribuyéndolos en la periferia de la placa, equidistantes entre sí. Presionar los discos suavemente con unas pinzas estériles para que entren bien en contacto con la superficie del agar. Las pinzas se han de flamear entre disco y disco.

f) Dejar la placa aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente para que el antibiótico se pueda difundir.

g) Incubar durante 18-24 horas en la estufa entre 35-37 °C.

El antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del agar (Mueller-Hinton) a partir del disco, formándose un gradiente de concentración. Después de 18-24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad de la bacteria al antibiótico (figura 7).

En el método de difusión en agar se trabaja con puntos de corte, basado en dos medidas: un diámetro menor del halo de inhibición por debajo del cual la bacteria es resistente (R) al antibiótico y un diámetro mayor por el cual es sensible (S). Entre ambos diámetros la sensibilidad se considera intermedia (I). Los halos de inhibición se pueden medir manualmente con un pie de rey o bien utilizando instrumentos que permiten leer automáticamente los halos e interpretar los resultados como, por ejemplo, el Osiris de Bio-Rad Laboratories, Inc. La interpretación de los resultados se realiza según criterios del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) o criterios del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Figura 7. Disco-difusión en agar



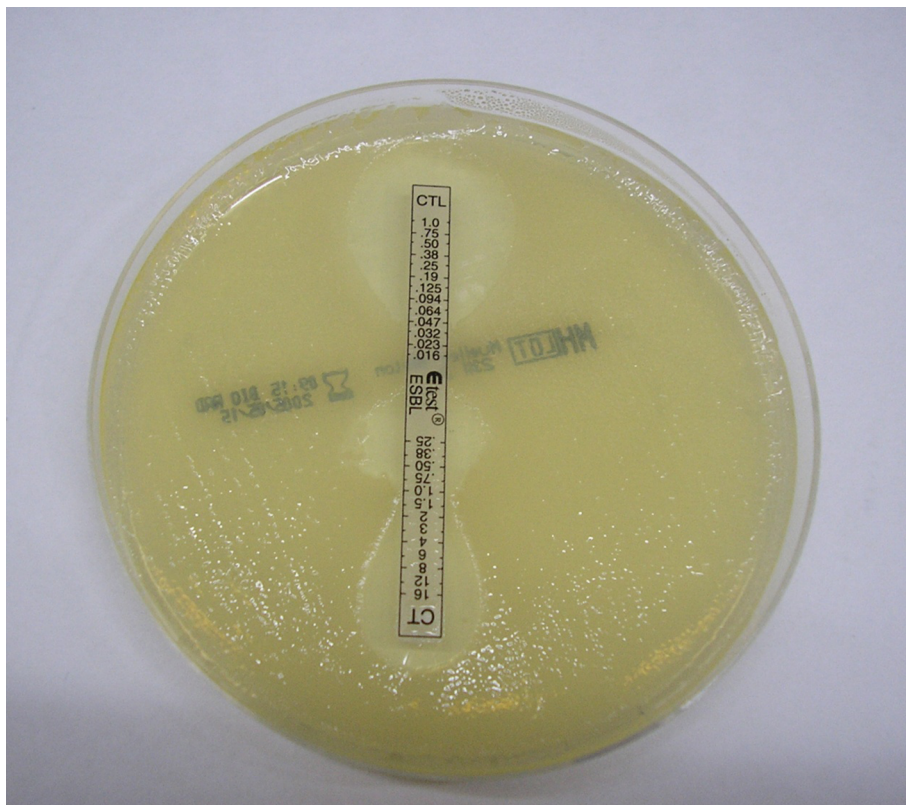
Fuente: foto cedida por la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Quesada Fernández. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

**2) Método Epsilon-test (E-test).** Con el método E-test podemos, mediante lectura directa, cuantificar la CMI. Consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido y señalado en la tira de antibiótico correspondiente a 15 diluciones dobles progresivas. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para el método de disco-difusión. Una vez sembrada la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre la superficie, produciéndose inmediatamente una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar; de este modo, se crea a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico. Después de la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (figura 8). Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa elipse de inhibición, la CMI se tiene que informar como superior al valor máximo de la escala de lectura.

Por el contrario, cuando la elipse se encuentre por debajo de la tira, la CMI se ha de informar como inferior al valor mínimo de la escala de la tira.



Figura 8. Antibiograma E-test



Fuente: foto cedida por la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Quesada Fernández. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

En el caso de infección por *Neisseria gonorrhoeae*, se recomienda testar por E-test los siguientes antibióticos: Penicilina, Cefotaxima, Ciprofloxacina, Cefixima, Azitromicina, Espectinomicina y Tetraciclina.

**3) Métodos de dilución.** En este caso y para determinar la CMI de un antibiótico frente a una bacteria, se prepara una serie de tubos (macrodilución) con una cantidad determinada de caldo de cultivo en cada uno de ellos, a los que se incorpora una cantidad de antibiótico creciente para obtener concentraciones dobles progresivas (por ejemplo, en el primer tubo una concentración de 0,12 µg; en el segundo, 0,25 µg; en el tercero, 0,50 µg; en el cuarto, 1 µg, y así sucesivamente hasta 11 tubos, donde la concentración será de 256 µg). Se siembra la bacteria en los tubos y se deja incubar durante 18-24 horas. Posteriormente, se observa si hay crecimiento. Los tubos que estén transparentes serán los que tengan mayor concentración de antibiótico y donde se ha inhibido el crecimiento bacteriano. El tubo con menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la CMI.

La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad para el estudio de las CMI. Es similar al método de macrodilución, pero en este caso la técnica se realiza en

placas de poliestireno con micropocillos. Los pocillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de antibiótico en forma liofilizada, por lo que solo se tiene que añadir el medio líquido en el cual se haya realizado la suspensión bacteriana. Como en el método de macrodilución, la CMI de cada antibiótico se comprueba con una tabla que señala si la bacteria es sensible o resistente.

**4) Betalactamasas.** La resistencia a los betalactámicos que presentan algunas bacterias se produce por la acción de las betalactamasas que hidrolizan el anillo de los antibióticos betalactámicos. Las técnicas de disco-difusión o dilución no son lo suficientemente sensibles, por ello en algunos casos la detección de estas enzimas es necesaria. Así sucede, por ejemplo, en el caso de *Neisseria gonorrhoeae*. Existen varios métodos para la detección directa de las betalactamasas. Los más utilizados son el acidimétrico y el cromogénico.

**a) El test acidimétrico** consiste en preparar una suspensión bacteriana espesa (McFarland 4) de la bacteria pendiente de estudio en un tubo con 1 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, se añade una pastilla de betalactamasa y se incuba a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15-20 minutos al menos durante 4 horas. Los resultados se interpretan como:

- **Reacción positiva:** el sobrenadante se vuelve de color amarillo o marrón en 15-20 minutos (el tiempo de reacción varía según el tipo de microorganismo y una reacción no se debe considerar negativa antes de las 4 horas de incubación).
- **Reacción negativa:** el reactivo sigue con el mismo color púrpura.

**b) El test cromogénico:** el disco de cefinasa está impregnado con nitrocefina, una cefalosporina cromógena. Este compuesto presenta un cambio de color muy rápido de amarillo a rojo cuando la amida unida al anillo -lactámico se hidroliza por la acción de una -lactamasa. La técnica se realiza como se explica a continuación:

- Humedecer el disco con agua destilada estéril.
- Con un asa, coger una colonia aislada de la placa de cultivo y extenderla en la superficie del disco, o coger con unas pinzas el disco y pasarlo por la colonia bacteriana.
- Observar el cambio de color.

La interpretación de los resultados es la siguiente:

**a) Reacción positiva:** cambio de color amarillo a rojo. El tiempo de reacción varía según el tipo de microorganismo, tal y como se observa en el ejemplo.

Microorganismo	Tiempo de reacción aproximado
<i>S. aureus</i>	1 h
<i>H. influenzae</i>	1 min
<i>N. gonorrhoeae</i> y <i>M. catarrhalis</i>	1 min
<i>E. faecalis</i>	5 min
Bacterias anaerobias	30 min

**b) Reacción negativa:** no hay cambio de color.

La vigilancia epidemiológica de la sensibilidad antibiótica de *Neisseria gonorrhoeae* es clave para monitorizar la aparición de cepas resistentes al tratamiento actual.

## 2.2. Técnicas de diagnóstico indirecto

### 2.2.1. Técnicas de detección de antígenos

Las técnicas de detección de antígenos empleadas en el diagnóstico de las ITS son principalmente dos:

1) **Técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD).** Las técnicas de IFD consisten en colocar sobre un portaobjetos una molécula fluorescente, que se une de forma covalente al antígeno (por ejemplo: anticuerpo antivírico de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína). Estas técnicas pueden ser utilizadas en el diagnóstico de infección por: (i) *Chlamydia trachomatis* (buenos resultados en muestras endocervicales y uretrales; es altamente específica), y (ii) virus Herpes tipo 2 (en pacientes sintomáticos, la sensibilidad y especificidad oscila entre el 70 % y el 90 %). Estas técnicas de inmunofluorescencia requieren personal altamente cualificado.

2) **Técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA).** La detección de antígenos por técnicas de EIA tiene lugar en placas de poliestireno, donde los anticuerpos específicos están fijados sobre la superficie de los pocillos. Estos anticuerpos retienen a los antígenos presentes en la muestra y su presencia es revelada posteriormente mediante la utilización de anticuerpos también específicos del antígeno, conjugados con enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP). Estas enzimas provocan un cambio de color al interaccionar con el sustrato (compuesto químico) específico, el cual será proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra del paciente (figura 9).

La reacción se interrumpe con una solución ácida. Posteriormente, la lectura de cada pocillo se lee en un espectrofotómetro, que nos dará la densidad óptica (DO). Una muestra se considera positiva o negativa en función del valor *cut-off*, valor umbral o punto de corte obtenido. Este valor se calcula según recomendaciones del fabricante. Las muestras positivas son aquellas que tengan un valor de DO superior al punto de corte, y las negativas las que tengan un valor inferior. Hay algunas muestras que tienen valores dentro de la llamada zona gris ( $\pm 10\%$  del valor del punto de corte).

El resultado de estas muestras se considera indeterminado y se recomienda realizar una nueva determinación con una nueva muestra en un plazo aproximado de 15 días.

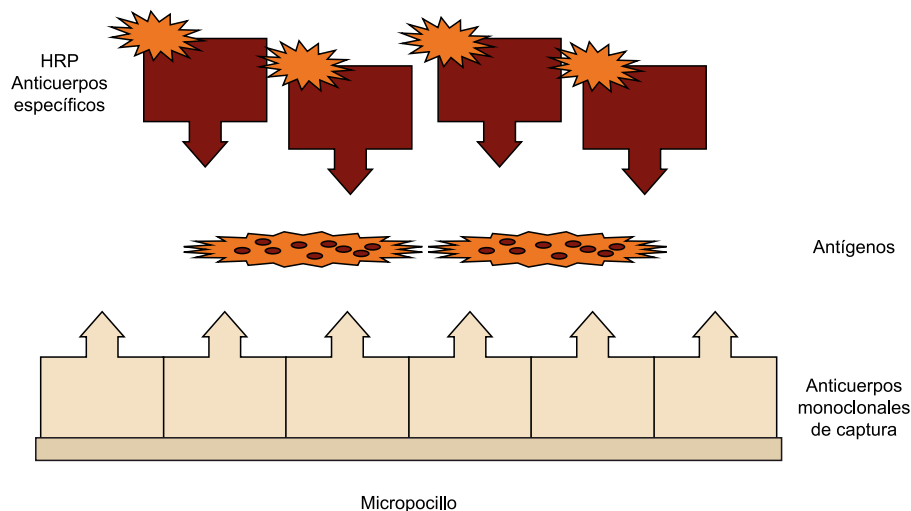
Actualmente estas técnicas se realizan de forma automatizada. Se pueden utilizar para:

1) Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis*, con una sensibilidad aproximada del 80 % y una especificidad del 97 %.

2) Detección del antígeno Core del virus de la hepatitis C (VHC). Las técnicas para la detección del antígeno Core aparecieron en los años 90 y el formato ha ido mejorando en las décadas siguientes. Actualmente se realiza a través de técnicas de quimioluminiscencia (CLIA). En varios estudios se ha demostrado la utilidad de este marcador para detectar infección por VHC durante el período de pre-seroconversión, para distinguir entre infección actual y resuelta y para monitorizar la respuesta al tratamiento antivírico (Morota y otros, 2009; Kesly y otros, 2011; González y otros, 2005).

Algunos estudios han mostrado que la detección del antígeno Core-VHC podría sustituir a las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de infección por VHC, cuando la carga vírica de VHC en plasma sea  $>3000$  UI/ml (Park y otros, 2010).

Figura 9. Formato de ensayo de un EIA para detectar antígenos



### 2.2.2. Técnicas de detección de anticuerpos. Serología

Las técnicas de detección de anticuerpos en el contexto de las ITS se utilizan fundamentalmente para el diagnóstico de:

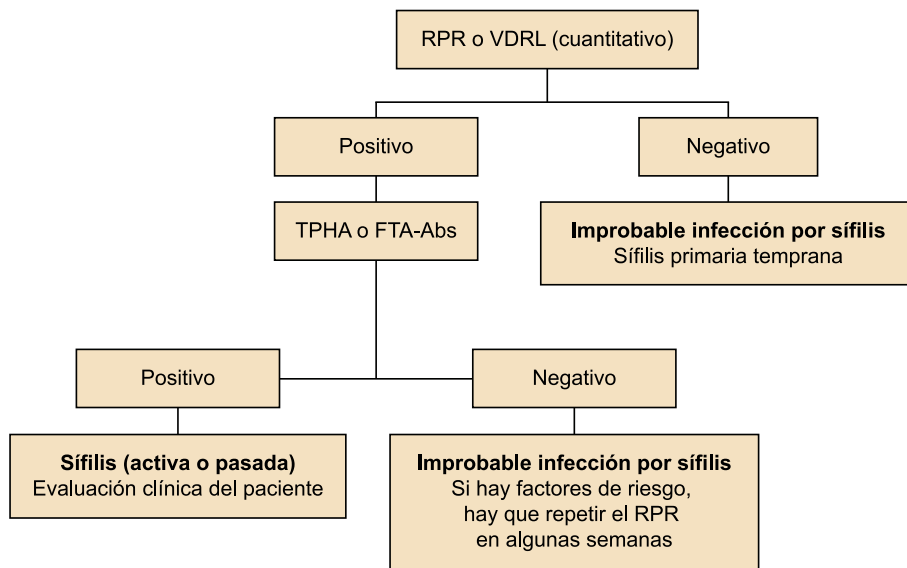
- sífilis
- virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- virus de la hepatitis C (VHC)
- virus de la hepatitis B (VHB)

#### Diagnóstico serológico de la sífilis

Implica la detección de dos tipos de anticuerpos: a) anticuerpos no treponémicos contra antígenos lipoidales liberados durante las infecciones causadas por espiroquetas (entre las que se encuentra *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis) y b) anticuerpos treponémicos, específicos contra las proteínas de *Treponema pallidum*. Los tests no treponémicos o reagínicos pueden ser negativos en fases muy tempranas o muy tardías de la infección. También pueden negativizarse después del tratamiento antibiótico. Los anticuerpos treponémicos aparecen antes que los no treponémicos y generalmente son detectables de por vida.

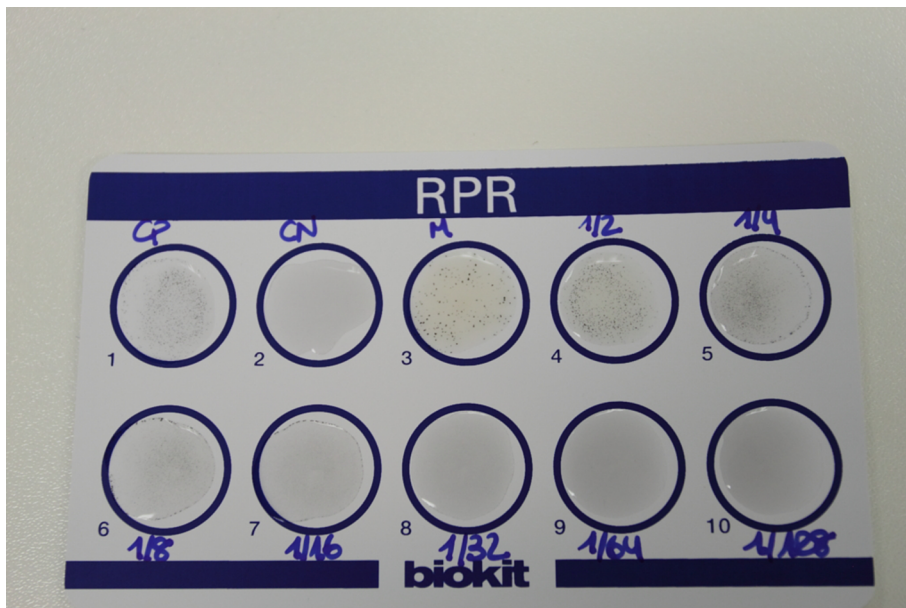
El algoritmo tradicional para el diagnóstico serológico de la sífilis se inicia con un test reagínico (figura 10): *Rapid Reagin Plasma* (RPR) o *Venereal Research Disease Laboratory* (VDRL). Este último es el único validado para la detección de anticuerpos no treponémicos en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de neurosífilis. Los tests reagínicos están basados en antígenos compuestos de soluciones alcohólicas con cantidades predeterminadas de cardiolipinas, colesterol y lecitina.

Figura 10. Algoritmo tradicional para el diagnóstico serológico de sífilis



Miden de forma simultánea IgG/IgM frente a estas sustancias que se han producido en los tejidos dañados por el treponema o por otras enfermedades. Para realizar un test de RPR, el suero del paciente se mezcla con la suspensión antigénica en un soporte circular y se coloca en un agitador automático durante aproximadamente 8 minutos. Si la muestra es positiva, se formarán unos agregados negros de carbón (floculación) visibles a simple vista (figura 11). En este caso, la muestra se ha de diluir a la mitad con suero fisiológico (50 microlitros de suero y 50 microlitros de suero fisiológico) realizando diluciones dobles progresivas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32...). Se informará la última dilución que se vea positiva. Las pruebas reagínicas son claves para evaluar la respuesta al tratamiento antibiótico. Si el tratamiento está siendo eficaz, los títulos de RPR disminuirán tras 6-12 meses de tratamiento. Como ya hemos mencionado anteriormente, los anticuerpos reagínicos no son específicos frente a *Treponema pallidum*, por ello los sueros positivos se han de confirmar con un test treponémico.

Figura 11. Test RPR



Los tests reagínicos pueden dar falsos negativos y falsos positivos. Los falsos negativos se producen por el llamado fenómeno prozona. En este caso, la cantidad de anticuerpos presentes en el suero del paciente es muy alta y no reacciona con el antígeno, dando lugar a una reacción falsamente negativa. La muestra se ha de diluir con suero fisiológico hasta que la concentración de anticuerpos en el suero sea la adecuada para reaccionar con el antígeno. El fenómeno prozona se suele observar en los casos de sífilis secundaria.

Los falsos positivos (generalmente no superan una titulación de RPR de 1:4) pueden ser transitorios o permanentes según persistan o no más de seis meses. Pueden ser debidos a infecciones víricas (mononucleosis infecciosa, hepatitis, sarampión, varicela, etc.), infecciones parasitarias como malaria o lepra, enfermedades autoinmunes, neoplasias o embarazo, y en individuos usuarios a drogas por vía parenteral (UDVP).

Los tests treponémicos se basan en la respuesta de anticuerpos (IgG/IgGM) frente a antígenos específicos de *Treponema pallidum*, y establecen una alta probabilidad de infección ya sea presente o pasada. Producen escasos falsos positivos, que pueden darse en las siguientes situaciones: mononucleosis, lepra, enfermedades del colágeno, borreliosis y en individuos UDVP.

Entre las pruebas treponémicas podemos distinguir las siguientes:

**1) Hemaglutinación pasiva: TPHA o MHA-TP.** Los hematíes de pollo o cordero estabilizados se sensibilizan con un extracto antigénico de *Treponema pallidum* (cepa Nichols). Estos hematíes se aglutinarán con los anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente. Las reacciones no específicas se

detectarán con el reactivo de control no sensibilizado. La técnica se realiza en una placa de microtitulación. De forma resumida, los pasos que hay que seguir son:

- a) Rotular cuatro pocillos: control positivo, control negativo y todas las muestras disponibles.
- b) Dispensar 25 microlitros de diluyente de muestra en los pocillos 1, 3 y 4, y 100 microlitros en el pocillo 2.
- c) Dispensar 25 microlitros de muestra en el pocillo 1. Mezclar bien todo el contenido y transferir 25 microlitros al pocillo 2. Mezclar y transferir 25 microlitros al pocillo 3.
- d) Mezclar y desechar 25 microlitros.
- e) Transferir 25 microlitros del pocillo 2 al pocillo 4. Mezclar bien y desechar 25 microlitros.
- f) Añadir 75 microlitros de reactivo control (hematíes no sensibilizados) a los pocillos 3 de control positivo, negativo y muestras.
- g) Añadir 75 microlitros de reactivo antígeno (hematíes sensibilizados) a los pocillos 4 de control positivo, negativo y muestras.
- h) Mezclar el contenido dando ligeros golpes en los lados de la microplaca o bien utilizar un agitador de placas durante aproximadamente 30 segundos.
- i) Incubar la placa a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos.
- j) Lectura de los resultados.

En una muestra positiva, se observará un tapiz homogéneo de células aglutinadas que cubre el fondo del pocillo, y en una muestra negativa, observaremos un botón de hematíes con una muy pequeña abertura central o botón totalmente compacto.

**2) Inmunofluorescencia: FTA-Abs.** El FTA-Abs es una prueba de inmunofluorescencia indirecta estándar que utiliza como antígeno *Treponema pallidum* obtenido de testículos de conejos. El suero del paciente debe ser primero absorbido con antígenos de treponemas no patógenos (se utilizan como absorbentes) para eliminar los anticuerpos naturales contra *Treponema* saprofitos de la boca o tracto genital, que pueden dar una reacción cruzada. Es una técnica



estandarizada para una dilución del suero 1:5. Como sucede en la mayoría de las técnicas de inmunofluorescencia, la interpretación de los resultados es bastante subjetiva.

**3) Enzimoimmunoensayo (EIA).** Las técnicas de enzimoimmunoensayo consisten en la detección de anticuerpos clase IgG/IgM en muestras de suero o plasma frente a antígenos específicos (p15, p47 y p17) de *Treponema pallidum* que están recubiertos en los pocillos de una microplaca. Si en el suero del paciente están presentes estos anticuerpos, se unirán a los antígenos formando un complejo antígeno-anticuerpo. A continuación, se lavan los pocillos con solución de lavado (generalmente un tampón fosfato) para eliminar cualquier inespecificidad. Posteriormente, se añaden antígenos recombinantes, p15, p17 y p47 de *Treponema pallidum* conjugados con un enzima (generalmente peroxidasa de rábano). Se deja incubar un tiempo (recomendado por cada fabricante).

Este conjugado se unirá al complejo antígeno-anticuerpo previamente formado. A continuación, se lavan de nuevo los pocillos y se añade el sustrato/cromógeno (compuesto químico) que se une al enzima produciendo una reacción enzimática que generará color. Esta reacción se interrumpe con una solución de ácido sulfúrico. La cantidad de color generada en cada pocillo se conoce como absorbancia y se lee en un espectrofotómetro.

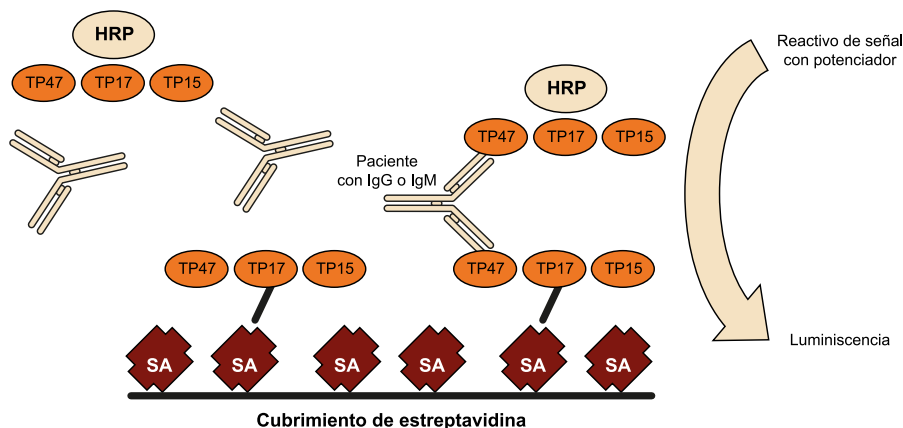
La interpretación de los resultados se realizará siguiendo recomendaciones de cada fabricante. La cantidad de color es proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*T.pallidum* presentes en el suero del paciente. La interpretación de los resultados también se hace en función del punto de corte obtenido (comentado en el apartado de técnicas de detección de antígenos). Actualmente, la mayoría de estos ensayos se realizan de forma automatizada.

Los EIA para detectar solo IgM se utilizan generalmente para el diagnóstico de una sífilis congénita. Estas técnicas son más sensibles que los ensayos de FTA-Abs IgM en los estadios tempranos de la sífilis congénita y algo menos en los estadios más avanzados. En los casos de sífilis congénita asintomática, la sensibilidad de todos los ensayos que detectan únicamente IgM es muy baja; por ello, un resultado positivo siempre confirma el diagnóstico, pero un resultado negativo se tiene que interpretar junto con otros datos clínicos como la fecha de inicio de tratamiento de la madre, si este fue correcto, y de los signos o síntomas del recién nacido.

**4) Quimioluminiscencia (CLIA).** Las técnicas de CLIA son enzimoimmunoensayos inmunométricos para los que se necesita la reacción de anticuerpos IgG/IgM presentes en el suero del paciente con antígenos específicos de *Treponema pallidum* (Tp15, Tp17 y Tp47) biotinilados y un conjugado de antígeno de *Treponema pallidum* (Tp15, Tp17 y Tp47) marcado con peroxidasa de rábano. La estreptavidina de los pocillos captura el complejo antígeno-anticuerpo. El material no unido se elimina con los procesos de lavado, para evitar inespeci-

ficidades. El conjugado unido se mide por una reacción luminiscente. Se añade a los pocillos un reactivo que contiene substratos luminógenos (un derivado del luminol y una sal perácida) y un agente de transferencia de electrones. La peroxidasa del conjugado cataliza la oxidación del derivado del luminol y produce luz. El agente de transferencia de electrones incrementa el nivel de luz y prolonga su emisión. La señal de luz es leída por el sistema automatizado utilizado en cada laboratorio. El conjugado unido es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*Treponema* presente (figura 12).

Figura 12. Ensayo treponémico basado en CLIA para el diagnóstico serológico de sífilis



Fuente: imagen cedida por Ortho Clinical Diagnostics. El triple antígeno. Treponémico TP47, TP15 y TP17 está patentado por Ortho Clinical Diagnostics.

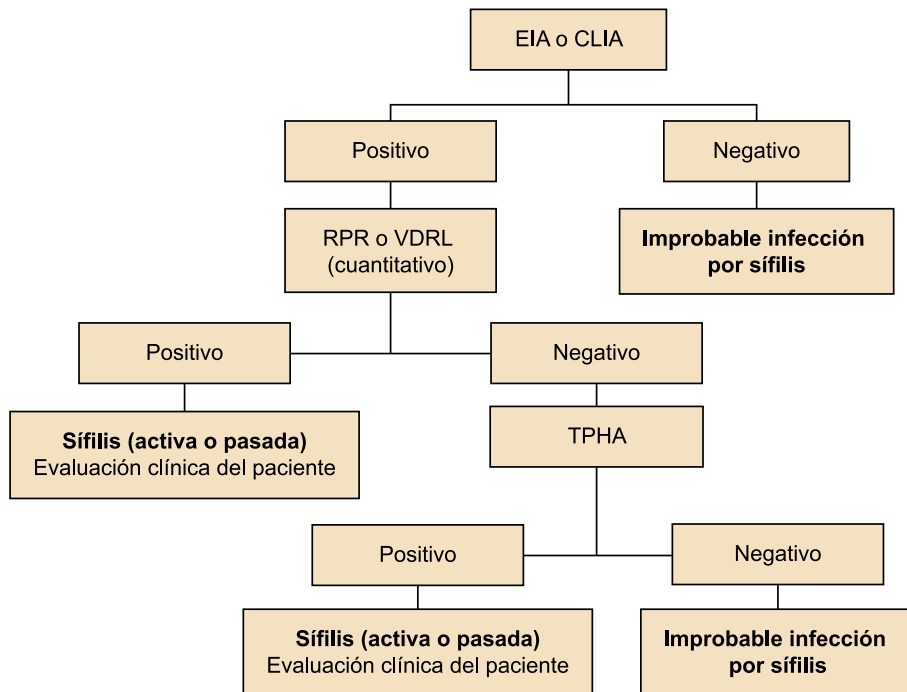
En los últimos años, numerosos laboratorios de microbiología han incorporado en su rutina diaria el llamado algoritmo reverso (*reverse sequence screening*) (figura 13) para el diagnóstico serológico de la sífilis, en el cual las muestras de suero se testan primero mediante ensayos treponémicos automatizados basados en enzimoimmunoensayo (EIA) o quimioluminiscencia (CLIA), seguido de un ensayo no treponémico en las muestras positivas (Lipinsky y otros, 2012; Sampedro-Martínez y otros, 2013; González y otros, 2015). La implementación de este algoritmo es apropiado en los laboratorios de microbiología con elevada carga de trabajo. Sin embargo, su incorporación ha incrementado el número de resultados discordantes entre tests treponémicos y no treponémicos (Park y otros, 2013). Los resultados discordantes podrían ser debidos a:

- Infección previa, tratada o no tratada, con persistencia de anticuerpos treponémicos.
- Falso positivo del test treponémico.
- Sífilis primaria temprana. El paciente todavía no ha desarrollado anticuerpos no treponémicos.

Para ayudar en la interpretación de los resultados, el *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) ha elaborado unas guías donde recomienda que todas las muestras de suero con resultado positivo en los tests treponémicos (EIA/CLIA)

y negativo en los tests no treponémicos (RPR/VDRL) sean testadas con un segundo test treponémico (TPHA) para validar el resultado del test treponémico de cribado (CDC, 2011).

Figura 13. Algoritmo reverso para el diagnóstico serológico de la sífilis



## Diagnóstico de la infección por VIH

Se realiza generalmente mediante técnicas serológicas, es decir, la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos del VIH1/2 o la detección simultánea de anticuerpos VIH1/2 y del antígeno p24 del VIH-1.

El diagnóstico se inicia con una técnica de cribado basada en formato de EIA o CLIA. Estas técnicas se realizan mayoritariamente en equipos automatizados y son de elevada sensibilidad. Estos inmunoensayos han ido evolucionando en el tiempo y se clasifican en función de su base antigénica. Actualmente se utilizan los inmunoensayos de 3ª generación, que detectan anticuerpos IgG/IgM y acortan el período de detección hasta 20-25 días. Los últimos inmunoensayos introducidos son los de 4ª generación, que detectan simultáneamente anticuerpos y antígeno p24. Acortan el tiempo de detección hasta 13-15 días posinfección. Las muestras con resultado positivo por el test de cribado se tienen que testar con técnicas confirmatorias, las cuales tienen una elevada especificidad. Las técnicas más utilizadas son el *Western blot* y el inmunoensayo en línea (Inno-LiA). Este último ensayo permite la diferenciación entre VIH-1 y VIH-2.

Son técnicas basadas en el principio de EIA indirecto sobre una tira de nitrocelulosa que contiene antígenos específicos recombinantes y sintéticos del VIH1/2.

La muestra que hay que testar se incuba con la tira que lleva los antígenos enganchados. Si en la muestra hay anticuerpos específicos contra estos antígenos, se unirán a ellos formando un complejo antígeno-anticuerpo. Después, se añade una inmunoglobulina G de cabra anti-humana marcada con fosfatasa alcalina que se unirá al inmunocomplejo antígeno-anticuerpo previamente formado. La incubación con un enzima-sustrato (BCIP/NBT) da un color marrón oscuro de intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en la muestra. El desarrollo de color se para añadiendo una solución de ácido sulfúrico.

La lectura de las bandas (interpretación de los resultados) se puede realizar siguiendo los criterios de distintas organizaciones. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera un resultado positivo cuando hay al menos dos bandas de la envuelta del VIH-1 o del VIH-2. El CDC cuando están presentes las bandas del núcleo p24, p31 y las bandas de la envuelta (gp41 o gp120/160). La Cruz Roja Americana cuando hay tres bandas (una de cada gen estructural: gag, pol y env) y el Consorcio de Estandarización de la Serología de Retrovirus (CRSS) cuando están presentes las bandas p24 o p31 y en menor intensidad las bandas gp41 o gp 160/120.

Un *Western blot* o Inno-LiA se considera indeterminado cuando se observan bandas con una reactiva débil, menor que la del criterio de positividad. Estos indeterminados pueden ser debidos a una infección aguda, estadio muy avanzado de la infección, recién nacido de madre VIH positiva, factor reumatoide o reacciones cruzadas con otros virus. En estos casos, es necesario, por un lado, solicitar una nueva muestra en un plazo aproximado de 15 días y, por otro, realizar en esta primera muestra la carga vírica de VIH (por técnicas de biología molecular), por si estamos ante una infección aguda por VIH.

Un resultado negativo de *Western blot* o Inno-LiA se informa en ausencia de bandas.

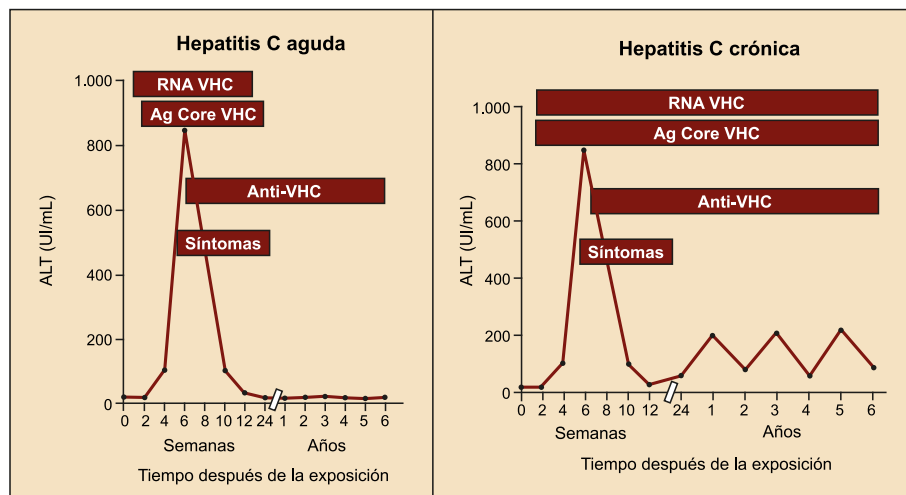
Los ensayos de *Western blot* o Inno-LiA son procesos lentos, costosos y requieren un equipo sofisticado, difícil de realizar en áreas con pocos recursos. Actualmente, existe una técnica confirmatoria sencilla que permite la diferenciación entre VIH-1 y VIH-2. Se trata de una técnica de inmunocromatografía que contiene péptidos recombinantes o sintéticos del VIH-1 (p31, gp160, p24 y gp41) y del VIH-2 (gp36 y gp140). Es una técnica rápida (de aproximadamente 30 minutos) y de fácil interpretación, ya que la lectura de las bandas es automatizada (*Geenius<sup>TM</sup> HIV 1/2 Confirmatory Assay*. Biorad).

### **Pruebas serológicas aplicadas al diagnóstico de la infección por el VHC**

Están especialmente diseñadas para la detección de anticuerpos específicos frente a determinados antígenos víricos. En los pacientes que resuelven espontáneamente la infección, los títulos de anticuerpos pueden ser detectados du-

rante toda la vida o bien pueden ir desapareciendo gradualmente. En el caso de los pacientes que evolucionan hacia hepatitis C crónica, los anti-VHC se detectan indefinidamente durante toda la vida, aunque pueden llegar a ser indetectables en el caso de los pacientes con inmunosupresión severa (figura 14).

Figura 14. Evolución de diferentes marcadores de infección durante el curso de una infección aguda y crónica de VHC



Fuente: imagen del capítulo 5 del libro *Manual de hepatitis C. Aspectos biológicos, clínicos y terapéuticos*. Editorial médica panamericana.

Las pruebas basadas en EIA utilizan antígenos específicos del VHC obtenidos por ingeniería genética (antígenos recombinantes) o mediante síntesis química (péptidos sintéticos) que son fijados a los pocillos de una microplaca o a microesferas adaptadas a sistemas automáticos cerrados. La presencia de anticuerpos capturados se identifica mediante anticuerpos anti-anticuerpos humano marcados con enzimas que catalizan la transformación de un sustrato a un compuesto coloreado, cuya densidad óptica es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

A partir del año 1996 se comenzaron a utilizar los EIA de 3ª generación, con la intención de solucionar las deficiencias diagnósticas de los EIA de 1ª y 2ª generación. Para ello, se rediseñó el formato utilizando péptidos modificados de la región del Core y NS3 del genoma del virus, combinando con otros péptidos pertenecientes a la región NS4 y NS5. Con estas modificaciones se consiguieron porcentajes de sensibilidad y especificidad del 99 % en su aplicación diagnóstica sobre grupos de alta prevalencia.

En pacientes inmunodeprimidos (infección por VIH, tratamiento inmunosupresor), su sensibilidad es inferior, por lo que un resultado negativo no descarta exposición o infección por el virus. Así mismo, los EIA también pueden dar falsos positivos. La causa más frecuente es la presencia en el suero de inmunoglobulinas circulantes que pueden interactuar de forma inespecífica con los antígenos del VHC. Suele ocurrir en pacientes con enfermedades autoinmunes de base o también puede deberse a contaminaciones en la preparación de los antígenos utilizados.

Las técnicas de inmunoblot o *Recombinant Immunoblot Assay* (RIBA) fueron diseñadas como pruebas complementarias y confirmatorias dado el problema de especificidad de los EIA de primera y segunda generación. Se basan en la unión de los anticuerpos séricos a diferentes antígenos víricos previamente fijados en una tira de nitrocelulosa, lo cual permite conocer frente a qué antígeno o antígenos víricos responden los anticuerpos circulantes e incluye una banda con estreptavidina para detectar reacciones inespecíficas. Después de una reacción enzimática, los complejos antígeno-anticuerpo formados son detectados tras la aparición de bandas de color en la membrana. Como en el caso de los EIA, las técnicas de inmunoblot han evolucionado a lo largo de tiempo.

Los inmunoblots de tercera generación fueron aprobados en el año 1999 para su utilización diagnóstica. Estos tests incluyen péptidos sintéticos como 5-1-1 (p) y c100 (p) de la región genómica NS4, el antígeno recombinante c33c de la región NS3 y el péptido sintético c22 (p) de la región del Core, así como también incluye la región NS5. Hoy en día, solo tienen utilidad para diferenciar los pacientes con EIA positivo, ARN-VHC negativo y RIBA negativo (falso positivo del EIA) y una infección resuelta, en los que el RIBA sería positivo.

### **El diagnóstico de infección aguda o crónica por VHB**

Se basa en la detección del antígeno de superficie (HBsAg) en suero plasma. Este marcador es detectable durante el período de incubación de la infección. En aproximadamente un 5 % de los pacientes, es eliminado de la circulación, tras la seroconversión a anticuerpos frente al antígeno de superficie (anti-HBs). Actualmente, la detección de HBsAg se realiza mediante técnicas de EIA tipo sándwich o CLIA. La mayoría de estos ensayos están automatizados.

Otros marcadores del VHB que se determinan para el diagnóstico de la infección son:

- **Anti-HBc.** Es el primer anticuerpo que aparece, y se detecta con los primeros síntomas de la infección. Generalmente se determina mediante ensayos de EIA o CLIA de tipo competitivo. En este caso, los anti-HBc presentes en la muestra de suero compiten por unirse al antígeno core fijado en los pocillos con un conjugado de anticuerpo (monoclonal de ratón anti-HBc).
- **Anti-HBc IgM.** Se detectan poco después de producirse la infección. Es un marcador de infección aguda. Se determina generalmente mediante técnicas serológicas de captura de anticuerpo.
- **Anti-HBs.** Es el último marcador en aparecer. Y será positivo tras la desaparición del HBsAg (caso de hepatitis B resuelta) o bien en los individuos vacunados. La determinación de este marcador se realiza por técnicas inmunométricas de tipo cuantitativa (UI/ml).

- **Complejo antígeno «e»-anticuerpo «e».** El antígeno e (AgHBe) marca replicación vírica. Hay casos en los que existe replicación vírica pero no se detecta el AgHBe. Esta situación se produce por mutaciones en la región pre-Core del genoma del VHB. La primera detección de anti-HBe puede producirse un poco antes de que desaparezca el antígeno. La seroconversión indica recuperación de la infección. Ambos marcadores se detectan por técnicas de EIA o CLIA.

### 2.3. Técnicas de biología molecular

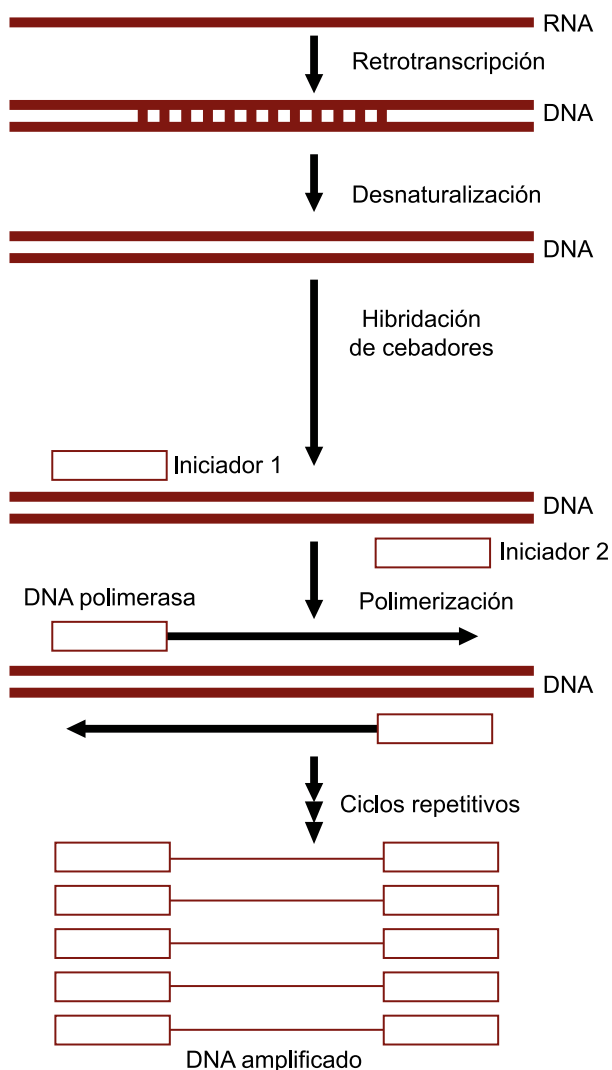
El proceso de detección de un patógeno mediante técnicas de biología molecular o amplificación genética tiene lugar en tres etapas:

1) Extracción de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) del microorganismo de la muestra biológica. Hoy en día este proceso se realiza de forma automatizada.

2) Amplificación de la secuencia genómica diana del microorganismo pendiente de estudio (este proceso se realiza en un instrumento llamado termociclador), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si el genoma del patógeno pendiente de estudio está formado por una molécula de ARN, es necesario que se incluya en el diseño de la técnica de PCR un enzima con actividad retrotranscriptasa, es decir, un enzima capaz de generar una molécula de ADN complementario (cDNA) utilizando como molde el ARN. A partir de este proceso, el resto de la reacción se basa en un procedimiento de PCR clásico. Los iniciadores de amplificación (*primers*) están expresamente diseñados para flanquear la región que hay que amplificar delimitando la polimerización de nuevas moléculas de ADN a la secuencia elegida. Una vez obtenida la molécula de cDNA, la enzima ADN-polimerasa cataliza la síntesis de una nueva hebra de ADN complementaria a la anterior.

La posterior PCR implica la repetición seriada de tres etapas bien diferenciadas: la desnaturalización de la doble cadena de ADN para formar hebras de ADN de cadena sencilla, el alineamiento de los iniciadores (oligonucleótidos sintéticos) a sus secuencias complementarias y, por último, la polimerización, a partir de estos, de una nueva cadena de ADN complementaria a la región de ADN diana que se desea amplificar. Estas tres etapas representan un único ciclo de amplificación. La repetición de cada ciclo de amplificación implica un incremento exponencial del producto que hay que amplificar, para obtener finalmente millones de copias de la secuencia genómica inicial (figura 15).

Figura 15. Esquema general de una PCR previa retrotranscripción (RT-PCR)



Fuente: imagen del capítulo 5 del libro *Manual de hepatitis C. Aspectos biológicos, clínicos y terapéuticos*. Editorial médica panamericana.

3) Detección del fragmento amplificado (amplicones) mediante diferentes métodos (electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio, hibridación con sondas específicas y enzimoensayos).

Todo el proceso dura aproximadamente 24 horas. La presencia en algunas muestras biológicas de sustancias que inhiben la PCR origina resultados falsos negativos; por ello es recomendable introducir controles internos de amplificación para detectarlos.

Debido a la elevada sensibilidad de estas técnicas, el riesgo de contaminación cruzada entre muestras es alto. La fuente de contaminación más común son los fragmentos de ADN previamente amplificados en el laboratorio, que pueden contaminar los reactivos, la superficie de trabajo y el material utilizado (pipetas y puntas). Para disminuir este riesgo es importante que un laboratorio de microbiología (dentro de sus posibilidades) tenga bien diferenciadas las áreas de trabajo para realizar las técnicas de biología molecular (figura 16).



Figura 16. Distribución de las áreas de trabajo en una sección de biología molecular

Zona limpia	Zona de pre-PCR	Zona de PCR	Zona de post-PCR
<ul style="list-style-type: none"> <li>Preparación de la mezcla de PCR.</li> <li>Dispensación en tubos o placas de PCR (cerrar tubos o sellar placas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extracción de ácidos nucleicos (ADN/ARN).</li> <li>Añadido de los ácidos nucleicos a la mezcla de PCR (cerrar tubos o sellar placas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción de PCR.</li> <li>Una vez finalizada:               <ul style="list-style-type: none"> <li>PCR en tiempo real: tirar los tubos o placa sin abrirlos.</li> <li>PCR convencional: no abrir</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detección de los productos de PCR (manipulación de los productos amplificados).</li> </ul>

Fuente: esquema cedido por la Dra. Elisa Martró Català. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

Además de tener las áreas de trabajo bien diferenciadas, hay que adoptar unas medidas de trabajo muy tediosas para disminuir el riesgo de contaminación. Se ha de utilizar material especial y sistemas de anticontaminación, como irradiar las superficies de trabajo (cabinas de seguridad tipo 1 y 2) con rayos ultravioleta (UV) o utilizar sistemas químicos como la uracil-N-glicosilasa.

Con la aparición de la **PCR en tiempo real**, los problemas de contaminación disminuyeron, ya que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado. Esta técnica permite la cuantificación precisa y continua del ADN que se va formando, ya que, tal y como indica su nombre, al mismo tiempo que va teniendo lugar la PCR, se va detectando una señal que aumenta en proporción directa a la cantidad de producto formado en cada ciclo de reacción. El sistema utiliza los mismos ingredientes que una PCR convencional, sin embargo, en este caso la muestra no se coloca en un tubo convencional sino en un tubo o capilar que permite cambiar de temperatura en un tiempo muy inferior al de los instrumentos (termocicladores) convencionales.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos donde se realice la amplificación.

Existen varios sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real, entre los que destacan agentes intercalantes o sondas de hibridación específicas. En la tabla 1 mostramos las diferencias entre una PCR convencional y una PCR en tiempo real.

En la tabla 2 se exponen las diferencias entre la PCR convencional y la PCR en tiempo real:

	PCR convencional	PCR en tiempo real
Extracción	Manual: 12 m/2 h Automático: 8 m/30 min - 96 m/30 min	
Amplificación	2-4 horas	30 min - 2 horas
Detección	1-3 horas	Automatización Evita contaminaciones
Sensibilidad	++	+++
Especificidad	++/++	+++
Otras	-	Posibilidad <i>multiplex</i> (detección simultánea del DNA de varios microorganismos)

Actualmente existen diversos ensayos comercializados para el diagnóstico molecular de las ITS, los cuales pueden detectar simultáneamente dos patógenos como *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* [Cheng *et al.* 2011] o incluso 18, como el ensayo CLART<sup>®</sup> STIs A&B, Genomica S.A.U., Madrid, España.

Recientemente se ha evaluado un ensayo basado en PCR en tiempo real, en el cual se detectan 7 patógenos causantes de ITS (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, y *Ureaplasma parvum*) en una sola reacción y en diferentes muestras clínicas (exudado endocervical, uretral, vaginal, frotis rectal y orina) (Bercot y otros, 2015). Estos ensayos de PCR en tiempo real *multiplex* representan una ventaja para el diagnóstico diferencial de síndromes como uretritis, cervicitis y vaginitis. Además, permiten detectar patógenos que habitualmente no se detectan por métodos convencionales.

Los resultados obtenidos en estas técnicas se tienen que interpretar con cautela, especialmente en los casos en los que se aíslen micoplasmas o ureaplasmas, ya que estos pueden colonizar el tracto genitourinario de personas sanas sexualmente activas. Sin embargo, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp* y *Mycoplasma genitalium* se han asociado con patología del tracto urogenital en el adulto, del embarazo, del parto, del feto y del neonato (Weinstein y otros, 2011; Uusküla y otros, 2002; Horner y otros, 2001).

En caso de obtener un resultado positivo por *Chlamydia trachomatis*, se puede determinar el serovar causante de la infección, especialmente en aquellos pacientes en los que se sospeche infección por el serovar L, causante de linfogranuloma venéreo (LGV). El genotipado de *Chlamydia trachomatis* se puede realizar mediante técnicas basadas en una PCR convencional seguida de la detección del producto amplificado por enzimoimmunoensayo y tipificación por

una técnica de hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa o bien mediante técnicas de PCR en tiempo real. La detección del serovar de *Chlamydia trachomatis* tiene implicaciones epidemiológicas y clínicas.

La detección y genotipado del virus papiloma humano (PVH) se pueden realizar mediante amplificación del ADN del virus e hibridación de los amplicones obtenidos con sondas de captura específicas para los genotipos de alto y bajo riesgo, seguida de la detección de los fragmentos amplificados mediante *microarrays* (García-Sierra y otros, 2009).

En los últimos 15 años, se han desarrollado diferentes estrategias para avanzar en el conocimiento del genoma de *Treponema pallidum* y determinar cuál sería la aplicación de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de la sífilis. Se han diseñado diferentes métodos de PCR para detectar diferentes genes que codifican diferentes proteínas de *Treponema pallidum*. Estas técnicas pueden detectar el ADN de *Treponema pallidum* en diferentes tipos de muestras (exudado del chancro sifilítico, biopsias de piel de pacientes con sífilis secundaria, suero, orina y LCR). La PCR en tiempo real es una técnica rápida y fiable para el diagnóstico de una sífilis primaria, pero no tiene un valor diagnóstico añadido en los casos de sífilis secundaria (Heymans y otros, 2010).

Actualmente también se han desarrollado técnicas basadas en *PCR multiplex* para la detección simultánea de patógenos causantes de úlceras genitales, como son *Treponema pallidum*, VHS-2, *Haemophilus ducreyi* (Glatz y otros, 2014).

Para el diagnóstico molecular del ARN del VIH-1, VHC y del ADN del VHB se utilizan técnicas de PCR en tiempo real, las cuales poseen una elevada sensibilidad. Son técnicas utilizadas para confirmar el diagnóstico de las infecciones causadas por estos virus y para monitorizar su respuesta al tratamiento antivírico.

Las características principales de las técnicas de biología molecular son las siguientes:

- Son de gran utilidad en el diagnóstico de las ITS dada su elevada sensibilidad y especificidad.
- Con la aparición de la PCR en tiempo real, se ha disminuido considerablemente el riesgo de contaminación entre los procesos de amplificación y detección, ya que estos son simultáneos y se producen en un mismo tubo cerrado.
- Con las nuevas técnicas de PCR en tiempo real existe la posibilidad de realizar *PCR multiplex*, detectando de forma simultánea el material genético de varios microorganismos.

#### **2.4. Técnicas de diagnóstico rápido (POC test: *point-of-care tests*)**

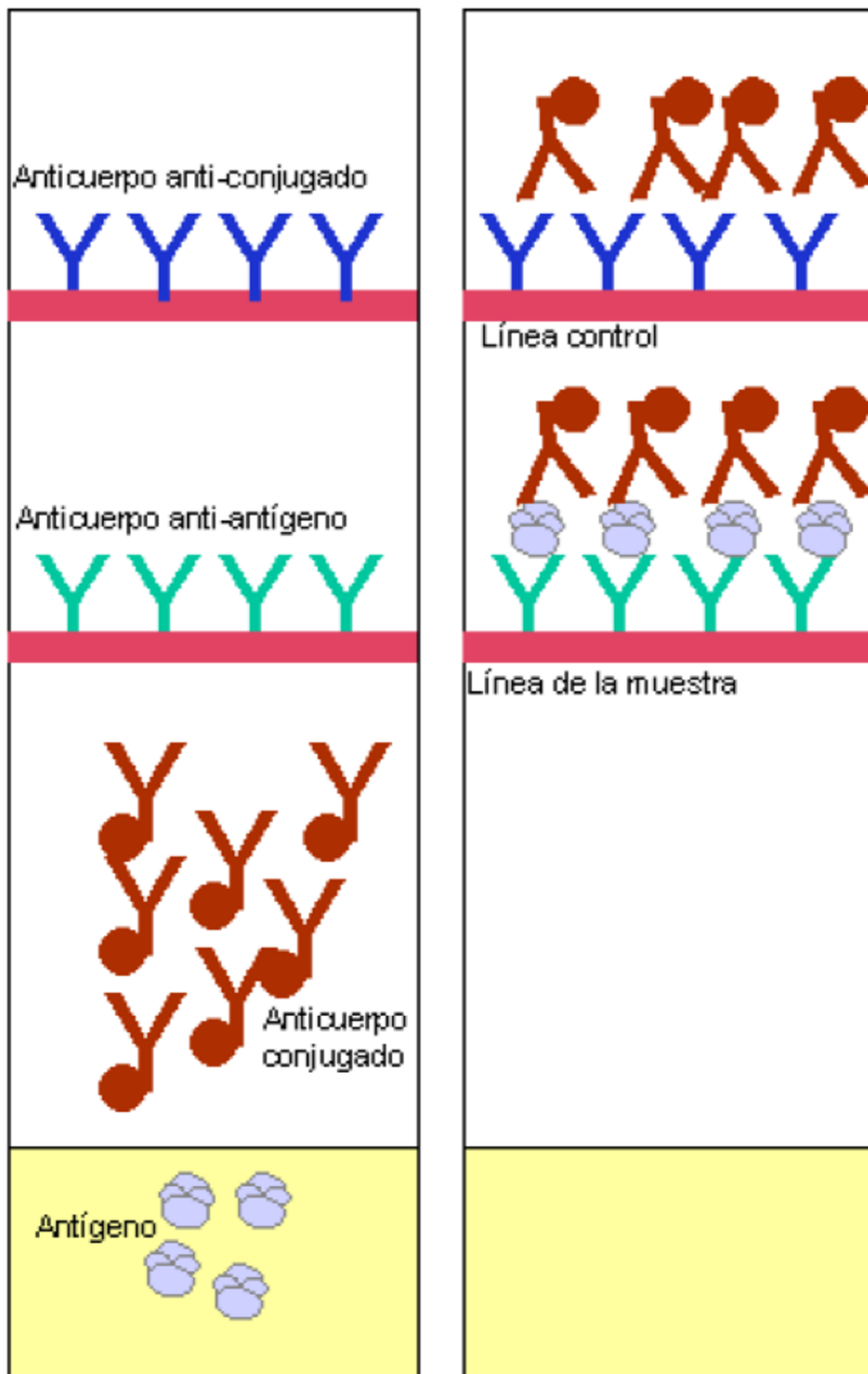
En áreas remotas del mundo, la distancia para llegar a los centros médicos y laboratorios es muy larga; lo que representa retrasos diagnósticos, entre ellos los de las ITS. Por otra parte, los países en vías de desarrollo no disponen de laboratorios con buena infraestructura para realizar un diagnóstico microbiológico adecuado de las ITS.

En estos casos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el manejo sindrómico como enfoque para diagnosticar y tratar las ITS más comunes (OMS, 2003). Este enfoque implica el tratamiento inmediato de las ITS basándose en un algoritmo de signos y síntomas característicos de las ITS [18,19]. Sin embargo, el manejo sindrómico deja muchas infecciones sin tratar y causa un tratamiento excesivo en otras.

Los tests rápidos, también conocidos como *point of care tests* (POC tests) han supuesto una mejora potencial en el diagnóstico y manejo de las ITS en áreas con accesos limitados a los servicios de salud. Son técnicas basadas en el formato de ensayo de inmunocromatografía. Sobre una membrana de nitrocelulosa o *nylon* se encuentran absorbidos en la línea de reacción anticuerpos específicos contra el antígeno que buscamos y sobre la línea control anticuerpos anti-conjugado, de forma que cuando la muestra contiene antígeno, este fluye por la membrana y queda retenido en la línea de reacción. El conjugado (anticuerpo específico) está marcado con una molécula de oro coloidal, que también fluye por la membrana y es retenido por el antígeno en la línea de reacción y por el anticuerpo en la línea control.

En el caso de muestras negativas que no contienen antígeno, el conjugado es retenido únicamente en la línea control. Son técnicas rápidas que no requieren equipamiento especializado, y cuyos resultados se obtienen en aproximadamente 15-30 minutos (figura 17).

Figura 17. Formato de ensayo de inmunocromatografía



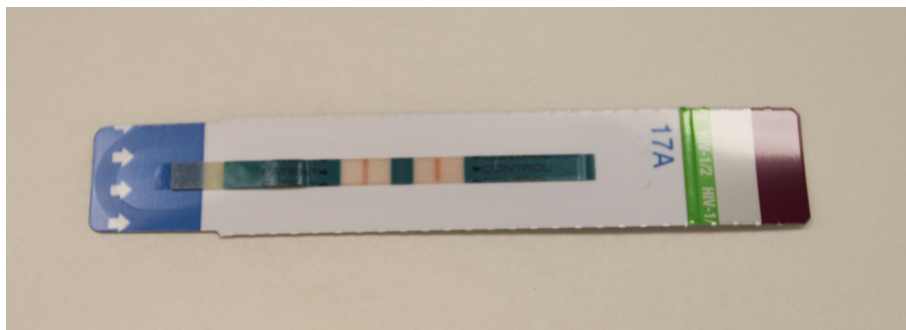
Fuente: imagen del capítulo 19 de los procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

La OMS determinó que los POC tests tenían que reunir una serie de características (denominadas criterio ASSURED) para que pudieran ser utilizados. Las siglas del criterio ASSURED se resumen en:

- **A:** *affordable* (asequible)
- **S:** *sensitive* (sensible)
- **S:** *specific* (específico)
- **U:** *user friendly* (de fácil uso)
- **R:** *robust and rapid* (robusto y rápido)
- **E:** *equipment-free* (sin equipamiento especializado)
- **D:** *deliverable* (entrega de resultados a los usuarios)

Existen diversos tests rápidos para el diagnóstico de infección por VIH en muestras de suero o punción digital. Están basados en inmunocromatografía, son de lectura rápida, no se requiere equipamiento sofisticado y se pueden conservar a una temperatura entre 2 °C y 30 °C. En la figura 18 se muestra un resultado positivo para VIH-1 en un test rápido.

Figura 18. Test rápido para VIH-1



Fuente: foto realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

En los últimos años se han desarrollado varios tests POC para el diagnóstico de sífilis. Son tests treponémicos con buena sensibilidad y especificidad, pero no distinguen entre infección activa, pasada o curada (Mabey y otros, 2006). Recientemente se ha evaluado un test rápido dual para la detección de anticuerpos reagínicos y treponémicos, mostrando resultados prometedores (Yin y otros, 2013). También se han evaluado tests rápidos *duplex*, en los cuales se pueden detectar anticuerpos frente a *Treponema pallidum* y VIH. Estos tests son de gran utilidad en poblaciones de alta prevalencia, debido a la elevada tasa de coinfección (Bristow y otros, 2014). Hess y Cols evaluaron en el año 2014 un test rápido que detectaba simultáneamente anticuerpos anti-*Treponema* (reagínicos y treponémicos), anti-VIH y anti-VHC en una población de riesgo atendida en una clínica de ITS. Los autores observaron que la sensibilidad de este test para VIH y VHC fue buena, pero en el caso del test treponémico la sensibilidad fue baja (Hess y otros, 2014).

Hasta el día de hoy, el uso de tests rápidos para el diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* ha sido limitado por las deficiencias de una metodología adecuada. Eran tests muy laboriosos, basados en inmunocromatografía, con tiempos de realización largos y valores de sensibilidad y especificidad muy bajos (Watchirs y otros, 2013; Dommelen y otros, 2010). Recientemente, se ha desarrollado un test rápido basado en biología molecular para la detección simultánea de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria*

*gonorrhoeae*. Es un test con elevada sensibilidad y especificidad para ambos patógenos. Es de fácil uso y disponibilidad de resultados en 90 minutos (Natoli y otros, 2014).

Los *point-of-care tests* pueden ser una herramienta diagnóstica importante para las infecciones de transmisión sexual fuera del ámbito sanitario y en áreas geográficas con recursos sanitarios limitados.





## Glosario

**sensibilidad** *f* Probabilidad de que la técnica utilizada para el diagnóstico de una infección sea positiva en un individuo infectado. Una técnica de gran sensibilidad dará pocos resultados falsos negativos.

**especificidad** *f* Probabilidad de que la técnica utilizada para el diagnóstico de una infección sea negativa en un individuo no infectado. Una técnica de gran sensibilidad dará pocos resultados falsos positivos.

**enzoinmunoensayo competitivo** *m* Ensayo mediante el cual la cantidad de anticuerpos presentes en el suero del paciente se determina evaluando la capacidad que estos tienen para bloquear la fijación al antígeno de una cantidad conocida y fija de anticuerpos contra ese antígeno, marcados y añadidos simultáneamente con el suero del paciente.

**ácido desoxirribonucleico** *m* Molécula que codifica la secuencia de aminoácidos de las proteínas y controla su síntesis. El conjunto de ácido desoxirribonucleico de una célula es su genoma y puede estar formado por una sola pieza, como ocurre en la mayoría de las bacterias, o por varios fragmentos que constituyen los cromosomas, como en el caso de las células eucariotas. El ácido desoxirribonucleico está formado por dos largas cadenas de nucleótidos. sigla ADN

**ADN** *m* Véase **ácido desoxirribonucleico**.

**ácido ribonucleico** *m* Molécula formada por una sola cadena. Su composición química es similar a la del ácido desoxirribonucleico, pero en lugar de deoxirribosa, está formado por ribosa. sigla ARN

**ARN** *m* Véase **ácido ribonucleico**.

**ADN polimerasa** *m* Conjunto de enzimas polimerasas que son capaces de replicar o transcribir ácidos nucleicos. Es el enzima que lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**nucleótido** *m* Cada una de las moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido (azúcar simple) de cinco carbonos, una base nitrogenada y un grupo fosfato.

**base nitrogenada** *f* Compuesto orgánico cíclico, que incluye dos o más átomos de carbono. Las bases adenina (A), timina (T), guanosina (G), y citosina (C) se encuentran en el ácido desoxirribonucleico. En el ácido ribonucleico se sustituye la timina por uracilo (U).

**oligonucleótido** *m* Molécula formada por varios nucleótidos. Se puede utilizar como cebadores o iniciadores (en inglés, *primers*) en la PCR.

**tecnología** *f* Tecnología que se basa en la división de una pequeña superficie (generalmente de vidrio —láminas de sílice— de aproximadamente 1 cm cuadrado) en numerosos cuadros imaginarios, en cada uno de los cuales se fijan las sondas.

**sonda** *f* Fragmento de ácido desoxirribonucleico que se puede marcar con diferentes sustancias para detectarlas cuando hibridan con su diana.

## Bibliografía

**Berçot, B.; Amarsy, R.; Goubard, A.; Aparicio, C.; Loeng, H. U.; Segouin, C.; Gueret, D.; Jacquier, H.; Meunier, F.; Mougari, F.; Cambau, E.** (2015). «Assessment of coinfection of sexually transmitted pathogen microbes by use of the anyplex II STI-7 molecular kit». *J Clin Microbiol* (vol. 53, núm. 3, págs. 991-3). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25540390>>

**Bristow, C. C.; Adu-Sarkodie, Y.; Ondondo, R. O.; Bukusi, E. A.; Dagnra, C. A.; Oo, K. Y.; Pe, E. H.; Khamsay, C.; Houng le, T.; Campuzano, R. V.; Estes, J.; Klausner, J. D.** (2014). «Multisite Laboratory Evaluation of a Dual Human Immunodeficiency Virus (HIV)/Syphilis Point-of-Care Rapid Test for Simultaneous Detection of HIV and Syphilis Infection». *Open Forum Infect Dis* (núm. 1). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734088>>

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2006-2010). «Discordant results from reverse sequence syphilis screening-five laboratories, United States». *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (vol. 60, núm. 5, págs.133-7). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307823>>

**Centre for Disease Control.** (2008). *NT Guidelines for the Management of Sexually Transmitted Infections in the Primary Health Care Setting*. Darwin: Northern Territory Government Department Health and Families.

**Communicable Disease Control Directorate.** (2006). *Guidelines for Managing Sexually Transmitted Infections*. Perth: Department of Health, Western Australia.

**Dommelen, L. van; Tiel, F. H. van; Ouburg, S.; Brouwers, E. E.; Terporten, P. H.; Savelkoul, P. H.; Morré, S. A.; Bruggeman, C. A.; Hoebe, C. J.** (2010). «Alarmingly poor performance in Chlamydia trachomatis point-of-care testing». *Sex Transm Infect* (vol. 86, núm. 5, págs. 355-9). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876754>>

**García-Sierra, N.; Martró, E.; Castellà, E.; Llatjós, M.; Tarrats, A.; Bascuñana, E.; Díaz R.; Carrasco, M.; Sirera, G.; Matas, L.; Ausina, V.** (2009). «Evaluation of an array-based method for human papillomavirus detection and genotyping in comparison with conventional methods used in cervical cancer screening». *J Clin Microbiol* (vol. 47, núm. 7, págs. 2165-9). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439534>>

**Glatz, M.; Juricevic, N.; Altwegg, M.; Bruisten, S.; Komericki, P.; Lautenschlager, S.; Weber, R.; Bosshard, P. P.** (2014). «A multicenter prospective trial to assess a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers». *Clin Microbiol Infect* (vol. 20, núm. 12, págs. 1020-7). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909546>>

**González, V.; Fernández, G.; Dopico, E.; Margall, N.; Esperalba, J.; Muñoz, C.; Castro, E.; Sulleiro, E.; Matas, L.** (2015). «Evaluation of the Vitros Syphilis TPA chemiluminescence immunoassay as a first-line method for reverse syphilis screening». *J Clin Microbiol* (vol. 53, núm. 4, págs. 1361-4). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609729>>

**González, V.; Padilla, E.; Diago, M.; Giménez, M. D.; Solà, R.; Matas, L.; Montoliu, S.; Morillas, R. M.; Pérez, C.; Planas, R.** (2005). «Clinical usefulness of total hepatitis C virus core antigen quantification to monitor the response to treatment with peginterferon alpha-2a plus ribavirin». *J Viral Hepat* (vol. 12, núm. 5, págs. 481-7). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16108762>>

**Hess, K. L.; Fisher, D. G.; Reynolds, G. L.** (2014). «Sensitivity and specificity of point-of-care rapid combination syphilis-HIV-HCV tests». *PLoS One*. (vol. 9, núm. 11, e112190). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375138>>

**Heymans, R.; Helm, J. J. van der; Vries, H. J. de; Fennema, H. S.; Coutinho, R. A.; Bruisten, S. M.** (2010). «Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis». *J Clin Microbiol* (vol. 48, núm. 2, págs. 497-502). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007388>>

**Horner, P.; Thomas, B.; Gilroy, C. B.; Egger, M.; Taylor-Robinson, D.** (2001). «Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis». *Clin Infect Dis* (vol. 32, núm. 7, págs. 995-1003). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264026>>

**Kesli, R.; Polat, H.; Terzi, Y.; Kurtoglu, M. G.; Uyar, Y.** (2011). «Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the

HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results». *J Clin Microbiol* (vol. 49, núm. 12, págs. 4089-93).

**Lipinsky, D.; Schreiber, L.; Kopel, V.; Shainberg, B.** (2012). «Validation of reverse sequence screening for syphilis». *J Clin Microbiol* (núm. 50, pág. 1501). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Validation+of+reverse+sequence+screening+for+syphilis>>

**Mabey, D.; Peeling, R. W.; Ballard, R.; Benzaken, A. S.; Galbán, E.; Changalucha, J.; Everett, D.; Balira, R.; Fitzgerald, D.; Joseph, P.; Nerette, S.; Li, J.; Zheng, H.** (2006). «Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis». *Sex Transm Infect* (núm. 82, supl. 5, v13-6). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215274>>

**Morota, K.; Fujinami, R.; Kinukawa, H.; Machida, T.; Ohno, K.; Saegusa, H. et al.** (2009). «A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen». *J. VirolMethods* (núm. 157, págs. 8-14).

**Natoli, L.; Maher, L.; Shephard, M.; Hengel, B.; Tangey, A.; Badman, S. G.; Ward, J.; Guy, R. J.; TTANGO Investigators.** (2014). «Point-of-care testing for chlamydia and gonorrhoea: implications for clinical practice». *PLoS One*. (23;9(6):e100518). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24956111>>

**OMS.** (2003). *Guidelines for the management of sexually transmitted infections*. Ginebra.

**Park, I. U.; Chow, J. M.; Bolan, G.; Stanley, M.; Shieh, J.; Schapiro, J. M.** (2011). «Screening for syphilis with the treponemal immunoassay: analysis of discordant serology results and implications for clinical management». *J Infect Dis* (vol. 204, núm.9, págs. 1297-304). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930610>>

**Park, Y.; Lee, J. H.; Kim, B. S.; Kim, Y. do; Han, K. H.; Kim, H. S.** (2010). «New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification». *J Clin Microbiol* (vol. 48, núm. 6, págs. 2253-6). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351215>>

**Sampedro-Martinez, A.; Padilla-Malo, A.; Gomez-Camarasa, C.; Rodriguez-Granger, J.; Lara-Oya, A.** (2013). «Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis». *J Microbiol Methods* (vol. 94, núm. 2, págs. 133-4). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732753>>

**Uusküla, A.; Kohl P. K.** (2002). «Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents». *Int J STD AIDS* (vol. 13, núm. 2, págs. 79-85). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839161>>

**Watchirs Smith, L. A.; Hillman, R.; Ward, J.; Whiley, D. M.; Causer, L.; Skov, S.; Donovan, B.; Kaldor, J.; Guy, R.** (2013). «Point-of-care tests for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection: a systematic review of operational and performance characteristics». *Sex Transm Infect* (vol. 89, núm. 4, págs. 320-6). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Watchirs+Smith+and+2013>>

**Weinstein S. A.; Stiles B. G.** (2011). «A review of the epidemiology, diagnosis and evidence-based management of *Mycoplasma genitalium*». *Sex Health* (vol. 8, núm. 2, págs.143-58). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592428>>

**Yin, Y. P.; Chen, X. S.; Wei, W. H.; Gong, K. L.; Cao, W. L.; Yong, G.; Feng, L.; Huang, S. J.; Wang, D. M.; Han, Y.; Chen, S. C.; Mabey, D.; Peeling, R. W.** (2013). «A dual point-of-care test shows good performance in simultaneously detecting nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis: a multisite evaluation study in China». *Clin Infect Dis* (vol. 56, núm. 5, págs. 659-65). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132172>>

