



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Diseño y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual

Gema Fernández Rivas

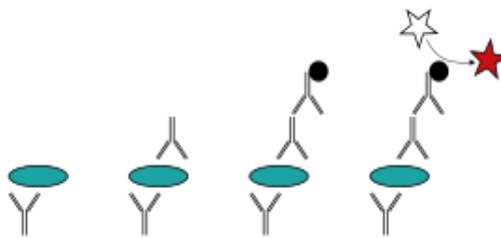
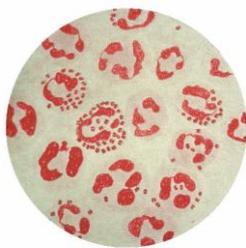




Universitat Autònoma de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
Departament de Genètica i Microbiologia  
Facultat de Biociències

Diseño y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual





UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
Departament de Genètica i Microbiologia  
Facultat de Biociències

Diseño y evaluación de nuevas técnicas de  
diagnóstico serológico y molecular para el  
diagnóstico de las infecciones de transmisión  
sexual

Memoria presentada por Gema Fernández Rivas  
para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Autonónoma de Barcelona.

Con la aprobación de los Directores de la Tesis

Dr. Vicente Ausina Ruiz

Dra. Lurdes Matas Andreu



A mis Pablos por cambiarme la vida a mejor  
y a mi madre por su vida de sacrificios.

Más veces descubrimos nuestra sabiduría con nuestros  
disparates que con nuestra ilustración.  
Oscar Wilde

La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos,  
tarde o temprano, se aplican.  
Severo Ochoa

Es mejor estar callado y parecer tonto, que hablar y  
despejar las dudas definitivamente.  
Groucho Marx



---

# ÍNDICE

Agradecimientos .....	11
Resumen.....	14
Listado de abreviaturas .....	17
Artículos en los que se basa esta tesis .....	21
1.Introducción .....	23
1.2 LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL A TRAVÉS DE LA HISTORIA .....	23
1.2 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL.....	25
1.3 PRINCIPALES SÍNDROMES CLÍNICOS ASOCIADOS A LAS ITS .....	31
2.4 PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS ITS.....	44
1.5 Métodos diagnósticos microbiológico.....	60
1.5.1 Las muestras clínicas en las infecciones de transmisión sexual.....	60
1.5.2 Métodos de diagnóstico directo .....	61
1.5.2.1 Técnicas tradicionales .....	61
1.5.2.2 Estudio de resistencias bacterianas .....	62
1.5.2.3 Técnicas rápidas de diagnóstico. Point of-care tests .....	66
1.5.3 Diagnóstico serológico .....	74
1.6 Importancia en salud pública de las ITS .....	83
2.Justificación .....	90
3. Objetivos .....	94
4. Resultados y discusión .....	95
5. Conclusiones.....	104
6. Bibliografía .....	106
Anexos: Artículos.....	124



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mis tutores por el apoyo y el tesón para que esta tesis llegara a buen puerto. Al Dr. Ausina por su incansable e incesable afán de superación, por la contagiosidad de su trabajo diario y por tener ese tipo de mente lúcida que siempre ve más allá de lo que los demás vemos. A la Dra. Matas, por sus siempre sabios consejos, por las correcciones de mejora continua de una manera siempre constructiva. Moltes gràcies per tot.

A la Dra. González Soler, es decir, a Vicky. Ella ha sido una pieza clave en este proceso. Gracias por tu meticulosa laboriosidad en todo lo que haces. En la capacidad infinita de trabajo y en aportarme muchos conocimientos adquiridos con esfuerzo y paciencia. Y muchas gracias por tantos momentos de risas y de compañerismo. De ella aprendí como manejar el “serotrón 3000”. ¡¡Gracias Vicky!!

A la Dra. Montserrat Giménez, por ser la primera persona que me enseñó esto de la microbiología clínica y mostrarme que hay que llegar hasta el final para ser un buen profesional.

Al Dr. Joxe Mari Manterola por ser un profesor “Bacterio” en toda regla. Sin pereza a enseñar, sin pereza a mirar parásitos con el residente hasta las 7 de la tarde, sin pereza a hacer algoritmos de identificación bioquímica en el papel de filtro o en el mantel de la cafetería. Un placer haber aprendido de ti. Eskerrik asko.

A la Dra. Águeda Hernández, mi compañera de prácticas. ¿Qué mejor equipo se puede hacer que el de Hernández y Fernández? Eres una persona increíble, porque siempre estás ahí para ayudar en cualquier cosa. Me parece que no puedo más que sentir admiración por tu constancia y capacidad de superación.

A la Dra. Silvia Blanco, que decidió irse a buscar fortuna al continente africano. La comisión de festejos se vino abajo con tu nuevo rumbo. Tu alegría y capacidad para hacer las cosas con una sonrisa es digna de envidiar y de imitar. Es más fácil trabajar sonriendo.

A las chicas que se han ido al hemisferio sur, Nerea y Loreto (Dra. Fuenzalida). Una a buscar aventuras y desventuras como viajera novata y otra a unirse a su familia y su tierra. ¡Viva la amistad forjada entre batas blancas y comidas en la minisalita!

A las “R200000”: la Dra. Cristina Prat, a la Dra M<sup>a</sup>Dolores Quesada y a la Dra. Sònia Molinos porque el compañerismo y el respeto al trabajo bien hecho ha primado por encima de todo.

A la otra “R200000”, la Dra. Cristina Vilaplana, porque tiene ese punto de genio loco y no lo digo sólo por la risa, sino porque eres una mujer valiente. Gracias por las confidencias de R grande.

A la Dra. Elisa Martró y a la Dra. Verónica Saludes. Por invertir vuestro tiempo en mí y ayudarme en la redacción de artículos. Cada vez que os daba algo para corregir estaba segura de que os lo ibais a mirar con detenimiento y con ánimo de mejora. He aprendido mucho de vosotras y espero seguir haciéndolo.

A la Dra. Melania Iñigo, siempre activa y combativa. Tu entusiasmo se contagia. Espero poder seguir trabajando contigo y con Andreu y hacer esas bases de datos kilométricas.

A María Carrasco porque es un placer trabajar contigo, con tu profesionalidad y tus inagotables ganas de aprender entre: “más de  $10^5$  de *E. coli* y anti de BGN”. Le has dado carácter a la sección de urocultivos. Ese carácter que tú sabes sacar cuando toca.

A Mireya Alcaide, que puedo decir de ti...Hemos evolucionado juntas como personas y como profesionales. Siempre juntas. Siempre risas, siempre chistes estúpidos que nos hacen reír. Eso sí, si no nos hace gracia no nos reímos y espero seguir haciéndolo por mucho tiempo.

A todos los enfermeros y técnicos del servicio. A Federico Cuchillo porque eres como la compuerta oculta en un armario cualquiera. A Miguel Pérez por sus chistes malos que me hacen reír. A Loli por estar siempre dispuesta a echar un cable. A Maragda por sus locuras de meterse en coches ajenos, a Gregorio por ser un manitas empedernido, a Dolors Melgosa por ser cómplice en los arreglos de los aparatos en serología, a Noelia por su curiosidad o sus: a ver...una pregunta..., a Jordi por las risas imitando a la Pantoja, a Miguel Ángel por compartir experiencias y magdalenas de chocolate, a Luci por su confianza y discreción y a Montse Morilla, por ser una conseguidora nata. Y a la “super”, Carmen Ramil, por gestionar todo esto con mucha mano izquierda. Muchas gracias a todos.

A mis vecinas de cubículo, la Dra. Alicia Lacomá, la Dra. Irene Latorre, Bárbara, Esther García, Raquel...por las miradas cómplices entre cristales a vuestro despacho. Y a Meissi, por ser un gran apoyo en muchos momentos. Eres una auténtica luchadora. Obrigada Meissi!! Tudo vale a pena se a alma não é pequena.

A las “secres” del Servicio. A Cristina por su gran orden. Si no fuera por ti, habría muchas cosas que no sabría cómo encontrar. A Isabel Carrasco por tus consejos y tus recomendaciones que lo he seguido siempre porque son consejos de amiga. Y como no a Aroa.

A mis niñas. Aroa, gracias por ayudarme en todo sin preguntar. Gracias por los cigarrillos del desahogo. Eres noble y una gran persona. ¡¡¡Nunca olvides quién eres porque eres grande!!! A mi Bascu, Mimi, Larga, o como todos te llaman Eli. Te mereces lo mejor. Que tu largura no cambie nunca y que esa energía positiva no desaparezca. A Jessy, por confiar en mí y por contar conmigo. Por ayudarme con todos y cada uno de los antibiogramas en los que dudo. Deberíais estar orgullosas de todo lo que habéis logrado.

A Elena Jordana (¡¡Dra. Jordana!!). ¡¡Como te lo has currado!! Gracias por el confesionario móvil, por ayudar siempre con todos los temas de papeleo y por organizar eventos y asegurar la diversión. Espero que en tu nueva etapa no decaiga tu alegría.

A mis cachorras. Belén, cuando te oí decir: soy de Asturias, pensé: “¡Ay madre!”. Gracias por ser mi conejillo de Indias. Me has ayudado en esto de ser tutora y me ha encantado hacer pirosecuenciación contigo porque eso es muy “dificulteiting”. Y a Clara, mi discretísima cachorra. Tienes unas cualidades valiosísimas porque eres muy buena. Ser vuestra tutora es privilegio. Me dais ese feedback positivo que siempre es necesario. Sé que seréis unas profesionales excepcionales porque sois personas de primera calidad. Y al R1, Adrián, por ser el residente de uros que ha llevado la sección con una gran profesionalidad. Gracias por las ganas de aprender.

A las “chicas de la tarde”. Aunque algunas ya no están en micro como Mayte, Marisol, Ester o Adry siempre vendréis a mi memoria con gratos recuerdos. Y a las que aún están, Natalia y Georgina. El dueto inquebrantable. Hacéis las cosas muy bien y sobre todo con ganas e ilusión.

A mis amigas. Los “abuelos”: Belén, Lara y Lilian. Nunca han podido con nosotras a pesar de los muchos kilómetros de por medio. ¡¡Hemos ido hasta China para estar juntas!! Y seguiría cruzando fronteras para ello. Los “abuelos” son los “abuelos”. A Mónica mi amiga y ex compañera de piso. Los años vividos contigo han sido de los mejores. Eres una gran profesional y una gran amiga. En Barcelona, en Gijón, en Munich, tu presencia no pasa desapercibida porque eres un colibrí inquieto y siempre con ganas de más. A Almu, desde Oviedo a Coruña, pasando por Madrid, Málaga, Barcelona y Bruselas, ¡suerte que por fin has decidido quedarte cerca! A Aída, mi parisina amiga. ¿Quién me iba a decir que en mi primer día en París, iba a conocer a mi *alter ego* de Gavà y que íbamos a compaginar de esta forma? Somos las “Viejus” y a mucha honra.

A M<sup>a</sup> del Carmen Rivas, mi madre. Por el esfuerzo que ha supuesto para ti tirar de dos niñas sola desde tan joven. Por tu incansable esfuerzo en educar, ser una gran madre y transmitir los valores del trabajo duro y el sacrificio. No sabes lo que te agradezco todo lo que has hecho.

A mis Pablos. A Pablo Mahedero, por estar a mi lado siempre sin importar la calidad del momento. Si no fuera por tu ayuda no sé cómo hubiera podido salir de los momentos difíciles. Y gracias por abrirme los ojos en tantas cosas en las que los mantenía cerrados. Me has dado a mi otro Pablo, miniPablo, una auténtica prueba de amor. Espero estar a la altura de las circunstancias.

## RESUMEN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) incluyen una serie de síndromes causados por agentes patógenos que pueden ser adquiridos mediante la actividad sexual. La incidencia de las ITS ha aumentado en los últimos años. Las cifras que hacen públicas los epidemiólogos son consistentes y reflejan este hecho. No se puede hablar de una situación de epidemia o de endemia como antes de la época antibiótica; es más bien una interrupción de la tendencia que seguían las tasas de incidencia hacia la estabilización o hacia un descenso desde la aparición del sida en 1982.

En el momento actual, el fenómeno parece afectar a algunos colectivos concretos (fundamentalmente, los hombres que practican sexo con hombres (HSH) y a los jóvenes de medios urbanos del mundo occidental), pero ya se detectan indicios de la extensión hacia otros estratos sociales y poblacionales. Lógicamente, estas afirmaciones se refieren sólo a las ITS de las cuales se posee un registro (básicamente, aquellas enfermedades de declaración obligatoria; se desconoce la evolución numérica real del resto).

Bajo el concepto de ITS se agrupan las enfermedades venéreas clásicas (uretritis, sífilis, chancroide y linfogranuloma venéreo) y el virus del papiloma humano, básicamente de transmisión sexual. También todas aquellas en las que este mecanismo de transmisión no es el único y ni tan sólo el principal (hepatitis B y C, la amebiasis intestinal en HSH, la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y algunas parasitosis), aunque haremos mención a aquellas que por su prevalencia e importancia epidemiológica son objeto de esta Tesis doctoral. Los patógenos más importantes engloban *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, VIH y otros microorganismos emergentes como el *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*, éstos tres últimos muchas veces con significado incierto.

El diagnóstico correcto de las ITS tiene importancia por su relevancia como problema de salud pública y también por las complicaciones que pueden producir en los pacientes no diagnosticados y no tratados correctamente.

En la práctica clínica muchas veces las ITS sólo son diagnosticadas sindrónicamente, bien por la ausencia de pruebas diagnósticas adecuadas o por la carencia en algunos laboratorios de estas herramientas. Actualmente se considera importante desarrollar nuevas técnicas para poder realizar un diagnóstico cada vez más preciso con tecnologías más sensibles, y al alcance de todos. Asimismo, es primordial disponer de técnicas rápidas en los casos en los que está

indicado un tratamiento en monodosis y en la propia consulta, para asegurar el cumplimiento del mismo.

- **La Tesis tiene 3 objetivos principales que se han abordado en tres artículos diferentes.** El **primer objetivo** es la evaluación de una técnica de avidez para la identificación de infección reciente por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 utilizando un inmunoensayo automatizado de quimioluminiscencia (QLIA). RITA del inglés *Recent Infection Testing Algorithm* es un nombre genérico para una serie de técnicas de laboratorio que distinguen la infección reciente por el VIH. El estudio indica que el ensayo de avidez evaluado es un método fiable para identificar infecciones recientes por el VIH-1 y podría ser utilizado dentro de un algoritmo RITA para estimar la incidencia de infección por VIH-1 en la población.
- La complejidad del diagnóstico de la sífilis continúa siendo un reto para el laboratorio de microbiología. La elección correcta de las técnicas es esencial para confirmar esta infección debido a la historia natural de la enfermedad. En la mayoría de las ocasiones la serología es la clave para llegar a un diagnóstico. Clásicamente los algoritmos que se han utilizado se basaban en la utilización de una prueba reagínica o no treponémica y posteriormente una prueba treponémica. El nuevo desarrollo de técnicas treponémicas automatizadas ha facilitado su uso como “screening” en lo que se ha denominado algoritmos reversos. **El segundo objetivo** de la tesis fue describir la utilidad de una técnica automatizada VITROS Syphilis TPA ( ensayo treponémico por quimioluminiscencia) para realizar el diagnóstico de la sífilis comparándolo con técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA), así como con las pruebas clásicamente realizadas, *Rapid Plasma Reagin* (RPR) con posterior confirmación con *Treponema pallidum hemagglutination assay* (TPHA). De esta parte de la tesis se puede extraer la conclusión de que el fácil uso de esta técnica permite implementarlo como técnica de cribaje en laboratorios con alta carga de trabajo gracias a su alto valor predictivo negativo.
- Para completar el estudio de las ITS, el **tercer y último objetivo** de la tesis fue estudiar y evaluar una nueva técnica de biología molecular con capacidad de detectar simultáneamente los principales agentes causales de ITS. Para ello se procedió a la evaluación de una técnica de PCR multiplex comercial con escaso respaldo bibliográfico, a partir de diferentes tipos de muestras provenientes de poblaciones seleccionadas y estudiadas previamente por otras técnicas. Éste método permite detectar a partir de una sola muestra, siete agentes causales diferentes de ITS (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium*) mediante el kit comercial *Anyplex II STI-7*

*Detección.* Los datos obtenidos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos al compararlos con las técnicas convencionales utilizadas en nuestro laboratorio son excelentes. Además la posibilidad de detectar por la misma técnica *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium* es de gran interés. Su detección, sobre todo de los tres primeros, aún hoy, presenta algunas sombras que esperamos puedan aclararse a medida que vayamos conociendo su implicación real en síndromes clínicos concretos.

Las nuevas técnicas moleculares e inmunológicas evaluadas en esta Tesis han resultado útiles para la detección de agentes causales de ITS. En general, los ensayos de PCR son muy sensibles y específicos en comparación con otras técnicas como los cultivos. Por otro lado, la introducción de estrategias basadas en PCR múltiple permitirá, en un futuro próximo, identificar pacientes con coinfecciones y también explicar determinados fallos en los tratamientos.

# LISTADO DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
BOE	Boletín Oficial del Estado
CDC	Centre for the Diseases Control and Prevention
CE	Cuerpos elementales
CEEISCAT	Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i Sida de Catalunya
CI	Cuerpos de inclusión
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendment
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Cconcentración mínima inhibitoria
CMV	Citomegalovirus
COMC	Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína
CR	Cuerpos reticulares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
DPO™	Dual priming oligonucleotide
ECDC	European Centre for the Diseases Control and Prevention
ECP	Efectos citopático
EDO	Enfermedades de declaración obligatoria
EIA	Enzimoimmunoanálisis
EPI	Enfermedad inflamatoria pélvica
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Fluorescencia por resonancia
FRR	False recent rate
FTA-ABS	Fluorescent treponemal antibody absorption
GISP	Gonococcal Isolate Surveillance Project
HSH	Hombres que practican sexo con hombres
HTLV	Virus humano de la leucemia de células T
ICT	Inmunocromatografía
IF	Inmunofluorescencia
IFD	Inmunofluorescencia directa
Ig	Inmunoglobulina
INE	Instituto nacional de estadística

ITS	Infecciones de transmisión sexual
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LGV	Linfogranuloma venéreo
LIA	Inmunoensayo en línea
LOES	Lesiones ocupantes de espacio
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
LTR	Long terminal repeat
MALDI-TOF	Matrix-assited laser desorption ionization-time-of-flight
MDGs	Millennium Development Goals
MOMP	Proteína de membrana externa
mRNA	RNA mensajero
OMS / TDR	Programa de Investigación y Formación en Enfermedades tropicales
OMS	Organización mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGP	Parálisis general progresiva
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PMPs	Proteínas polimórficas de membrana
POC	Point-of-care
PTI	Púrpura trombocitopénica idiopática
QLIA	Quimioluminiscencia
QRDRs	Regiones indicadoras de resistencias a quinolonas
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RITA	Recent Infection Testing Algorithm
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Receiver operating characteristic
RPR	Rapid Plasma Reagin
SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIM	Sistema de Información Microbiológica
SNC	Sistema Nervioso Central
SNMC	Sistema de Notificació Microbiologica de Catalunya
SNP	Single nucleotid polymorfism

STARHS	Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOCE™	Tagging oligonucleotide cleavage and extension)
TPHA	<i>Treponema pallidum</i> hemagglutination assay
UDVP	Usuarios a drogas por vía parenteral
UNG	Uretritis no gonocócica
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHS	Virus herpes simple
VPH	Virus del papiloma humano
VPH	Virus del papiloma humano
VPN	Valores predictivos negativos
VPP	Valores predictivos positivos
WB	Western Blot



## ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS

### Artículo 1

Evaluation of an antibody avidity index method for detecting recent human immunodeficiency virus type 1 infection using an automated chemiluminescence immunoassay.

**Gema Fernández**, Christian Manzardo, Alexandra Montoliu, Colin N Campbell, Gregorio Fernández, Jordi Casabona, José M Miró, Belén Rivaya, Lurdes Matas, Victoria González.

### Artículo 2

Evaluation of the Vitros Syphilis TPA Chemiluminescence Immunoassay as a First-Line Method for Reverse Syphilis Screening.

Victoria González, **Gema Fernández**, Eva Dopico, Nuria Margall, Juliana Esperalba, Carme Muñoz, Elisabeth Castro, Elena Sulleiro, Lurdes Matas.

### Artículo 3

Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections.

**Gema Fernández**, Elisa Martró, Victoria González, Verónica Saludes, Elisabet Bascuñana, Clara Marcó, Belén Rivaya, Evelin López, Pep Coll, Lurdes Matas, Vicente Ausina.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.2 LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL A TRAVÉS DE LA HISTORIA

A lo largo de la historia, muchas han sido las hipótesis sobre el origen de ciertas enfermedades consideradas de transmisión sexual o venéreas. El término venéreo, actualmente en desuso, procede de Venus, diosa romana de la belleza, del amor y de la fecundidad y versión latina a su vez de la diosa griega del amor llamada Afrodita. Este término, acuñado a finales del siglo XVI por Jacques de Bitencourt, tan sólo enmascaraba de forma metafórica, el hecho de cómo se transmitían estas enfermedades. Otros autores posteriormente llegaron a llamarlas "efectos colaterales del amor" como el escritor francés Jacques de Siboulei.

Muchas de estas enfermedades, han tenido diversos orígenes según el punto de vista de unos u otros. Este es el caso de la palabra sífilis que proviene del nombre '*Syphilo*', pastor y protagonista del poema del médico italiano, Gerónimo Fracastoro, donde relata como Syphilo fue castigado por haber erigido altares prohibidos en la montaña con una terrible y desconocida enfermedad, la sífilis, descrita de manera magistral y didáctica por Fracastoro (1). Desde *mal francés a mal napolitano*, (2) los epónimos son variados en función de quién pusiera el nombre. El debate sobre los orígenes de la sífilis ha continuado durante casi 500 años, desde que los europeos a principios del siglo XVI se culparan mutuamente, refiriéndose a ella de diversas maneras. Una hipótesis supone un origen en el Nuevo Mundo, y sostiene que los marineros que acompañaron a Colón y otros exploradores trajeron la enfermedad a Europa. Otra explicación es que la sífilis siempre estuvo presente en el Viejo Mundo, pero no fue identificada como una entidad propia. Ésta es la teoría unitaria o del Viejo Mundo defendida por Hudson que postula el hecho de que podría tratarse de un único microorganismo cuyo origen pudo ser África a partir de una enfermedad denominada *yaws*, que se extendió por el Norte del continente africano hasta Europa y que tuvo distintos nombres dependiendo de la zona en la que aparecía (3).

Otras viejas enfermedades no parece que tengan tantas teorías para explicar su origen como la sífilis. Es el ejemplo de la *Neisseria gonorrhoeae*, ya conocida desde tiempos bíblicos, estudiada por Hipócrates y referenciada por Galeno como gonorrea (del griego "salida de flujo o semilla), pensando que el flujo presente era una espermatorrea y no bien el exudado propio de la infección. No fue hasta 1879 que el médico alemán Albert Neisser, descubriera la presencia de una bacteria con morfología cocoide, en exudados purulentos de los pacientes infectados (4). Demostrada la presencia de la bacteria, siguió manteniendo el nombre acuñado por Galeno.

Los tratamientos efectivos para los males de aquella época eran escasos, tengamos en cuenta que la explosión de la sífilis y la gonorrea hizo estragos en el siglo XVI en España y no fue hasta la irrupción de la penicilina, que estas dos infecciones pudieron ser tratadas con éxito.

Durante muchos años el espectro de las ITS estaba limitado a las clásicas cinco enfermedades venéreas: gonorrea, sífilis, chancro blando, linfogranuloma venéreo (LGV) y granuloma inguinal.

En la década de los setenta del siglo pasado se describieron nuevos patógenos genitales como herpes, *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*, cuyas infecciones se denominaron ITS de segunda generación. En la actualidad se considera que las infecciones víricas, como las producidas por el virus de las hepatitis B y C, el VIH y el virus del papiloma humano (VPH) han reemplazado a las enfermedades de transmisión sexual bacterianas clásicas en importancia y frecuencia, considerándose las de tercera generación.

De estas últimas, la que tiene una historia más curiosa es el sida. Fue en junio de 1981 cuando se comunicó, en una revista científica, el primer caso de neumonía por *Pneumocystis carinii* en un paciente homosexual. Este microorganismo era hasta entonces muy poco frecuente salvo en sujetos con gran inmunodepresión. Casi simultáneamente se publicaron varios casos de sarcoma de Kaposi en pacientes jóvenes. Ambas eran enfermedades raras que aparecían sólo en sujetos inmunodeprimidos. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), es un *Lentivirus*, perteneciente a la familia de los retrovirus que se aisló por primera vez en el Instituto Pasteur de Paris en 1983. Se han identificado dos tipos de VIH, el 1 y el 2, aunque el primero es el causante de la mayoría de los casos de la actual pandemia de sida.

Se podrían definir las ITS como un conjunto de infecciones agrupadas por tener en común la misma vía de transmisión independientemente de cuál sea su etiología. Éstas responden a su vez, a diferentes agentes microbiológicos con diversidad de síntomas y signos clínicos. A su vez, muchos de estos microorganismos comparten también otras vías de transmisión diferentes. Así pues, con esta amplia definición podemos estar hablando del orden de unas 30 enfermedades capaces de cumplir estos criterios.

Todas tienen una trascendencia doble, por un lado afectan al individuo adulto produciendo en él una enfermedad con alta morbi-mortalidad, pero por otro lado tienen la capacidad de perpetuarse y de mantenerse en la sociedad.

## 1.2 SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL.

En la actualidad las ITS constituyen una de las causas más importantes de morbilidad en el hombre, siendo el grupo de los adultos jóvenes el más susceptible por los cambios que han sufrido sus comportamientos sexuales en los últimos años. Es por tanto, un problema de salud pública de mayor importancia encontrar métodos diagnósticos más versátiles y aplicables para realizar el correcto estudio de las infecciones de transmisión sexual y esta detección se ha convertido en uno de los aspectos a desarrollar para *el Millennium Development Goals (MDGs) for child health, maternal health and HIV* liderado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) desde el año 2000. El control que se pretende realizar en este campo ya ha dado sus frutos en algunos países como Cuba, Sri Lanka y Tailandia (5)

Las tasas de incidencia de las ITS siguen siendo altas en la mayor parte del mundo, con áreas de mayor incidencia como en el caso de la infección por VIH en el continente africano (Figura 1) a pesar de los avances de diagnóstico y terapéuticos que pueden rápidamente hacer que los pacientes con ITS no se vuelvan contagiosos y se curen para aquellas enfermedades de las que disponemos de tratamientos. En muchas culturas, las costumbres sexuales cambiantes y el uso del anticonceptivo oral han eliminado las restricciones sexuales tradicionales, especialmente para las mujeres y, sin embargo, tanto los profesionales de la salud como los pacientes tienen dificultades para tratar abierta y sinceramente los problemas sexuales.

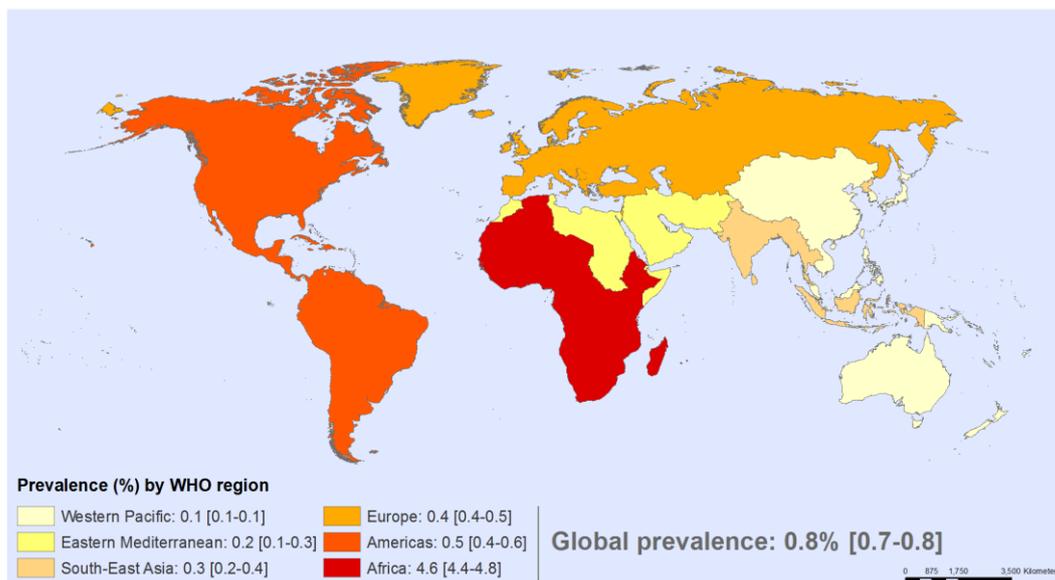


Figura 1. Prevalencia de infecciones por VIH en adultos entre 15-49 años 2011. Fuente OMS.

La levedad o prácticamente nulidad de los síntomas ayuda a la propagación de estas infecciones, puesto que la persona infectada no tiene, con frecuencia, conciencia de su enfermedad.

La incidencia de casos de gonorrea y sífilis ha comenzado de nuevo a aumentar en muchos países después de casi una década de tasas decrecientes. La mayoría de los países presentan un aumento en las tasas de incidencia, sobre todo entre los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), donde la información y los factores de riesgo son conocidos. Pero, independientemente de esto, cualquier individuo sexualmente activo está en riesgo de sufrir una infección por gonococo y este riesgo se incrementa a medida que aumentan el número de parejas sexuales y el número de otras ITS. De hecho esta premisa, se puede hacer extensible a todas las ITS.

Los datos de sífilis muestran un aumento progresivo y continuo a partir del año 2003 hasta alcanzar una tasa de 7,89 por 100.000 habitantes en 2012. Asimismo, desde el año 2004 las tasas de sífilis superan a las de infección por gonococo (6), a pesar de que la Organización mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2008 se dieron 106 millones de nuevos casos de infección gonocócica en adultos en todo el mundo (7). Comparando los datos de España con las tasas encontradas a nivel mundial, la tendencia parece que se confirma. La sífilis es un problema de salud pública a nivel mundial, no sólo por la morbilidad que tiene lugar en el hombre enfermo, sino también por las consecuencias que puede tener a nivel de mortalidad fetal y morbi-mortalidad infantil en países en vías de desarrollo. Los datos emitidos por el *European Centre for the Diseases Control and Prevention* (ECDC) estratifican la sífilis como una enfermedad que se da más frecuentemente en HSH, en mujeres trabajadoras del sexo y usuarios a drogas por vía parenteral (UDVP) (8). Asimismo se observa como los casos notificados han ascendido en el territorio europeo (Figura 2).

En España los datos que se obtienen del Instituto nacional de estadística (INE), hacen referencia tan sólo a las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) como la sífilis y las infecciones por gonococo, no obstante, la tendencia al alza en los últimos años también se pone en evidencia, de hecho desde el año 2004 las tasas de sífilis superan a las de gonococia (Figura 3) (6)

En 2007, 253.386 casos confirmados de infección por clamidia fueron reportados por 22 países europeos, con una tasa global de 122,6 por 100.000 habitantes. La verdadera incidencia de infecciones por clamidia probablemente sea más alta que estas tasas reportadas. *C. trachomatis* afecta principalmente a los jóvenes de entre 15 y 24 años de edad, con una tasa de notificación de 367,5 por 100 000 habitantes (9).

Country	2012				2011		2010		2009	
	National data	Report type	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
Austria	N	C	78	-	72	-	59	-	62	-
Belgium	N	C	776	-	746	-	704	-	699	-
Bulgaria	Y	A	309	4.2	314	4.3	397	5.3	420	5.6
Cyprus	Y	C	6	0.7	16	1.9	20	2.4	15	1.9
Czech Republic	Y	C	325	3.1	372	3.5	462	4.4	697	6.7
Denmark	Y	C	343	6.1	427	7.7	413	7.5	255	4.6
Estonia	Y	C	40	3	66	4.9	69	5.2	57	4.3
Finland	Y	C	203	3.8	176	3.3	200	3.7	194	3.6
France	N	C	857	-	782	-	657	-	540	-
Germany	Y	C	4 406	5.4	3 692	4.5	3 029	3.7	2 738	3.3
Greece	N	A	363	-	272	-	241	-	259	-
Hungary	N	A	621	-	565	-	504	-	489	-
Ireland	Y	C	99	2.2	148	3.2	115	2.6	106	2.4
Italy	Y	C	596	1	898	1.5	1 060	1.8	1 074	1.8
Latvia	Y	C	146	7.1	143	6.9	122	5.8	175	8.1
Lithuania	Y	C	227	7.6	273	8.9	345	11	326	10.2
Luxembourg	Y	C	19	3.6	28	5.5	13	2.6	13	2.6
Malta	Y	C	35	8.4	45	10.8	25	6	16	3.9
Netherlands	N	C	649	-	545	-	695	-	711	-
Poland	Y	A	961	2.5	941	2.4	914	2.4	1 255	3.3
Portugal	Y	C	267	2.5	159	1.5	179	1.7	150	1.4
Romania	Y	C	1 707	8.5	2 348	11.8	1 809	9	3 252	16.1
Slovakia	Y	C	407	7.5	416	7.7	328	6.1	301	5.6
Slovenia	Y	C	63	3.1	79	3.9	40	2	47	2.3
Spain	Y	A	3 638	7.8	3 522	7.5	3 187	6.9	2 496	5.4
Sweden	Y	C	197	2.1	206	2.2	198	2.1	182	2
United Kingdom	Y	A	3 316	5.3	3 252	5.2	2 930	4.7	3 192	5.2
<b>EU Total</b>	-	-	<b>20 654</b>	<b>4.6</b>	<b>20 503</b>	<b>4.6</b>	<b>18 715</b>	<b>4.2</b>	<b>19 721</b>	<b>4.5</b>
Iceland	Y	C	5	1.6	2	0.6	5	1.6	0	0
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norway	Y	C	110	2.2	130	2.6	118	2.4	76	1.6
<b>EU/ EEA Total</b>	-	-	<b>20 769</b>	<b>4.5</b>	<b>20 635</b>	<b>4.6</b>	<b>18 838</b>	<b>4.2</b>	<b>19 797</b>	<b>4.5</b>

Source: Country reports; Y: Yes; N: No; A: Aggregated data report; C: Case-based data report; -: No report; U: Unsp. Note: Rates are calculated only for countries with comprehensive surveillance. Data is presented by 'date of diagnosis' available by 'date used for statistics'. Case numbers might differ from those reported in national bulletins due to different variables.

Figura 2. Número de casos de sífilis en Europa 2009-2012. Fuente: ECDC

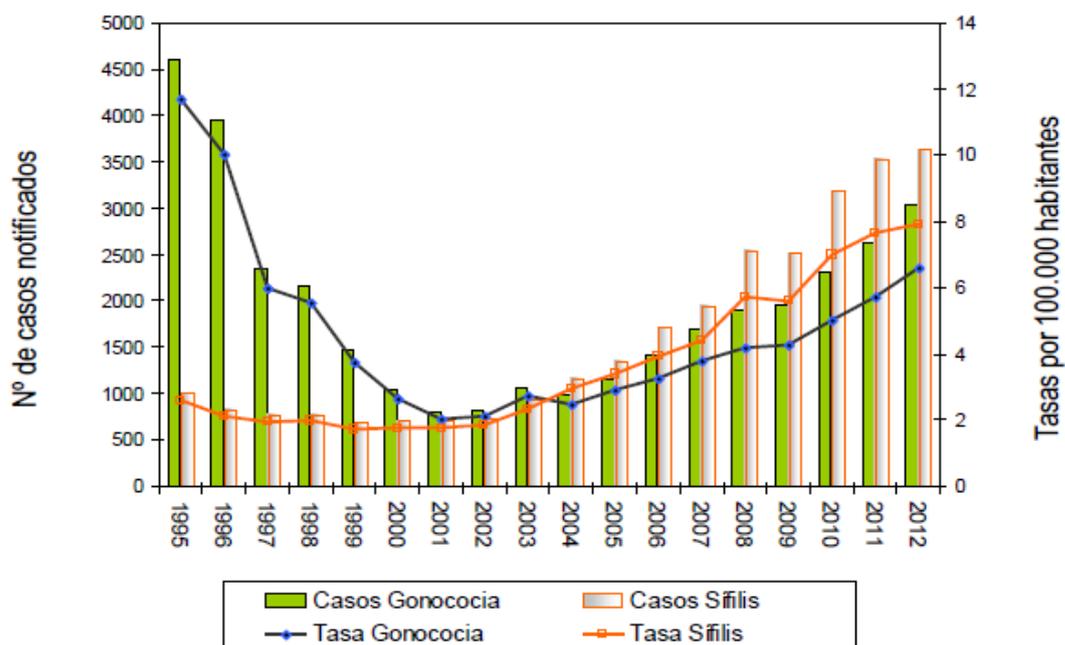


Figura 3. Incidencia de infecciones sífilis y gonococo. Años 1995-2012. Fuente: RENAVE

En julio de 2013 el Consejo Interterritorial aprobó los nuevos protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), sumando a las ya estipuladas (sífilis, sífilis congénita, infección gonocócica e infección por VIH), la infección por *C. trachomatis* y el linfogranuloma venéreo (LGV). Una nueva orden ministerial publicada en el Boletín Oficial del Estado (BOE) en marzo del 2005 especifica las nuevas EDO. La presente orden tiene por objeto modificar la lista de enfermedades de declaración obligatoria, sus modalidades de declaración y las enfermedades de ámbito regional.

Este documento pretende adaptar nuestro sistema de vigilancia a las nuevas definiciones de caso para la notificación de enfermedades transmisibles en la Unión Europea (10), así como a los conocimientos y situación epidemiológica actual de las enfermedades que son objeto de vigilancia. De esta forma los datos obtenidos a partir de la fecha de la infección por *C. trachomatis* podrán ser comparables a los de otros países miembros de la UE y así evitar la subnotificación de los casos.

*C. trachomatis* sigue siendo una de las ITS más frecuentemente reportada y parece que a diferencia de las edades reportadas en Europa, en España las edades en las que más frecuentemente se ha reportado infecciones genitales por clamidia fueron las comprendidas entre 25 a 34 años. Figura 4.

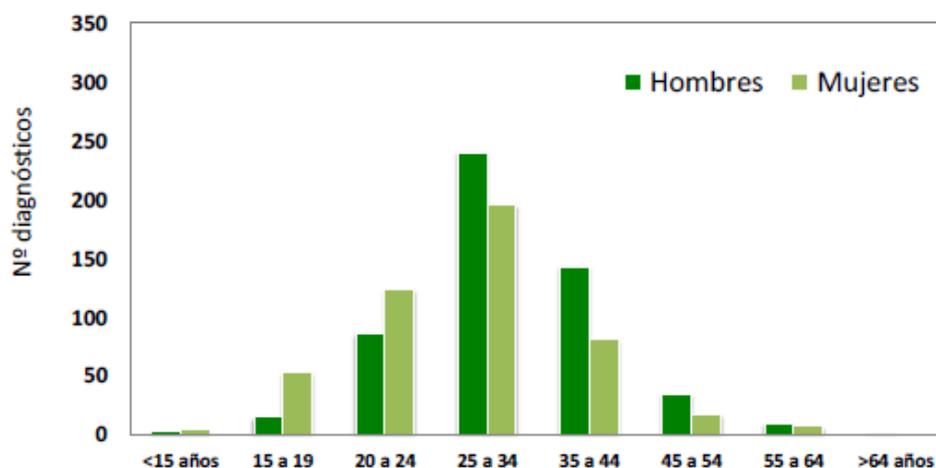


Figura 4. Distribución de los diagnósticos de *C. trachomatis* según edad y sexo. Año 2012. Fuente: RENAVE

En Cataluña, la infección genital por *C. trachomatis* es de declaración obligatoria numérica (MDO). En el año 2013 se notificaron un total de 804 casos, lo que representa una tasa de 11,1 casos por 100.000 habitantes (11). Una tasa sensiblemente inferior a la de la totalidad europea, pero al igual que pasa con la sífilis y la infección gonocócica, con una tendencia al alza. (Figura 5)

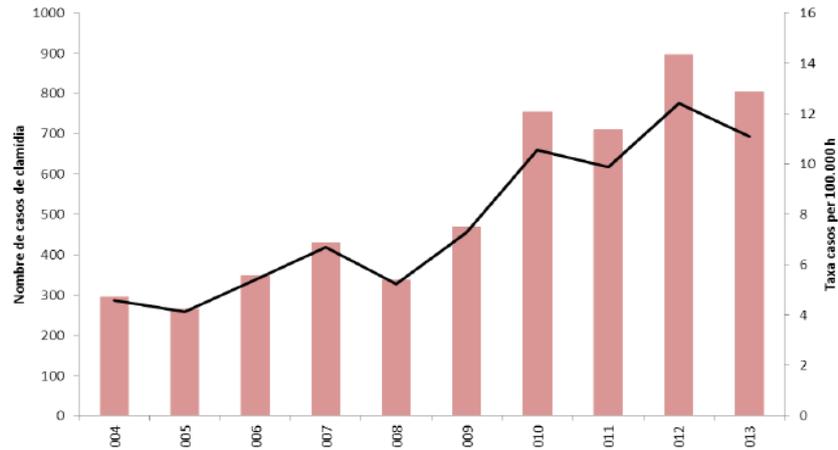


Figura 5. Evolución de los casos de infección genital por Clamidia. Registro MDO numérica en Cataluña 2004-2013. Fuente: CEEISCAT

Otras ITS presentan datos menos uniformes por el tipo de registro que se realiza en los diferentes lugares. Los registros obtenidos en toda España mediante el Sistema de Información Microbiológica (SIM) permiten conocer las tasas en todo el territorio. En el 2012 se notificaron 535 casos de herpes genital incluyendo tanto los el tipo 1 como el tipo 2 o aquellos en los que no se incluía esta información (6).

En el informe de la Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual 1995-2012, aparece un gráfico que puede resumir perfectamente todos los datos que hemos relatado. (Figura 6)

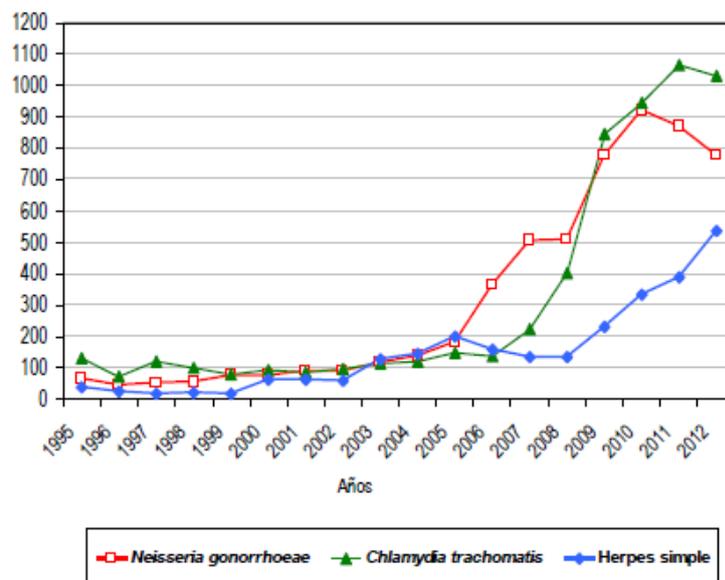


Figura 6. Diagnósticos microbiológicos de ITS. España 1995-2012. Fuente: RENAVE

Concretamente en Cataluña, tanto la infección por *T. vaginalis* como por el virus herpes simple (VHS), son EDO, y se notifican por el Sistema de Notificación Microbiológica de Catalunya (SNMC). En el año 2013 se declararon 846 casos de tricomoniasis, lo que representa una tasa

de 11,7 casos por 100.000 habitantes y 2670 casos de herpes genital, con una tasa de de 36,8 casos por 100.000 habitantes (11).

Las tasas varían ampliamente en toda la UE, lo que refleja no sólo la proyección existente en algunos países de esta enfermedad sino también la diferencia en los métodos diagnósticos que se aplican en los países de la unión europea, así como la diversidad en los sistemas sanitarios y de información.

Los datos que podemos obtener de la prevalencia de VIH en la población son objeto de múltiples estudios. La infección por el VIH sigue siendo un problema de salud pública de mayor importancia en los países europeos, caracterizado por el aumento continuo de casos detectados. En contraste, el número total de casos de sida diagnosticados sigue disminuyendo, por ejemplo, en 2010, 27116 nuevos casos de infección por el VIH se informaron en 28 estados miembros de la UE, lo cual corresponde a un tasas de 5.7/100000 habitantes. Este número es probable que aumente debido a la demora en el diagnóstico de esta infección. En cuanto a las poblaciones afectadas, el colectivo de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) es el que presenta mayor número total de casos (38%), seguido por los individuos infectados por contacto por contacto heterosexual (24%) y usuarios a drogas por vía parenteral (UDVP) (4%). Las tasas reportadas en Europa parecen mantenerse estables desde el año 2004 (6.5/100000 habitantes) al 2010 (5.7/100000 habitantes) (12).

En España, se notificaron 3.210 nuevos diagnósticos de VIH en el año 2012, lo que supone una tasa de 8,5/100.000 habitantes. Figura 7

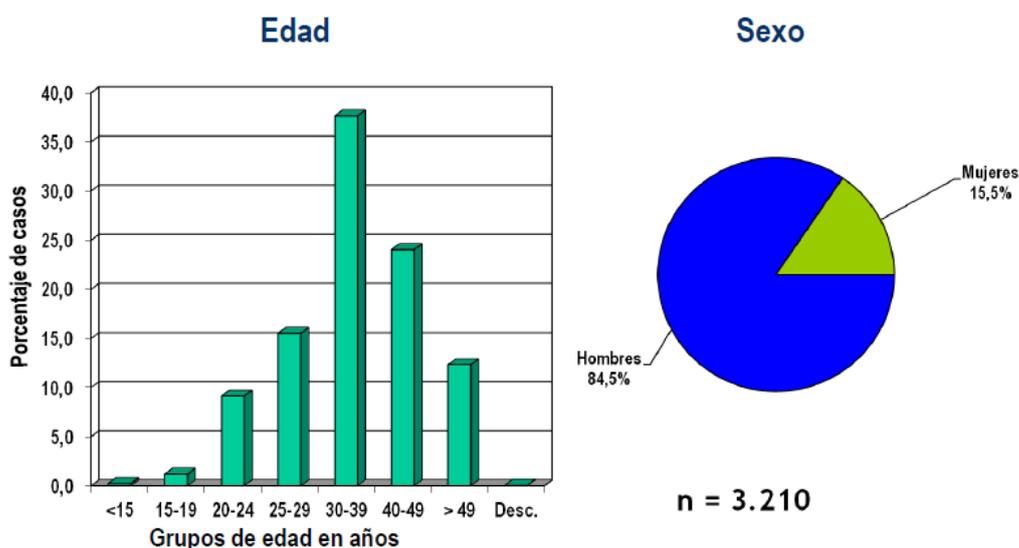


Figura 7. Nuevos diagnósticos de VIH en España 2012. Distribución por edad y sexo. Fuente: Plan Nacional sobre el SIDA

La tasa es parecida a la que se observa en el resto de Europa así como las poblaciones en las se notifican un mayor número de nuevos casos. Los HSH es el grupo en el que la transmisión fue más frecuente (51%), seguida de la transmisión heterosexual (31%), y la que se produce entre

UDVP (5%). El 48% del global de los nuevos diagnósticos presentaron diagnóstico tardío, definido éste como la cifra de linfocitos CD4 inferior a 350 células/ $\mu$ l en la primera determinación que se realiza tras el diagnóstico (13). Este hecho supone una capacidad de transmisión del virus más alta debido al desconocimiento de la enfermedad y el desconocimiento de cuándo se pudo producir el contagio.

Adicionalmente a este considerable aumento de las diferentes y más importantes enfermedades de transmisión sexual, está la emergencia actual de bacterias resistentes a los antibióticos usados como es el caso del gonococo. Ya pocos aislamientos son sensibles a penicilina y en Cataluña se observa un alto número de cepas resistentes a las fluoroquinolonas. La aparición de estas cepas es un problema a nivel mundial (14) y refleja tanto el uso erróneo de antibióticos como la capacidad de la bacteria de desarrollar mecanismos de resistencia.

### 1.3 PRINCIPALES SÍNDROMES CLÍNICOS ASOCIADOS A LAS ITS

#### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)/ SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

Fue a finales de los años setenta cuando la comunidad científica comenzó a encontrar que en determinados tipos de pacientes aparentemente sanos, sufrían infecciones poco frecuentes y consideradas oportunistas. Estas infecciones evolucionaban de una forma tórpida, causando la muerte incluso en aquellos individuos con tratamientos antimicrobianos adecuados. A partir de ahí, se definió una enfermedad denominada Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (sida).

Una cosa que parecía tener en común este síndrome era el tipo de pacientes a los que afectaba. En un primer momento, los casos descritos tenían lugar en hombres jóvenes homosexuales, haitianos, heroinómanos y hemofílicos (el llamado grupo de las 4 H) (15). Con el tiempo se asoció con un virus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La infección por VIH es una zoonosis. Los primeros casos conocidos son de 1959 y 1960, pero la epidemia tuvo lugar a partir de 1978. La expansión de la epidemia se debió a los movimientos migratorios del hombre por temas de guerras y hambre. En la zona de Congo y Nueva Guinea se pueden encontrar todos los subtipos de VIH-1. La infección humana por VIH tiene su origen en retrovirus que infectan a los primates. El salto entre especies se dio en África occidental a principios del siglo XX. Del SIV del chimpancé derivó el VIH-1 y del SIV del Sooty mangabey el VIH-2.

La enfermedad por el VIH puede ir desde una infección asintomática hasta una inmunodepresión profunda y severa con múltiples infecciones oportunistas. Desde la entrada del virus en el organismo hasta el comienzo de los primeros síntomas pueden pasar meses e incluso años. Su célula diana son los linfocitos T CD4+, macrófagos y células de la microglía. El virus penetra en ellas mediante un mecanismo secuencial producido por la interacción de diferentes moléculas que se encuentran en la membrana del virus y de la célula diana. Una vez dentro, la integración del virus en la célula del hospedador tiene lugar para así, producirse la retrotranscripción y posterior replicación del virus en la célula. Éste puede permanecer latente o por el contrario experimentar una replicación masiva. En cualquiera de los casos la traducción clínica es siempre la misma, la destrucción de los linfocitos CD4+. El tiempo que transcurre tiene su traducción clínica por la aparición más temprana o tardía de los síntomas, en cualquier caso, el último paso es la destrucción de los CD4+. Aproximadamente la progresión de la enfermedad oscila entre unos 5 a 10 años, con una mediana de 10 años (16).

La clínica de la infección por el VIH depende del momento de la evolución natural en el que se encuentre el individuo infectado. Lo que está claro es que la mayoría de los infectados acaban presentado síntomas y la inmensa mayoría finaliza en enfermedad si no se instaura el tratamiento adecuado. Las manifestaciones de la infección por el VIH son variadas y pueden estar producidas bien por la propia acción del virus o bien por las infecciones oportunistas y tumores relacionados con la progresión de la inmunodepresión. En la evolución natural de la enfermedad, cabe distinguir pues, diferentes estadios de una misma infección:

1. **FASE INICIAL O DE PRIMOINFECCIÓN:** ésta se define como el periodo transcurrido entre la infección inicial hasta la seroconversión. En muchas ocasiones esta infección es asintomática aunque en un alto porcentaje, entre un 50-70%, puede aparecer un síndrome mononucleósico con rash acompañante e incluso con baja frecuencia cuadros tipo encefalitis o meningitis aséptica con presencia o no de rash cutáneo. Se caracteriza por la aparición de fiebre, adenopatías, faringitis, exantema, artralgias, diarrea, cefalea, etc. Analíticamente puede aparecer trombopenia, leucopenia y linfopenia transitoria a expensas de una disminución de los linfocitos CD4+ y CD8+ y un patrón de citolisis hepática. La clínica aparece entre las 2 a 4 semanas postinfección, aunque el exantema puede aparecer 3 meses después. Analíticamente esta fase se caracteriza por la presencia en plasma de una elevada viremia pero no se detectan anticuerpos específicos frente al VIH. Éste es el denominado “periodo ventana”.
2. **FASE INTERMEDIA O CRÓNICA O ASINTOMÁTICA:** fase de varios años de evolución con replicación viral activa en los ganglios linfáticos, cargas virales en plasma en valores intermedios o altos en función del paciente aunque generalmente estable y anticuerpos

detectables. La baja viremia en plasma es un marcador de buena evolución y pronóstico de la enfermedad. En esta fase pueden aparecer algunas entidades clínicas como la linfadenopatía persistente generalizada o ausencia de manifestaciones clínicas.

- 3. FASE FINAL O FASE DE ENFERMEDAD:** en la que la viremia asciende a valores elevados y hay un descenso en los niveles de CD4+ por debajo de 200 células/  $\mu\text{L}$ . El inicio de los síntomas se relaciona con la caída de los CD4 por debajo de 450/ $\mu\text{L}$ . En este momento empezaría a aparecer infecciones oportunistas como neumonías por *P. jiroveci*, infecciones por candidas en forma de candidiasis oral o vaginales de repetición, etc (Figura 8). Si los niveles de CD4 bajan drásticamente ( $<50/\mu\text{L}$ ) pueden aparecer síntomas producidos por el propio virus como el síndrome caquético por VIH caracterizado por un adelgazamiento extremo y diarrea de más de 1 mes de duración. Ésta es la fase que se denomina sida según los criterios revisitados por los Centre for the Diseases Control and Prevention (CDC) en el 2008 (17). Generalmente en este paciente aparecen entidades clínicas indicadoras de sida.

La combinación de los criterios clínicos y los analíticos, tales como el recuento de linfocitos CD4+ permite realizar la clasificación de la infección por el VIH y/o definir el estadio de SIDA en categorías clínicas. Figura 9

**Categoría clínica A:** asintomáticos con/sin linfadenopatía generalizada persistente.

**Categoría B:** (procesos no incluidos en la siguiente categoría C): angiomatosis bacilar, candidiasis oral recidivante (muguet), candidiasis vulvovaginal persistente con pobre respuesta a tratamientos, displasia cervical leve-moderada o carcinoma "in situ", fiebre o diarrea inexplicada de  $> 1$  mes evolución, leucoplasia vellosa oral, herpes zoster ( $> 1$  episodio o afectación extensa  $> 1$  dermatomo), púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), listeriosis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) (especialmente con absceso tuboovárico), neuropatía periférica.

**Categoría C** (complicaciones definatorias de SIDA): aparición de alguna de las enfermedades presentes en la Figura 8.

Pero a efectos prácticos, parece más lógico establecer el riesgo de cada infección en función únicamente del número de linfocitos CD4+, ya que ayuda a plantear estrategias diagnósticas y preventivas.

	Situación clínica	Características
<b>1. Hongos</b>	Candidiasis	Esófago, tráquea y pulmones
	Micosis endémicas (histoplasmosis, coccidiomicosis)	Diseminada
	Criptococosis	Extrapulmonar
	Infección por <i>P. jiroveci</i>	Neumonía
<b>2. Parásitos</b>	Infecciones por coccidios (Isosporidiasis, criptosporidiasis)	Diarrea más de un mes de duración
	Toxoplasmosis	Cerebral
<b>3. Bacterias</b>	Complejo <i>Mycobacterium avium intracellulare</i> u otras micobacterias atípicas	Diseminada
	Tuberculosis	Diseminada o extrapulmonar
	Infecciones piógenas	Múltiples o recurrentes
	<i>Salmonella</i> entérica (diferentes a la fiebre tifoidea)	Sepsis recurrente
<b>4. Virus</b>	Infección por herpes virus (VHS, CMV)	Persistente o diseminada
	Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva	
<b>5. Neoplasias</b>	Leucoplaquia vellosa por el virus Epstein-Barr	
	Sarcoma de Kaposi	
	Linfoma cerebral primario y otros linfomas no Hodgkin	
<b>6. Otras</b>	Infección por el propio VIH	Síndrome caquético y encefalopatía
	Neumonía intersticial linfoide	

Figura 8. Enfermedades indicadoras de SIDA. Modificado de Murray PR. Microbiología médica. 6ª Ed. Madrid 2009

Cifra de linfocitos CD4+	Categoría clínica ABC
1. >500/mm <sup>3</sup> (>29 por ciento)	A1 B1 C1
2. 200-499/mm <sup>3</sup> (14-28 por ciento)	A2 B2 C2
3. <199/mm <sup>3</sup> (<14 por ciento) (SIDA)***	A3 (**) B3 (**) C3

Figura 9. Categorías clínicas de la infección por El VIH.

\*Categorías clínicas, incorporadas a la nueva definición de SIDA en 1993, y aceptadas por la OMS para Europa.

\*\*Categorías analíticas, incorporadas a la nueva definición de SIDA en 1993 (EE.UU.), y no aceptadas por la OMS para Europa, hasta la fecha. \*\*\*La presencia de una enfermedad definitoria de SIDA prevalece sobre el recuento de

CD4+ y obliga a clasificar al paciente en estadio 3

La terapia antirretroviral ha conseguido enormes beneficios en la reducción de la morbimortalidad y la transmisión de la infección por el VIH. Desde que se iniciaron los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA), el sida ha dejado de ser una infección mortal a corto-medio plazo para devenir una enfermedad crónica que requiere de un tratamiento crónico durante toda la vida. El manejo de estos fármacos ha supuesto un importante avance en la realidad del sida tal. Además, el manejo de estos tratamientos ha adquirido gran complejidad con la aparición de distintas familias farmacológicas y de múltiples facetas en cuanto a la eficacia, la toxicidad, las resistencias, el tropismo, las interacciones entre fármacos, el uso de los mismos en situaciones especiales e incluso como prevención de la transmisión del virus. Además de los aspectos médico-clínicos, no podemos ignorar el aspecto económico de la situación. El elevado coste de los fármacos antirretrovirales, en tratamientos de por vida, constituyen un considerable importe en el total del gasto sanitario. De ahí la necesidad de seguir trabajando para conseguir una vacuna preventiva frente a este virus.

### SÍFILIS

La sífilis es una enfermedad sistémica compleja con manifestaciones clínicas diversas, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum*. Ha sido considerada en la historia de la Medicina como "la gran imitadora o gran impostora". Aunque no es propiamente una enfermedad oportunista, al igual que el VIH se transmite de forma predominante por vía sexual. La evolución clínica de la sífilis se divide en tres fases.

- 1. FASE INICIAL O SÍFILIS PRIMARIA:** Tras 10-90 días postexposición, aparece en el lugar de la inoculación una pápula que rápidamente se erosiona dando lugar al chancro. Esta lesión se caracteriza por ser de base limpia e indurada, no exudativa y poco dolorosa. Generalmente aparece como lesión única aunque en pacientes inmunodeprimidos pueden aparecer múltiples chancros. Estas lesiones se consideran una fuente importante de treponemas, y a partir de ellas se puede demostrar fácilmente su presencia. Los genitales externos son los lugares más frecuentes donde aparece el chancro (habitualmente en el surco balanoprepucial), pero no los únicos ya que se han visto también en cuello uterino, boca, región anal etc... En la mujer el chancro luético puede pasar desapercibido, ya que no es accesible a la vista. Acompañando al chancro hay una linfadenopatía regional no supurativa e indolora. El chancro desaparece espontáneamente a lo largo de los 2 meses posteriores sin dejar lesión residual. Las espiroquetas pueden ser identificadas mediante técnicas microbiológicas directas (campo oscuro o inmunofluorescencia). También puede efectuarse el diagnóstico mediante técnicas indirectas (serología) pero, generalmente, los

anticuerpos aparecen entre 1 y 4 semanas después de la formación del chancro. Actualmente es posible detectar la presencia del treponema en el exudado del chancro mediante técnicas de PCR en tiempo real. Esta úlcera desaparece tras unas 3 a 6 semanas para luego desaparecer sin lesión residual.

- 2. SÍFILIS SECUNDARIA:** Representa la fase más florida de la infección. Comienza entre 2 y 8 semanas después de la aparición del chancro (máximo 6 meses), aunque pueden coexistir. Los treponemas invaden todos los órganos y la mayoría de los líquidos orgánicos gracias a una diseminación hematogena. Las manifestaciones son muy variadas y capaces de simular muchas patologías. Puede debutar como un cuadro pseudogripal con febrícula, cefalea, malestar general y artromialgias y linfadenopatías generalizadas (la adenopatía epitroclear es patognomónica). Posteriormente, el paciente presenta una erupción cutánea generalizada, maculopapular de color rojo-cobrizo, no pruriginosa, con predominio de lesiones en áreas periorificiales, palmas y plantas y afectación de mucosas aunque puede afectar a cualquier parte del cuerpo. La localización en palmas y plantas sugiere el diagnóstico. En las áreas intertriginosas y en las mucosas, las pápulas se agrandan y erosionan produciendo placas denominadas condilomas planos o condilomas latos. En la mucosa oral se aprecian áreas de lengua depapilada. Las lesiones de las mucosas son altamente contagiosas por contener un elevado número de treponemas y por la existencia de una solución de continuidad. En esta fase, cualquier órgano puede estar afectado: SNC, riñón, hígado, alteraciones gastrointestinales, sinovitis, osteitis, etc...
- Esta forma también se autoresuelve en unas semanas, el exantema cura espontáneamente, y el paciente pasa a la fase de latencia. Las pruebas serológicas son la base del diagnóstico en esta fase. En ella obtendremos positividad tanto en las pruebas treponémicas como en las no treponémicas.

Afectación del SNC: La invasión del LCR por el *T. pallidum* junto con alteraciones bioquímicas es común en adultos con sífilis primaria o secundaria sobre en pacientes VIH positivos. Sin embargo, a menos que los signos clínicos, síntomas neurológicos, afectación oftálmica estén presentes o pacientes cuyos títulos serológicos no disminuyan a pesar del tratamiento correcto y descartada una reinfección, el análisis rutinario del LCR no se recomienda en pacientes en estos estadios. (18)

- 3. SÍFILIS LATENTE:** etapa que correspondería a los períodos asintomáticos de la enfermedad aunque esto no es sinónimo de ausencia de enfermedad. La infección sigue progresando. En esta fase las pruebas antitreponémicas específicas son positivas. La sífilis latente tardía es una enfermedad inflamatoria en la que cualquier órgano puede estar afectado. Esta fase suele ser referida como neurosífilis, aunque no sólo el Sistema Nervioso Central (SNC)

puede verse implicado porque también puede tener lugar una afectación cardiovascular (sífilis cardiovascular) o gomas (infiltrados de monocitos con destrucción tisular). La neurosífilis no es exclusiva de la sífilis latente (19) ya que las espiroquetas son capaces de introducirse en el SNC en cualquiera de las fases de la enfermedad, aunque generalmente tiene lugar tras la sífilis latente precoz. Esta fase se divide en sífilis latente precoz (la que corresponde al primer año desde la infección) y tardía (más de un año de infección o de duración indeterminada) (20).

- a. Neurosífilis: Se podría definir como la afectación del SNC por el *T. pallidum* en cualquier estadio evolutivo de la enfermedad (19). Es un conjunto de alteraciones meningovasculares que tienen lugar en el parénquima del SNC. Patogénicamente, la neurosífilis se debe al desarrollo de una endoarteritis obliterante que afecta a los vasos sanguíneos de las meninges, cerebro, cordones espinales, etc...que dará lugar a múltiples infartos y se caracteriza por meningitis, pérdida de la agudeza visual y auditiva, parálisis general progresiva (PGP), la tabes dorsal y manifestaciones psiquiátricas. El diagnóstico diferencial de neurosífilis se realiza con otras enfermedades del SNC como la tuberculosis con afectación del SNC, infecciones fúngicas, LOES (lesiones ocupantes de espacio), hematoma subdural, alcoholismo crónico, etc. La variedad es amplia, por lo que su diagnóstico no es fácil, aunque la demostración de anticuerpos específicos treponémicos en el LCR ayuda al diagnóstico. En ocasiones, puede que no haya clínica pero en cambio sí puede haber alteraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR), como pleocitosis, aumento de las proteínas y disminución de la glucosa. En los últimos años el panorama clínico de la neurosífilis ha cambiado sustancialmente y las características clásicas ya no son tan frecuentes. Los CDC hacen hincapié en que cada vez más casos de neurosífilis pueden manifestarse como meningitis, accidentes isquémicos cerebrovasculares, especialmente en personas menores de 40 años de edad, demencia rápidamente progresiva, especialmente en pacientes jóvenes, pacientes con problemas propiocepción, y alteraciones de audición y de la vista como uveítis o pérdida repentina de la audición (18).
- b. La sífilis cardiovascular: La lesión patológica subyacente es la endoarteritis obliterante que afecta la *vasa vasorum* de la aorta y que provocará una necrosis de la capa media con destrucción del tejido elástico y la consiguiente aortitis con aneurisma sacular. Hay una predilección por la aorta ascendente que lleva consigo la debilidad del anillo valvular aórtico. Gracias a los tratamientos y las

herramientas diagnósticas, la sífilis cardiovascular es, en la actualidad, una curiosidad.

- c. La goma sifilítico: Debido a la una lesión granulomatosa inespecífica de la sífilis terciaria o tardía que se presenta como nódulos o úlceras indoloras en cualquier órgano siendo más frecuente en huesos, piel y mucosas. En ella tiene lugar una destrucción local, siendo muy difícil observar espiroquetas en las preparaciones obtenidas de estas lesiones.

Aproximadamente un tercio de los pacientes no tratados evolucionan a sífilis latente.

Sin tener cabida en esta evolución en fases de la enfermedad, tendría una mención especial la sífilis congénita. La infección en el feto puede tener lugar en cualquier mujer embarazada con sífilis no tratada, aunque es más frecuente en los estadios precoces de la infección. La gravedad clínica va desde el aborto tardío al parto pretérmino, muerte neonatal, infección neonatal e infección latente. En general, la sífilis congénita se clasifica en: temprana o tardía. La temprana, se observa antes del segundo año de vida y puede ser fulminante. Puede manifestarse como una infección diseminada, o como coriza, lesiones cutáneomucosas, osteocondritis, anemia, hepatoesplenomegalia y afectación del SNC. La forma tardía se define como aquella en la que aparecen síntomas después de los 2 años de vida del niño. Puede originar queratitis intersticial, deformaciones óseas y dentales (dientes de Hutchinson), sordera del VIII par craneal, neurosífilis y otras manifestaciones de un terciarismo. Las manifestaciones clínicas son muy variables, siendo las más características la rinitis serohemorrágica, seguida del exantema maculopapular descamativo. También puede aparecer osteocondritis y pericondritis, hepatopatía, anemia, neumonía grave o hemorragia pulmonar, glomerulonefritis, etc... Es bastante frecuente el desarrollo de una queratitis intersticial en el contexto de una sífilis latente, que aparece a los 6-12 meses de nacer si no ha existido tratamiento.

### URETRITIS Y EPIDIDIMITIS

La uretritis afecta fundamentalmente al varón y se caracteriza por presencia de secreción uretral mucoide o mucopurulenta, disuria y prurito o eritema en el meato uretral, aunque en algunos casos puede ser asintomática. Se definen dos tipos de uretritis atendiendo a su etiología: uretritis gonocócicas y uretritis no gonocócicas (UNG) producidas por *C. trachomatis* y *M. genitalium* e incluso otras etiologías menos frecuentes como adenovirus y virus herpes simplex (21). También *U. urealyticum*, *U. parvum* y *M. hominis* han sido implicados como agentes etiológicos, aunque su papel está aún en discusión (22), si bien también se ha descrito que *M.genitalium*, *U.urealyticum*, *T.vaginalis* y adenovirus pueden asociarse con uretritis

persistentes y recurrentes (23,24). Aunque en ocasiones podemos detectar infecciones mixtas que gracias a las nuevas técnicas diagnósticas, las asociaciones que se observan son cada vez más variadas.

En la mujer la uretritis no presenta las mismas manifestaciones clínicas que en el varón y por lo tanto los microorganismos antes mencionados, suelen encontrarse produciendo patologías tales como cervicitis o vaginitis. No obstante, se ha descrito el síndrome uretral agudo como una manifestación similar a la uretritis en la mujer. Este síndrome se caracteriza por la presencia de disuria, con o sin polaquiuria y con piuria en el estudio de los elementos formes de la orina, pero con cultivos negativos en una mujer sexualmente activa (25).

El reconocimiento de estas entidades es importante ya que pueden dar lugar a complicaciones como:

- Epididimitis/orquiepididimitis en varones. En los hombres sexualmente activos menores de 35 años, *C. trachomatis* o *N. gonorrhoeae* representan la etiología más frecuente. También por vía sexual las enterobacterias pueden causar epididimitis aguda. Por lo general va precedida de una uretritis asintomática. También pueden complicarse con formas de prostatitis e incluso infertilidad. Por ello se recomienda la realización de técnicas de PCR para la detección de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (26)
- Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) en mujeres. *C. trachomatis* causa el 50% de los casos; un 10-20% de gonococias no tratadas pueden producir EIP. También pueden dar lugar cuadros de perihepatitis y periapendicitis.
- Infección gonocócica diseminada y Síndrome de Reiter (tríada de uretritis, artritis reactiva y conjuntivitis o uveítis, con o sin lesiones cutáneo-mucosas) en ambos.

### CERVICITIS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA PÉLVICA (EIP)

La **cervicitis** es una inflamación del cuello uterino, caracterizado por la presencia de un exudado endocervical purulento o mucopurulento localizado en el conducto cervical y/o por la presencia de un sangrado endocervical fácilmente inducido cuando un hisopo pasa a través del orificio cervical. La cervicitis con frecuencia es asintomática, pero algunas mujeres se quejan de un flujo vaginal anormal y sangrado vaginal intermenstrual. Es una enfermedad de etiología multifactorial, que aparece como resultado de una infección polimicrobiana. Los microorganismos implicados son *C. trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, pero también *T.vaginalis*, los VHS tipos 1 y 2, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus* spp, enterobacterias, y en general microorganismos que puede formar parte de la flora vaginal. En muchas ocasiones el agente es desconocido. Entre los patógenos emergentes, destaca sobre todo *M. genitalium*, al que se le ha atribuido un rol patógeno.

La **enfermedad inflamatoria pélvica** (EIP) es un trastorno infeccioso e inflamatorio del tracto genital femenino superior, incluyendo el útero, las trompas de Falopio y estructuras pélvicas adyacentes que se manifiesta en forma de endometritis, salpingitis, abscesos tubo-ováricos y peritonitis pelviana (24). La infección y la inflamación puede extenderse al abdomen, incluyendo estructuras perihepáticas (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis).

Se inicia por una infección que asciende desde la vagina y el cuello del útero hacia el tracto genital superior. *C.trachomatis* es el microorganismo de transmisión sexual predominante, aunque también se han implicado otros como: *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*, *H. influenzae* y bacterias anaerobias (especies de *Peptococcus* y *Bacteroides*). Estudios laparoscópicos han demostrado que en el 30-40% de los casos, la EIP es polimicrobiana.

El diagnóstico de EIP aguda se basa principalmente en los hallazgos clínicos. Las manifestaciones clínicas son variadas; sin embargo, muchas pacientes presentan pocos o ningún síntoma, mientras que otras tienen, enfermedad grave y aguda. El retraso en el diagnóstico y el tratamiento, probablemente contribuye a secuelas inflamatorias en el tracto genital femenino (dolor abdominal crónico, esterilidad, embarazo ectópico, etc...). Los datos indican que el diagnóstico clínico de la EIP sintomática presenta un valor predictivo positivo relativamente bueno (65% -90%) en comparación con la laparoscopia (27). Las características epidemiológicas de la paciente también pueden ayudar a sospecharla.

### **ÚLCERAS GENITALES**

Aunque académicamente se ha intentado realizar un diagnóstico etiológico de las úlceras genitales simplemente por las características clínicas, en la práctica, se suelen presentar en infecciones mixtas o con presentaciones confusas, que no hacen evidente la diferenciación entre unas y otras (Figura 10).

La incidencia de las úlceras genitales varía en los diferentes países del mundo. En los países desarrollados son menos frecuentes que otras ITS como la vaginitis y la uretritis. Hoy en día en nuestro medio, la primera causa de úlcera se debe al VHS. Aún así, no se llega al diagnóstico etiológico en un 21-37% según diversos estudios (28). Están causadas por el **VHS tipo 1 y 2**, con predominancia del tipo 2 en algunas regiones del planeta (29). La clínica se inicia con pródromos de escozor, parestesias o dolor, seguido a las pocas horas de eritema y edema en el área afectada, sobre el que aparecen unas pocas vesículas dispersas o agrupadas en racimo, que recidivan con una periodicidad irregular en la misma localización y son siempre dolorosas.

Sífilis	Herpes genital	Chancroide	LGV	Granuloma inguinal
<i>T.pallidum</i>	Herpes simplex virus	<i>H. ducreyi</i>	<i>C.trachomatis</i> (serotipos LGV)	<i>Klebsiella granulomatis</i>
9-90 días	3-6 días	3-6 días	3-30 días	3 días - 6 meses
Pápula única/múltiple	Vesícula múltiple	Papulopústula única/múltiple	Pápula/pústula única	Pápula única/múltiple
Redonda/ovalada indurada/indolora	Pequeñas/grupos superficiales dolorosas	Irregular blanda,dolorosa	Úlcera superficial	Serpiginosa de bordes elevados
Adenopatías uni/bilaterales indoloras No supurativas	Adenopatías bilaterales dolorosas	Adenopatías uni/bilaterales dolorosas supurativas	Adenopatías variables duras supurativas o no	Adenopatías primarias induradas indoloras

Figura 10. Características clínicas de las úlceras genitales.

Muchas de las personas infectadas pueden sufrir formas leves o asintomáticas pero eliminan el virus de forma intermitente, contagiando a sus parejas. Otro problema de infección herpética radica en la mujer embarazada por el riesgo de transmisión al feto que es elevado, sobre todo en los casos de primoinfección.

El chancro blando o chancroide es una enfermedad producida por *Haemophilus ducreyi*. Su incidencia es mayor en países del Caribe, Sudamérica y África (28). Clínicamente se caracteriza por la aparición de una úlcera única o múltiple, dolorosa, de bordes irregulares y no indurados, en los genitales o en la región perianal en HSH o mujeres que practiquen sexo anal que evoluciona a pústula y posteriormente se ulcera a los 2 días. En ocasiones las úlceras pueden confluir dando grandes úlceras. Asociada a esta lesión puede aparecer una adenopatía inguinal supurativa dolorosa, sobre todo si se ha producido un retraso en el diagnóstico. La base de la lesión está cubierta de un exudado necrótico y purulento con tendencia al sangrado en caso de raspado o roce. La ausencia de un tratamiento adecuado puede conducir a la ruptura espontánea de las adenopatías lo que se conoce como bubón. A pesar de la exactitud en la descripción, el diagnóstico clínico no es evidente y pueden aparecer presentaciones atípicas con riesgo de sobreinfección bacteriana.

En el linfogranuloma venéreo (LGV), están implicadas las *serovars* L1, L2 y L3 de *C. trachomatis*. Aunque antiguamente era excepcional en Europa, en los últimos años su incidencia ha ido en aumento sobre todo en colectivos de HSH (30).

Hay tres etapas distintas en el LGV clásico. La primera comienza con la formación de una lesión primaria, generalmente en la mucosa genital o zonas adyacentes de la piel. La lesión primaria comienza como una pequeña pápula o úlcera herpetiforme paucisintomática que pasa desapercibida y que cura espontáneamente a los 3-30 días post-infección, sin dejar una cicatriz. La infección inicial puede ir acompañada de una uretritis sintomática, cervicitis o proctitis rectal. Tras días o semanas después, aparece una linfadenopatía unilateral que corresponde al territorio donde drena el área implicada de la lesión primaria (generalmente inguinal si la localización de la lesión es a nivel genital o iliaca si es a nivel rectal). Inicialmente, la adenopatía se presenta de forma sutil, blanda al tacto y con eritema, pero a causa de la extensa inflamación que tiene lugar, el proceso se extiende desde los ganglios linfáticos hacia el tejido perilesional, formando un mazacote inflamatorio que se va abcesificando con tendencia a la confluencia, dando lugar a un bubón que puede romperse espontáneamente y desarrollar abscesos loculados o fístulas que drenan al exterior (31). La tercera etapa implica complicaciones severas como la hipertrofia crónica granulomatosa con ulceración de los genitales externos que puede llegar a elefantiasis debido a las obstrucciones linfáticas e infertilidad.

Por último y con menor frecuencia, otra de las ITS que cursa con úlceras sería el granuloma inguinal o Donovanosis producida por la *Klebsiella granulomatis*, antiguamente *Calymatobacterium granulomatis*, patología muy poco frecuente en nuestro medio.

La lesión primaria de donovanosis comienza como una pequeña pápula o nódulo indoloro e indurado que aparece tras un período de incubación de entre 8 y 80 días que se localiza en el 90% de los casos en el área genital (32). La lesión se ulcera para formar una exuberante úlcera rojiza con un aspecto aterciopelado y que sangra fácilmente al contacto. Si hay múltiples lesiones, pueden fusionarse para formar grandes úlceras, así como nuevas lesiones como resultado de una autoinoculación. La enfermedad avanza a nivel subcutáneo destruyendo más tejidos y dejando secuelas como cicatrices y deformidades. El linfedema y la elefantiasis de los genitales externos, pueden ocurrir en casos graves como resultado de la obstrucción de los vasos linfáticos por las cicatrices queloides. Los lugares donde comúnmente aparecen estas lesiones son en los hombres, en el prepucio, en el surco coronal y en el pene y en las mujeres, en los labios mayores y menores. La propagación subcutánea en la región inguinal puede conducir a la formación de pseudobubones, que no son verdaderas adenopatías, sino el reflejo

del la inflamación a nivel local. También se han descrito lesiones rectales sobre todo en HSH, así como orales.

### OTRAS INFECCIONES GENITALES: VAGINITIS Y VAGINOSIS BACTERIANA

El ecosistema vaginal presenta un delicado equilibrio reconocido a partir del estudio publicado por Döderlein en 1892. Diversos factores juegan un papel importante en la protección de la mucosa de potenciales agentes patógenos (33). Entre ellos destaca, por su importancia, la presencia de bacterias del género *Lactobacillus* que juegan un papel muy importante como colonizantes y protectores en la mujer de la proliferación de otros microorganismos.

La alteración del equilibrio da lugar a cuadros clínicos diversos cuyo signo príncipe es el flujo vaginal anómalo como son las vaginitis y vulvovaginitis y la vaginosis bacteriana. En otras ocasiones la causa de vaginitis es debido a una transmisión por vía sexual “sensu estricto” como es el caso de la infección por *T. vaginalis*. En cualquier caso el flujo vaginal anómalo no es un buen predictor de la presencia de una ITS.

La vulvovaginitis candidiásica es una causa muy frecuente de consulta por flujo vaginal alterado y prurito perivaginal. Se estima que aproximadamente el 70% de las mujeres ha padecido en algún momento una candidiasis vaginal (34). *C. albicans* se aísla en aproximadamente entre el 80% al 90% de las pacientes con candidiasis vulvovaginal. Las candidiasis vulvovaginales recurrentes son un problema particularmente difícil y complejo y pueden estar relacionadas con deficiencias tanto en la inmunidad celular como alteraciones en la inmunidad de mucosas (34). La candidiasis vaginal como ITS es poco frecuente; no así en el varón, donde la transmisión sexual de cándida, da lugar a una balanitis.

La vaginosis bacteriana es una de las causas más frecuentes de molestias y discomfort en las mujeres (35). Los lactobacilos son capaces de inhibir el crecimiento “in vitro” de *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Bacteroides* y otros microorganismos implicados en la etiología de la vaginosis bacteriana. En realidad, su desarrollo se debe a una compleja interacción de múltiples factores, que incluyen los numerosos componentes del ecosistema microbiano vaginal y su relación con el hospedador (36). Uno de estos factores es el cambio frecuente de pareja sexual pero aunque esté relacionado con la actividad sexual, la vaginosis bacteriana no se considera una ITS, a pesar de que algunas guías recomiendan realizar un despistaje de ITS en el caso de que haya algún factor de riesgo asociado como molestias abdominales o pareja sexual sintomática y flujo vaginal anómalo (37). Las complicaciones que puede acarrear son importantes sobre todo en las embarazadas en las que este fenómeno se ha asociado con rotura prematura de membranas, corioamnionitis y otras complicaciones importantes durante la gestación (38).

En el año 2008, la OMS estimó 276.400.000 nuevos casos de *T. vaginalis* a nivel mundial en adultos con edades comprendidas entre 15 y 49 años (7). El flujo vaginal en la infección por *T. vaginalis* es también característico. Este protozoo puede afectar tanto a hombres como a mujeres. En el varón la infección por tricomonas puede no dar clínica o cuadros tipo UNG. La mujer suele presentar síntomas caracterizados por, flujo vaginal maloliente, amarillo-verdoso con eritema vulvar aunque, algunas tienen síntomas mínimos o nulos, por ello se recomienda la búsqueda de *T. vaginalis* en mujeres con alteraciones del flujo (39). En mujeres embarazadas *T. vaginalis* se ha asociado con parto prematuro y neonatos de bajo peso, así como un aumento en la transmisión y adquisición de VIH (40). Y también, el examen rutinario de *T. vaginalis* en mujeres asintomáticas infectadas con VIH se recomienda debido a los efectos adversos que tiene lugar en estas coinfecciones (27,41).

### 2.4 PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS ITS

#### VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus RNA (ácido ribonucleico) con envuelta de 80-100 nm perteneciente a la familia *Retroviridae*. Estos virus poseen un interés biológico y médico muy importante al poseer como enzima de replicación, la transcriptasa inversa, considerada una DNA (ácido desoxirribonucleico) polimerasa RNA dependiente que puede transcribir RNA de cadena simple en DNA de doble cadena. La integración del DNA del genoma viral en el genoma de la célula huésped es una condición previa para la replicación viral. Los retrovirus causantes de patología humana conocidos hasta la fecha incluyen el HTLV (Virus humano de la leucemia de células T) tipos I y II y el VIH 1 y 2, estos últimos causantes del SIDA.

Debido a su diversidad genética existen diferentes grupos y subtipos dentro de los VIH1 y VIH2.

VIH1:

Grupo M (main o mayor): subtipos A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L

Grupo O (outlier)

Grupo N (New)

Grupo P (putative)

VIH2: A, B, C, D, E, F

La envoltura del VIH contiene glicoproteínas que permiten la adherencia a la membrana plasmática. Esta envoltura rodea una cápside que contiene 2 moléculas idénticas de RNA de cadena positiva dentro de un centro vírico (Figura 11).

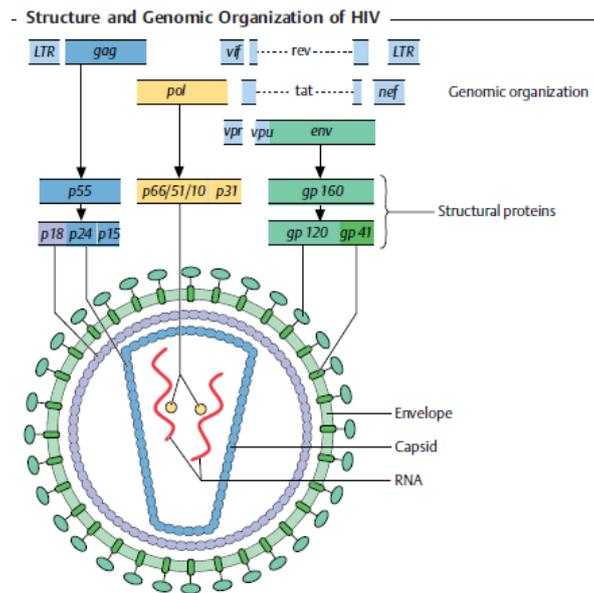


Figura 11. Estructura y organización genómica del VIH. Extraído de Kayser. Medical Microbiology 2005

El genoma viral, contiene los genes estructurales (*env*, *gag*, *pol*), reguladores (*tat*, *rev*) y accesorios (*nef*, *vpr*, *vpu*, *vif*) (Figura 12).

El VIH puede infectar linfocitos T y otras células que llevan el receptor CD4 en su superficie. El virus del VIH puede infectar por lo tanto monocitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, de centros germinales, de la mucosa intestinal y genital, nódulos linfáticos, microglía del SNC, de la piel) y las neuronas. La molécula de CD4 es el receptor principal para el VIH, o más precisamente para su gp120 aunque también intervienen otros correceptores (CCR5 y CXCR4). La capacidad para destruir la célula diana está relacionada con la cantidad de CD4 que expresa la célula en su membrana. Así, los linfocitos T tienen más CD4 que los macrófagos y por ello, éstos “escapan mejor” a la acción del VIH. Al penetrar en el citoplasma, el virus comienza su fase precoz de replicación. La transcriptasa inversa usa como cebador el RNAt del virión para sintetizar el DNAc (DNA complementario) y después formar una doble cadena de DNA. Éste se inserta en el genoma de la célula hospedadora con ayuda de la enzima integrasa y las secuencias LTR (long terminal repeat) de ambos extremos del genoma vírico. En este momento, la célula quedaría infectada. A partir de este momento, el DNA vírico o provirus puede permanecer en latencia, donde el provirus es transcrito como un gen celular más por parte de la polimerasa de la célula hospedadora. La interacción de los muchos y diferentes genes del virus, son los responsables del largo período de latencia y replicación viral posterior. A esta etapa de la patogenia del virus que se le conoce con el nombre de ciclo de latencia. Pero también, puede replicarse activamente entrando en lo que se conoce como ciclo lítico. En este caso, la transcripción del genoma vírico produce un RNA que se procesa hasta convertirse en RNAm. Los transcritos del genoma se ensamblarán en el citoplasma de la célula para formar

## Introducción

nuevos viriones, siendo su resultado final la destrucción de la célula hospedadora. Además de la destrucción celular inducida por el virus, la apoptosis también parece jugar un papel importante en la eliminación de células CD4 + (42).

<b>Gen</b>	<b>Proteína viral</b>	<b>Función</b>
<b>env</b>	gp 120 (gp125 en VIH2)	Glicoproteína de envoltura: interacción con CD4 y otros correceptores celulares
	gp41(gp36 en VIH2)	Glicoproteína de envoltura: sirve de anclaje para la gp120. Permite la fusión de las membranas viral y celular
	gp 160	Poliproteína precursora
<b>gag</b>	p17	Proteína de la matriz viral
	p24	Proteína principal de la cápside viral
	p7	Proteína de la nucleocápside: empaquetamiento RNA viral
	p6	Proteína de la nucleocápside: unión a Vpr y encapsidación viral
<b>pol</b>	p50	Transcriptasa inversa: transforma RNA a DNA proviral
	p15	RNAsa H: elimina el molde de RNA viral una vez realizada la retrotranscripción
	p31	Integrasa: inserta el DNA proviral en el genoma de la célula hospedadora
	p10	Proteasa: procesamiento de las proteínas Gag y Gag-Pol
<b>tat</b>	Tat (p14); Tax en VIH-2	Activador de la transcripción para la síntesis del mRNA viral
<b>rev</b>	Rev (p19); Rex en VIH-2	Transporte de mRNA viral del núcleo al citoplasma
<b>nef</b>	Nef (p27)	Reduce la expresión de CD4, interfiere en la activación de los linfocitos → evolución a SIDA
<b>vpr</b>	Vpr (p15)	Transporte de cDNA proviral al núcleo
<b>vpu</b>	Vpu (p16); Vpx en VIH-2	Bloqueo de los CD4 evitando la interacción con gp120. Estimula la liberación de partículas virales por la célula infectada
<b>vif</b>	Vif (p23)	Estimula el ensamblaje y eliminación de partículas virales

Figura 12. Principales genes y proteínas codificadas en VIH

La aparición de síntomas en la infección por el VIH, es debido a un desequilibrio entre la actividad replicativa del virus y la capacidad del sistema inmunitario para regenerarse del daño ocasionado. Así pues, la aparición de SIDA tiene lugar generalmente tras 5 años desde la

infección, con una mediana de tiempo de 11 años (43). Durante ese tiempo, el paciente puede permanecer asintomático e incluso desconocer su infección.

### TREPONEMA PALLIDUM

En el orden *Spirochaetales* se engloban tres familias: Treponemas, Borrelias y Leptospiras. Dentro de los treponemas, dos especies producen patología en humanos: *T. pallidum* y *T. carateum*. *T. pallidum* subespecie *pallidium* (a partir de ahora *T. pallidum*), es el agente etiológico de la sífilis. Otras subespecies como *T. pallidum* subesp *endemicum* o la subespecie *pertenue* son los responsables de la sífilis endémica y la frambesia respectivamente. *T. carateum* origina la pinta. Estas últimas entidades clínicas son curiosidades en nuestro ámbito, y están limitadas a determinadas zonas del planeta, por lo que es la subespecie *pallidium*, la que mayor relevancia clínica ha presentado a lo largo de la historia.

*T. pallidum* es una espiroqueta delgada y enroscada en forma de sacacorchos con extremos puntiagudos. En cada uno de estos extremos se insertan 3 flagelos periplásmicos. Una característica microbiológica de *T. pallidum* es que no se puede cultivar en medios artificiales acelulares. Esta característica es debida a que no realiza el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y depende de las células del hospedador para obtener las purinas y pirimidinas y gran parte de los aminoácidos. Son microorganismos microaerófilos o anaerobios y muy sensibles al oxígeno. Debido a su fina estructura no pueden ser visualizadas mediante tinción de Gram o Giemsa y microscopía de campo claro, pero por el contrario, la visualización de las formas móviles es posible mediante el microscopio de campo oscuro o mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Los factores de virulencia de *T. pallidum* han sido difíciles de estudiar por su incapacidad de crecer en los medios artificiales, pero ciertas características estructurales han demostrado que la mayor parte de las lipoproteínas que están ancladas en la membrana citoplasmática no se exponen en la superficie de la membrana externa y por lo tanto, les permite evadir la respuesta del sistema inmune, al no presentar antígenos específicos.

Asimismo, gracias al estudio del genoma bacteriano, se han identificado genes que se ocupan de la interacción con el hospedador que conferirán la capacidad al microorganismo de adherirse a los tejidos, invadir nuevos compartimentos o evadir la respuesta inmune. A pesar de su fragilidad, *T. pallidum* es capaz de producir una enfermedad crónica con manifestaciones clínicas muy variadas. *T. pallidum* carece de lipopolisacárido (LPS) (44), sin embargo, sí produce lipoproteínas que pueden inducir la expresión de mediadores de la inflamación a través de los receptores tipo Toll 2 (TLR2). Enzimas citolíticas, hemolisinas y u otras citotoxinas no se han demostrado que desempeñen un papel en la patogénesis de la sífilis (45).

La sífilis afecta sólo a los seres humanos. El *T. pallidum* se transmite por contacto directo normalmente en el contexto de relaciones sexuales, aunque hay otras vías de transmisión como la que tiene lugar en la sífilis congénita que se produce por vía vertical, intrauterinamente. La infección se produce debido al contacto directo con lesiones que contienen la bacteria, que invaden al individuo a través de microtraumatismos en la piel o mucosas. A partir de aquí entra en el sistema linfático y el torrente sanguíneo y se disemina por todo el cuerpo. El periodo de incubación oscila entre 2 a 4 semanas. Si no se trata, la enfermedad se manifiesta en varias etapas.

### NEISSERIA GONORRHOEAE

El género *Neisseria* contiene principalmente dos especies patógenas para el hombre, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, y aproximadamente 30 especies por lo general no patógenas. Estos organismos habitan predominantemente como comensales en tracto respiratorio superior, y con menor frecuencia en el tracto urogenital inferior. Los gonococos son cocos gramnegativos, aerobios, capnófilos, no flagelados, no productores de esporas y oxidasa y catalasa positivos. Como todas las bacterias gramnegativas presentan una membrana citoplasmática, una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa que contiene proteínas, fosfolípidos y lipopolisacárido (LPS). Los LPS de gonococo carecen de cadenas laterales repetidas del antígeno somático O por lo que se le suele llamar lipooligosacárido (LOS), característico para diferentes tipos de cepa (46). Se disponen en parejas (diplococos) adoptando la morfología en microscopía de un grano de café. *N. gonorrhoeae* es exigente y requiere medios de cultivo enriquecidos para su aislamiento, que considerará siempre patológico ya que es un patógeno primario.

La patogenicidad de gonococo comienza gracias a la adhesión a través de las fimbrias (*pili*) a las superficies del epitelio uretral, endocervical, vaginal e incluso a las células epiteliales no ciliadas de las trompas de Falopio (47). Además, LOS es un factor de virulencia ya que estimula la respuesta inflamatoria, activa el complemento y la producción de citoquinas y de factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , provocando la lisis de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Las proteínas de la membrana externa llamadas **porinas** o **Por** (PorA/PorB) asociadas al LOS, inducen la respuesta inmunitaria humoral y celular, disminuyen la asociación leucocitaria y confieren resistencia a la acción bactericida del suero. Estas proteínas son excluyentes, es decir, la presencia de PorA, excluye la de PorB. Los anticuerpos monoclonales contra la proteína Por son la base de la tipificación de las cepas de gonococo mediante técnicas comerciales de coaglutinación. Existen otros muchos factores de virulencia en *N. gonorrhoeae* (Figura 13) que

comparten en un 86% con neiserias comensales, mediante plásmidos que merece una mención especial y que se tratará en otro capítulo.

*N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a muchos antimicrobianos de primera línea como penicilinas, tetraciclinas y las fluoroquinolonas (14). Durante la última década, la susceptibilidad a la cefalosporinas también ha disminuido y los fracasos del tratamiento con cefixima se han reportado en diversos países (48). En el grupo de las fluoquinolonas los índices de resistencia son cada vez mayores. Los mecanismos de resistencia frente a quinolonas están producidos por mutaciones espontáneas en las regiones indicadoras de resistencias a quinolonas (QRDRs) de los genes *gyrA* y *Parc* (49). Actualmente, el uso de quinolonas de forma empírica está contraindicado. Son muchas las dianas que pueden estar implicadas en la resistencia antimicrobiana de gonococo, de ahí su rápida evolución (50).

Los lugares donde *N. gonorrhoeae* producirá principalmente infección son las mucosas (uretra, endocérnix, recto, faringe y conjuntiva ocular). La transmisión se produce directamente por la inoculación de secreciones infectadas persona a persona durante las relaciones sexuales no protegidas, pero también por vía vertical. El período de incubación es corto, entre 2 y 7 días.

Factor de virulecia	Localización	Acción
<b>Pil E</b>	Fimbria proteica mayor	Adhesión a células epiteliales
<b>P II (Opa)</b>	Proteína de membrana externa	Contribuye a la invasión.
<b>P.I (Por)</b>	Porina de membrana externa	Mediador de inflamación
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido	Realza la respuesta inflamatoria. Libera TNF $\alpha$
<b>P.III (Rmp)</b>	Proteína de membrana externa	Induce anticuerpos frente a los formados contra PI y LOS
<b>Tbp1 y Tbp2</b>	Receptores de membrana externa para transferrina	Acumulación de hierro para el crecimiento
<b>IgA1 proteasa</b>	Citoplasmática (Proenzima)	Inactivación de las IgA1 de la superficie de mucosas

Figura 13. Principales factores de virulencia de *N. gonorrhoeae*

La mayoría de casos son asintomáticos o dan manifestaciones clínicas muy leves en la mujer alrededor, pero en cambio, en el hombre la clínica suelen ser más evidente, aunque también puede haber formas asintomáticas (<10%) (51), generalmente a nivel genital. También puede

existir una diseminación hematológica que se presentaría con afectación cutánea (exantema macular o papular, a veces pustuloso, con ampollas o equimosis), artritis, tenosinovitis e, incluso, sepsis (52). Existen muchos casos con presentaciones atípicas en la literatura, que generalmente corresponden a pacientes con enfermedades subyacentes como infección por el VIH u otras enfermedades inmunológicas (53).

Las coinfecciones con *C. trachomatis* son frecuentes, sobre todo en las edades comprendidas entre los 11 y 25 años (26.7% de los hombres y el 40.1% de las mujeres) según de un estudio realizado durante un periodo de 2 años en Nueva Escocia, Canadá (54). Asimismo, la presencia de infección gonocócica, favorece la transmisión de la infección por el VIH (55).

### CHLAMYDIA TRACHOMATIS

*Chlamydia trachomatis* pertenece a la familia *Chlamydiaceae*. Dentro de esta familia se incluyen los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*. Esta división siempre ha sido polémica y datos recientes sugieren que el género *Chlamydophila* no estaría aceptado por lo que volverían a reclasificarse las 11 especies de la familia dentro del género *Chlamydia* (56). Estas bacterias pertenecen a una división bacteriana muy divergente del resto de las eubacterias y junto con los micoplasmas, constituyen las especies bacterianas con los genomas más pequeños entre 1,04-1,23 Mb. Su taxonomía está en constante evolución y gracias a la biología molecular, se seguirán garantizando nuevos cambios taxonómicos (57). Clamidia es un parásito intracelular obligado lo que le ha permitido perder ciertas rutas metabólicas como la biosíntesis de aminoácidos o la fermentación anaeróbica. Además, las características de su ciclo biológico, no facilitan la posibilidad de intercambio y adquisición de material genético exógeno.

*C. trachomatis* se clasifica en tres biotipos, cada uno conteniendo varias serovariedades (serovar) o genotipos (dependiendo del método utilizado para la clasificación). Las serovars se definieron sobre la base del tipo de infección, localización de la infección (tropismo tisular), y tipo de enfermedad que causan. (Figura 14)

Serovar	Características	Tropismos tisular	Infección
A-C	No invasivo	Células epiteliales	Tracoma endémico
D-K (B, Ba)	No invasivo	Células epiteliales	Neumonía neonatal, Conjuntivitis, Uretritis
L1,L2,L3	Invasivo	Células linfáticas	Linfogranuloma venéreo

Figura 14. Características e infecciones asociadas a las diferentes serovariedades de *C. trachomatis*. Fuente: WHO 2013

Todas las especies de clamidia tienen el mismo aspecto morfológico pero cada una presenta un polimorfismo resultado del ciclo de vida característico. Poseen membrana interna y externa

de manera similar a las bacterias gramnegativas y presentan lipopolisacárido pero no tienen lámina de peptidoglicano. Aunque sintetizan la mayoría de sus intermediarios energéticos, son incapaces de sintetizar su propio ATP y por lo tanto son parásitos obligados.

En su ciclo vital se pueden diferenciar dos tipos de elementos:

1. Los cuerpos elementales (CE). Son las diminutas formas infectivas de clamidia (0.3 - 0.4  $\mu\text{m}$ ). Poseen una membrana externa rígida que presenta extensivamente enlaces cruzados por puentes disulfuro. Esta rigidez les confiere resistencia a condiciones adversas en el medio externo cuando no están dentro de la célula hospedadora. Son por lo tanto también formas de resistencia extracelular. Los CE se unen a receptores en la célula huésped (células del epitelio columnar y macrófagos) e inician la infección.
2. Los cuerpos reticulares (CR). Son las formas intracelulares no infecciosas y metabólicamente activas de clamidia. Su pared no es rígida puesto que su membrana externa es más fina que la de los CE, debido a la ausencia de enlaces disulfuro. Los cuerpos de inclusión (CI) son las estructuras que desarrolla clamidia a las 48-72 horas de haber infectado a las células.

Al infectar la célula huésped, se estimula la infiltración de PMN y linfocitos, lo cual conduce a la formación de folículos y cambios fibróticos. Las manifestaciones clínicas son el resultado de la destrucción de las células y de la respuesta inflamatoria. La infección no estimula la respuesta inmune de larga duración y una reinfección trae como resultado la respuesta inflamatoria con el consiguiente daño tisular. El ciclo se inicia cuando los CE se fijan a las microvellosidades de la célula a infectar para luego penetrar en su interior mediante pinocitosis, así, las bacterias permanecen en el fagosoma citoplasmático; la fusión del fagosoma con el lisosoma no tiene lugar con lo que se impide la formación del fagolisosoma y la lisis de la bacteria. Después de unas 2 horas, los CE se reorganizan para convertirse en CR. A partir de las 6 horas comienzan a observarse las primeras divisiones que se continuarán hasta las 30 horas posteriores. Aparece en el citoplasma de la célula una auténtica colonia bacteriana que ofrece una imagen patognomónica: los cuerpos de inclusión. La multiplicación continúa por fisión binaria en el interior de la célula. (Figura 15)

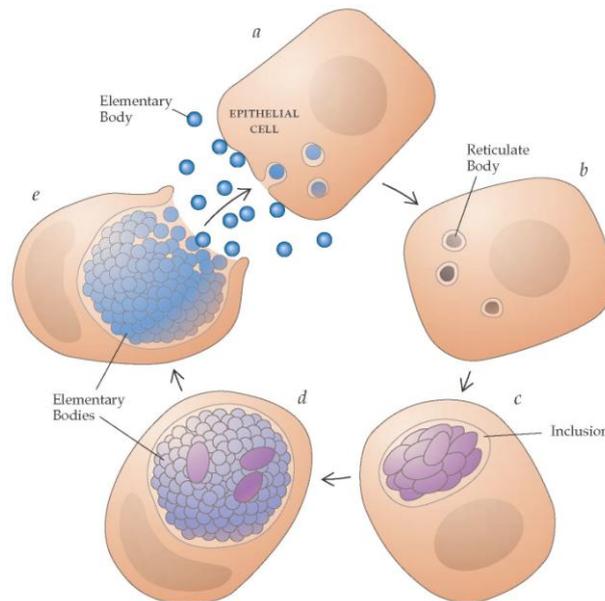


Figura 15. Ciclo vital de *C. trachomatis*. De <http://theamazingmedicine.blogspot.com.es>

Se han identificado diversos factores de virulencia, aunque todavía no podemos definir con certeza todos los factores de virulencia que han influido en los diferentes tropismos bacterianos, Algunos de los más importantes son:

1. El lipopolisacárido (LPS): antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. En 2011 Nguyen *et al* (58) constataron que en ausencia de LPS, las clamidias no son capaces de realizar la transición de CR a CE, que es la forma infectiva.
2. MOMP: principal proteína de membrana externa. Actúa como adhesina, facilitando las interacciones no específicas y la penetración de los CEs al interior de la célula. La porción monomérica actúa como porina en los CRs facilitando la permeabilidad de nutrientes y de ATP.
3. PMPs: proteínas polimórficas de membrana. Son un conjunto de proteínas que tienen un papel importante en la biología y patogénesis de todas las clamidias, aunque se encuentran en menor número en *C. trachomatis* que en otras especies de clamidia. Tienen función de autotransporte y actúan como adhesinas.
4. COMC: complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína. Contribuye a la rigidez y estabilidad osmótica del CE y participa en las primeras fases del anclaje del CE a la célula eucariota. Parece estar implicada en la transición de CR a CE, por lo que esta proteína tiene un papel relevante en la virulencia.
5. Sistema de secreción tipo III (TTSS) : mecanismo clave ya que facilita la interacción entre la célula huésped y el patógeno bacteriano.

6. Proteínas del proceso celular (proteínas Hsp): La Hsp60 ó “GroEL-like”, aparece durante las infecciones crónicas persistentes, su exposición prolongada parece relacionarse con fenómenos de autoinmunidad (56). Asimismo, la Hsp70 ó “Dnak-like”, se localiza en el citoplasma y en la membrana externa de los CE. A ella se le atribuye un papel mediador en la adhesión de *C. trachomatis* a la célula hospedadora, cosa que no se ha comprobado en el resto de especies.

Los serovares D-K de *C. trachomatis* y ocasionalmente B y Ba producen una amplia variedad de infecciones óculo-genitales. Se diferencian en:

- Infecciones en el hombre adulto: uretritis (y sus complicaciones como epididimitis y artritis reactiva incluyendo el síndrome de Reiter), proctitis y conjuntivitis
- Infecciones en la mujer adulta: cervicitis (y sus complicaciones como endometritis, salpingitis y peritonitis o perihepatitis), proctitis, uretritis y conjuntivitis y en caso de mujeres embarazadas responsable de partos prematuros, e infecciones en el recién nacido en el que producen conjuntivitis y neumonía.

*C.trachomatis* juega un papel importante en las infecciones perinatales. La infecciones producidas por *C.trachomatis* son: la conjuntivitis de inclusión, que se desarrolla unos 5-12 días tras el nacimiento, tras la adquisición de *C.trachomatis* del cuello uterino materno; y la neumonía, que aparece en el 10-20% de los casos, probablemente por diseminación desde la nasofaringe. En neonatos con pocos días de vida la infección puede ser muy severa y relacionarse con la aparición de apneas.

Las serovariedades L1, L2 y L3 producen típicamente el LGV ya han sido abordadas en otro capítulo.

### TRICHOMONAS VAGINALIS

*T.vaginalis* es un parásito protozoo flagelado del grupo *Mastigophora*. Presenta una forma piriforme, suele medir 10 µm de largo y unas 7 µm de ancho y su apariencia puede verse alterada en función de las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentre. Posee de 5 flagelos, 4 de los cuales están ubicados en su porción anterior el quinto se dirige hacia la parte posterior del cuerpo celular formando una membrana ondulante. Tanto los flagelos como la membrana ondulante le confieren movilidad, pero en condiciones desfavorables el parásito puede redondearse e internalizar sus flagelos. *In vitro*, los trofozoítos pueden diferenciarse en pseudoquistes tras la exposición al frío u otras condiciones adversas que a su vez se pueden dividir y rediferenciar a trofozoítos (59). *In vivo*, los trofozoítos pueden formar agregados celulares que probablemente tengan propiedades de citotoxicidad, provocando una unión

más fuerte hacia los tejidos humanos, dando lugar a una forma de reacción defensiva a la respuesta inmune del hospedador (60).

*T.vaginalis* vive exclusivamente en el tracto urogenital de los seres humanos y se multiplica en él mediante fisión binaria. Necesita para su desarrollo óptimo un pH de 5,5. Una vez que prospera la infección, el propio parásito producirá un aumento de la alcalinidad del medio para favorecer su crecimiento.

La respuesta inmune a *T. vaginalis* aún es poco conocida pero esencial para estudiar sus variaciones y comprender las interacciones hospedador-parásito (61). Existen muchos estudios sobre los factores de virulencia de *T. vaginalis*, pero lo primordial para el parásito su unión a las células epiteliales. Esta citoadherencia depende de varias proteínas (adhesinas). La más numerosa es un lipoglicano (TvLG) que también es conocido por modular la respuesta inflamatoria de las células epiteliales y macrófagos (60). Otros candidatos a factores de virulencia incluyen tres tetraspaninas, proteínas de la membrana implicadas en la señalización de la modulación de la adhesión, la motilidad y la invasión de tejidos.

Durante el proceso de infección, *T. vaginalis* fagocita activamente células humanas (62), bacterias y hongos para obtener nutrientes, lo que condiciona un desequilibrio en la flora normal similar a la que se produce en la vaginosis bacteriana. De acuerdo con esta posibilidad, una correlación entre la presencia de *T.vaginalis* y una microbiota vaginal con baja carga de lactobacilos y proporciones más altas otras bacterias, implicará la contribución (posiblemente sinérgica) al desarrollo de la vaginosis bacteriana y también al aumento en la susceptibilidad del huésped a la infección por VIH (63).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *T.vaginalis* son vulvovaginitis con prurito intenso, disuria y leucorrea de aspecto blanquecino-verdoso y maloliente. Los hombres con tricomoniasis pueden sentir picazón o irritación dentro del pene, ardor después de orinar o eyacular o alguna secreción en la uretra. Durante el embarazo la tricomoniasis se relaciona con partos prematuros y recién nacidos de bajo peso (64). Las mujeres embarazadas con flujo vaginal anormal deben ser evaluadas y tratadas adecuadamente.

### AGENTES MENOS FRECUENTES: HAEMOPHILUS DUCREYI, KLEBSIELLA GRANULOMATIS

El género *Haemophilus* se clasifica en la familia *Pasterurellaceae*. El género *Haemophilus* incluye 9 especies que se encuentren en el hombre. Se asocian a las vías respiratorias a excepción de *H. ducreyi* que produce ITS.

*H. ducreyi* es un cocobacilo gramnegativo, no móvil y con requerimientos nutricionales complejos. El crecimiento tiene lugar tanto en atmósfera aerobia, anaerobia o microaerófila y es óptimo a 32-33 ° C en atmósfera capnófila. Bioquímicamente tiene pocas características

distintivas: reducen el nitrato a nitrito, son oxidasa y fosfatasa alcalina positiva, y requieren hemina (factor X) para el crecimiento.

Aunque se han identificado factores de virulencia, el papel patogénico de *H. ducreyi* no está bien esclarecido, así parece tener fimbrias superficiales finas y entremezcladas, OMP, LOS y una citotoxina/hemolisina. Durante las infecciones experimentales y naturales, *H. ducreyi* reside en los abscesos formados por neutrófilos y macrófagos (65), y por lo tanto, sobrevive expuesto a múltiples situaciones de estrés, como ambientes hipóxicos, limitaciones de nutrientes... Este hecho sugiere que *H. ducreyi* posee mecanismos para detectar y responder a las tensiones impuestas por el huésped (66). Las localizaciones son clásicamente en dorso del pene o debajo del prepucio y en los labios genitales o en la región perianal en la mujer. También existen casos de chancroide extragenital descritas en boca, conjuntiva y piel (67).

La donovanosis, también conocida como granuloma inguinal, es una infección crónica afecta a la piel, mucosa, membranas, y sistema linfático de los genitales y del área perineal. Está causada por *Klebsiella* (anteriormente *Calymmatobacterium*) *granulomatis* (68). El género *Klebsiella* es heterogéneo y está formada por tres agrupamientos filéticos. *K. granulomatis* se engloba dentro del grupo I junto con *K. pneumoniae* subespecie *pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis*. *K. granulomatis* es un bacilo gramnegativo capsulado con requerimientos nutricionales especiales. No puede ser cultivado en medios con agar convencionales aunque se han conseguido aislamientos a partir de huevos embrionados y cultivos celulares con monocitos y Hep 2 (7). Se encuentra en regiones del planeta concretas: Brasil, el Caribe, India, Papúa Nueva Guinea, y Sudáfrica. El diagnóstico de laboratorio depende de la visualización de los cuerpos de Donovan en frotis teñidos con Giemsa o de Wright obtenidos de lesiones clínicas o en cortes histológicos de tejido. También se han desarrollado técnicas de biología molecular.

El período de incubación es incierto aunque se estima que oscila entre 1-360 días. Este amplio intervalo es probablemente multifactorial y puede reflejar cualquier presentación tardía o la transmisión no sexual. La infección por lo general comienza como una pápula firme o un nódulo subcutáneo que se ulcera. Clásicamente hay cuatro tipos de donovanosis (32): tipo ulcerogranulomatoso, es el más común; 2) tipo hipertrófico o úlcero-verrucoso; 3) tipo úlcera profunda y 4) tipo lesión seca, esclerótica, o cicatricial. Las úlceras son más comunes en hombres no circuncidados con baja higiene genital. Las lesiones extragenitales representan el 6% de los casos pueden encontrarse diversos casos publicados (69).

### AGENTES EMERGENTES: UREAPLASMA UREALYTICUM, UREAPLASMA PARVUM, MYCOPLASMA HOMINIS Y MYCOPLASMA GENITALIUM

Dentro de la clase *Mollicutes* (“piel blanda”) encontramos la familia *Mycoplasmataceae*. Representan un grupo de microorganismos complejos y sofisticados. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En la actualidad, se ha descrito ya aproximadamente unas 200 especies, muchas de ellas se describen como comensales de la flora autóctona del hombre, mientras que otras se consideran patógenas.

En el hombre, las especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* pueden transmitirse por contacto directo entre los hospedadores (es decir, genital-genital u oro-genital), vertical (ya sea en el nacimiento o en el útero), o por la adquisición nosocomial a través de los tejidos trasplantados. Las infecciones respiratorias causadas principalmente por *M. pneumoniae* se transmiten normalmente a través de aerosoles respiratorios.

En los humanos, se han aislado 14 especies, 12 especies pertenecen al género *Mycoplasma* y las otras 2 al género *Ureaplasma* (*U. parvum* y *U. urealyticum*). Seis de las 14 especies colonizan principalmente el tracto genitourinario. (Figura 16). Desde el punto de vista de los microorganismos que nos interesan como causantes de ITS nos centraremos en: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium*.

Los micoplasmas poseen características biológicas que los hacen diferentes del resto de las bacterias (70).

1. Carecen de pared celular y presentan el tamaño más pequeño conocido en un microorganismo de vida libre, tanto en su dimensión celular (0,2-0,8  $\mu\text{m}$ ) como en el tamaño del genoma. Esta característica es en gran parte responsable de sus propiedades biológicas, como que no se tiñan con la tinción de Gram y la no susceptibilidad a muchos agentes antimicrobianos como los beta-lactámicos
2. Escasa dotación de vías metabólicas. El estudio del genoma completo de *M. pneumoniae* y *M. genitalium*, ha puesto de manifiesto la ausencia de genes implicados en la síntesis de aminoácidos y muy pocos genes para la biosíntesis de vitaminas, precursores de ácidos nucleicos, ácidos grasos y colesterol. Esto implican que dependen del exterior para su aporte, ya sea proveniente de las células del hospedador o bien de los medios de cultivo enriquecidos.
3. Íntima relación microorganismo-hospedador, como consecuencia del punto 2, que se manifiesta como parasitismo de superficie con las células de los epitelios y células del sistema inmunitario y como localización intracelular, en algunas especies.

Especies	Mucosa colonizada		Metabolismo de:			Patogenicidad
	Orofaringe	Tracto genitourinario	Glucosa	Arginina	Urea	
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	+
<i>M. salivarium</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. orale</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. buccale</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. faucium</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. lipophilum</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. hominis</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. genitalium</i>	?+ <sup>a</sup>	+	+	-	-	+
<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+	-	+
<i>M. primatum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>M. spermatophilum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>M. pirum</i>	? <sup>b</sup>	? <sup>b</sup>	+	+	-	-
<i>M. penetrans</i>	-	+	+	+	-	?
<i>Ureaplasma spp.</i>	+	+	-	-	+	+

?<sup>a</sup> se ha encontrado también en orofaringe. Se desconoce su papel en esta localización. <sup>b</sup>?Desconocida

Figura 16. Especies de *Mollicutes* de origen humano: mucosas que colonizan, metabolismo y patogenicidad. De Procedimientos microbiológicos SEIMC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp y

Presentan la estructura celular más sencilla, integrada por una membrana plasmática trilaminar, un citoplasma con ribosomas y una molécula de DNA de doble cadena circular, densamente empaquetada, por lo que su aspecto es similar al de una célula eucariótica. La membrana plasmática está esencialmente compuesta por proteínas (60-70%) y lípidos (fosfolípidos, glicolípidos y esteroides, 20-30%), aportados desde el exterior (70). En función de su metabolismo, los micoplasmas se dividen en fermentativos y no fermentativos. Los no fermentativos poseen una arginina dihidrolasa que degrada la arginina y genera ATP (adenosín trifosfato) por fosforilización a nivel de sustrato, una forma poco eficaz de producir energía. El género *Ureaplasma*, presentan aún otra peculiaridad ya que no poseen la vía anteriormente descrita pero, en cambio, poseen una potente ureasa y requieren de urea para su crecimiento. La hidrólisis de la urea con la consiguiente formación de radicales amonio está acoplada a la síntesis de ATP mediante un mecanismo quimiostático.

La patogenia y sus fundamentos no están aún del todo estudiados, aunque se han propuestos diversos factores de virulencia:

1. Estructuras para la adherencia a las células del hospedador. Algunas especies patógenas poseen una estructura terminal u "orgánulo para la adherencia". También presentan adhesinas para facilitar la unión a las células epiteliales. También posee

- otra proteína superficial, llamada antígeno variable asociado a la adherencia (Vaa), que favorece la diseminación de una célula a otra y es altamente inmunogénica
2. Secreción de enzimas que indirectamente actúan sobre la síntesis de las prostaglandinas desencadenantes del parto, alteran la función surfactante del pulmón del feto y por otra parte activan procesos inflamatorios en el líquido amniótico. (71)
  3. Efecto inmunomodulador sobre el sistema inmunitario del hospedador. Además de la inducción de una respuesta de anticuerpos específicos, pueden producir una respuesta inmunitaria lesiva con exacerbación de la enfermedad al suprimir a varias estirpes de linfocitos de forma policlonal e inespecífica.
  4. Capacidad de penetración intracelular. En la última década ha quedado demostrada la presencia intracelular de organismos de algunas especies (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans* y *M. penetrans*) con distribución citoplásmica y en las regiones perinucleares de una amplia gama de tipos de células humanas (70)

La clínica de los pacientes con infecciones urogenitales o extragenitales causadas por especies *Mycoplasma* o *Ureaplasma* es síndrome-específico, no órgano- específico, y, como en el caso de *M. pneumoniae*, no hay rasgos distintivos que indiquen la etiología microbiológica de la infección respiratoria producida por el mismo (72).

La sospecha clínica de infecciones por estos microorganismos es poco frecuente lo cual complica aún más su diagnóstico. Las entidades clínicas relacionadas con especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* son: UNG, vaginosis bacteriana, pielonefritis, EIP, endometritis o corioamnionitis, embarazo ectópico, artritis infecciosas, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia neonatal/neumonía o meningitis neonatal. Especialmente importantes por las consecuencias que tienen, son las infecciones materno-fetales por el género *Ureaplasma*. Estos pueden estar presentes en el líquido amniótico de mujeres que experimentan parto prematuro y en los casos de ruptura prematura de las membranas, dando lugar a la hipótesis de que este organismo son los responsables de estos procesos (70). (Figura 17)

Enfermedad	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. genitalium</i>
Vaginosis bacteriana	++++ / +	+++ / -	+ / -
Embarazo ectópico	++ / +	+ / -	++ / -
Bajo peso al nacer	+ / -	+++ / +	
Parto pretérmino	++ / -	+++ / ++	++ / +
Fiebre materna	+++ / ++	++ / +	?
Enfermedad respiratoria neonatal	+ / ?	+++ / ++	?

Figura 17. Especies de *Mollicutes* de origen humano: mucosas que colonizan, metabolismo y patogenicidad. De Procedimientos microbiológicos SEIMC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp y

### VIRUS HERPES SIMPLEX

El VHS se clasifica clásicamente en dos tipos: el herpes tipo 1 (VHS1) y (VHS2). Ambos están estrechamente relacionados, pero difieren en la epidemiología. VHS1 se asocia tradicionalmente con la enfermedad orofacial, mientras que el VHS2 se asocia con la enfermedad genital; sin embargo, la ubicación de la lesión no es necesariamente indicativa de tipo de virus, dado que estudios recientes han demostrado que el VHS1 está implicado en una proporción sustancial de las infecciones de herpes genital, especialmente en Europa (72). El VHS es un virus DNA que pertenece a la familia *Herpesviridae*. Es un agente infeccioso común de piel, genitales y la mucosa oral y faríngea. La infección se produce por contacto entre una persona sana y un individuo que esté eliminando activamente el virus. Las células infectadas por el virus se fusionan y forman células gigantes multinucleadas. El virus se replica en la piel o en la mucosa gracias a receptores y ligandos específicos, como los que se encuentran en las células parabasales e intermedias de la vagina y cérvix, causando inflamación localizada y dando lugar a lesiones primarias que aparecen como consecuencia del efecto citopático (citolítico) del virus. VHS tiene la capacidad de migrar a los ganglios de las raíces dorsales y posteriores donde se multiplica, pudiendo alcanzar la fase de latencia. La supresión transitoria de la inmunidad celular debido a diversos factores, posibilita que el virus se pueda trasladar de manera retrógrada a través del nervio que deriva del ganglio infectado y presentar nueva replicación en el punto original de entrada o en sus cercanías, causando una reactivación con enfermedad episódica (recurrencia), aunque las recurrencias pueden ser asintomáticas. El herpes genital es una infección viral muy común y puede estar implicado en la transmisión materna causando graves complicaciones en el feto o en el recién nacido.

### VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH es un virus DNA pertenecientes a la familia de los *Papillomaviridae* y representa una de las ITS más comunes. La mayoría de las infecciones por VPH son autolimitadas y asintomáticas o no reconocidas. Se conocen más de cien tipos virales y al menos cuarenta que pueden infectar la región anogenital (27). En relación a su patogenia oncológica, se clasifican en tipos de alto y de bajo riesgo oncológico. Se considera que los genotipos de VPH 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 70 son los genotipos de alto riesgo y que otros tipos, incluidos el VPH 6 y 11, 42, 43 y 44 son de bajo riesgo. Como todos los virus de esta familia, los VPH sólo establecen infecciones en el epitelio estratificado de la piel y mucosas de humanos. Los VPH adquiridos sexualmente pueden producir varios tipos de lesiones dependiendo del tipo de VPH involucrado: a) Infecciones latentes, sin expresión clínica permaneciendo en la

piel; b) Infecciones subclínicas, la piel afectada no presenta lesiones a simple vista pero tras la aplicación de ácido acético al 3-5% aparece una zona blanquecina en la zona afectada; c) las verrugas anogenitales que aparecen sobre la piel de la región anogenital y están asociadas a los tipos 6 y 11, y no evolucionan a neoplasias y d) Infecciones activas de larga evolución, asociadas con VPH de alto riesgo (principalmente los tipos 16 y 18), que producen cambios en las células infectadas que conducen a neoplasias genitales. El diagnóstico de las lesiones inducidas por VPH es fundamentalmente clínico, aunque se requiere del tipado molecular en el caso de demostrar una lesión precancerosa o cancerosa.

### 1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MICROBIOLÓGICO.

A continuación se describen las principales técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de las ITS y algunos aspectos prácticos.

#### 1.5.1 LAS MUESTRAS CLÍNICAS EN LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

##### RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LAS MUESTRAS

Es importante elegir bien la muestra a la hora de diagnosticar una ITS, así como también su transporte y conservación hasta su procesamiento. Para ello son necesarios medios de transporte a veces específicos como es el caso de *C. trachomatis*, VHS (73) o los micoplasmas genitales para los que existen medios de transporte comerciales si se va a realizar cultivo (74). En líneas generales, se deben utilizar sistemas de transporte adecuados para microorganismos aerobios como las torundas de alginato cálcico o dacrón, en medio de Amies o de dacrón para el transporte de virus (75). El envío al laboratorio ha de ser rápido para asegurar la viabilidad del microorganismo y debe procesarse antes de las 6-12 horas tras la obtención. Las muestras que se envíen para cultivos bacteriológicos o de tricomonas se conservarán a temperaturas entre 35-37°C o en su defecto a temperatura ambiente, aunque existen estudios recientes que han demostrado que el gonococo puede resistir la temperatura de refrigeración (76,77).

Las muestras que se procesen por técnicas de amplificación genómica y para estudios virológicos, se deberán guardar preferiblemente en nevera a 4°C no más de 24 horas. En caso de demora es preferible congelarlas a -20°C o -80°C por un periodo de 7 a 30 días hasta su procesamiento (73).

##### TIPOS DE MUESTRAS

El lugar de toma de la muestra depende de la localización de la sintomatología. En localizaciones genitales las muestras más frecuentes son: el **exudado vaginal** que será muy útil para el estudio de *T. vaginalis*, vaginosis bacteriana y candidiasis vaginal (34,37); el **exudado**

**endocervical**, que se procesará para cultivo bacteriológico convencional y para PCR cuando haya sospecha de cervicitis o EIP, el **exudado de úlceras o vesículas** en las que hay que tener en cuenta las particularidades de los microorganismos a estudio en función de la presentación clínica, como la infección herpética, el LGV o la sífilis (que requiere observación al microscopio de campo oscuro); el **exudado uretral** en el que se utilizarán torundas finas con medio de transporte tipo Stuart-Amies recogiendo la secreción para poder realizar tinciones, cultivo (78) y PCR y la **orina** de la primera parte de la micción para realizar técnicas de PCR para el diagnóstico de la uretritis o el síndrome uretral agudo (79). También el **exudado anal**, utilizado en pacientes HSH para el diagnóstico de la gonococia rectal, proctitis por *Chlamydia*, o LGV.

Otras muestras menos frecuentes son: el **exudado faríngeo** que debido a la baja sensibilidad del cultivo en la detección de *N. gonorrhoeae*, generalmente, se requiere una toma de muestra más completa para optimizar su detección (80), la **triple toma** (uretral/endocervical, faríngeo y anal), realizado para el estudio de portador/a asintomático de gonococo. El **exudado o pus de una adenopatía** si hay sospecha de LGV, el **líquido cefalorraquídeo (LCR)** para el diagnóstico de la neurosífilis y los **hemocultivos** para el diagnóstico de la infección gonocócica diseminada.

## 1.5.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRECTO

### 1.5.2.1 Técnicas tradicionales

Las técnicas microbiológicas convencionales (examen directo y cultivo) siguen teniendo un papel en el diagnóstico de las ITS; en la mayoría de tratados de microbiología podemos encontrar las recomendaciones para el tratamiento de las diversas muestras clínicas en función del microorganismo a investigar. Únicamente destacar los principales aspectos que interesan actualmente.

El examen en fresco del exudado uretral permite categorizarlo como patológico o no, teniendo interés sobre todo en las uretritis no gonocócicas. La observación por tinción de Gram de diplococos gramnegativos intraleucocitarios en el exudado uretral tiene una sensibilidad del 85 al 90% y una alta especificidad (95-99%) (73), además de rapidez y limitado coste. Tal como se comentará más adelante es importante realizar el aislamiento de *N. gonorrhoeae* para el posterior estudio de sensibilidad a los antibióticos, dado que las técnicas moleculares para este fin, no están disponibles en la mayoría de laboratorios.

En otro orden de cosas el aislamiento de *Candida* spp sigue teniendo interés, básicamente por su sencillez y limitado coste. Para *C. trachomatis* se requieren técnicas de cultivo celular que no están implantados en la mayoría de laboratorios de microbiología, al igual que ocurre con el cultivo de *H. ducreyi* y *K. granulomatis*, este último se ha intentado aislar en líneas celulares

con poco éxito (82,83). Para el cultivo de VHS cultivo celular es el método de referencia. El crecimiento se detecta mediante la aparición de efectos citopáticos (ECP) en la monocapa celular. Para agilizar el aislamiento del virus, muchos laboratorios utilizan métodos de cultivo con centrifugación (shell vial) combinados con inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales. La sensibilidad comparada con el cultivo convencional es ligeramente mejor pero en cambio su manejo es sencillo y fácil de encajar en la rutina diaria de un laboratorio de virología (84). Más controvertido sería el papel del cultivo para *T. vaginalis* puesto que requiere de mucho trabajo técnico para una limitada sensibilidad en relación a las técnicas de biología molecular (85).

Técnicas de identificación. Aunque presuntivamente las morfologías de las colonias bacterianas permiten realizar una aproximación del tipo de bacteria que hemos aislado, es necesario realizar otras técnicas para confirmar la sospecha inicial. Estas pruebas se basan en diferentes metodologías.

- Métodos fenotípicos: la identificación fenotípica bacteriana o micológica se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de las bacterias o levaduras desconocidas con aquellas de cultivos tipo. Requieren de un tiempo medio de entre 12-16 horas para tener la identificación completa mediante las características metabólicas y/o bioquímicas. Existen muchos sistemas comerciales que ayudan en este proceso y cada vez más rápidos.
- Métodos genotípicos: los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia. En bacteriología la secuenciación del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Aunque en micología la diversidad de genes utilizados en secuenciación es mucho más amplia.
- Métodos proteómicos: la proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). En los últimos años, la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight*) ha tomado relevancia en los laboratorios de microbiología, acortando y simplificando sensiblemente el tiempo para obtener a una identificación fiable.

### 1.5.2.2 Estudio de resistencias bacterianas

El tratamiento de las ITS requiere en muchas ocasiones de un tratamiento efectuado directamente en la consulta del médico. Este hecho hace que sea importante conocer la sensibilidad antibiótica de las cepas circulantes en nuestro entorno, así como la sensibilidad de las cepas a nivel mundial, debido al fenómeno de la globalización, también aplicable a las ITS. Como reflejo de esta necesidad, los CDC recomiendan el tratamiento combinado para *N.*

*gonorrhoeae* con una cefalosporina de tercera generación más o azitromicina preferiblemente a, aunque las pruebas de PCR para *C. trachomatis* sean negativas (27) para el tratamiento de la gonorrea no complicada uretral, cervical, rectal y faríngea. Esto es debido a la creciente resistencia observada en *N. gonorrhoeae*, el cual siempre ha sido el microorganismo que ha suscitado mayor interés a la hora de estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos.

### *Neisseria gonorrhoeae*.

Consideraciones generales. Aunque el cultivo para *N. gonorrhoeae* pueda resultar menos sensible que las técnicas de PCR, todavía se requiere para este fin. Actualmente no existen sistemas comerciales y estandarizados de PCR que detecten las resistencias en gonococo por lo que el cultivo sigue siendo la única opción. El tratamiento empírico de las infecciones por gonococo ha resultado complicado debido a la capacidad de *N. gonorrhoeae* para desarrollar resistencia a las antibióticos. Su capacidad se basa en la posibilidad de adquirir material genético que codifique resistencias a antimicrobianos de bacterias estrechamente relacionadas como las neiserias comensales, además, es capaz de producir mutaciones que confieren estas resistencias.

Las resistencias de gonococo implican todos los mecanismos de resistencia actualmente conocidos: inactivación mediante enzimas de los antimicrobianos, alteración en la diana, aumento de la eliminación y disminución de la entrada. Estas resistencias llevan parejos mecanismos muy complejos y a veces asociados entre ellos.

**Resistencia a los  $\beta$ -lactámicos: Penicilina y cefalosporinas.** La resistencia a penicilina está mediada por plásmidos que codifican  $\beta$ -lactamasas que destruyen la penicilina (86). Ésta puede estar mediada también por otros mecanismos como por ejemplo, la resistencia cromosómica a penicilina por alteraciones en PBP-2 (penicillin protein binding) y PBP-1 y así disminuir su afinidad por las penicilinas (87); también puede que tenga lugar por la existencia de bombas de flujo debido a cambios en otros *loci*, tales como mutaciones en el gen *mtr* y el *penB* que tendrán efectos aditivos. El *locus mtr* media la resistencia a una amplia gama de antibióticos a través de un mecanismo de expulsión activa. Las mutaciones en el *locus penB*, afectan a una porina, y dan como resultado una permeabilidad reducida de la célula a los antibióticos (88).

Durante la última década, la susceptibilidad a las cefalosporinas también ha disminuido en muchas regiones del mundo. Concomitantemente, se han reportado fracasos terapéuticos en pacientes tratados con cefixima (89,90). Este problema empieza a afectar a la ceftriaxona, antibiótico de primera línea en el tratamiento de las infecciones por gonococo. La primera cepa que apareció con resistencia de alto nivel a ceftriaxona se describió en Japón (91),

posteriormente, han aparecido nuevos casos en Francia, Noruega y España (90, 92-94). En la figura 17, se muestra la distribución geográfica en Europa de las cepas de gonococo resistentes a cefixima durante el periodo 2009-2011 (95).

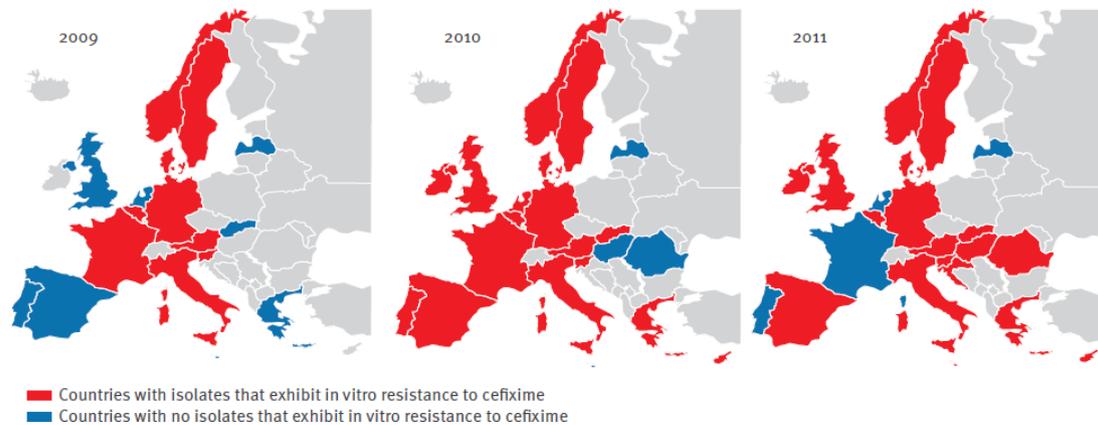


Figura 18. Distribución geográfica de las cepas resistentes a cefixima 2009-2011. Fuente Eurosurveillance 2014

**Resistencia a quinolonas.** Las mutaciones que ocurran en genes cromosómicos de *N. gonorrhoeae* pueden conferir resistencia a la penicilina pero también a fluoroquinolonas, tetraciclinas y a la espectinomicina (96).

En la década de los 90 comenzaron a aparecer en Asia las primeras cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a fluoroquinolonas. En la actualidad la presencia de estas cepas es un problema a nivel mundial con tasas en Europa del 48.7% (97). Una teoría que puede explicar este fenómeno, podría ser la introducción de la quinolonas para el tratamiento de otras infecciones (89). Las resistencias a las fluoroquinolonas son debidas al resultado de las mutaciones en la DNA girasa (*gyrA*) o topoisomerasa (*ParC*) que comporta la disminución de la penetración del fármaco y aumento de flujo de salida (98). A pesar de que los niveles de resistencia a ciprofloxacina ha disminuido en Europa (95), los porcentajes de resistencia continúan siendo demasiado altos para que estos antimicrobianos sean utilizados en monoterapia de forma empírica (88), a menos que la susceptibilidad haya sido confirmada con las pruebas de sensibilidad pertinentes.

**Resistencia a tetraciclinas.** La resistencia a tetraciclinas también puede ocurrir cuando el microorganismo adquiere plásmidos del género estreptococo, gracias al gen *tetM* que permite la síntesis de proteínas ribosomales normalmente afectadas por tetraciclina (99).

**Resistencia a macrólidos.** Otros agentes, como la azitromicina, presentan tasas de resistencia en Europa más bajas que rondan el 5.3% (95). Este nuevo macrólido ha sido explorado en el tratamiento de la gonorrea debido a su eficacia en el tratamiento de infecciones por *C. trachomatis* y de esa forma realizar un tratamiento combinado. Además es uno de los tratamientos recomendados como primera línea en las infecciones por *M. genitalium*.

Independientemente de que las tasas de resistencia a la azitromicina no son tan altas como las encontradas en las fluoroquinolonas, este antibiótico tampoco se recomienda como tratamiento en dosis única. Además, los parámetros para definir las resistencias a la azitromicina y las correlaciones con los tratamientos parecen no ser del todo evidentes. Los CDC definieron en el 2007 en su programa GISP (*Gonococcal Isolate Surveillance Project*) y sólo para fines epidemiológicos, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que definen la susceptibilidad reducida de *N. gonorrhoeae* a la azitromicina como CMI  $\geq 2$  mg / ml (100).

#### **Estudios convencionales de susceptibilidad, $\epsilon$ - test y concentración mínima inhibitoria (CMI) versus técnicas moleculares.**

La evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* requiere aislamientos viables para realizar pruebas de dilución que proporcionen la CMI. Los métodos más simples se basan en la utilización de  $\epsilon$ -test. Las CMI se interpretan según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (disponible en <http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/arg/criteria.htm>). Existen también opciones "in house" basadas en métodos moleculares. Algunos han sido descritos para la detección de resistencias cromosómicas a penicilina pero sobre todo son para el estudio de las resistencia a fluoroquinolonas que analizan las regiones *gyrA* y *Parc*. (101,102).

Además aún no existe ningún método comercial capaz de detectar resistencias de muestra directa. Quizá sea por la baja carga bacteriana que pueden tener las muestras o por la poca estandarización de los métodos moleculares. Por lo tanto a pesar de que estas técnicas nos ayudan a realizar diagnósticos, no podemos olvidar que es necesario realizar concomitantemente cultivos en caso de sospechar infecciones por *N. gonorrhoeae*.

#### Otras bacterias: *C. trachomatis*, *M. genitalium* y *T.pallidum*

De particular interés es también *C. trachomatis*. Aunque *C. trachomatis* ha sido históricamente sensible a las tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas, ya en los años 90 se reportaron datos en los que se observaba un aumento en la resistencia in vitro (103). La dificultad en la realización de los cultivos de clamidia, hace el estudio de susceptibilidad antimicrobiana no se haya desarrollado con suficiente estandarización, debido a la laboriosidad del procedimiento (104). Aunque no existen en la actualidad pruebas de resistencia a los antibióticos en entornos clínicos, hay estudios que indican indicios de que varios genotipos de resistencia a antibióticos pueden ser generados y transferidos a *C.trachomatis*, *C.suis* y *C.muridarum*, y por lo tanto, el estudio de resistencias a antimicrobianos en clamidia será una importante herramienta en los laboratorios en un próximo futuro (104).

La evaluación de la eficacia del tratamiento en las infecciones por *M. genitalium* ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones (105). Para el tratamiento del este microorganismo se han utilizado macrólidos como la azitromicina y quinolonas. Así como ocurre en *N. gonorrhoeae*, ya se han descrito casos en los que las pautas con azitromicina no han evolucionado bien (106). Con estos datos y ante la única posibilidad de diagnosticar las infecciones por *M. genitalium* mediante técnicas de PCR, también se han desarrollado métodos moleculares para el estudio de SNP (*single nucleotid polymorfism*) en la región que determina la resistencia a quinolonas (QRDR) así como las mutaciones en el 23s rRNA para el estudio de las resistencias a macrólidos. La doxiciclina es sólo eficaz frente a *M. genitalium* en un 20% – 35% de las ocasiones, mientras que azitromicina se estima que es efectiva en más de un 70% (23). En las cepas estudiadas se ha observado un porcentaje de resistencias a azitromicina que oscila entre un 41% a un 43.4% según los diferentes autores y una tasa de resistencia a quinolonas inferior, entre un 4.54% y un 15.4% (107). Un estudio reciente en Estados Unidos sobre el tratamiento de las uretritis no gonocócicas encontró que las tasas de curación para el *M. genitalium* eran extremadamente bajas para azitromicina y doxiciclina (40% vs 30%, respectivamente; P =0.41) (23).

Aunque la penicilina sigue siendo eficaz, se ha observado clínicamente una significativa resistencia a los macrólidos, tratamiento de segunda línea y alternativo a la penicilina en casos de alergia. Las cepas resistentes a macrólidos de *T. pallidum* se han descrito ya en varios países como EEUU y China (107). Este tipo de resistencia se asocia a menudo con la alteración de la diana de acción de estos antibióticos destino (el área que codifica la peptidil-transferasa en el dominio V del 23S RNAr) a través de la mutación o la metilación. Aún no se han detectado cepas resistentes ni a penicilina ni a tetraciclinas, pero se ha de implementar una vigilancia a nivel mundial para que este fenómeno no tenga lugar (108).

### 1.5.2.3 Técnicas rápidas de diagnóstico. Point of-care tests

Las pruebas de diagnóstico rápido, son aquellas en las que el resultado se obtiene en un corto periodo de tiempo tras una pequeña y sencilla manipulación de la muestra.

Otra acepción reciente son los *Point of-care* (POC) tests. Estos se definen como técnicas de diagnóstico aplicadas cerca o en sitio donde se realiza la consulta del paciente, permitiendo la obtención de un resultado rápido o relativamente rápido, del que se deriva una decisión terapéutica inmediata. Estos pueden estar basados en diversas tecnologías como los inmunoensayos o las técnicas de biología molecular.

El acrónimo ASSURED (Figura 19), fue acuñado, en una reunión especial del Programa de Investigación y Formación en Enfermedades Tropicales (OMS / TDR) de la OMS en el 2003, para definir las características ideales de una prueba rápida tipo POC test, dentro de todos niveles de un sistema de la salud (7). Un POC test aunque es una técnica rápida no tiene por qué ser sinónimo de un test rápido ya que lo que define a un POC test es sobre todo su mínima manipulación, facilidad de interpretación y poca necesidad de maquinaria compleja.

Estas pruebas se pueden dividir en dos grandes grupos: los ensayos serológicos, que evalúan la respuesta inmune del individuo a una infección o los ensayos de detección de antígeno, método de diagnóstico capaz detectar la presencia de un agente infeccioso o parte de él en la muestra clínica. El desarrollo de técnicas de biología molecular en formato POC test, ha sido muy importante en los últimos años y de ello hablaremos y se han ido incorporando cada vez más en los laboratorios de microbiología (109). Las técnicas basadas en detección de antígenos se utilizan para diagnosticar infecciones agudas. Desde el punto de vista de las ITS, se necesitan POC tests no sólo para aumentar la especificidad del manejo sindrómico y reducir el número de tratamientos de infecciones gonocócicas y por clamidia, sino también para detectar ITS asintomáticas (7).

**Box 1: The ideal rapid test—ASSURED criteria**

A = Affordable  
S = Sensitive  
S = Specific  
U = User-friendly (simple to perform in a few steps with minimal training)  
R = Robust and rapid (can be stored at room temperature and results available in <30 minutes)  
E = Equipment-free or minimal equipment that can be solar- or battery-powered

Figura 19. Características de los POC tests. Extraído de Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. WHO 2013

En estas pruebas diagnósticas el tipo de muestra a utilizar también puede ser variado: sangre, suero, plasma, orina, secreciones salivales e hisopos recogidos de diferentes lugares del cuerpo. Las primeras técnicas de POC test que se comercializaron y que tienen una amplia distribución, son las técnicas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos frente al VIH. Estas pruebas permiten diagnosticar la infección por el VIH tanto a partir de sangre obtenida por punción en el dedo hasta fluido oral que el propio paciente puede recoger en su

casa, que incluso la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó para su uso doméstico en el 2012 (110).

A pesar de su gran variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad los POC tests han mejorado la eficacia en la prevención de la transmisión del VIH y la sífilis de la madre al recién nacido (111).

### POC tests disponibles en la actualidad para el diagnóstico de las ITS.

Se han desarrollado muchas técnicas rápidas tanto de detección de anticuerpos como de detección de antígenos para el diagnóstico de las ITS. Estas últimas están siendo relegadas debido al desarrollo e introducción en el mercado, de técnicas rápidas de PCR (108). En la actualidad las ITS que disponen de POC tests para su diagnóstico son las siguientes:

**VIH.** El avance de la infección por el VIH hace necesario acelerar los esfuerzos de prevención y control del VIH (112). Las pruebas de diagnóstico rápido son herramientas críticas para ayudar a reducir la prevalencia de la infección no diagnosticada, mejorar el seguimiento de los resultados clínicos e identificar infecciones para orientar los esfuerzos de prevención y control (113). Cuando el resultado es positivo se considera preliminar y se debe enviar una muestra al laboratorio de Microbiología para confirmar mediante técnicas estándar. En un principio las pruebas rápidas se usaban en situaciones de urgencia, pero en la actualidad se utilizan pruebas con licencia CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendment*) en entornos no clínicos. Las pruebas rápidas se pueden realizar en fluido oral o en sangre capilar recogida mediante punción digital y no requieren extracción de sangre venosa. Detectan la presencia de anticuerpos VIH-1, VIH-2 y/o el antígeno p24 del VIH-1. La sensibilidad y la especificidad son buenas con un VPN elevado (114). Excepto en el diagnóstico de la infección aguda por VIH (114) ya que son capaces de detectar sólo la mitad de las primoinfecciones (115). Actualmente se han desarrollado POC tests basados en la amplificación de ácido nucleicos (116). La empresa Cepheid ha comercializado recientemente en su plataforma de GeneXpert la técnica Xpert<sup>®</sup> HIV-1 Qual que es capaz de detectar la presencia de RNA del VIH-1 así como determinar la carga vírica con un límite de detección de 40 copias/mL mediante el kit Xpert<sup>®</sup> HIV-1 Load.

**SÍFILIS.** Estas técnicas recobran gran importancia en la detección de mujeres embarazadas infectadas por el *T. pallidum* debido a la capacidad de transmisión del treponema al recién nacido. Un estudio mostró que las pruebas treponémicas rápidas tipo POC test pueden ser introducidas en los siguientes contextos: clínicas prenatales rurales de Tanzania, Uganda y China; clínicas rurales y urbanas en Perú y Zambia; y las comunidades indígenas remotas en

Brasil. Estas iniciativas, evitaron muchas muertes fetales y redujeron la mortalidad neonatal. (112). El problema surge en que muchas de las pruebas POC para sífilis están basadas en pruebas treponémicas que pueden persistir positivas después del tratamiento. Por ello se han desarrollado kits que combinan ambos tipos de pruebas treponémicas y no treponémicas en un solo paso para poder distinguir infección activa de pasada. El test daría lugar a la identificación de más del 93% de las infecciones por sífilis activa, mientras que poco más de la mitad de las infecciones pasadas se diagnosticarían como antiguas, evitando tratamientos innecesarios. Estas pruebas tienen sensibilidades de entre 89.8 y 94.2% en relación a las técnicas treponémicas y no treponémicas respectivamente y una especificidad del 99.3% y del 62.2% (117). La OMS está a punto de validar el uso de un test inmunocromatográfico que combina la detección de VIH y de la sífilis en un solo ensayo.

**Infecciones por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.** Desde hace años ya las técnicas de detección de antígenos se han utilizado para la detección de clamidia. Debido a la baja sensibilidad y especificidad en comparación con ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, el desarrollo y el uso de éstas ha caído en desuso (113). En cuanto a *N. gonorrhoeae*, las técnicas de ICT han demostrado sensibilidades entre 60-94%, especificidades del 89-97% y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) del 55-97% y 92-99%, respectivamente, comparado con técnicas de amplificación genómica. A pesar de la buena especificidad, la sensibilidad de la técnica no es aceptable como herramienta diagnóstica y requeriría confirmar el resultado (118). En la actualidad estas técnicas ya no están disponibles. En el caso de *C. trachomatis*, los métodos inmunoenzimáticos van dirigidos a detectar el antígeno LPS de grupo que puede dar falsos positivos por reacción cruzada con LPS de otros microorganismos, incluyendo otras especies de *Chlamydia* (73). Las sensibilidades de las diferentes técnicas oscilan entre un 40-80% (119). En una revisión publicada en el 2010 aún se reportaban peores valores (Biorapid CHLAMYDIA Ag®, QuickVue clamidia® y Handilab-C® presentaron sensibilidades del 17%, 27% y 12%, respectivamente) (120). Las últimas guías de los CDC (27) continúan considerando inaceptables las sensibilidades de los POC tests comerciales para *C. trachomatis* en mujeres, y no las recomiendan como pruebas de detección de *C. trachomatis*.

***T. vaginalis*.** Las pruebas rápidas en el diagnóstico de la tricomoniasis presentan resultados aceptables. Sólo se recomienda realizar en mujeres que presentan una cantidad suficiente de secreción vaginal y de hecho sólo están aprobados para este tipo de muestra. Comparado con el cultivo, su sensibilidad y especificidad es superior al 83% y al 97%, respectivamente, aunque pueden dar falsos positivos, sobre todo en poblaciones con baja prevalencia (121). La última generación de estas pruebas, por ejemplo, OSOM *Trichomonas* Rapid Test® (Genzyme

Diagnostics,USA), tiene una sensibilidad mayor en comparación con la microscopía del 82-85% y un especificidad del 97-100% (122). Los resultados están disponibles en aproximadamente 10 minutos.

**Vaginosis bacteriana.** A pesar de que el diagnóstico de la vaginosis reposa en la microscopía y la búsqueda de las *clue cells*, en el caso de que no se disponga de un microscopio o la posibilidad de realizar tinciones, existen comercializadas pruebas rápidas. Una de ellas es OSOM Blue BV® (Sekisui Diagnostics, Framingham, MA), mide la presencia de sialidasa, una enzima que producen algunas de las aminas liberadas por las bacterias implicadas en la vaginosis bacteriana. En comparación con los criterios de Nugent y Amsel, tiene una sensibilidad de 88% y una especificidad de 95% y 91%, respectivamente (123). Un estudio realizado en India también muestra resultados similares. En comparación con el Nugent y Amsel score, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 61,9%, 88,3%, 81,5%, 73,7% y 38,1%, 92,7%, 82,1%, 63,9%, respectivamente (124). Otra técnica rápida es el FemExam que consiste en dos tarjetas con indicadores que miden el pH vaginal, las aminas, y la actividad enzimática de la aminopeptidasa. La tarjeta 1 mide el pH y la presencia de aminas, la tarjeta 2 mide la actividad de la aminopeptidasa. La comparación entre FemExam 1 y el Nugent score muestra una sensibilidad y especificidad del 71,4% y 72,8%, respectivamente, y la FemExam 2 presenta una sensibilidad y especificidad del 70% y 81%, respectivamente (125). Aunque en la prueba FemExam está disponible la detección de pH elevado y trimetilamina, su baja sensibilidad y especificidad no la hace recomendable para el diagnóstico (121), aunque estos kits aprobados por la FDA y tienen licencia CLIA.

A pesar de los buenos resultados el diagnóstico de la vaginosis bacteriana reposa en la tinción de Gram, el problema es que no todos los entornos disponen de esta opción. La realización de estas pruebas rápidas es más caro que tratar de forma empírica a las mujeres que consulten por flujo anómalo, y así lo recomienda la OMS (126).

### 2.5.2.4. Técnicas de diagnóstico molecular

La técnica de PCR fue desarrollada en 1986 por Kary Mullis (127) y se considera uno de los hitos científicos más importantes de los últimos tiempos. Actualmente es una herramienta fundamental en el campo de la medicina y su introducción ha supuesto un gran avance en la microbiología clínica. Son métodos basados en la búsqueda y reconocimiento del genoma del microorganismo. Uno de los puntos fuertes de las técnicas de PCR es su capacidad para detectar microorganismos sin necesidad de que sean viables pero también hay que considerar, que el transporte y el almacenamiento de las muestras no es menos crítico que el de otras

técnicas. Las ventajas de las pruebas de PCR incluyen: formatos automatizados, tecnologías conocidas y respaldadas por la bibliografía, inclusión de controles de amplificación que permiten validar los resultados con seguridad, detección de varios microorganismos en una sola reacción y posibilidad de una mayor automatización.

Actualmente, existen muchos kits comerciales disponibles en formato uniplex (que detectan un solo patógeno) o multiplex (posibilidad de detectar 2 o más microorganismos en una sola reacción). Este fenómeno ha llevado al desarrollo de la producción de ensayos comerciales capaces de hacer un diagnóstico sindrómico y de esta forma, ser potencialmente capaces de detectar aquellos microorganismos que pueden estar implicados en el cuadro clínico.

*C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* son dos de los principales agentes etiológicos de las ITS. A pesar de que el cultivo de *N. gonorrhoeae* es aún hoy el “gold estándar” para el diagnóstico de las infecciones por gonococo sobre todo en zonas de baja prevalencia (128) en el caso de *C. trachomatis* su aislamiento requiere líneas celulares no disponibles para todos los laboratorios de microbiología clínica. Las técnicas serológicas para diagnosticar infecciones por *C. trachomatis* carecen de especificidad, y además no son útiles para *N. gonorrhoeae* (129). Así pues las técnicas basadas en PCR se consideran actualmente los métodos de elección para el diagnóstico las infecciones por *C. trachomatis*.

Inicialmente estas técnicas comenzaron a usarse para muestras del aparato genitourinario (130), pero poco a poco, su uso se ha ido ampliando muestras extragenitales con buenos resultados (131, 132). La posibilidad de aplicar estas tecnologías a otros tipos de muestras ha ampliado el conocimiento de las ITS así como la capacidad para buscar reservorios antes menos estudiados como el canal anal o la faringe. En este aspecto, una desventaja de las técnicas de PCR es la posibilidad de encontrar falsos positivos con *Neisserias* comensales sobre todo a nivel oral (133,134) cosa que también ocurre con el cultivo.

Otras técnicas de PCR que se utilizan en la práctica clínica son las que detectan VIH, el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y el virus del papiloma humano (VPH). Además de detección cualitativa de estos virus, la cuantificación de la carga viral es de gran valor para el diagnóstico, pronóstico y monitorización terapéutica de los pacientes infectados con VIH, VHB y VHC.

Desde las primeras PCRs realizadas hasta la actualidad, esta tecnología ha evolucionado considerablemente, dando lugar a técnicas cada vez más específicas. En general todas pretenden amplificar una porción de ácido nucleico determinada de una forma más o menos específica, pero lo que más ha cambiado es la forma de detectar este producto amplificado. Inicialmente, el producto resultado de la amplificación se detectaba con técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos generados de acuerdo a su carga y, en menor

medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa. Aunque aún se siguen utilizando, existen otras formas de detección como la mediada por fluorescencia con una alta aplicabilidad en el diagnóstico clínico. La PCR en tiempo real es la más utilizada actualmente en los laboratorios de microbiología clínica. Es una reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar, mediante el uso de calibradores la cantidad de DNA o RNA presente en la muestra original. Además, la PCR en tiempo real integra y automatiza la amplificación y la detección en un solo instrumento y al mismo tiempo, y que por lo tanto, requiere menos tiempo y mano de obra, en comparación con la realización de la PCR convencional.

Las principales ventajas de la PCR en tiempo real respecto a los métodos clásicos de PCR son:

- Rapidez, ya que las reacciones se producen en capilares que permiten acortar los ciclos de las rampas de temperatura.
- Son sistemas que detectan el producto amplificado a medida que se va produciendo. Es decir, se realiza la amplificación y la detección en un solo proceso.
- Seguridad. Al no tener que manipular el producto amplificado disminuye el riesgo de contaminación.
- Automatización. Algunos sistemas llegan a incorporar también el paso de extracción, simplificando enormemente el proceso.

También pueden encontrarse en formatos multiplex (PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción). Este tipo de PCR es muy útil para el diagnóstico sindrómico en el que pueden estar implicados diversos microorganismos como agentes causales (135).

### PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Este tipo de PCR utiliza como molde inicial el RNA y requiere de una transcriptasa inversa, para realizar la conversión del RNA a un tipo de DNA llamado cDNA (DNA complementario). Esta PCR es la que se emplea para el estudio de virus RNA como algunos virus respiratorios, norovirus y también para el estudio de la carga viral del VIH y del VHC.

### TOCE™ (*Tagging oligonucleotide cleavage and extension*) y DPO™ (*dual priming oligonucleotide*)

TOCE™ es un nuevo enfoque de PCR en tiempo real. Basado en el análisis de las curvas de melting (cyclic-CMTA), esta tecnología es una aplicación novedosa para la semicuantificación. Los componentes clave para la tecnología TOCE™ son los *primers DPO*, el *pitcher* y el *catcher* (136). El *pitcher* es un oligonucleótido marcado que hibrida específicamente con la región de destino. El *catcher* es un molde artificial de la región diana del DNA o RNA marcado con

fluorescencia. A través de la unión del *pitcher* a su diana, la reacción de PCR con los *primers DPO* comienza a producirse, moviendo el punto de la detección hacia el *cátcher*. Durante la extensión de los *primers* el marcador del *pitcher* se separa gracias a la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa. Esta porción se une al *cátcher* ya que tiene una secuencia complementaria a la porción escindida. La extensión de la porción marcada hace que se separe el *quencher* del marcador fluorescente presente en el *catcher* lo cual implicará la emisión de fluorescencia específica para cada secuencia. Este sistema DPO™ es una herramienta fundamental para el bloqueo de la extensión inespecífica de los moldes, y por lo tanto da lugar a una alta especificidad de PCR incluso bajo condiciones menos óptimas (137). La utilidad de la tecnología TOCE™ se puede incorporar con éxito en los sistemas de diagnóstico molecular, ya que permite la identificación de múltiples dianas simultáneamente en un solo canal. La señal se puede medir en tiempo real y/o analizar gracias a las curvas de *melting* del *catcher* (*Catcher-Tm*). Las actuales curvas *melting* tienen diferentes valores acordes con los cambios en la secuencia de nucleótidos del microorganismo a detectar. Sin embargo la tecnología TOCE™ permite un valor consistente *Catcher-Tm* que no está afectado por las variaciones de la secuencia diana. En la actualidad está disponible en el mercado Anyplex™ II STI-7 (Seegene, Seoul, Korea) que detecta 7 agentes causales de ITS (138).

Además, permite una semi-cuantificación del microorganismo causante de la infección que se puede ver de forma simultánea mediante el establecimiento de un punto del ciclo del proceso de la PCR en tiempo real. El punto se puede en el ciclo 30, 40, 50, y el análisis cuantitativo se puede realizar en función del pico de *melting* debido directamente proporcional a la cantidad de microorganismo implicado.

El producto amplificado su puede detectar por otros métodos como los microarrays o biochips de DNA que detectan el producto amplificado mediante sondas inmovilizadas en una superficie (139).

En los últimos años las PCR se han incorporado al fenómeno de los POC test y en la actualidad se encuentran disponibles y comercializados varios productos: el Xpert® CT/NG para la detección de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, y el Xpert® HIV-1 Load y Xpert® HIV-1 Qual que presenta una buena correlación con Abbott m2000 RealTime HIV-1 (140).

En general, las técnicas de PCR han revolucionado la comprensión de las ITS, asimismo ofrecen un rango de oportunidades y ventajas respecto a los métodos convencionales, tales como el diagnóstico rápido y el diagnóstico a partir de muestra no invasiva (141) o tomadas por el propio paciente, pero también permite detectar microorganismos como *M. genitalium*, que no eran detectables por otros métodos (7).

### 1.5.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las pruebas serológicas están basadas en la detección de anticuerpos frente a un microorganismo causante de una infección. Estas pruebas consisten en enfrentar el suero del paciente a un antígeno microbiano y ver si se produce la reacción antígeno-anticuerpo ya que los anticuerpos reaccionan con los antígenos de forma específica, de tal manera que se pueden utilizar para confirmar la identidad de un microorganismo en particular. Existen diferentes técnicas para detectar esta reacción como los ensayos de inmunoenzimología (EIA), la inmunofluorescencia (IF), inmunocromatografía (ICT), quimioluminiscencia (QLIA), etc, que a su vez, también pueden ser usadas para la detección de antígenos. A pesar de que en algunas patologías la serología ha sido relegada por otras técnicas, como la detección de ácidos nucleicos, en algunas infecciones, aún siguen siendo la clave del diagnóstico como en la infección por el VIH, las hepatitis y la sífilis.

Las pruebas serológicas son también útiles en estudios de seroprevalencia en una población determinada, permitiendo conocer el porcentaje de individuos que han estado en contacto con el microorganismo a estudio.

Disponemos de técnicas para detectar diferentes tipos de anticuerpo que nos permitirán saber si estamos ante una infección aguda (IgM, IgA o IgG con baja avidéz) o infección crónica (IgG o IgG de alta avidéz), pero su aplicabilidad en el diagnóstico de las ITS es limitado.

El mejor método para llegar al diagnóstico de infección reciente es la detección de una seroconversión, mediante el estudio en paralelo de dos sueros obtenidos en diferentes estadios de la enfermedad, uno al inicio y otro en la fase de convalecencia. Se considera que existe infección actual si se objetiva un incremento significativo de título de anticuerpos en la segunda muestra respecto a la primera.

En lo que respecta a las ITS, es en el diagnóstico de la infección por VIH y en el diagnóstico de la sífilis, donde la serología es la piedra angular y es en estas dos entidades en las que se centra esta Tesis.

### Serología para el diagnóstico del VIH. Nuevas perspectivas

El hecho de que menos de la mitad de las personas que viven con el VIH conozcan su estado serológico es una inmensa barrera que dificulta el inicio del tratamiento, así como la obtención de beneficios preventivos. La situación es incluso más grave en algunas de las áreas del planeta más afectadas como ocurre en muchos países africanos.

El diagnóstico de la infección por el VIH se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero o plasma del paciente. La elección de la técnica apropiada y del

algoritmo diagnóstico dependerán del objetivo a alcanzar (142). Las pruebas de laboratorio basadas en las técnicas de antígeno/anticuerpo son extremadamente precisas. En términos de sensibilidad la mayoría de las técnicas alcanzan niveles de sensibilidad de entre el 99,8% y el 100%. Resultados similares se encuentran para la especificidad; de hecho, todas las técnicas evaluadas por la *Health Protection Agency* del Reino Unido presentaban una especificidad del 99,7% o superior (143).

- **Pruebas de cribado**

La mayoría de las pruebas de anticuerpos contra el VIH se encuentra en formato ELISA o EIA, aunque cierto es, que existen muchas otras tecnologías con los mismos resultados como las técnicas de QLIA. A lo largo de los años, estas pruebas han ido variando a base de mejorar los antígenos utilizados para mejorar la especificidad y acortar el tiempo de detección de la infección, que actualmente es de 20 a 25 días (144). Pero estas pruebas sólo detectan anticuerpos formados por el individuo como respuesta a la infección por el virus. En este aspecto, el diagnóstico serológico ha intentado adecuarse a las demandas diagnósticas y epidemiológicas, y a contribuir a disminuir el número de pacientes no diagnosticados, gracias los ensayos de cuarta generación y que son capaces de detectar tanto anticuerpos contra el VIH como a uno de los antígenos más importantes del virus, el antígeno p24. Aunque ya fueron desarrollados en los noventa son en la actualidad los métodos que se recomiendan para el diagnóstico de la infección por el VIH debido a la presencia de altos niveles del antígeno en el plasma durante el breve período entre la infección y la seroconversión del VIH. El antígeno p24 es generalmente detectable unos días antes que los anticuerpos, por lo que en caso de que el paciente se encuentre en el período ventana, éste podrá ser igualmente diagnosticado adelantándose en unos 13-15 días (144). Presentan una sensibilidad del 89% al casi 100% en comparación con la detección del RNA (prueba que se consideraría la más sensible) y se estima que correspondería a aproximadamente unas 30.000-50.000 copias/mL de RNA del VIH (145). A pesar de la ventaja que se le puede tomar a la hora de realizar el diagnóstico de la infección por el VIH, las técnicas que primero detectarán un caso de infección serán las técnicas de detección de RNA viral ya que éste, será detectable incluso a los 10 días del momento de contagio. Debe tenerse en cuenta que las altas cargas virales van parejas a altas tasas de transmisión, por lo que el cribado y la elección de técnicas sensibles en esta fase es especialmente importante para prevenir la transmisión de la enfermedad. Las pruebas de cribado requieren posteriormente de la realización de pruebas confirmatorias que presentan alta especificidad.

- **Pruebas de diagnóstico de la infección reciente**

Es pues importante realizar una correcta identificación de las infecciones recientes por VIH para evaluar el patrón actual de la transmisión del VIH en una comunidad. Con este objetivo se han desarrollado diferentes ensayos que tienen en cuenta los eventos inmunológicos normalmente rápidos que ocurren poco después de la infección por VIH. De hecho, los ensayos convencionales para la detección de anticuerpos, antígenos o ácidos nucleicos, descritos anteriormente, no son capaces de distinguir una infección reciente de una crónica, excepto en el caso de detección de antígeno o RNA con anticuerpos negativos. Existen por tanto nuevos métodos con esta capacidad discriminatoria una vez confirmada la presencia de anticuerpos que se agrupan bajo el término RITA (*Recent Infection Testing Algorithm*) aunque también se les puede conocer como STARHS (*Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*). RITA es un nombre genérico acuñado en el 2009 para una serie de técnicas de laboratorio que distinguen la infección reciente de la crónica por el VIH. La definición de infección reciente depende de la prueba utilizada, pero se estima que es capaz de predecir si la infección se ha producido en los cuatro o seis meses previos.

El ensayo EIA "detuned" fue de los primeros en ser descritos. Éste se basa en la concentración de anticuerpos y ha sido de los más empleados. Son EIAs menos sensibles, de manera que los pacientes seropositivos que no reaccionan a estos ensayos, pero sí lo hacen a los EIA tradicionales, habrán sido infectados hace poco y serán diagnosticados de infección reciente. Otro ensayo RITA es el ensayo BED-CEIA que mide la proporción de las IgG dirigidas contra los antígenos del VIH (la proporción aumenta en la infección de larga duración). También existen ensayos fundamentados en la afinidad de los anticuerpos, conocidos como ensayos de avidéz (146,147).

Los ensayos de avidéz emplean técnicas de EIA utilizadas en el diagnóstico pero con modificaciones en el tratamiento de la muestra para poner en evidencia la afinidad antígeno-anticuerpo. Se sabe que la avidéz del anticuerpo IgG del VIH aumenta con el tiempo durante el primer año de la infección. Por lo tanto, los anticuerpos de alta avidéz indicarían una infección antigua. Para demostrar esto será necesario pretratar el suero del paciente con guanidina, sustancia que altera los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura secundaria del anticuerpo interfiriendo en la interacción con el antígeno. El tratamiento del suero con este agente, es muy eficaz para los primeros anticuerpos que presentarán baja avidéz, y determinará una falta de unión del anticuerpo al antígeno. Por el contrario, en las etapas posteriores de la infección, el aumento de la avidéz del anticuerpo al antígeno es mayor y determina una mayor resistencia al tratamiento con este agente, resultando en la unión del anticuerpo al antígeno. Se puede por tanto calcular un índice de avidéz que permitirá

establecer un punto de corte a partir del cual se estimará si los anticuerpos detectados presentan baja o fuerte avidéz.

- **Pruebas confirmatorias**

Posteriormente a la realización de las pruebas de cribado y en el caso de que éstas sean positivas, se realizan pruebas confirmatorias mediante ensayos de alta especificidad que permiten corroborar estos resultados iniciales. Hasta ahora los más usados son el *Western Blot* (WB) y el inmunoensayo en línea (LIA).

El WB es la prueba más emplada. Consiste en una tira de nitrocelulosa donde se han transferido los antígenos propios del VIH-1 a partir de un cultivo viral en linfocitos. Las proteínas virales se han separado en función de su peso molecular y carga eléctrica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior transferencia a un soporte de nitrocelulosa. En los LIA se utilizan antígenos recombinantes. Tanto el WB como el LIA pueden llevar antígenos de envoltura del VIH-2, para poder también diagnosticar la infección por este virus. Para valorar los resultados positivos se pueden aplicar varios criterios establecidos por distintas organizaciones en función del patrón de bandas encontrados (Figura 20). La ausencia de bandas se considera como resultado negativo y cualquier patrón de los no descritos en la figura 20, se cataloga como indeterminado (148). Los WB indeterminados con alguna banda de la envoltura suelen asociarse a pacientes en los estadios iniciales de la seroconversión. Por el contrario, la detección de bandas del core (p24) suele deberse a reactividades inespecíficas y no a verdaderas infecciones.

Criterios de positividad del WB para el diagnóstico de la infección por VIH-1	
<b>OMS</b>	Dos bandas de la envoltura (gp120/gp160, gp 41)
<b>FDA</b>	p24 + p32 + (gp41 o gp120/gp160)
<b>CDC</b>	Al menos, dos bandas de las siguientes: p24, gp41 y gp120/gp160
<b>CRSS</b>	Al menos, una banda del core (p24 o p32) y otra de la envoltura (gp41 o gp120/gp160)

Figura 20. Interpretación del WB según diferentes organizaciones. CRSS: Consortium for Retrovirus Serology and <sup>eden</sup> ser las causas de estos resultados (149). Normalmente responden a: a) la infección por VIH-2, un virus genéticamente alejado del VIH-1; b) los estadios iniciales de seroconversión, en los que todavía no se ha desarrollado el perfil completo de anticuerpos; c) estadios terminales de sida, y d) individuos tratados con terapia antirretroviral de alta eficacia en la fase aguda o reciente de la infección (150).

Actualmente la mayoría de los reactivos comerciales incluyen proteínas del VIH-2, que eliminan al menos uno de los factores anteriormente descritos como causa de indeterminación.

- **Algoritmos diagnósticos. Nuevas perspectivas**

El algoritmo actual con inmunoensayo más su posterior confirmación mediante WB o LIA deriva de las guías de los CDC, que se empezaron a aplicar a mediados de los años ochenta pero que son lentos, costosos y requieren de equipos sofisticados (145). Además, el WB puede tener reacciones cruzadas con el VIH 2 como hemos dicho anteriormente, por ello es necesario desarrollar nuevos algoritmos que permitan confirmar estas infecciones en zonas con menor disponibilidad de tecnologías. Además, actualmente se encuentra disponible un método serológico suplementario eficiente y rápido para diferenciar el VIH-2 del VIH-1 (151). La única prueba suplementaria aprobada por la FDA con la capacidad de diferenciar VIH -1 de VIH -2 es la prueba rápida multispot VIH-1/VIH-2 (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA).

Es importante revisar los algoritmos actuales para agilizar el diagnóstico de la infección por el VIH, con el propósito de por un lado reducir la transmisión del virus, que se ha demostrado que se produce fundamentalmente en las primeras semanas de la infección, y por otro, intentar que no se pierdan oportunidades de diagnóstico, disminuyendo el tiempo de espera para los resultados positivos, consiguiendo así la rápida notificación a los médicos y a los pacientes (145). Existen ya algoritmos alternativos para la detección de anticuerpos adoptados posteriormente por la OMS y la ONUSIDA basados en diferentes estrategias con el fin de eliminar las pruebas confirmatorias y reducir costes en los países con escasos recursos económicos (152). Además en estos nuevos algoritmos, las pruebas confirmatorias no se limitan tan sólo al WB o LIA. Esto aparece en el documento *Criteria for Laboratory Testing and Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection; approved guideline CLSI-M53-A* (2011), donde se incluye un algoritmo que indica que las muestras positivas mediante técnicas de cribado con ensayos de cuarta generación deben ser analizadas con un ensayo suplementario que sea capaz de confirmar y diferenciar anticuerpos del VIH -1 y VIH -2 (145). Este nuevo algoritmo se ha puesto en marcha en EEUU con muy buenos resultados (153). Asimismo, se han aceptado otras pruebas como confirmatorias, incluyendo algunas que alternativamente, podrían ser utilizadas como prueba de cribado, siempre que las primeras pruebas y las confirmatorias se utilicen conjuntamente como partes de un algoritmo aprobado (Figura 21).

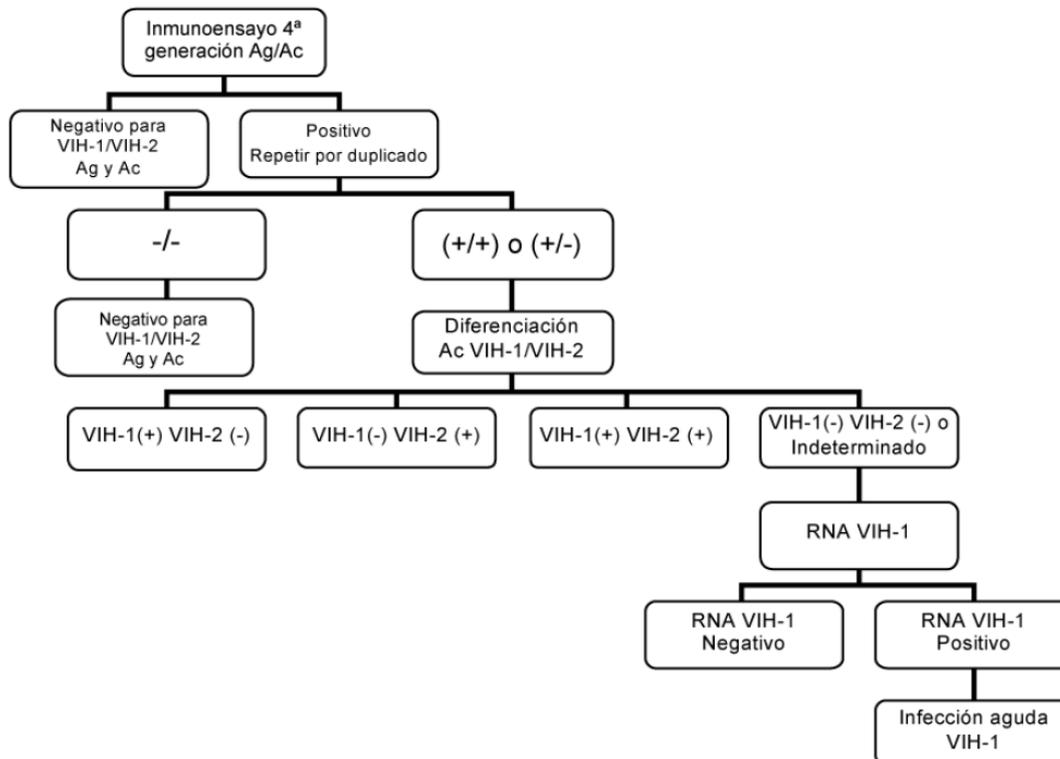


Figura 21. Nuevo algoritmo aprobado para el diagnóstico de la infección por el VIH 1 y 2. Extraído de Aguilera Guirao *et al* (145)

Las pruebas serológicas para la sífilis basadas en la detección de anticuerpos no treponémicos o treponémicos a lo largo de todas las etapas de la infección, siguen siendo el pilar básico del diagnóstico en la sífilis. Disponer de pruebas fiables es esencial para establecer el diagnóstico correcto e instaurar el tratamiento apropiado, especialmente en la fase de latencia, cuando no hay signos o síntomas de enfermedad.

Las pruebas no treponémicas se utilizan en gran medida para controlar el estado de la infección, mientras que las pruebas treponémicas se utilizan principalmente para confirmar la presencia de la infección. Las primeras, detectan anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra antígenos lipídicos (tales como cardiolipina y lecitina) liberados como consecuencia del daño celular tanto en el hospedador como en la bacteria (Figura 22). Las pruebas treponémicas detectan anticuerpos dirigidos específicamente frente al treponema.

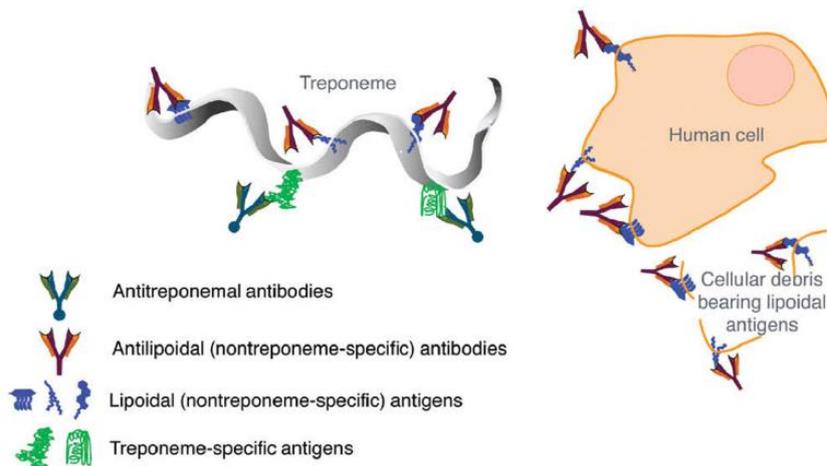


Figura 22. Anticuerpos detectados en las pruebas treponémicas y no treponémicas. Extraído de Soreng K *et al* (154)

- i. **Métodos reagínicos o no treponémicos.** Las pruebas no treponémicas detectan IgG o IgM frente a antígenos lipídicos inespecíficos. Los primeros antígenos de cardiolipina que usaron eran extractos crudos hechos a partir de hígados o corazones de vacuno por lo que los resultados falsos positivos eran comunes. En la actualidad, la cardiolipina utilizada es una preparación mucho más pura y con menos reacciones falsas positivas. Las pruebas no treponémicas más comunes son el RPR y el VDRL (*Veneral Research Disease Laboratory*). Pueden realizarse de forma cualitativa o cuantitativa permitiendo el seguimiento de un paciente tratado y están basadas en métodos de floculación macroscópica o microscópica respectivamente. Son técnicas manuales lo cual implica laboriosidad y puede conllevar a errores en la identificación de las muestras y su manipulación. Son por lo general pruebas sensibles pero poco específicas, ya que existen entidades en las que pueden aparecer falsos positivos (Figura 23). Otro problema a tener en cuenta es la posibilidad de obtener falsos negativos debido al fenómeno prozona (155). Éste se produce cuando la concentración de anticuerpo es muy alta; de esta forma, el antígeno se satura por los anticuerpos en exceso, evitando la formación de la matriz de antígeno-anticuerpo requerido para la aglutinación. El efecto prozona puede evitarse mediante diluciones seriadas del suero hasta que el título de anticuerpos sea suficiente para dar una aglutinación visible. Esto se debe hacer si la sospecha clínica de sífilis es alta y en la muestra obtenemos un resultado negativo, débilmente positivo o atípico. La utilidad de estas técnicas también radica en la capacidad de monitorizar la respuesta del paciente al tratamiento. Un descenso mínimo de cuatro veces el título de anticuerpos respecto al suero inicial, utilizando el mismo método no treponémico, indicaría respuesta al tratamiento instaurado y es un criterio de buena evolución. Los títulos de anticuerpos no treponémicos pueden variar durante el curso de la enfermedad no tratada. Las pruebas

cuantitativas VDRL o RPR se convierten en negativas 1 año después del tratamiento con éxito en la sífilis primaria y 2 años después en la terapia de la sífilis secundaria; la mayoría de los pacientes con sífilis tardía se negativizarán en aproximadamente el quinto año después del tratamiento (156).

La buena sensibilidad de las pruebas no treponémicas no se corresponde con su especificidad, por lo que un resultado positivo ha de ser confirmado con una prueba más específica como son las pruebas treponémicas.

- ii. **Métodos treponémicos.** Éstos métodos detectan anticuerpos IgM e IgG dirigidos específicamente frente a antígenos de *T. pallidum*. Los ensayos treponémicos son cualitativos y, en general están diseñados para detectar uno o más de los anticuerpos generados en respuesta a *T. pallidum*. Para realizar estas pruebas existen comercializados varios tipos de formatos. Existen ensayos manuales como FTA-ABS (*fluorescent treponemal antibody absorption*) o el TPHA (*Treponema pallidum* hemaagglutination), otras versiones tanto manuales como automatizadas incluyen inmunoblots, microbeads inmunoensayos, enzimoimmunoanálisis (EIA), y métodos basados en la QLIA. Los ensayos pueden usar antígenos ya sea naturalmente purificados o recombinantes. Al igual que en las pruebas no treponémicas, también pueden dar reacciones falsas positivas (Figura 23).

Aunque estas pruebas serían relativamente caras como técnicas de cribado, algunos laboratorios clínicos con gran volumen de muestras han comenzado a utilizar las pruebas treponémicas específicas automatizadas.

Pruebas no treponémicas	Pruebas treponémicas
Edad avanzada	Edad avanzada
Endocarditis bacteriana	Brucelosis
Brucelosis	Cirrosis hepática
Chancroide	Adicción a drogas
Varicela	Herpes genital
Adicción a drogas	Hiperglobulinemia
Hepatitis	Vacunaciones
Purpura trombocitopénica idiopática	Mononucleosis infecciosa
Vacunaciones	Leptospirosis
Alteraciones en las inmunoglobulinas	Lepra
Mononucleosis infecciosa	Enfermedad de Lyme
Usuarios a drogas por vía parenteral (UDVP)	Malaria
Gestación	Gestación

Figura 23. Causas de falsos positivos en las pruebas no treponémicas y treponémicas

Esto es lo que se ha llamado el algoritmo reverso (157) que ha supuesto un cambio importante en la manera de diagnosticar la sífilis. El algoritmo reverso implica realizar la confirmación de este resultado con pruebas no treponémicas ya que es capaz de identificar pacientes con buena respuesta al tratamiento y/o sífilis ya curadas, así como pacientes con sífilis no tratada. Sin embargo, también puede dar lugar, en un número elevado de casos, a falsos positivos (valor predictivo positivo bajo), sobre todo en poblaciones de baja prevalencia. Por esta razón se recomienda a su vez confirmar este resultado con otra prueba treponémica que sea diferente a la usada como cribado (20).

### Algoritmo tradicional versus algoritmo reverso. Nuevas perspectivas

Durante muchos años, el algoritmo tradicional para el diagnóstico de la sífilis fue la realización de una prueba no treponémica como screening seguido de la confirmación mediante un ensayo treponémico. La disponibilidad comercial de un número cada vez mayor de ensayos treponémicos automatizados que incluyen formatos EIA y QLIA, ha sugerido un enfoque alternativo para la detección de la sífilis. Éstos requieren mucho menos interacción técnica, son fáciles y rápidos de realizar, y están optimizados para trabajar con un alto volumen de muestras y dar una respuesta rápida. Por lo tanto, no es sorprendente que muchos laboratorios hayan invertido el orden en que se realizan ambas pruebas (Figura 24). Esta nueva aproximación es capaz además, de detectar aquellos casos de sífilis tratadas o ya que los anticuerpos no treponémicos persisten para siempre (158). Además de ser capaz de detectar estos casos más extremos también permitirán diagnosticar aquellos casos de sífilis primaria muy incipiente en los que las pruebas no treponémicas darían resultados negativos. Asimismo, se podría evitar el fenómeno prozona, sin necesidad de tener en cuenta si hay una alta sospecha de sífilis y sin necesidad de realizar diluciones de los sueros sospechosos. Una consideración importante con las nuevas pruebas de sífilis es que su VPP y VPN depende de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada ya que el hecho de detectar inicialmente anticuerpos treponémicos puede dar lugar a un mayor número de resultados positivos en poblaciones con alta incidencia de sífilis (157). También es importante tener en cuenta que tras la obtención de un resultado positivo en una prueba treponémica inicial es necesario realizar una prueba no treponémica. Existe un número no despreciable de pacientes en los que la primera prueba es positiva pero la segunda es negativa, en estos casos es necesario confirmar este resultado con otra prueba treponémica clásica como puede ser el TPHA que puede o no verificar nuestro resultado inicial. Estos resultados discordantes pueden ocurrir en pacientes con sífilis pasada, tratada o no tratada; sífilis temprana; o en pacientes que nunca han tenido sífilis. Estudios recientes sugieren que el algoritmo de detección inversa

puede provocar un aumento de los seguimientos de pacientes, tratamientos excesivos y potencialmente mayor coste debido a estas discordancias (159) pero en cambio agilizaría el tratamiento de las muestras.

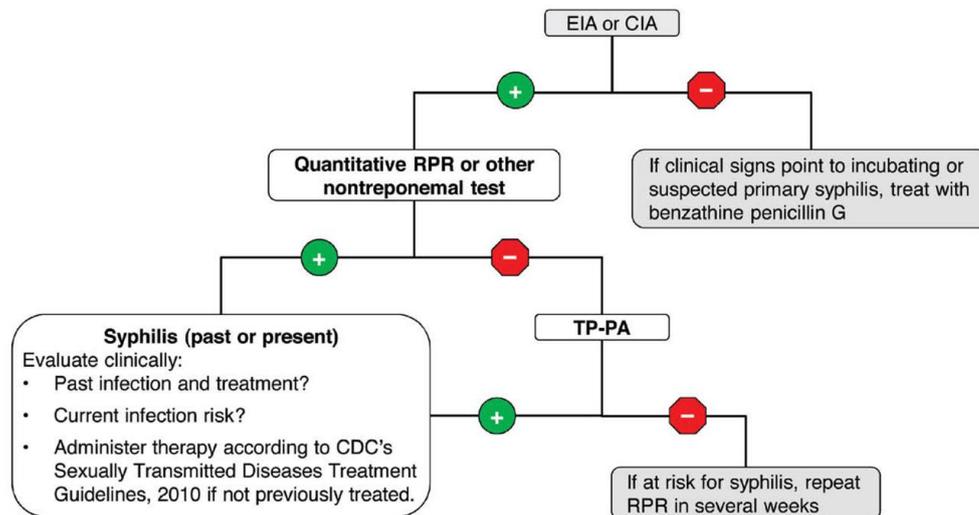


Figura 24. Algoritmo reverso recomendado por el CDC. Extraído de Soreng K *et al* (154)

\*CIA=QLIA

Lo que está claro es que cada vez más laboratorios están incluyendo este nuevo flujo de trabajo en la rutina. De hecho, el Reino Unido recomienda su uso en el manejo de la sífilis (160) y tanto en Estados Unidos como otros países europeos están adoptando ya esta nueva perspectiva.

### 1.6 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA DE LAS ITS

Se estima que más de 340 millones de nuevos casos de ITS curables pueden producirse cada año en todo el mundo en los hombres y mujeres de edades comprendidas entre los 15 y 49 años, con una proporción más grande en las regiones del sur y el sudeste asiático, seguida del África Subsahariana, América Latina y el Caribe (161). También otras infecciones con peor evolución como la infección por el VIH o el virus de la hepatitis B tienen también una alta incidencia en el mundo con complicaciones importantes. A nivel mundial, todas estas infecciones constituyen una enorme carga sanitaria y económica, especialmente para los países en desarrollo, donde representan el 17% de las pérdidas económicas causadas por la mala salud (162). Las ITS y sus complicaciones se encuentran entre las primeras causas de enfermedades por las cuales se solicita atención médica entre los adultos. Asimismo, siguen existiendo aún hoy grupos poblacionales especialmente a riesgo como el colectivo de la gente joven o los y las trabajadoras del sexo que son una diana para estas enfermedades.

El peso que puede tener en la sociedad el problema de las ITS, y su probada asociación con la transmisión del VIH, pone de manifiesto la necesidad de investigar nuevos enfoques para prevenir y controlar su propagación como podría ser la adopción de medidas en salud pública entre los que destacarían los programas de prevención. Ésto pueden estar formado por diversas actuaciones como las siguientes:

- A. Promoción de un comportamiento sexual más seguro; con el consiguiente fortalecimiento del uso de preservativos.
- B. Fomentar la de demanda de asistencia sanitaria.
- C. Integrar el control de las ITS en atención primaria y otros servicios de asistencia sanitaria.
- D. Prestación de servicios específicos para las poblaciones que corren más riesgo.
- E. Detección precoz de las ITS mediante técnicas de laboratorio de mayor sensibilidad.
- F. Detección precoz y control de los casos de ITS congénitas.

**A. Promoción de un comportamiento sexual más seguro; con el consiguiente fortalecimiento del uso de preservativos.**

Hay pruebas suficientes para demostrar que los preservativos, cuando se usan correctamente, son eficaces en la protección contra la transmisión del VIH y reducen el riesgo de otras ITS como las infecciones por herpes simple, infecciones gonocócicas tanto en hombres como en mujeres, infecciones por clamidia, sífilis e infecciones por tricomonas. Asimismo, el uso del preservativo también da lugar a la regresión acelerada en el cuello uterino y en el pene del virus del papiloma humano (VPH) (163). Es por tanto importante intentar fomentar su uso, así como recomendar la abstinencia cuando algún síntoma aparezca y fomentar la comunicación a las parejas sexuales de los últimos meses. Las dificultades en cuanto al uso del preservativo que se han encontrado en algunos países ha supuesto realmente una lacra para el desarrollo de estas políticas de salud reproductiva.

**B. Fomentar la demanda de asistencia sanitaria.**

Aún hoy, el padecimiento de una ITS supone un estigma social difícil de superar. Una vez que la consulta médica se ha realizado, esto puede evitar la cadena de transmisión que puede conllevar una ITS. Las encuestas de salud en los países en desarrollo indican que una importante proporción de personas con ITS sintomáticas buscan tratamiento en sectores informales y no cualificados y que sólo asistirán a los servicios de salud públicos después

de que los tratamientos alternativos hayan fallado (164-165). Un estudio sobre la actuación de médicos privados en Sudáfrica mostró que menos de uno de cada 10 pacientes recibieron dosis adecuadas de antibióticos y en el 75% de los casos los medicamentos prescritos eran incorrectos (166). Cuando un paciente consulta por una ITS se recomienda evaluar la posibilidad de que padezca otra enfermedad venérea concomitante mediante una historia clínica, en la que se debe detallar el grado de promiscuidad, el tipo de relaciones sexuales que mantiene y si usa o no preservativo. Se debe realizar un examen genital completo y una exploración general, para descartar la presencia de visceromegalias y adenopatías. Asimismo se deben recoger muestras de los exudados para examen directo, cultivo y PCR; y además se solicitarán serologías para sífilis, hepatitis B y C y VIH.

**C. Integrar el control de las ITS en atención primaria y otros servicios de asistencia sanitaria**

A la vista de los datos anteriores no es difícil pensar que es primordial disponer de buenos profesionales para conseguir una mejor atención.

Es muy importante realizar una correcta introducción de las actividades de prevención y atención a través de todos programas de atención primaria, incluyendo la salud sexual y los programas de salud reproductiva y el VIH. El éxito de los programas integrados para ITS, VIH y la tuberculosis se ha documentado en varios países. Estos programas son llevados a cabo generalmente por los centros de atención primaria. La formación continuada de los profesionales de la salud es fundamental para frenar la evolución de las ITS en la comunidad ya que, el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz de las ITS es un componente esencial de los programas. Para ello es importante que el colectivo médico realice un manejo sindrómico de los casos, seguido de un tratamiento dirigido a las causas más comunes del síndrome. La gestión se simplifica mediante el uso de diagramas de flujo y prescripciones normalizadas. Este enfoque es particularmente importante en entornos en los que los medios diagnósticos son precarios o poco fiables. Por ello el manejo en los centros de atención primaria en el caso de infecciones no complicadas, es importante ya que la cercanía de este profesional con el paciente es mayor. Es importante saber discernir qué patología debería derivarse a un especialista para su correcto manejo y seguimiento. El manejo sindrómico de las ITS conduce a un tratamiento inmediato, no siempre basado en que el paciente regrese a la consulta para obtener su resultados (167), si no en intentar romper la cadena epidemiológica.

Los gobiernos y la comunidad médica deberían considerar favorecer el estímulo la colaboración efectiva entre los sectores privados y públicos (167) ya que el control de las ITS son una combinación tanto de políticas que dependen del gobierno de un país como de entidades que pueden aportar soporte financiero, como es el caso del Fondo Mundial de

Lucha contra el SIDA (*Global Fund to Fight AIDS*), estrategias e iniciativas para ampliar el acceso a los antirretrovirales y otros fármacos.

### D. Prestación de servicios específicos para las poblaciones que corren más riesgo.

A la hora de realizar el análisis estadístico de cuáles son los individuos en los que hay una mayor prevalencia de las ITS es claramente el colectivo de jóvenes de entre 15 a 24 años los que presentan mayor número de nuevos casos declarados. Además estos casos suelen ocurrir también entre HSH (11). Esto es lo que en salud pública se define como un “*Core Group*”. El concepto de un *core group* fue descrito por Yorke *et al* en 1978 en el contexto de la infección gonocócica como una subpoblación que muestra prevalencia suficientemente alta de la enfermedad a estudio, es decir de más del 20%, para realizar con éxito alguna estrategia anticipada (168). Existen evidencias que sugieren que actividades dirigidas a grupos básicos pueden conducir a una disminución de la prevalencia de las ITS tanto en el núcleo de estudio como en la población general. Durante la década de los ochenta, se observó una disminución importante en los casos de gonorrea en Canadá y en EE.UU., tras la aplicación de los programas de cribado y una disminución en las conductas sexuales de alto riesgo como el sexo sin protección entre HSH, posiblemente debido al temor de emergente de VIH. La incidencia de casos notificados de infección gonocócica disminuyó en un 71,3%, pasando de 431,5 en 1981 a 124 casos por cada 100000 habitantes en 1996, en la población general (169). Un colectivo importante en el que focalizar los esfuerzos es el de HSH. Los datos sugieren que son el grupo con mayor incidencia de ITS y es por lo tanto este grupo en el que mayores campañas de prevención y facilidades a la hora de realizar un diagnóstico y seguimiento de una ITS tienen lugar (170,171). Asimismo el colectivo de jóvenes también es considerado un grupo a estudio (172). Los CDC recomiendan el cribado anual de clamidia en todas las mujeres sexualmente activas de menores 25 años y en las mujeres de mayor edad con factores de riesgo específicos (por ejemplo, nuevas o múltiples parejas sexuales y/o parejas sexuales con otras relaciones sexuales), así como la detección de la gonorrea en las mujeres sexualmente activas que están en mayor riesgo de infección (como las menores de 25 años). No se recomienda el cribado de rutina para clamidia y gonococo en la población general. También recomiendan realizar pruebas de detección de clamidia en los hombres jóvenes sexualmente activos en contextos de alta prevalencia (27).

### E. Detección precoz de las ITS mediante técnicas de laboratorio de mayor sensibilidad.

El uso de la biología molecular ha abierto el camino a una nueva forma diagnóstica más eficaz en relación con la que se disponía hasta el momento. Estos métodos presentan mejor sensibilidad y especificidad, cualidades especialmente importantes en los casos de ITS asintomáticas o en estadios incipientes; los cuales, a pesar de la ausencia de síntomas, pueden

ser un elemento en la propagación así como diana por las posibles complicaciones. Como resultado, identificar a las personas infectadas, reduciría el riesgo de las complicaciones y su transmisión. La detección puede ser más rentable si puede orientarse a subgrupos de población en riesgo debido al alto coste de estas pruebas.

A la hora de elegir un test adecuado hay que tener en cuenta la prevalencia local de la enfermedad ya que está determinará, en parte, el valor predictivo de pruebas de laboratorio. Por lo tanto, la vigilancia para determinar la prevalencia local proporciona datos importantes para elegir pruebas para enfermedades de transmisión sexual (7). En muchos casos, las pruebas moleculares se prefieren sobre métodos de diagnóstico convencionales por su superior sensibilidad y especificidad, tiempo de respuesta menor, alto rendimiento, y la oportunidad para la automatización. En otras como en el caso de la infección por el VIH o la sífilis, la serología sigue siendo la opción más recomendada.

En general, se ha evolucionado a un diagnóstico sindrómico que permitiría detectar múltiples microorganismos a partir de una única muestra. Esto no sólo es aplicable en la consulta del médico, sino que se están empezando a implementar el *self collected*, auto-recogida, para muestras no invasivas, como los exudados vaginales o la orina. En general estas aproximaciones tienen cierto éxito según la bibliografía (173,174).

#### F. Detección precoz y control de los casos de ITS congénitas

La prevención de la infección congénita y perinatal es un problema de salud pública reconocido en todo el mundo y ha dado lugar a la implantación de programas de control por parte de las autoridades sanitarias de diferentes países. Dentro de las posibles infecciones implicadas en este fenómeno, las ITS pueden producir complicaciones en el embarazo y tener efectos graves tanto en la mujer como en el recién nacido. Algunos de estos problemas pueden ser diagnosticados antes del nacimiento y otros en el momento del nacimiento, pero algunos no serán descubiertos hasta meses o años después del mismo. La mayoría de estos problemas se pueden prevenir si la madre recibe atención médica regular durante el embarazo. Esto incluye pruebas para ITS a partir del primer trimestre de gestación, así como un seguimiento trimestral por parte del obstetra. La detección y el tratamiento de las ITS en las mujeres embarazadas es una forma de evitar complicaciones tanto en la madre y como del recién. Los CDC en sus guías del 2010 recomiendan qué tipo de infecciones y cuándo testarlas. Figura 25 (39).

Tipo de infección	Recomendaciones del CDC
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Screening de todas las mujeres embarazadas en la primera visita prenatal y en el tercer trimestre si es menor de 25 años de edad y/o grupo de alto riesgo (mujeres mayores de 25 años, que viven en una zona de alta incidencia, infección previa, otras ITS, nuevas o múltiples parejas sexuales, no uso de preservativo, trabajadores del sexo, consumo de drogas)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Screening de todas las mujeres embarazadas en la primera visita prenatal y en el tercer trimestre si es menor de 25 años de edad y/o grupo de alto riesgo
Sífilis	Screening de todas las mujeres embarazadas en la primera visita prenatal; durante el tercer trimestre repetir el control de las mujeres si hay alto riesgo de sífilis o que viven en zonas con un alta incidencia, y / o los que no fueron probados previamente o ha tenido un resultado positivo en el primer trimestre
Vaginosis bacteriana	Buscar en mujeres embarazadas que presentan síntomas o se encuentran en alto riesgo de parto prematuro
<i>T. vaginalis</i>	Buscar en mujeres sintomáticas
Herpes (HSV)	Buscar en mujeres sintomáticas
HIV	Screening de todas las mujeres embarazadas en la primera visita prenatal y en el tercer trimestre si hay alto riesgo de infección por VIH
Hepatitis B	Screening de todas las mujeres embarazadas en la primera visita prenatal. Volver a testar en aquellas con comportamientos de alto riesgo y/o si presentan de hepatitis en el momento del parto. Los factores de riesgo incluyen: más de una pareja sexual en los anteriores 6 meses, diagnóstico de otra ITS, uso reciente o actual de drogas inyectables, y un compañero sexual con serología positiva para hepatitis B.
Virus del papiloma humano	No hay suficiente evidencia para hacer una recomendación
Hepatitis C	Todas las mujeres embarazadas con alto riesgo en la primera visita prenatal

Figura 25. Recomendaciones del CDC sobre el cribado de ITS en mujeres embarazadas

La importancia de la infección congénita se ha desplazado hacia el periodo prenatal como resultado en la mejora del diagnóstico en este periodo. Aunque muchas de estas infecciones siguen siendo potencialmente graves en mujeres de alto riesgo, las políticas sanitarias de los países deben ser revisadas de acuerdo con la prevalencia actual. La investigación en la prevención mediante la vacunación en el caso de la hepatitis B, así como en el tratamiento prenatal con el fin de prevenir la infección congénita o sus complicaciones es fundamental. Estas tareas han requerido un esfuerzo importante a nivel mundial fundamentalmente para la sífilis y el VIH. La infección del niño por el VIH supone la adquisición de una enfermedad crónica que potencialmente acorta la esperanza de vida y que supone un enorme coste humano, social y económico. Por otra parte, son conocidas las consecuencias que la sífilis puede ocasionar. Sin tratamiento, de un 50% a un 80% de las gestaciones con sífilis acabarán de forma adversa, en forma de aborto, muerte neonatal, parto prematuro, bajo peso al nacer e infección congénita con diversos grados de afectación. De hecho, la mortalidad y morbilidad infantil como resultado de la sífilis materna se concentran en países con bajo acceso al estudio prenatal o con bajas tasas de detección de la sífilis (175). Con el conocimiento actual, está fuera de toda duda la necesidad del cribado serológico de la lúes, hepatitis B y VIH y así lo recomiendan grupos de expertos de las diferentes sociedades científicas implicadas en las infecciones neonatales, como es el caso de la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia).

## 2.JUSTIFICACIÓN

La evolución de la sociedad actual hace necesario un desarrollo tecnológico para comprender los fenómenos sociales que están teniendo lugar. Esta evolución es aplicable asimismo, al campo de la medicina ya que la comprensión de las enfermedades que afectan al hombre, así como su correcto diagnóstico, es esencial para una mejora de las condiciones de salud mundial.

Las ITS tienen importancia desde diferentes puntos de vista, lo cual las hace importantes para que un correcto diagnóstico sea el pilar básico para su control.

El **primer** punto de vista a abordar es el epidemiológico. Las ITS son una de las enfermedades con mayor relevancia social. Su prevalencia, su incremento en los últimos años y el hecho de ser enfermedades prevenibles implica que sean infecciones en las que se puede actuar con políticas de educación sanitaria y sexual basadas en los datos epidemiológicos. El problema reside en que para poder aplicar estas políticas es preciso conocer la incidencia, la prevalencia y los modos de transmisión. Por eso es importante disponer de herramientas diagnósticas que aporten datos fiables y que aumenten el conocimiento de las ITS en la sociedad. La infección por VIH es una pandemia que se ha cobrado la vida de millones de personas en todo el mundo desde el primer caso reconocido en diciembre 1981 de acuerdo con la OMS y el Programa de las Naciones Unidas sobre el VIH / SIDA (ONUSIDA) (176). La estimación de la incidencia del VIH, o la velocidad a la que la nueva infección por el VIH se adquiere, es primordial para evaluar el impacto de las medidas de prevención adoptadas, y para identificar poblaciones en las que aplicar intervenciones destinadas a prevenir la infección o tratar la infección temprana. En este aspecto es especialmente importante estimar el momento de la infección en que se encuentra la persona a la que se le acaba de diagnosticar la infección por el VIH.

Diferentes metodologías basadas en técnicas serológicas se han utilizado con este fin, todas ellas capaces de clasificar las infecciones por VIH en función de si se adquirieron o no en el pasado reciente (generalmente dentro de los cuatro a 12 meses previos). Estos métodos se engloban bajo el acrónimo RITA y permiten estimar lo reciente que ha sido la infección por el VIH en determinados grupos poblacionales.

Uno de estos tests consiste en determinar la avidéz de los anticuerpos frente al VIH en personas ya infectadas. El análisis de la avidéz de los anticuerpos (la fuerza de unión entre el antígeno o proteína viral y de los anticuerpos específicos contra el VIH) se basa en la premisa de que los anticuerpos de baja avidéz son sugestivos de infección reciente. En la actualidad, ninguno de los ensayos serológicos disponibles utilizados para la detección de infecciones recientes por

VIH son ideales debido a las falsas tasas de infecciones recientes que estiman. Con el fin de minimizar estos falsos diagnósticos y mejorar la precisión de las estimaciones de incidencia, el mejor enfoque es el uso de más de un ensayo serológico en paralelo tal y como sugiere la OMS (177). Existen diversos formatos del ensayo, incluyendo manuales y automatizados que pueden ser utilizadas en los laboratorios, permitiendo así que los datos obtenidos en diferentes áreas geográficas y poblaciones puedan compararse (178). Desde una perspectiva de salud pública, estas pruebas se aplican para estimar la proporción de nuevos diagnósticos de VIH adquiridos recientemente en una población, para la descripción epidemiológica de los casos, y para estimar la tasa de incidencia del VIH en la población. El objetivo del estudio fue evaluar la exactitud del ensayo VITROS avidity VIH para detectar la infección reciente por VIH y la capacidad de discriminar entre infección reciente en infección crónica. Tras las consiguientes validaciones, el método puede ser adoptado como una herramienta más para estimar la infección reciente por VIH.

La sífilis es también un problema de Salud Pública. Su diagnóstico requiere el uso de dos pruebas: una prueba no treponémica o reagínica (VDRL o RPR) y una prueba treponémica (FTA-ABS, TPHA, EIA, QLIA, inmunoblots, o incluso POC tests). El uso únicamente de un tipo de prueba es insuficiente para el diagnóstico y puede dar resultados falsos negativos en personas con sífilis primaria y falsos positivos en personas sin la enfermedad.

Debido al gran volumen de muestras que algunos laboratorios clínicos reciben al cabo del día, cada vez se están evaluando más el uso de pruebas treponémicas automatizables, normalmente por EIA o QLIA como prueba inicial de screening (179). El contexto actual hace necesario una mayor automatización del diagnóstico serológico de la sífilis. Para ello se evaluó el ensayo diagnóstico Vitros Sífilis TPA (un ensayo treponémico de QLIA) comparado con dos ensayos treponémicos de EIA tradicionales, así como el uso de esta plataforma como ensayo inicial del algoritmo reverso. La facilidad de uso, automatización y su alto rendimiento hacen que el Vitros Sífilis TPA sea una buena elección para el cribado de la sífilis.

En **segundo** lugar la importancia del correcto diagnóstico de estas enfermedades reposa en la salud individual. Estas son enfermedades que tienen graves consecuencias tanto en mujeres (esterilidad, embarazo ectópico) como en ambos sexos (el sida es ya una enfermedad crónica). Con carácter individual, los test RITA son útiles para clasificar clínicamente la infección por VIH, lo que lleva a tomar diferentes decisiones sobre el tratamiento y el estudio de contactos. En cuanto a la sífilis, cabe decir que al identificar este abanico de posibilidades con el nuevo algoritmo, las personas con una prueba inicial treponémica positiva, se les debe realizar una prueba no treponémica estándar con titulación (RPR o VDRL). Si la prueba no treponémica es negativa, el laboratorio debe realizar una tercera prueba treponémica diferente de la usada al

inicio para confirmar los primeros resultados. Este algoritmo reverso puede identificar a personas tratadas previamente, a personas con sífilis no tratada o tratada de forma incompleta y las personas con resultados falsos positivos que pueden tener baja probabilidad de sífilis.

Las ITS que cursan con clínica en el aparato genitourinario pueden tener diversas etiologías, que muchas veces se presentan como coinfecciones. Las nuevas herramientas de PCR multiplex han conseguido minimizar este inconveniente. Pero también han sido útiles para mejorar los problemas de sensibilidad e idoneidad del tipo de muestras utilizadas para el diagnóstico microbiológico convencional. Este avance en el diagnóstico ha contribuido al aumento en el número de casos detectados en toda Europa (128, 180), evitando complicaciones en el individuo infectado. Además, microorganismos ya consolidados como causantes de ITS, como es el caso de *M. genitalium* (102), sólo pueden ser diagnosticados desde un punto de vista práctico con técnicas moleculares debido a la dificultad del cultivo. Existen en el mercado múltiples ensayos capaces de detectar infecciones mixtas por técnicas moleculares que detectan simultáneamente *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*. A lo largo de los años se han ido desarrollando ensayos con posibilidad de detectar más de 2 microorganismos (181-183).

En este aspecto, se procedió a la evaluación de una nueva técnica de biología molecular mediante TOCE™ technology y su comparación con los métodos convencionales como el cultivo u otra técnica de PCR utilizados en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos respaldan el uso de esta técnica como herramienta de diagnóstico sindrómico de las ITS por varios motivos. Uno de ellos por la versatilidad a la hora de poder utilizar diferentes tipos de muestras (orina, exudados vaginales, endocervicales, rectales...), también la capacidad de detectar microorganismos implicados en ITS que hasta el momento, eran de difícil diagnóstico como es el caso de *M. genitalium* y finalmente, porque permite de esta forma mejorar el diagnóstico etológico en una entidad en la que pueden estar implicados diferentes microorganismos y por lo tanto pueden tener lugar fallos en el tratamiento si hay un infradiagnóstico.

El **tercer** problema es la capacidad de favorecer resistencias en todos los microorganismos debido al uso indebido de tratamientos antimicrobianos, así como las repercusiones económicas que presentan estas infecciones. El sida es una enfermedad crónica que requiere tratamientos muy caros de por vida, así como otras ITS actualmente emergentes como la infección por el VHC.

Asimismo, las complicaciones de ciertas ITS como la esterilidad, haría necesario un tratamiento de estos pacientes *a posteriori*.

Es un hecho que las ITS son un problema importante en salud pública y que las mejoras en el diagnóstico expuestas en esta Tesis pueden contribuir a mejorar el conocimiento, la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de este importante síndrome

### 3. OBJETIVOS

1. Validar la precisión de un ensayo de avidéz automatizado para discriminar entre infección reciente y crónica por el VIH-1 utilizando la plataforma VITROS 3600
  - 1.1. Evaluar la precisión del ensayo de avidéz automatizado VITROS® Anti-HIV1+2 assay para la detección cualitativa de anticuerpos frente al VIH-1 y el VIH-2.
  - 1.2. Comparar el método VITROS® Anti-HIV1+2 assay con el ensayo BED-CEIA.
  - 1.3. Evaluar la tasa de infecciones crónicas por VIH-1 clasificadas incorrectamente como recientes en los pacientes en tratamiento antirretroviral combinado y en pacientes con un recuento de CD4 < 200 céls/L.
2. Evaluar el rendimiento del ensayo de quimioluminiscencia Vitros sífilis TPA para la realización del cribado de sífilis.
  - 2.1. Comparar el ensayo de quimioluminiscencia Vitros sífilis TPA con otros dos inmunoensayos enzimáticos treponémicos: Enzygnost sífilis IgG IgM y Bioelisa Sífilis 3.0.
  - 2.2. Estudiar la aplicabilidad del algoritmo diagnóstico de la sífilis como técnica de cribado en un laboratorio de microbiología.
3. Evaluar la utilidad del ensayo de PCR en tiempo real STI-7 Anyplex™II (Seegene, Seúl, Corea), para la detección y el diagnóstico de las ITS causadas por siete de los principales agentes causales: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*.
  - 3.1. Evaluar aplicabilidad de la ensayo de PCR en tiempo real STI-7 Anyplex™II (Seegene, Seúl, Corea), para la detección y el diagnóstico de las ITS en un laboratorio de microbiología.
  - 3.2. Comparar el ensayo de PCR en tiempo real STI-7 Anyplex™II (Seegene, Seúl, Corea) con las técnicas de referencia utilizadas Abbott *RealTime* CT/NG PCR Assay y cultivo bacteriológico y parasitológico para cada microorganismo y según el tipo de muestra.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Artículo 1

**Evaluación de una técnica de avidéz para la detección de infección reciente por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 utilizando un inmunoensayo automatizado de quimioluminiscencia.**

Gema Fernández; Christian Manzardo; Alexandra Montoliu; Colin N Campbell; Gregorio Fernández; Jordi Casabona; José M Miró; Belén Rivaya; Lurdes Matas, Victoria González.

El Anti VIH1+2 Vitros es un inmunoensayo cualitativo de quimioluminiscencia que utiliza la tecnología Intellicheck®. En la primera etapa de este ensayo, los anticuerpos del VIH presentes en la muestra se unen con el antígeno recombinante del VIH que recubre los pocillos de reacción (cuatro antígenos recombinantes derivados de VIH-1 (p24), VIH-1 sobre (p10 y p13) y VIH-2 sobre AL). En la segunda etapa, el conjugado (peroxidasa de rábano picante marcada) se une específicamente a cualquier anti-HIV-1 o anti-HIV-2 (IgG e IgM) capturada los pocillos del primer paso. El conjugado unido es medido por una reacción luminiscente. Un reactivo que contiene substratos luminógenos es añadido a los pocillos junto a un agente de transferencia de electrones. El conjugado cataliza la oxidación del derivado de luminol produciendo luz, que se medirá con un luminómetro. Los resultados se presentan como la ratio S/CO (sample/cutoff) con valores positivos  $\geq 1.00$ . Para el estudio de avidéz se analiza la muestra en presencia de guanidina y en dilución con PBS comparando ambos valores. El índice de avidéz (AI) se calcula utilizando la fórmula siguiente:  $AI = (\text{ratio S/CO de la alícuota de guanidina} / \text{ratio S/CO de la alícuota con PBS})$ . Se ha evaluado la precisión mediante el análisis por duplicado y repetido durante diez días de nueve muestras. Para la validación del ensayo se analizaron 154 muestras de 47 pacientes, recogidas en distintos momentos de la infección por VIH. Para la comparación con BED-CEIA (otra técnica aplicable en RITA) se han estudiado 164 con fecha de seroconversión conocida. Finalmente para la determinación de tasa de FRR (false recent rate) se analizaron muestras de 73 pacientes con recuentos  $< 200$  CD4 y 165 en tratamiento con antirretrovirales.

Los resultados del estudio de precisión mostraron que el ensayo VITROS avidity VIH es altamente reproducible con una variabilidad de menos del 5% (artículo 1, tabla 1). La exactitud del ensayo se validó mediante la realización de curvas ROC (*receiver operating characteristic*), cuyo análisis reveló que un valor de punto de corte  $\leq 0,51$  (artículo 1, Figura 2) presenta una sensibilidad y especificidad del 86,7% (IC 95%:72,5-94,5) y 86,2% (IC 95%:78,0-91,8) respectivamente. Este valor sería por lo tanto el punto de corte óptimo para estimar las

infecciones recientes por VIH. En este sentido Suligoi *et al*, obtuvo datos muy similares de sensibilidad y especificidad con la plataforma AxSYM HIV 1/2 gO (87.9% y 86.3% respectivamente) con un índice de avidez óptimo de 0.99 (184). Asimismo, Wang *et al* estimó el punto de corte óptimo en 0.8 con el ensayo de avidez con guanidina modificado de Abbott AxSYM HIV Antigen/Antibody Combo con sensibilidad de 90.2% y especificidad de 83.8% (185) La elección del punto de corte debe variar en función de si esta técnica se va a utilizar con fines epidemiológicos o si la utilizamos con fines clínicos. En este punto debemos elevar el punto de corte para obtener una mayor sensibilidad/especificidad.

Por otro lado, al validar el ensayo de avidez VITROS avidity VIH con la técnica BED-CEIA, ensayo diseñado exclusivamente para la identificación de la infección reciente por VIH (186), la proporción de sueros correctamente clasificados como infecciones de larga evolución fue ligeramente mayor con el ensayo de avidez de los anticuerpos por la plataforma VITROS 3600 que con el método BED-CEIA. La discordancia entre ensayos se puso de manifiesto en 19/164 (11.58%) de las muestras analizadas con este fin, 18 de las cuales correspondían a infecciones recientes según el método BED-CEIA y infección de larga duración mediante VITROS 3600. De éstas, tan sólo uno de los sueros fue recogido un mes después de la seroconversión, el resto se tomaron tras más de un mes después de la seroconversión. Asimismo, la utilización del ensayo de avidez VITROS avidity VIH permite una mayor automatización, lo que conduce a una mejor reproducibilidad. De entre las muestras analizadas por VITROS avidity VIH, en diez de ellas (6%), se obtuvo un resultado indeterminado (artículo 1, figura 3), pero al excluir estas muestras del análisis, no se observaron cambios significativos en cuanto a la concordancia entre ambos ensayos ( $\kappa=0.78$  IC95%: 0.68-0.87) lo que da robustez al estudio.

Los errores de clasificación entre infección de larga evolución o infección reciente fueron confirmados mediante la revisión del nivel de linfocitos CD4, considerando que los pacientes que presentan niveles de CD4 inferiores a 200/ $\mu\text{L}$  a pesar del tratamiento antirretroviral correspondían a infecciones crónicas. El ensayo de la avidez VITROS avidity VIH distingue con precisión la infecciones de larga evolución de las recientes, en pacientes en tratamiento antirretroviral y con CD4 inferiores 250/ $\mu\text{L}$  y en los pacientes con CD4 <200 células /  $\mu\text{L}$ . La clasificación errónea de estos grupos como infección reciente podría esperarse como consecuencia de los cambios tanto cualitativos como cuantitativos que tienen lugar en los pacientes con enfermedad avanzada o en tratamiento antirretroviral. Los errores de clasificación de pacientes con infección crónica en infección reciente con el ensayo VITROS avidity VIH tuvieron lugar en un 8.2% de los pacientes con CD4 <200 células/  $\mu\text{L}$  y en un 8,7% de los pacientes con tratamiento antirretroviral.

En Cataluña, los algoritmos para el diagnóstico de la infección reciente por el VIH han sido parte del sistema de vigilancia del VIH desde 2003 (187). En el momento de escribir el artículo, ocho son los ensayos utilizados para el diagnóstico de la infección reciente por VIH. Aunque algunos de estos han sido desarrollados específicamente para identificar la infección reciente, otros son modificaciones de las pruebas de diagnóstico del VIH como el EIA *detuned*.

Sin embargo, las estimaciones de incidencia se basan en tener una falsa tasa de infecciones recientes (FRR del inglés false recent rate) lo más baja posible y en la actualidad, ninguno de los ensayos serológicos utilizados son ideales debido a las altas tasas de FRR. Con el fin de reducir al mínimo los errores de clasificación y con ello mejorar la exactitud de la incidencia, el mejor enfoque es el uso de más de un ensayo serológico en un algoritmo en el que se realicen en paralelo diversos ensayos según lo sugerido por la *WHO Technical Working Group on HIV* (177).

Recientemente, el foco de los estudios epidemiológicos sobre VIH se ha desplazado de la vigilancia de la prevalencia a la medición de incidencia de la infección por el VIH (185). Como un barómetro para monitorizar los cambios en la infección, el estudio de la incidencia de los casos de infección reciente por el VIH puede justificar la elaboración de nuevas políticas de prevención. Aunque la utilidad de estas técnicas está aplicada fundamentalmente a hechos epidemiológicos, en ocasiones se han utilizado para estimar la presencia de una infección reciente a nivel individual (187). El sistema VITROS 3600 tiene una respuesta rápida y automatizada, permitiendo que los laboratorios clínicos que realizan inicialmente el diagnóstico de VIH puedan posteriormente, aplicar el ensayo de avididad cuyos resultados mostraron una muy alta reproducibilidad con una variabilidad de menos de 5%.

Compaginar la información clínica, con la obtenida en el laboratorio, así como la utilización de un método de cribado como el BED-CEIA seguido de un ensayo con mayor especificidad como el de avididad de anticuerpos de VITROS avidity VIH puede proporcionar la mejor opción tanto a nivel de costes como minimizando la FRR. Deberían llevarse a cabo más estudios que permitan establecer definitivamente la necesidad de más de un ensayo serológico y así consolidar su aplicabilidad en Salud Pública.

### 4.2 Artículo 2

#### **Evaluación del inmunoensayo de Quimioluminiscencia Vitros Syphilis TPA como primer paso en el screening de algoritmo reverso para el diagnóstico de la sífilis.**

Victoria González, Gema Fernández, Eva Dopico, Nuria Margall, Juliana Esperalba, Carme Muñoz, Elisabeth Castro, Elena Sulleiro, Lurdes Matas.

La sífilis es un problema de salud mundial con 10,6 millones de casos notificados en adultos en 2008 notificado (188). El algoritmo de diagnóstico clásico de la sífilis utiliza como prueba inicial un test no treponémico como el RPR o el VDRL con posterior confirmación de las muestras positivas con un ensayo treponémico como el TPHA o el FTA-ABS. La mayoría de los laboratorios con alto volumen de muestras han adoptado el nuevo "algoritmo reverso" para mejorar la eficiencia del diagnóstico de la sífilis (189). Con el fin de validar este nuevo algoritmo, se evaluó el ensayo VITROS Sífilis TPA (Ortho Clinical Diagnostics, Inc., High Wycombe, United Kingdom), consistente en una prueba cualitativa de quimioluminiscencia para la detección de IgG e IgM, que utiliza antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* (TP15, TP17 y TP47) en doble sándwich en una plataforma automatizada (Vitros 3600). El ensayo Vitros Sífilis TPA para la detección en rutina de anticuerpos treponémicos se comparó con otros dos inmunoensayos enzimáticos treponémicos: Enzygnost sífilis IgG+IgM (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) y Bioelisa Sífilis 3.0 (Biokit SA, Barcelona, Spain). Se analizaron prospectivamente 317 sueros provenientes del Laboratori Clínic de l'Hospitalet utilizando el VITROS Sífilis TPA y Bioelisa y 300 sueros provenientes del Servicio de Microbiología del "Hospital Universitari Vall d'Hebró" usando VITROS Sífilis TPA y Enzygnost. Las muestras negativas por QLIA y/o EIA se consideraron definitivamente negativas; las muestras positivas fueron testadas mediante RPR y TPHA tal como recomiendan los CDC (27). En caso de discrodancia entre QLIA/EIA y TPHA se realizó otra prueba treponémica, el FTA-Abs. Las muestras con absorbancia >3,00 por Bioelisa fueron confirmados por INNO-LIA Sífilis ensayo (Fujirebio Iberia SLU Barcelona, España). La eficacia del algoritmo reverso para la detección de sífilis se evaluó mediante la comparación de los algoritmos tradicionales versus el algoritmo reverso en 792 sueros de manera prospectiva utilizando RPR y VITROS Sífilis TPA, respectivamente. De estos, 402 fueron analizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol y 390 en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Santa Creu i Sant Pau. Las muestras discordantes entre RPR y VITROS Sífilis TPA se sometieron a pruebas de TPHA y las discordantes entre VITROS Sífilis TPA y/o RPR fueron testadas por FTA-Abs.

La concordancia fue casi perfecta entre VITROS Sífilis TPA y Bioelisa ( $\kappa = 0,83$  IC del 95%: 0,72 a 0,94). De las 317 muestras, 283 fueron negativas, 25 fueron positivas por ambas pruebas, 24 de las cuales fueron confirmadas por TPHA. De los 9 discordantes restantes todos fueron considerados como falsos positivos (2 mediante VITROS Sífilis TPA y 7 mediante Bioelisa). La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos fueron del 100%, 99.30%, 92.59% y 100% respectivamente, ligeramente superiores a Bioelisa (artículo 2, tabla 1a). La concordancia entre VITROS Sífilis TPA y Enzygnost fue elavada ( $\kappa = 0,96$ ; IC 95%: 0,91 a 1,00) con sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos del 100%, 99.65%, 94.12% y 100% respectivamente, al igual que para el anterior método ligeramente superiores (Artículo 2, tabla 1b). Estos resultados también han sido similares a los observados por otros autores (190,191) que también evaluaron otra plataforma de QLIA. Ambos ensayos clasificaron 283 muestras como negativas y 16 muestras positivas, también confirmados por TPHA.

De los 792 sueros utilizados para comparar el algoritmo tradicional versus el reverso, 723 fueron negativas por VITROS Sífilis TPA y RPR y 38 fueron positivos por ambos ensayos y confirmados por TPHA. Tan sólo se encontraron 31 discordantes (artículo 2, tabla 2), por lo que se procedió a la revisión de las historias clínicas, concluyendo que sólo en 5 de los 31 se podría considerar que el algoritmo reverso no era concluyente. En todos ellos la técnica VITROS Sífilis TPA fue positiva, pero el RPR y el TPHA fueron negativos. No se pudo realizar confirmación mediante FTA-ABS por no disponer de más suero y fueron excluidos del análisis estadístico. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de VITROS Sífilis TPA fue del 100% (IC del 95%: 93,98 a 100); 99,87% (IC del 95%: 99,29-99,98); 98,33 (IC 95%: 91,03-99,72) y 100% (IC del 95%: 99,53 a 100), respectivamente. La tasa de falsos positivos mediante el algoritmo reverso fue menor que la informada en otros estudios (1/787, 0,13%) (192,193).

El algoritmo reverso identificó 21 pacientes con RPR negativos y VITROS Sífilis TPA positivos, 17 de los cuales fueron confirmados como positivos por TPHA y 4 por FTA-Abs, confirmando la aplicabilidad de esta procedimiento para el diagnóstico de la sífilis. Al igual que otros autores, no fue posible distinguir de forma fiable entre sífilis primaria, sífilis latentes/tardías ya tratadas (192,194) lo cual puede ser una limitación. Diferentes metodologías han sido evaluadas para valorar este nuevo algoritmo como el BioPlex 2200 sífilis IgG/IgM BioPlex 2200, basado en la tecnología de Multiplex flow, u otros inmunoensayos quimioluminiscente como el Architect sífilis TP, que detecta IgG y/o IgM anti-*T.pallidum* (195). En general, el uso de una prueba treponémica como primer paso para el diagnóstico de la sífilis, implica un mayor número de falsos positivos (196). En nuestro caso la tasa de resultados falsos positivos fue baja (17 de 792 muestras).

En conclusión, VITROS sífilis TPA es altamente sensible y específico. La facilidad de uso, la automatización y su alto rendimiento lo hacen ideal para la detección de la sífilis en laboratorios con elevado número de muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante técnicas de QLIA o EIA deben ser comprobados con otra prueba treponémica y con pruebas no treponémicas cuantitativas para descartar falsos positivos debido bajo valor predictivo positivo que presentan estas pruebas treponémicas como método de *screening* en poblaciones con baja prevalencia de la sífilis (197)

### 4.3 Artículo 3

#### **Utilidad de un nuevo ensayo de PCR multiplex para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual.**

Gema Fernández, Elisa Martró, Victoria González, Verónica Saludes, Elisabet Bascuñana, Clara Marcó, Belén Rivaya, Evelin López, Pep Coll, Lurdes Matas, Vicente Ausina.

Las nuevas técnicas moleculares que se han desarrollado han incrementado el conocimiento actual de la situación real de las ITS. Entre estas nuevas herramientas, destacan las técnicas de biología molecular, ya que gracias a su flexibilidad a la hora de procesar diversos tipos de muestra y su capacidad de detectar varios microorganismos en una sola reacción, han permitido, realizar un diagnóstico más exacto. Asimismo, estas nuevas plataformas de PCR permiten detectar microorganismos en los que el cultivo u otras técnicas disponibles hasta el momento no eran suficientemente sensibles y específicas (102,197). En nuestro estudio, se comparó el ensayo STI-7 Anyplex™ II con el cultivo bacteriológico y parasitológico y con el ensayo Abbott RealTime™ CT/NG (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL), técnica con una amplia experiencia en su utilización en nuestro servicio.

El ensayo STI-7 Anyplex™ II detecta siete microorganismos implicados en las ITS. La posibilidad de realizar esta técnica de diferentes tipos de muestras (como frotis rectales, vaginales, uretrales o endocervicales, así como orinas) hace de este método una herramienta muy útil en el laboratorio de microbiología clínica. Asimismo, permite la detección de *M. genitalium*, microorganismo que está teniendo cada vez más impacto en el diagnóstico de las ITS debido a su difícil detección y manejo. La realización de esta PCR multiplex permite obtener resultados en 3 horas, previo paso de extracción del DNA bacteriano o parasitario, pudiendo aplicarse en la rutina del día a día de un laboratorio.

Para ello se incluyeron 2 tipos de población diferentes. El grupo 1 incluyó 234 individuos atendidos en el servicio de urgencias, los servicios de urología y ginecología de nuestro hospital, diferentes centros de atención primaria, así como adultos jóvenes ( $\leq 25$  años) con sospecha de ITS, reclutados para estudios de prevalencia en centros de salud sexual y

reproductiva. El Grupo 2 incluyó 33 HSH VIH negativos tienen alto riesgo de ITS y fueron examinados periódicamente en el centro BCN Checkpoint (un centro de detección basado en la comunidad del VIH y otras infecciones de transmisión sexual).

Tras realizar el diagnóstico microbiológico de rutina (cultivo y Abbott Tiempo Real CT / NG), la muestra restante se almacenó a -20°C hasta su utilización para la evaluación de la Anyplex™ II STI-7 ensayo. Se incluyeron un total de 105 muestras de orina de la primera parte de la micción, 50 rotis rectales, 18 frotis uretrales, y tres muestras de linfadenopatías inguinales de pacientes con sospecha de LGV, 38 exudados endocervicales y 53 muestras vaginales. Todas las muestras fueron anonimizadas previo a la validación.

Las sensibilidades, especificidades y valores predictivos fueron analizados para *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *T.vaginalis*, alcanzando sensibilidades de 93,94% a 100%, especificidades de 96,55% a 100%, valor predictivo negativo entre 93,33% y el 98,85% y valores predictivos positivos de 96,88% a 100% con coeficientes  $\kappa$  entre 0,88 y 1 (artículo 3, tabla 3). Las muestras que peor rendimiento ofrecieron fueron los frotis rectales y las muestras de orina. En lo que respecta a las muestras del canal anal, las técnicas de biología molecular están siendo cada vez más utilizadas, a pesar de que aún permanecen sin validación para ello. La detección de ITS a través de frotis rectales mediante PCR se debe ofrecer en los HSH con sospecha de LGV. En cambio, las pruebas de detección de clamidia y gonococo a partir de frotis rectal en HSH sigue siendo objeto de examen. A pesar de no estar aprobado su uso por la FDA, son muchos los autores que han utilizados esta muestra para el diagnóstico de una ITS con buenos resultados (198). A pesar de esto es importante mirar con cautela los resultados obtenidos a partir de muestras extragenitales, especialmente, los provenientes de frotis rectales y faríngeos. Recientemente, se ha evaluado la orina, el canal anal y la faringe como las diversas muestras para diagnosticar ITS en un grupo de 149 HSH VIH positivos asintomáticos. Las muestras fueron testadas mediante técnicas de amplificación genómica. Los autores concluyen que de los 18 pacientes que resultaron positivos, tan sólo dos fueron detectados únicamente a través de la muestra de orina y otros dos a partir de la orina y también del frotis faríngeo y/o rectal, concluyendo que la orina no debería ser la única muestra a testar en el caso de buscar una ITS asintomática (199).

Los resultados obtenidos para *Mycoplasma* y *Ureaplasma* son difíciles de interpretar al no poder compararlos con otros métodos de referencia utilizados en el laboratorio, ya que hasta ahora, no se buscaban activamente, lo cual es una limitación de nuestro estudio. Debe tenerse en cuenta que estos microorganismos se detectaron principalmente en infecciones mixtas. Este hecho también ha sido reportado por otros autores que evaluaron el mismo ensayo (138). Las muestras donde se detectaron con más frecuencia fueron las de orina y las muestras

vaginales. Se obtuvo una prueba de PCR positiva para al menos uno de estos microorganismos en 59 de 113 pacientes con un resultado negativo para los patógenos más relevantes (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. vaginalis*). Pero de entre estos, sólo en siete casos (12,06%) el microorganismo detectado se consideró clínicamente relevante (artículo 3, tabla 5).

Dado que *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* son parte de la flora del tracto genitourinario de personas sanas y sexualmente activas (200), un seguimiento del paciente pueden ser útil para confirmar su papel patogénico. La identificación de estos microorganismos potencialmente patógenos es muy relevante dado que el tratamiento de primera línea puede no ser apropiado para las infecciones causadas por *Ureaplasma* y *Mycoplasma*. En la población estudiada, *U. parvum* mostró la tasa de detección más alta (34,08%), seguido de *U. urealyticum* (25,09%). A pesar del papel controvertido de *Ureaplasma* y *Mycoplasma*, P. Horner *et al.* (201) llegó a la conclusión de que *U. urealyticum* y *M. genitalium* se asocian con un 15% -25% de los dos casos crónicos y agudos de la UNG. Adicionalmente, *M. genitalium* se ha estudiado como una causa de la uretritis y cervicitis después de una recaída a un tratamiento de primera línea (107) debido a su prevalencia y la resistencia a los tratamientos con macrólidos. Además, las técnicas de biología molecular son los métodos recomendados para detectar *M. genitalium* (7), y por lo tanto el ensayo evaluado podría ser una buena opción para su detección.

En general, el presente estudio demuestra que el Anyplex™ II STI-7 es un método sencillo y fiable para el diagnóstico de las ITS capaz de mejorar los métodos de diagnóstico utilizados de manera habitual. Además, la opción de poder realizar esta técnica en diferentes tipos de muestras y la capacidad de detección de varios microorganismos en una sola reacción es muy recomendable para el diagnóstico sindrómico de las ITS. Asimismo, ha mostrado buenos resultados tanto en pacientes asintomáticos o con poca clínica como en pacientes sintomáticos. Aunque la detección de *U. urealyticum*, *U. parvum* y *M. hominis* debe interpretarse con cuidado en el ámbito clínico, especialmente en muestras no genitales, como la orina o el frotis rectal, este ensayo puede ser una herramienta útil para los programas de cribado de diagnóstico y también para estudios epidemiológicos en Salud Pública.

Las ITS tienen efectos profundos en la salud sexual y reproductiva en todo el mundo y figuran entre las cinco categorías principales por las que los adultos buscan atención médica. Más de 1 millón de personas contraen ITS diariamente. La cifra estimada arroja números desorbitados: 500 millones de personas contraen alguna de las cuatro ITS siguientes: clamidiasis, gonorrea, sífilis o tricomoniasis; más de 530 millones de personas están infectadas por el VHS; más de 290 millones de mujeres están infectadas con el VPH.

Independientemente de la propia infección en sí, las ITS pueden tener consecuencias graves:

- Algunas ITS pueden triplicar con creces el riesgo de infección con el VIH.
- La transmisión materno-fetal puede dar lugar a serias complicaciones como muerte fetal o neonatal, bajo peso del feto, prematuridad, sepsis neonatal, neumonía, conjuntivitis neonatal y deformidades congénitas.
- Anualmente, la infección del VPH provoca 530.000 casos de cáncer de cérvix y 275.000 muertes en el mundo.
- Algunas ITS como la gonorrea y la infección por clamidia son causas principales de EIP, la cual puede ser consecuencia de abortos e infertilidad.
- La ausencia de síntomas en muchas ocasiones implica una propagación mayor, debido al desconocimiento de la enfermedad.

A lo largo de los años se ha detectado un incremento en los casos de ITS declarados en toda Europa. Las causas de este aumento probablemente sean multifactoriales, pero parece influido por cambios en las conductas y las relaciones sociales, fenómenos migratorios, viajes internacionales y la aparición de nuevos grupos de riesgo no suficientemente valorados hasta el momento. La magnitud del problema hace que cada día se trabaje para implementar herramientas de prevención, diagnóstico y tratamiento. De esta forma se pretende paliar el daño que provocan en la sociedad.

## 5. CONCLUSIONES

### **1. Validar la precisión de un ensayo automatizado de avidéz para discriminar entre infección reciente y crónica por el VIH-1 utilizando la plataforma VITROS 3600 (Artículo 1)**

1. Presenta una buena reproductibilidad intradiaria e interdiaria
2. El punto de corte óptimo para diferenciar entre infección reciente o infección de más larga duración se ha establecido en 0.51.
3. Se obtuvo muy buena concordancia entre el ensayo de avidéz VITROS 3600 y la técnica de referencia BED-CEIA.
4. El ensayo de la avidéz VITROS 3600 distingue con precisión la infecciones de larga evolución de recientes de en pacientes en tratamiento antirretroviral y CD4 inferiores 250/ $\mu$  y los pacientes con CD4 <200 células /  $\mu$ L
5. El ensayo de avidéz evaluado es un método fiable para detectar infecciones recientes por VIH-1 y podría ser utilizado dentro de un algoritmo RITA para estimar la incidencia de infección por VIH-1 en la población.
6. Es necesario compaginar la información clínica, con la obtenida por el laboratorio, así como la utilización de un método de screening como el BED-CEIA seguido de un ensayo con mayor especificidad como el de avidéz de anticuerpos de VITROS 3600 para poder proporcionar menor tasa de FRR.

### **2. Evaluar el rendimiento del ensayo de quimioluminiscencia Vitros sífilis TPA para la realización del cribado de sífilis (Artículo 2).**

7. La concordancia obtenida entre el ensayo VITROS Sífilis TPA y otras pruebas treponémicas de EIA para el diagnóstico de la sífilis fue excelente.
8. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de VITROS Sífilis TPA en el diseño de la utilización del algoritmo reverso fue excelente.
9. La tasa de falsos positivos obtenidos mediante VITROS Sífilis TPA como pieza inicial del algoritmo reverso fue menor de la reportada por otros autores.
10. En los casos positivos mediante VITROS Sífilis TPA no fue posible distinguir de forma fiable entre sífilis primaria, sífilis latentes/tardías ya tratadas, lo cual es una limitación del estudio como ocurre con otros ensayos serológicos.
11. VITROS sífilis TPA es altamente sensible y específico. La facilidad de uso, la automatización y su alto rendimiento lo hacen ideal para la detección de la sífilis en laboratorios que procesan una gran número de muestras cada día.

**3. Utilidad de un nuevo ensayo de PCR multiplex para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual.**

12. Las sensibilidades, especificidades y valores predictivos positivos y negativos del STI-7 Anyplex™ fueron muy buenos, analizados en función del tipo de muestra y el microorganismo detectado.
13. La flexibilidad a la hora de utilizar diferentes tipos de muestras hace de STI-7 Anyplex™ una muy buena herramienta para el diagnóstico de las ITS.
14. La detección de siete microorganismos permite realizar un diagnóstico sindrómico mucho más exacto que el que se podría obtener con otros métodos más convencionales.
15. El ensayo STI-7 Anyplex™ es útil para la detección de *M. genitalium*.
16. Los resultados obtenidos permiten deducir que STI-7 Anyplex™ puede ser útil tanto para el diagnóstico de las ITS sintomáticas como aquellas en las que no hay síntomas o estos son escasos y por lo tanto podría usarse para conocer la prevalencia de las ITS como herramienta en Salud Pública.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Pesapane F, Marcelli S, Nazzaro G. Hieronymi Fracastorii: the Italian scientist who described the "French disease". *An Bras Dermatol*. 2015 Sep-Oct; 90(5): 684–686.
2. Arrizabalaga J, Henderson J and French R. *The great pox: the french disease in renaissance Europe*. New Haven and London, Yale University Press, 1997, pp. xv, 352.
3. María Victoria Borobio. El enigma de la sífilis. Disponible en: [www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/sifilis](http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/sifilis). Visitado el 17 de marzo del 2015.
4. Conde-González, Carlos J. y Uribe-Salas, Felipe. Gonorrea: la perspectiva clásica y la actual. *Salud pública Méx [online]*. 1997, vol.39, n.6 [cited 2015-03-17], pp.543-579. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36341997000600011>. Visitado el 17 de marzo del 2015.
5. Millennium Development Goals (MDGs) for child health, maternal health and HIV. WHO. Ginebra . Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs290/en/>. Visitado el 17 de mayo del 2015.
6. Área de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual 1995-2012. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología/Subdirección General de Promoción de la Salud y Epidemiología-plan Nacional sobre el SIDA; 2014. Disponible en: [https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/VigilanciaITS1995\\_2012.pdf](https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/VigilanciaITS1995_2012.pdf). Visitado el 26 de marzo del 2015.
7. Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, Unemo M (Editor-in-chief). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization 2013. Switzerland. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf). Visitado el 26 de marzo del 2015.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 - Sexually transmitted infections, including HIV and blood-borne viruses. Stockholm: ECDC; 2015. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexually-transmitted-infections-HIV-AIDS-blood-borne-annual-epi-report-2014.pdf>. Visitado el 26 de marzo del 2015.
9. Clamidia control in Europe. Stockholm, 2009. ECDC Guidance. Disponible en: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906\\_GUI\\_Chlamydia\\_Control\\_in\\_Europe.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf). Visitado el 23 de marzo del 2015.

10. Decisión de la Comisión 2012/506/EU de 8 Agosto de 2012 en la que se cambia la Decisión 2002/253/EC relativa a las definiciones para la notificación de enfermedades transmisibles a la Red Comunitaria según la Decisión No 2119/98/EC del Parlamento Europeo y el Consejo.
11. Vigilància epidemiològica de les infeccions de transmissió sexual a Catalunya. Actualització a 30 de juny de 2014. Disponible en <http://www.ceeiscat.cat/documents/Semestral ITS.pdf>. Visitado el 24 de marzo del 2015.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. Disponible en <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>. Visitado el 08 abril del 2015.
13. Área de Vigilancia de VIH y Conductas de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH/sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida - S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología / Centro Nacional de Epidemiología -ISCIII. Madrid; Madrid Nov 2013. Disponible en [http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIHSida\\_JuniJ2013.pdf](http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIHSida_JuniJ2013.pdf). Visitado el 08 abril del 2015.
14. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7(7):821-834.
15. Murray P.R. Microbiología médica. Barcelona. Elsevier España. 2009.
16. Alcamí Pertejo J, Rivero Román A. Infecciones por los virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2. En Ausina Ruiz V y Moreno Guillén S. En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, 2006, pp. 951-973.
17. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised surveillance cases for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 Months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 Years. United States, 2008. *MMWR Recomm Rep*. 2008 Dec 5; 57(RR-10):1-12.
18. Workowski KA. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin Infect Dis* 2015; 61:S759–62.
19. Wong T; Fonseca K, Chernesky MA, Garceau R, Levett PN, Serhir B. Canadian public health laboratory network laboratory guidelines for the diagnosis of neurosyphilis in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2015;26(Suppl A):18A-22A.

20. M. Janier, V. Hegyi, N. Dupin, M. Unemo, G.S. Tiplica, M. Potočnik, P. French and R. Patel. 2014 European guideline on the management of syphilis. JEADV. 2014; 28 (12): 1581–1593
21. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Read TRH, Garland SM, Hopkins CA, Moss LM, Fairley CK. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. J Infect Dis 2006; 193:336–45.
22. William M. McCormack. Urethritis. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious disease, 7, Gerald L Mandell, John E. Bennet, and Raphael Dolin, Elsevier, 2010. Vol I, p.1485-1494.
23. Bachmann L H, Manhart LE, Martin DH, Seña AC, Dimitrakoff J, Jensen JS, and Gaydos CA. Advances in the Understanding and Treatment of Male Urethritis. Clin. Infect. Dis.. 2015;61:S763–9.
24. T. Hellín, A. Rodríguez Pichardo, E. Ribera. Enfermedades de transmisión sexual. Procedimientos clínicos SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicoviii.pdf>. Visitado el 17 de mayo del 2015.
25. Wilbanks MD, Galbraith JW, Geisler WM. Dysuria in the emergency department: missed diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. West J Emerg Med. 2014 Mar; 15(2):227-30.
26. Taylor SN. Epididymitis. Clin Infect Dis. 2015; 61:S770-3.
27. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015; 64 No. RR-3 (1-135).
28. Perea Pérez EJ y Pascual Hernández A. Enfermedades de transmisión sexual. Urethritis, vulvovaginitis y cervicitis. úlceras genitales. enfermedad pélvica inflamatoria. En Ausina Ruiz V y Moreno Guillén S. En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, 2006, pp. 1249-1262.
29. LeGoff J, Péré H and Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. Virol J. 2014; 11: 83.
30. Van der Laar MJW; Gotz HM; de Zwart O. Lymphogranuloma venereum among men who have sex with men—Netherlands, 2003-2004. Morb Mort Wkly Rep 2004 Vol: 53:985.
31. Stamm WE and Batteiger B.E. *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, 2010, pp2443-2461.
32. O'Farrel N. Donovanosis. Sex Transm Infect 2002;78:452–457.
33. Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. Rev Infect Dis. 1990; 12:856-72.

34. William McCormack. Vulvovaginitis and cervicitis. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, 7, Gerald L Mandell, John E. Bennet, and Raphael Dolin, Elsevier, 2010. Vol I, p.1485-1509.
35. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, De Seta F, Quadrifoglio F, de Aloysio D, Guaschino S. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri and postmenopausal women. J Clin Microbiol. 2002; 40:2147-52.
36. Yevgeniy Turovskiy, Katia Sutyak Noll, and Michael L. Chikindas. The etiology of bacterial vaginosis. J. Appl Microbiol. 2011 May;110(5): 1105–1128.
37. "Vaginal discharge (bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, trichomoniasis). Management and treatment of specific syndromes". a: 2006 Canadian guidelines on sexually transmitted infections. Ottawa: Public Health Agency of Canada. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/std-mts/sti-its/cgsti-ldcits/index-eng.php> Visitado el 27 de mayo del 2015.
38. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaidler A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. 2003;189:139–147.
39. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR 2010; 59(No. RR-12): [1-116].
40. Tanton C, Weiss HA, Le Goff J, Chagalucha J, Rusizoka M, Baisley K, Everett D, Ross DA, Belec L, Hayes RJ, Watson-Jones D. Correlates of HIV-1 genital shedding in Tanzanian women. PLoS One 2011; 6: e17480.
41. Kissinger P, Adamski A.. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sex Transm Infect. 2013 Sep;89(6):426-33.
42. Gougeon ML, Garcia S, Heeney J, Tschopp R, Lecoœur H, Guetard D, Rame V, Dauguet C, Montagnier L. Programmed cell-death in AIDS-related HIV and SIV infection. AIDS Res Hum Retroviruses 1993; 9: 553-63.
43. Smit C, Geskus R, Walker S, Sabin C, Coutinho R, Porter K, Prins M; CASCADE Collaboration. Effective therapy has altered the spectrum of cause-specific mortality following HIV seroconversion. AIDS 2006; 20:741–9.
44. Fraser, C. M., S. J. Norris, G. M. Weinstock, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey E. K, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO and Venter JC. 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science 281:375–388.

45. LaFond RE and Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan; 19(1): 29–49.
46. Yamasaki R, Kerwood DE, Schneider H, Quinn KP, Griffiss JM, Mandrell RE. The structure of lipooligosaccharide produced by *Neisseria gonorrhoeae*, strain 15253, isolated from a patient with disseminated infection. Evidence for a new glycosylation pathway of the gonococcal lipooligosaccharide. *J Biol Chem.* 1994 Dec 2;269(48):30345-51.
47. Heckels JE. Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* 1989;2 (Suppl):S566-S573
48. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiology*, 2012, 7(12):1401–1422
49. Belland, R. J., S. G. Morrison, C. Ison, and W. M. Huang. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.* 1994; 14:371-380.
50. Goire N, Lahra MM, Chen M, Donovan B, Fairley CK, Guy R, Kaldor J, Regan D, Ward J, Nissen MD, Sloots TP, Whiley DM. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12, 223–229
51. Clinical Effectiveness Group. National guideline on the diagnosis and treatment of Gonorrhoea in adults 2005. Londres: British Association for Sexual Health and HIV (BASHH), 2005. Disponible a <http://www.bashh.org/documents/116/116.pdf>. Visitado el 15 de junio del 2015
52. Mehrany K, Kist JM, O'Connor WJ, DiCaudo DJ. Disseminated gonococemia. *Int J Dermatol* 2003; 42:208-209
53. Especies de *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*. En: Koneman MD. Diagnóstico Microbiológico. 6ª Edición. Editorial Panamericana. 2006. p. 539-592
54. KR Forward. Risk of coinfection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2010; 21:84-86.
55. Weir SS, Feldblum PJ, Roddy RE, Zekeng L. Gonorrhoea as a risk factor for HIV acquisition. *AIDS.* 1994 Nov; 8(11):1605-8.
56. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo CC, Rosselló-Móra R, Horn M. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus *Chlamydia* to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol.* 2015 Mar; 38(2):99-103.
57. Rodríguez-Domínguez M, Sanbonmatsu S, Salinas J, Alonso R, Gutiérrez J, Galán JC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC 2012. Disponible en:

- <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf>. Visitado el 14 de junio del 2015.
58. Nguyen BD, Cunningham D, Liang X, Chen X, Toone EJ, Raetz CR, Zhou P, Valdivia RH. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 21; 108:10284-9.
  59. Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in trichomonads—new insights. Protist 2003;154:313–29
  60. Honigberg BM. Host cell-Trichomonad interactions and virulence assays in vitro systems. En: Honigberg BM, ed. Trichomonads parasitic in humans. New York: Springer-Verlag, 1990:155–212.
  61. Hirt RP. Trichomonas vaginalis virulence factors: an integrative overview. Sex Transm Infect 2013;89:439–443
  62. Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YC, Diaz N, Rappelli P, Acosta-Serrano A, Fiori PL, Mottram JC. *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. Adv Parasitol 2011;77:87–140
  63. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, Gajer P, Ault K, Peralta L, Forney LJ, Carlton JM, Abdo Z, Ravel J. Association between Trichomonas vaginalis and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. Sex Transm Dis 2012;39:807–12
  64. Cotch MF, Pastorek JG 2nd, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. Sex Transm Dis 1997; 24:353-60.
  65. Bauer ME, Townsend CA, Ronald AR, Spinola SM. Localization of *Haemophilus ducreyi* in naturally acquired chancroidal ulcers. Microbes Infect. 2006; 8:2465-8.
  66. Gangaiah D, Zhang X, Fortney KR, Baker B, Liu Y, Munson RS Jr, Spinola SM. Activation of CpxRA in *Haemophilus ducreyi* primarily inhibits the expression of its targets, including major virulence determinants. Journal of Bacteriology. 2013;195:3486-3502.
  67. McBride WJH, Hannah RCS, Le Cornec GM and Bletchly C. Cutaneous chancroid in a visitor from Vanuatu. Australas J Dermatol. 2008 May;49:98-9.
  68. Carter J.S, Bowden F.J, Bastian I, Myers G.M, Sriprakash K.S, and Kemp D.J. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999 49:1695-1700
  69. Sehgal VN, Prasad AL. Donovanosis. Current concepts. Int J Dermatol 1986;25:8–16
  70. Acosta Boga BA, Grau Codina MG, Matas Andreu L, Meseguer Peinado MA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. Procedimientos

- en Microbiología Clínica SEIMC 2011. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf>. Visitado el 21 de Junio del 2015
71. Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, Cassell GH, Waites KB. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci.* Jan 2009;16:56-70.
  72. Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect* 2005;81:103–107.
  73. Aznar Martín J, Blanco Galán MA, Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Vázquez Valdés F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC 2007*. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia24.pdf>. Visitado el 22 de junio del 2015
  74. Waites K, Bébéar CM, Robertson J, Talkington D, and Kenny G. Cumitech 34 Laboratory diagnosis of *Mycoplasma* infections. Nolte FS (coordinador). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2001
  75. Baron EJ, Cassell GH, Eschenbach DA, Greenwood JR, Harvey SM, Madinger NE Paterson EM, Waites KB. Cumitech 17<sup>a</sup>, Laboratory diagnosis of female genital tract infections. Baron EJ (coordinador). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
  76. Sng EH, Rajan VS, Yeo KL, Goh AJ. The recovery of *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens: effects of different temperatures, transport times, and media. *Sex Transm Dis.* 1982;9:74-8.
  77. Wade JJ, Graver MA. Refrigeration does not compromise recovery of *Neisseria gonorrhoeae* from charcoal transport swabs. *Sex Transm Infect.* 2005;81:93-4.
  78. Evangelista AT, Beilstein HR. Cumitech 4A, Laboratory diagnosis gonorrhea. Abramson C (coordinador). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
  79. Gaydos CA, Quinn TC. Urine nucleic acid amplification tests for the diagnosis of sexually transmitted infections in clinical practice. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:55-66.
  80. M Mitchell; V Rane; C K Fairley; D M Whiley; C S Bradshaw; M Bissessor; M Y Chen. Sampling Technique Is Important for Optimal Isolation of Pharyngeal Gonorrhoea. *Sex Transm Infect.* 2013;89(7):557-560.
  81. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991 Feb;29(2):297-301.

82. Kharsany AB, Hoosen AA, Kiepiela P, Naicker T, Sturm AW. Growth and cultural characteristics of *Calymmatobacterium granulomatis*: the aetiological agent of granuloma inguinale (donovanosis). *J Med Microbiol.* 1997;46:579–85
83. Carter J, Hutton S, Sriprakash KS, Kemp DJ, Lum G, Savage J, Bowden FJ. Culture of the causative organism for donovanosis (*Calymmatobacterium granulomatis*) in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol.* 1997;35:487–9
84. Winter GF, Inglis JM, Cubie HA. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections in conventional and shell vial cell cultures using monoclonal antibodies. *J Virol Methods.* 1987;15:329-30.
85. Gelbart SM, Thomason JL, Osypowski PJ, Kellett AV, James JA, Broekhuizen FF. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *J Clin Microbiol.* 1990;28:962-4.
86. Ashford WA, Golash RG, Hemming VG. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* 1976;7897:657–8.
87. Dougherty TJ. Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in lowlevel resistance to b-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28:90–95.
88. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Ginebra: World Health Organization 2011. Disponible en: [http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial\\_resistance\\_in\\_Neisseria\\_gonorrhoeae.pdf](http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_resistance_in_Neisseria_gonorrhoeae.pdf). Visitado el 30 de Junio del 2015
89. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J and Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Eurosurveillance*, 2011, 16:pil:19833.
90. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56:1273–1280.
91. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55:3538–3545
92. Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim DF, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(47):pii=19721. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19721>

93. Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, Ardanuy C. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:1858–1860
94. Unemo M and Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* 2012; 7: 1401–1422
95. Cole MJ, Spiteri G, Chisholm SA, Hoffmann S, Ison CA, Unemo M, Van de Laar M. Emerging cephalosporin and multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. *Euro Surveill* 2014 Nov 13;19:20955
96. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41:S120–6.
97. Whittington WL, Knapp JS. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States. *Sex Transm Dis.* 1988;15:202–10.
98. Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Ezaki T, Maeda S, Saito I, and Kawada Y. Rapid detection of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae gyrA* gene associated with decreased susceptibilities to quinolones. *J Clin Microbiol* 1996;34:2255–2258
99. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is the result of acquisition of streptococcal *tetM* determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;20:117–21.
100. CDC. Gonococcal Isolate surveillance project protocol. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. Disponible en: [http://www.cdc.gov/std/gisp/protocol2006\\_web\\_version\\_rev12\\_2007.pdf](http://www.cdc.gov/std/gisp/protocol2006_web_version_rev12_2007.pdf). Visitado el 02 de Julio del 2015
101. Lindbäck E, Unemo M, Akhras M, Gharizadeh B, Fredlund H, Pourmand N, Wretling B. Pyrosequencing of the DNA gyrase gene in *Neisseria* species: effective indicator of ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoea*. *APMIS.* 2006;114:837-41
102. Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Kanematsu E, Ozeki S, Nishino Y, Ezaki T, Maeda S, Saito I and Kawada Y. Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae parC* gene associated with resistance to the quinolones. *J Clin Microbiol* 1997;35:948–950
103. Rice RJ, Bhullar V, Mitchell SH, Bullard J, Knapp JS. Susceptibilities of *Chlamydia trachomatis* isolates causing uncomplicated female genital tract infections and pelvic inflammatory disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:760–2.
104. Sandoz KM and Rockey DD. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. *Future Microbiol.* 2010; 5(9): 1427–1442.

105. Couldwell DL, Tagg KA, Jeffreys NJ, Gilbert GL. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int J STD AIDS*. 2013 Oct;24(10):822-8
106. Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2245-9
107. Pond MJ, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST. High Prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: the need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. *Clin Infect Dis*. 2014 Mar; 58(5):631-7
108. Stamm LV. Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (2): 583-589.
109. Peeling RW. Applying new technologies for diagnosing sexually transmitted infections in resource-poor settings. *Sexually Transmitted Infections*, 2011, 87:ii28–30.
110. US Food and Drug Administration (2012). FDA approves first over-the-counter home-use rapid HIV test. FDA news release, 3 July 2012. Available: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm310542.htm> Visitado el 08 de Junio del 2015.
111. Mabey DC, Sollis KA, Kelly HA, Benzaken AS, Bitarakwate E, Chagalucha J, Chen XS, Yin YP, Garcia PJ, Strasser S, Chintu N, Pang T, Terris-Prestholt F, Sweeney S, Peeling RW. Point-of-care tests to strengthen health systems and save newborn lives: the case of syphilis. *PLoS Med*. 2012;9:e1001233
112. UNAIDS. UNAIDS 2011 World AIDS Day report. Geneva. UNAIDS; 2011.
113. Tucker JD, Biena CH, Peeling RW. Point-of-Care testing for sexually transmitted infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(1):73-79.
114. Arai H, Petchclai B, Khupulsup K, Kurimura T, Takeda K. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 1999 Feb;37(2):367-70.
115. Patel P, Bennett B, Sullivan T, Parker MM, Heffelfinger JD, Sullivan PS; CDC AHI Study Group. Rapid HIV screening: missed opportunities for HIV diagnosis and prevention. *J Clin Virol* 2012; 54:42–47.
116. Curtis KA, Rudolph DL, Nejad I, Singleton J, Beddoe A, Weigl B, LaBarre P, Owen SM. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS One* 2012; 7:e31432

117. Causer LM, Kaldor JM, Conway DP, Leslie DE, Denham I, Karapanagiotidis T, Ryan C, Wand H, Anderson DA, Robertson PW, McNulty AM, Donovan B, Fairley CK, Guy RJ. an evaluation of a novel dual treponemal/nontreponemal point-of-care test for syphilis as a tool to distinguish active from past treated infection. *Clin Infect Dis*. 2015 Jul 15;61(2):184-91.
118. Watchirs Smith LA, Hillman R, Ward J, Whiley DM, Causer L, Skov S, Donovan B, Kaldor J, Guy R. Point-of-care tests for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection: a systematic review of operational and performance characteristics. *Sex Transm Infect*. 2013 Jun;89(4):320-6.
119. Horner P, Boag F. Clinical Effectiveness Group. 2006 UK National guideline for the management of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. Londres: British Association for Sexual Health and HIV (BASHH), 2006. Disponible a: <http://www.bashh.org/documents/61/61.pdf>. Visitado el 09 de Julio del 2015
120. Van Dommelen L, van Tiel FH, Ouburg S, Brouwers EE, Terporten PH, Savelkoul PH, Morré SA, Bruggeman CA, Hoebe CJ. Alarmingly poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. *Sex Transm Infect*. 2010 Oct;86(5):355-9
121. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR*. 2006;55 (RR-11):1-94.
122. Campbell L, Woods V, Lloyd T, Elsayed S, Church DL. Evaluation of the OSOM Trichomonas rapid test versus wet preparation examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *J Clin Microbiol* 2008;46:3467–9.
123. Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK. Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar;43(3):1304-8
124. Madhivanan P, Krupp K, Li T, Ravi K, Selezneva J, Srinivas V, Arun A, Klausner JD. Performance of BVBlue rapid test in detecting bacterial vaginosis among women in Mysore, India. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2014;2014:908313.
125. West B, Morison L, Schim van der Loeff M, Gooding E, Awasana AA, Demba E, Mayaud P. Evaluation of a new rapid diagnostic kit (FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in The Gambia. *Sex Transm Dis*. 2003 Jun;30(6):483-9.
126. WHO. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva, Switzerland: WHO, 2001. Disponible en: [http://www.who.int/hiv/topics/vct/sw\\_toolkit/guidelines\\_management\\_sti.pdf](http://www.who.int/hiv/topics/vct/sw_toolkit/guidelines_management_sti.pdf). Visitado el 09 de Julio del 2015.

127. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987, 155:335–350
128. Otero Guerra L, Lepe Jimenez JA, Blanco Galán MA, Aznar Martín J, Vázquez Valdés F. Utility of the molecular biology techniques in the diagnosis of sexual transmitted diseases and genital infections *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26 (9): 42-9.
129. Maurin M. Real-time PCR as a Diagnostic Tool for Bacterial Diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012 Sep;12(7):731-54.
130. Bhalla P, Baveja UK, Chawla R, Saini S, Khaki P, Bhalla K, Mahajan S, Reddy BS. Simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in genitourinary specimens from men and women attending an STD clinic. *J Commun Dis* 2007; 39:1–6
131. Walsh A, Rourke FO, Crowley B. Molecular detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital and extragenital specimens using the Abbott CT/NG RealTime assay and an in-house assay targeting the porA pseudogene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:561-7
132. Consentino LA, Campbell T, Jett A, Macio I, Cranston RD and Hiller SL. Use of nucleic acid amplification testing for diagnosis of anorectal sexually transmitted infections. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (6): 2005-2008
133. Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, Hogan TR, Hjelmevoll SO, Garland SM and Tapsall J. Evaluation of six commercial nucleic acid tests for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 2001; 49 (10): 3610-3615.
134. Upton A., Bromhead C. and Whiley M. *Neisseria gonorrhoeae* false-positive result obtained from pharyngeal swab by using the Roche cobas 4800 CT/NG assay in New Zealand in 2012. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (5): 1609-1610.
135. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijans M, Mulders B, Simons G, Temmerman M, Claeys G, Padalko E. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STI. Finder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted diseases pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 71 (1): 29-37
136. Cho CH, Chulten B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, Kim YK. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2013; 57:338-42.
137. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6):e40

138. Berçot B, Amarsy R, Goubard A, Aparicio C, Loeung HU, Segouin C, Gueret D, Jacquier H, Meunier F, Mougari F, Cambau E. Assessment of co-infection of sexually transmitted pathogen microbes by performing the molecular kit Anyplex II STI-7. *J Clin Microbiol.* 2015;53(3):991-3.
139. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *1995 Science* 270 (5235): 467–470.
140. Ehret R, Schütze M, Moritz A, Breuer S and Obermeier M. Performance of the Cepheid Xpert® HIV-1 VL compared to the Abbott RealTime HIV-1 viral load measurement. Comunicación presentada al 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenague. Abril 2015.
141. Trembizki E, Costa AM, Tabrizi SN, Whiley DM, Twin J. Opportunities and pitfalls of molecular testing for detecting sexually transmitted pathogens. *Pathology.* 2015;47(3):219-26.
142. Buttó S, Suligoi B, Fanales-Belasio E, Raimondo M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann Ist Super Sanità* 2010;46(1 ):24–33
143. Pebody R. HIV testing, *Aidsmap*, 2012. Disponible en: [http://www.aidsmap.com/v635544251970000000/file/1187610/HPE\\_briefing\\_HIV\\_testing\\_technologies.pdf](http://www.aidsmap.com/v635544251970000000/file/1187610/HPE_briefing_HIV_testing_technologies.pdf). Visitado el 31 de Julio del 2015
144. Alvarez Estévez M, Reina González G, Aguilera Guirao A, Rodríguez Martín C, García García F. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.07.007>
145. Aguilera Guirao A, Álvarez Estévez M, García García F, Reina González G, Rodríguez Martín C. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. 6a. García García F. (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. Disponible en [www.seimc.org](http://www.seimc.org). Visitado el 02 de Agosto del 2015
146. Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro surveill* 2008;13.pii:18966.
147. Martró E, Suligoi B, González V, Bossi V, Esteve A, Mei J, et al. Comparison of the avidity index method and the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion, two methods using a single serum sample for identification of recent HIV infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6197–9.
148. WHO. AIDS. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidem Rec* 1990;65:281-3

149. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in Western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:649-59.
150. Amor A, Toro C, Jiménez V, Simón A, Ramos B, Soriano V. Seroreversion of HIV antibodies in patients with prolonged suppression of viraemia under HAART. *AIDS* 2006;20:1460-2
151. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Detection of acute HIV infection in two evaluations of a new HIV diagnostic testing algorithm – United States, 2011–2013. *MMWR*. 2013;62:489–94.
152. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Revised recommendations for the selection and use of HIV antibody tests. *Wkly Epidemiol Rec* 1997;72:81-8.
153. Owen SM, Yang C, Spira T, Ou CY, Pau CP, Parekh BS, Candal D, Kuehl D, Kennedy MS, Rudolph D, Luo W, Delatorre N, Masciotra S, Kalish ML, Cowart F, Barnett T, Lal R, McDougal JS. Alternative algorithms for human immunodeficiency virus infection diagnosis using tests that are licensed in the United States. *J Clin Microbiol* 2008;46:1588-95
154. Soreng K, Levy R, Fakile Y. Serologic Testing for Syphilis: Benefits and Challenges of a Reverse Algorithm. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2014; 36(24):195-202.
155. Berkowitz K1, Baxi L, Fox HE. False-negative syphilis screening: the prozone phenomenon, nonimmune hydrops, and diagnosis of syphilis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163(3):975-7.
156. Brown ST, Zaidi A, Larsen SA, Reynolds GH. Serological response to syphilis treatment: a new analysis of old data. *JAMA*. 1985 ;253(9):1296-9.
157. Seña AC, White B, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 700–708
158. Larsen, S.A. B.M. Steiner, and A.H. Rudolph. 1995. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 8:1-21
159. Binnicker MJ.. Which algorithm should be used to screen for syphilis? *Curr Opin Infect Dis*. 2012 Feb;25(1):79-85.
160. Kingston, M. French P, Goh B, Goold P, Higgins S, Sukthankar A, Stott C, Turner A, Tyler C, Young H. U.K. national guidelines on the management of syphilis. *Int. J. STD AIDS* 2008;19:729-740
161. World Health Organization .Global prevalence and incidence of curable STIs. Geneva, Bull World Health Organ, 2001 (WHO/CDS/CDR/ EDC/2001.10). Disponible en: [http://www.who.int/hiv/pub/sti/who\\_hiv\\_aids\\_2001.02.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf). Visitado el 05 de Agosto del 2015.

162. Mayaud P, Mabey D. Approaches to the control of sexually transmitted infections in developing countries: old problems and modern challenges. *SexTrans Infect*, 2004, 80:174–182.
163. World Health Organization. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections : 2006 - 2015 : breaking the chain of transmission. Geneva, Bull World Health Organ.2007. Disponible en: [http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis\\_strategy\[1\]en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/stis_strategy[1]en.pdf). Visitado el 05 de Agosto del 2015.
164. Crabbe F, Carsawu H, Buve A, et al. Why do men with urethritis in Cameroon prefer to seek care in the informal health sector? *Genitourin Med* 1996;72:220–2
165. Garcia P, Hughes J, Carcamo C, Holmes KK. Training pharmacy workers in recognition, management, and prevention of stds: district-randomized controlled trial. *Bull World Health Organ*. 2003;81(11):806-14.
166. Connolly AM, Wilkinson D, Harrison A, Lurie M, Karim SS. Inadequate treatment for sexually transmitted diseases in the South African private health sector. *Int J STD AIDS*1999; 10:324–7.
167. Mayaud P, Mabey D. Approaches to the control of sexually transmitted infections in developing countries: old problems and modern challenges. *Sex Transm Infect* 2004; 80:174-182
168. Yorke JA, Hethcote HW, Nold A. Dynamics and control of the transmission of gonorrhoea. *Sex Transm Dis*1978;5:51–6.
169. Fox KK, Whittington WL, Levine WC, Moran JS, Zaidi AA, Nakashima AK. Gonorrhoea in the United States, 1981–1996. *Sex Transm Dis*1998;25:386–93.
170. Diaz A, Garriga C, Varela JA, Fernández E, Sanz I, Boronat J, Gual F, Colomo C, López de Munain J, Esteban V, Junquera ML, Martínez B, Pueyo I, Suárez J, Barberá MJ, Arando M, Ureña JM, Diez M; STI Study Group. Gonorrhoea diagnoses in a network of STI clinics in Spain during the period 2006–2010: differences by sex and transmission route. *BMC Public Health* 2013, 13:1093
171. Cunha CB, Friedman RK, de Boni RB, Gaydos C, Guimarães MR, Siqueira BH, Cardoso SW7, Chicayban L8, Coutinho JR9, Yanavich C, Veloso VG, Grinsztejn B. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and syphilis among men who have sex with men in Brazil. *BMC Public Health*. 2015 Jul 21;15:686
172. Murray PJ, Braverman PK, Adelman WP, Breuner CC, Levine DA, Marcell AV, Murray PJ, O'Brien RF, Burstein GR. Committee on Adolescence; Society for Adolescent Health and

- Medicine. Screening for nonviral sexually transmitted infections in adolescents and young adults. *Pediatrics*. 2014 Jul;134(1):e302-11
173. Lippman SA, Jones HE, Luppi CG, Pinho AA, Veras MA, van de Wijgert JH. Home-based self-sampling and self-testing for sexually transmitted infections: acceptable and feasible alternatives to provider-based screening in low-income women in São Paulo, Brazil. *Sex Transm Dis*. 2007 Jul;34(7):421-8.
174. Paudyal P, Llewellyn C, Lau J, Mahmud M, Smith H. Obtaining self-samples to diagnose curable sexually transmitted infections: a systematic review of patients' experiences. *PLoS One*. 2015 24;10(4):e0124310.
175. Kuznik A, Habib AG, Manabe YC, Lamorde M. Estimating the public health burden associated with adverse pregnancy outcomes resulting from syphilis infection across 43 countries in Sub-Saharan Africa. *Sex Transm Dis*. 2015 Jul;42(7):369-75
176. WHO/EM: Report on the intercountry workshop on STD prevalence study, Amman, Jordan, 12–15 Oct 1998.
177. World Health Organization (WHO). When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. Geneva: WHO. Disponible en: <http://www.who.int/diagnostics laboratory/ hiv incidence may13 final.pdf>. Visitado el 10 de Agosto del 2015.
178. Chawla A, Murphy G, Donnelly C, Booth CL, Johnson M, Parry JV, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) antibody avidity testing to identify recent infection in newly diagnosed HIV type 1 (HIV-1)-seropositive persons infected with diverse HIV-1 subtypes. *J Clin Microbiol*. 2007;45:415–20.
179. CDC. Discordant results from reverse sequence syphilis screening—five laboratories, United States, 2006-2010. *MMWR* 2011;60:133–7.
180. Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Blanco Galán MA, Aznar Martín J, Vázquez Valdés F. Panorama actual de la epidemiología, diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 13:25-31.
181. McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D, Kong F, Freedman E, Wang H, Gilbert GL. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1871-7.
182. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijans M, Mulders B, Simons G, Temmerman M, Claeys G, Padalko E. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(1):29-37.

183. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, Kim TH, Cho YH. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis.* 2013;17(12):e1134-40.
184. Suligoi B, Galli C, Massi M, Di Sora F, Sciandra M, Pezzotti P, et al. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4015–20.
185. Wang JS, Kee MK, Choi BS, Kim SS. Modification of AxSYM Human Immunodeficiency Virus assay to identify recent Human Immunodeficiency Virus infections in Korean Human Immunodeficiency Virus-positive individuals. *Osong Public Health Res Perspect* 2015 6(3), 184-191
186. Parekh BS, Kennedy S, Dobbs T, Pau CP, Byers R, Green T, Hu DJ, Vanichseni S, Young NL, Choopanya K, Mastro TD, McDougal JS. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2002, 18:295–307.
187. Romero A, González V, Granell M, Matas L, Esteve A, Martró E, Rodrigo, I.; Pumarola, T.; Miró, J. M.; Casanova, A.; Ferrer, E.; Tural, C.; Romero, J. del; Rodríguez, C.; Caballero, E.; Ribera, E.; Casabona, J.; Spain, Standardized Algorithm for Recent HIV Infections (AERIVIH) study group. Recently acquired HIV infection in Spain (2003-2005): introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect.* 2009 Apr;85(2):106–10.
188. World Health Organization (WHO). 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. WHO, Geneva. <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/>. Visitado el 11 de Agosto del 2015
189. Lipinsky D, Schreiber L, Kopel V, Shainberg B.. Validation of reverse sequence screening for syphilis. *J Clin Microbiol.* 2012. 50:1501.
190. Marangoni A, Sambri V, Accardo S, Cavrini F, D'Antuono A, Moroni A, Storni E, Cevenini R.. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005.12:1231-4.
191. Wellinghausen N, Diertenberger H. Evaluation of two automated chemiluminescence immunoassays, the LIAISON Treponema screen and the ARCHITECT Syphilis TP, and the

- Treponema pallidum particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis. Clin Chem Lab Med. 2011.49:1375-7.
192. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Direct comparison of the traditional and reverse syphilis screening algorithms in a population with a low prevalence of syphilis. J Clin Microbiol. 2012. 50:148-50.
193. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Discordant results from reverse sequence syphilis screening--five laboratories, United States, 2006-2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011. 60:133-7.
194. Mishra S, Boily MC, Ng V, Gold WL, Okura T, Shaw M, Mazzulli T, Fisman DN. The laboratory impact of changing syphilis screening from the rapid-plasma reagin to a treponemal enzyme immunoassay: a case-study from the Greater Toronto Area. Sex Transm Dis. 2011. 38:190-6.
195. Marangoni A, Nardini P, Foschi C, Moroni A, D'Antuono A, Bacchi Reggiani L, Cevenini R. 2013. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis system as a first-line method of reverse-sequence screening for syphilis diagnosis. Clin Vaccine Immunol. 20:1084-8.
196. Binnicker MJ, Jespersen DJ and Rollins LO. Treponema-Specific Tests for Serodiagnosis of Syphilis: Comparative Evaluation of Seven Assays. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(4):1313-1317
197. Ghanem KG. Management of adult syphilis: key questions to inform the 2015 Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. Clin Infect Dis. 2015;61:S818-36
198. Heras E, Llibre JM, Martró E, Casabona J, Martín-Iguacel R, Sirera G. Lymphogranuloma venereum proctocolitis in men with HIV-1 infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(2):124-6
199. Sandkovsky U, O'Neill J, Sayles H, et al. High rates of asymptomatic Chlamydia and gonorrhea infection among HIV infected MSM. IDWeek 2015, October 7-11, San Diego. Abstract 120. <https://idsa.confex.com/idsa/2015/webprogram/Paper50444.html>.
200. Weinstein SA, Stiles BG. A review of the epidemiology, diagnosis and evidence-based management of Mycoplasma genitalium. Sexual Health 2011; 8: 143-158
201. Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum in acute and chronic nongonococcal urethritis. Clin Infect Dis 2001; 32:995-1003

## ANEXOS: ARTÍCULOS



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

## Evaluation of an antibody avidity index method for detecting recent human immunodeficiency virus type 1 infection using an automated chemiluminescence immunoassay



Gema Fernández<sup>b</sup>, Christian Manzano<sup>d</sup>, Alexandra Montoliu<sup>a,c</sup>, Colin Campbell<sup>a,c</sup>, Gregorio Fernández<sup>b</sup>, Jordi Casabona<sup>a,c</sup>, José María Miró<sup>d</sup>, Lurdes Matas<sup>b,c</sup>, Belén Rivaya<sup>b</sup>, Victoria González<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre for Epidemiological Studies on HIV/STI in Catalonia (CEEISCAT) – ICO, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Microbiology Service, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

<sup>c</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Infectious Diseases Service, Hospital Clínic/DIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 January 2014

Accepted 25 April 2014

Available online 22 July 2014

#### Keywords:

Human immunodeficiency virus

Avidity index

Recent infection

False recent rate

Incidence

### ABSTRACT

**Background:** Recent infection testing algorithms (RITAs) are used in public health surveillance to estimate the incidence of recently acquired HIV-1 infection.

**Objectives:** Our aims were (i) to evaluate the precision of the VITROS® Anti-HIV 1+2 automated antibody avidity assay for qualitative detection of antibodies to HIV 1+2 virus; (ii) to validate the accuracy of an automated guanidine-based antibody assay to discriminate between BED-CEIA and long standing infections using the VITROS 3600 platform; (iii) to compare this method with BED-CEIA assay; and (iv) to evaluate the occurrence of false recent misclassifications by the VITROS antibody avidity assay in patients with a CD4 count <200 cells/ $\mu$ L and in patients on combination antiretroviral therapy (cART).

**Results:** The VITROS® antibody avidity assay is highly reproducible. The ROC curve analysis of the accuracy of this assay, optimized for sensitivity and specificity, had an AI cut off of  $\leq 0.51$ , with sensitivity and specificity values of 86.67% (95% CI: 72.51–94.46) and 86.24% (95% CI: 78.00–91.84), respectively. The agreement between VITROS antibody avidity and BED-CEIA assays was good. Misclassifications of long standing infections as recent infection occurred in 8.2% of patients with CD4 <200 cell/ $\mu$ L and 8.7% in patients on combination antiretroviral therapy.

**Conclusions:** The VITROS antibody avidity assay is a reliable serological method to detect recent HIV-1 infections and it could be incorporated into a RITA to estimate HIV incidence.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Evaluación de una técnica de avididad para la detección de infección reciente por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 utilizando un inmunoanálisis automatizado de quimioluminiscencia

### RESUMEN

**Introducción:** El algoritmo RITA (*recent infection testing algorithm*) es utilizado en los sistemas de vigilancia epidemiológica de Salud Pública para estimar la incidencia de infección por VIH-1 en nuestro medio.

**Objetivos:** Los objetivos de nuestro estudio fueron: (i) Evaluar la precisión del ensayo de avididad automatizado VITROS® Anti-HIV1+2 para la detección cualitativa de anticuerpos frente al VIH-1 y el VIH-2; (ii) Validar la precisión de un ensayo de avididad automatizado para discriminar entre infección reciente y crónica por el VIH-1 utilizando la plataforma VITROS 3600; (iii) Comparar este método con el ensayo

#### Palabras clave:

Virus de la inmunodeficiencia humana

Índice de avididad

Infección reciente

Tasa de falsos recientes

Incidencia

\* Corresponding author.

E-mail address: vgsoler@iconcologia.net (V. González).

BED-CEIA; y (iv) Evaluar la tasa de infecciones crónicas por VIH-1 clasificadas incorrectamente como recientes en los pacientes en tratamiento antirretrovírico combinado y en pacientes con un recuento de CD4 < 200 células/μL.

**Resultados:** El ensayo de avidez de VITROS es altamente reproducible. El análisis de curvas ROC reveló que un valor de punto de corte  $\leq 0,51$  con una sensibilidad y especificidad del 86,7% (IC 95%: 72,5–94,5) y del 86,2% (IC 95%: 78–91,8) respectivamente, es óptimo para buena especificidad de VIH-1. La correlación entre el ensayo de VITROS® avidez y BED-CEIA fue buena ( $\kappa = 0,77$ ; IC 95%: 0,67–0,86). La tasa de infecciones crónicas por VIH-1 clasificadas incorrectamente como recientes por el ensayo de avidez fueron del 8,2% en los pacientes con CD4 < 200 células/μL y del 8,7% en los pacientes en tratamiento antirretrovírico combinado.

**Conclusiones:** El ensayo de avidez evaluado es un método fiable para detectar infecciones recientes por VIH-1 y podría ser utilizado dentro de un algoritmo RITA para estimar la incidencia de infección por VIH-1 en la población.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

## Introduction

At the time of writing, eight types of assays have been developed as tests for recent HIV infection. Although some of these have been developed specifically to identify recent infection, others are modifications of HIV diagnostic tests,<sup>1</sup> with the first HIV incidence study using recent infection assays being published in 1998.<sup>2</sup> As well as being used for the estimation of incidence,<sup>3</sup> less frequently, these tests are used for individual diagnosis of recent HIV infection, with suitable caveats.<sup>3</sup>

Many of these early serological approaches to the detection of recent infection were based initially on changes in antibody titer, using dual sensitive/less sensitive detuned enzyme immunoassay (3A11, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) and (Vironostika, BioMerieux INC., Durham, NC). Later, a quantitative enzyme immunoassay for the determination of the proportion of HIV-1 specific IgG was commercialized.<sup>4</sup> More recently, commercial antibody avidity assays have been developed and marketed.<sup>5–8</sup> These avidity assays are based on the rationale that in the early phase of infection, antibodies show a low avidity (binding capacity) for HIV antigen and that over a period of 6–12 months the avidity matures and rises. Techniques based on limiting antigen avidity EIA (LAg-Avidity EIA) to identify recent HIV infections in cross-sectional studies using a multi-subtype gp41 recombinant protein have been described recently and although LAg assays are promising, they are also subject to misclassification.<sup>9</sup>

A significant problem of serological assays used to detect recent HIV infection is the misclassification of long standing infection (LSI) as recent infection (RI), so-called the false recent rate (FRR) which can lead to an over-estimate of HIV incidence.<sup>10,11</sup> FRR occurs more frequently in HIV positive patients with LSI, advanced infection (defined by a diagnosis of AIDS, CD4 count <200 cell/μL) or among those on antiretroviral therapy (ART) and elite controllers (HIV positive patients with low or undetectable viral loads in the absence of ART).<sup>12,13</sup>

Recent studies have shown that the FRR can be minimized by using algorithms for detecting recent HIV infection which include more than one serological assay and complementing the results with additional clinical information or laboratory tests such as CD4+T cell count or antiretroviral drug testing.<sup>14,15</sup>

In Catalonia, recent infection algorithms have been part of the HIV surveillance system since 2003,<sup>16</sup> initially using Vironostika and later BED-CEIA.<sup>17</sup> BED has been found to have a high FRR<sup>18</sup> and in addition its application in our setting incurs a relatively high cost. The Vitros already used at our laboratory for HIV diagnosis, has a rapid turnaround time and has been shown to accurately detect recent HIV infections.<sup>8</sup> It has the additional advantage of not needing official approval by the regulatory authority since it is

a modification of existing methods and requires only a preparation sample.<sup>5,8</sup>

Key aims of this study were (i) to evaluate the precision of an automated antibody avidity assay for qualitative detection of antibodies to HIV 1+2 virus; (ii) to validate the accuracy of an automated guanidine-based antibody avidity assay to discriminate between RI ( $\leq 6$  months after seroconversion date) and LSI ( $> 12$  months after the diagnosis of HIV infection) using the VITROS® Anti-HIV 1+2 assay (Ortho Clinical Diagnostics Inc, Cardiff, Wales, UK) in a VITROS 3600 platform; (iii) to compare this method with BED-CEIA assay (Calypte Biomedical Inc, Portland, OR, USA), which is the only commercial assay developed specifically for HIV incidence surveillance; and (iv) to evaluate the occurrence of false recent misclassifications by the VITROS antibody avidity assay in patients with a CD4 count <200 cells/μL and in patients on combination antiretroviral therapy (cART).

## Materials and methods

### Precision study

The precision of the VITROS HIV antibody avidity assay was assessed following the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document EP5-A2.<sup>19</sup> We selected nine serum samples from nine different individual known to have tested positive for HIV 1+2 using the VITROS® Immunodiagnos-tics Products HIV 1+2 and confirmed as positive by Inno-LiA test (Innogenetics Inc, Alpharetta, GA, USA). Two of these nine specimens had a weak positive signal (a sample/cutoff [S/CO] of less than eight). For each sample, we tested two aliquots of 150 μL; one aliquot was diluted 1:10 with phosphate buffer saline (PBS) and the other one was diluted 1:10 with 1 M guanidine (dissociation agent). All samples were vortexed and incubated at room temperature for 10 min. Two replicates each of nine samples were tested by VITROS® Immunodiagnos-tics Products HIV 1+2 using the VITROS 3600 instrument on two separate runs every day for 10 days.

The Vitros Anti HIV1+2 assay is a qualitative chemiluminescence immunoassay using Intellicheck® Technology. In the first stage of this assay, HIV antigens present in the sample bind with HIV recombinant antigen coated on the wells (four recombinant antigens derived from HIV-1 core (p24), HIV-1 envelope (p10 and p13) and HIV-2 envelope AL). In the second stage, the conjugate (horseradish peroxidase (HRP)-labeled) binds specifically to any human anti-HIV-1 or anti-HIV-2 (IgG and IgM) captured on the wells in the first stage. The bound conjugate is measured by a luminescent reaction. A reagent containing luminogenic substrates is added to the wells with an electron transfer agent. The conjugate

catalyzes the oxidation of the luminol derivate, producing light, which is measured by a luminometer. Results are reported as the S/CO ratio with positive values being  $\geq 1.00$ . The avidity index (AI) was calculated using the following formula:  $AI = (S/CO \text{ ratio of the guanidine aliquot}) / (S/CO \text{ ratio of the PBS aliquot})$ .

*Statistical analysis of the precision study*

We calculated the mean and standard deviations of the AI obtained on each sample in each run and every day. The intra-day, inter-day and total imprecision of procedure were analyzed by analysis of variance and expressed as coefficients of variation.

*Validation study*

We performed a validation study to evaluate the accuracy of the VITROS antibody avidity assay to detect RI and the ability to discriminate between RI and LSI. A total of 154 serum samples from 47 HIV-1 positive patients and confirmed according to standard HIV algorithms for screening and confirmatory testing were included in the study. For these patients the seroconversion date could be estimated as the midpoint between the last HIV-negative test and the first HIV-positive test (interval between the two tests  $\leq 24$  months). For each patient, at least one serum sample was collected within the first year of the seroconversion date, plus one or more samples (two to seven specimens per patient) collected at different points after seroconversion. Nineteen of these patients were known to be infected with subtype B, one patient was infected with subtype CRF01\_AE and in the remaining patients the subtype was unknown. The study received approval from the local Ethics Committee.

*Statistical analysis of the validation study*

The distribution of the AI at different times after seroconversion date was graphically represented with box plots. ROC analysis was used to determine the accuracy of the VITROS antibody avidity assay to discriminate between recent and established HIV-1 infection. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of this assay were calculated.

*Comparison of the VITROS HIV antibody avidity and BED-CEIA assays for detecting recent HIV-1 infections*

A total of 164 serum samples from HIV-1 infected patients with known seroconversion date were collected to compare the ability of both assays to detect RIs. Kappa coefficient was used to assess agreement between results obtained by both, using a cut off of  $\leq 0.51$  for the VITROS antibody avidity assay and a normalized median optical density (ODn) of  $\leq 0.8$  for BED-CEIA assay as recommended by the manufacturer (Kappa values interpreted according to Viera and Garrett<sup>20</sup>). We defined a “gray zone” for VITROS antibody avidity assay based on the precision study, which showed a

coefficient variation of the avidity index  $< 5\%$ . The BED-CEIA assay procedure has been described previously.<sup>21</sup> Briefly, serum samples and controls were diluted 1:101. Specimens were tested singly and the controls (high and low positive and calibrator) were tested in triplicate and their median values were used to calculate the normalized ODn. Specimens with  $ODn \leq 1.2$  were tested in triplicate to confirm their ODn values. In confirmatory testing, those specimens with  $ODn < 0.8$  were considered as recent infections.

*Evaluation of the frequency of false recent misclassification using the VITROS HIV antibody avidity assay*

We selected 73 patients with CD4 count  $< 200 \text{ cell}/\mu\text{L}$  and 138 patients on long cART to investigate the ability of the VITROS HIV antibody avidity assay to correctly discriminate RI from LSI in advanced and treated HIV-1 infection.

**Results**

*Precision study*

The results obtained in the precision study are shown in [Table 1](#). The intra-day, inter-day, coefficients of variation and the total variance of the VITROS antibody avidity assay were consistently lower than 5%.

*Validation study*

Among the 154 samples selected, 45 samples were collected 0–6 months after seroconversion, 25 samples were collected 7–12 months after seroconversion, and 84 were collected more than 12 months after seroconversion. The distribution of avidity index by the time elapsed since seroconversion is shown in [Fig. 1](#). The AI reached approximately 1 at the end of the first year after seroconversion. For serum samples collected within 6 months from seroconversion, the 75th percentile was lower than 0.51. The median avidity indices increased with time since seroconversion, from 0.33 IQR (0.22–0.44) to 1.01 IQR (0.89–1.14). There were significant differences between groups ( $p < 0.001$  Kruskal–Wallis test). The ROC curve analysing the accuracy of the VITROS HIV antibody avidity assay to detect recent HIV-1 infection is shown in [Fig. 2](#). We explored several cut offs for the VITROS antibody avidity assay and the optimal cut off point on the ROC curves for clinical use was an AI equal or lower than 0.51, with a sensitivity and specificity values of 86.67% (IC 95%: 72.51–94.46) and 86.24% (IC95%: 78.00–91.84), respectively.

Once the sensitivity and specificity were calculated, we estimated the positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively) of the VITROS antibody avidity assay if we were to use this test for identification recent HIV-1 infections among HIV-positive populations. Considering the prevalence of recent HIV

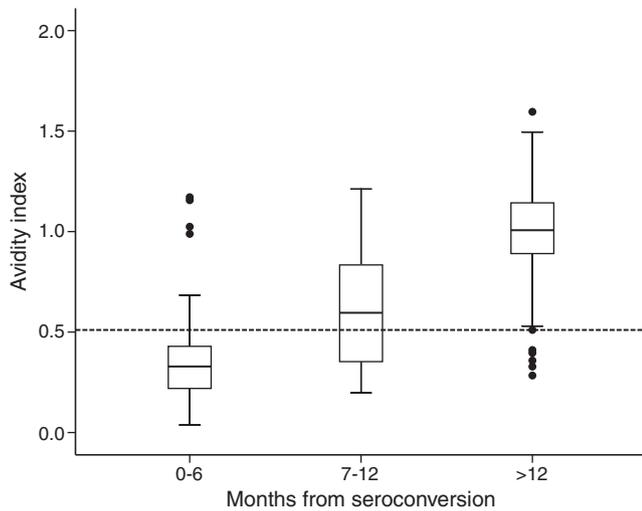
**Table 1**  
Precision of the VITROS antibody avidity assay to detect recent HIV infection.

Specimen no	Mean AI <sup>a</sup>	STD <sup>b</sup> intraday	STD interday	STD total	%CV <sup>c</sup> intraday	%CV interday	%CV total
1	0.275	0.000	0.022	0.022	0.000	8.137	8.137
2	0.297	0.000	0.022	0.022	0.000	5.318	5.318
3	0.965	0.032	0.042	0.052	3.276	4.334	5.433
4	0.243	0.000	0.016	0.016	0.000	6.520	6.520
5	0.739	0.032	0.016	0.035	4.280	2.140	4.786
6	0.773	0.032	0.000	0.032	4.092	0.000	4.092
7	0.585	0.000	0.016	0.016	0.000	2.701	2.701
8	0.991	0.032	0.000	0.032	3.192	0.000	3.192
9	0.093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>a</sup> Mean of 40 replicates.

<sup>b</sup> STD – standard deviation.

<sup>c</sup> Coefficients of variation.

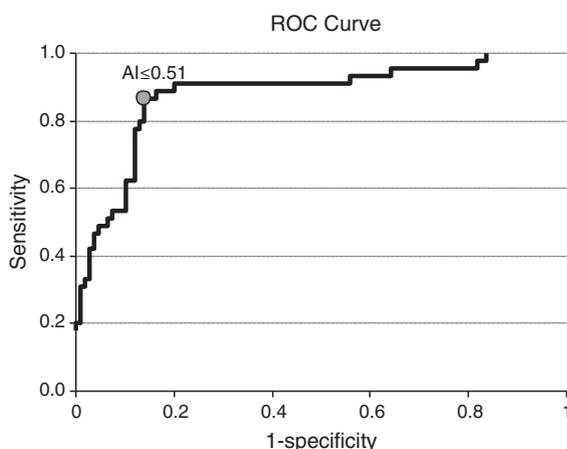


**Fig. 1.** Box-plots of the avidity index by time from seroconversion in months. Values not within the range of the adjacent values are individually plotted (circle). The dotted line indicates  $AI = 0.51$ .

infection obtained in our previous study, which was 19.5%<sup>14</sup>; we could estimate a PPV and NPV for this assay of 61.16% and 97.34%, respectively.

#### *Comparative study between VITROS HIV antibody avidity and BED-CEIA assays for identification of recent HIV-1 infections*

The overall agreement between the VITROS HIV antibody avidity and BED-CEIA assays was substantial ( $\kappa = 0.77$  IC95%: 0.67–0.86), with both assays concordant in classifying 66 specimens as RI and 79 specimens as LSI. The remaining 19/164 (11.58%) specimens were discrepant. Eighteen specimens were classified as RI by the BED assay and as LSI by the VITROS antibody avidity assay. Among these 18 discrepant results, 15 specimens were collected more than 12 months after seroconversion and 3 specimens were collected 9, 8 and 1 months respectively after seroconversion. One specimen was classified as an RI by the VITROS antibody avidity assay and as LSI by the BED assay; this specimen was collected 6 months after seroconversion. The AI was in the gray zone for 10 specimens with VITROS antibody avidity assay (Fig. 3). The agreement between BED-CEIA and VITROS antibody avidity assays remained similar when the 10 specimens in the gray zone were excluded ( $\kappa = 0.78$  IC95%: 0.68–0.87).



**Fig. 2.** ROC analysis to identify the optimal avidity index (AI) cut off to discriminate between recent and long standing HIV infection.

#### *Misclassifications among patients with CD4 count <200 cell/ $\mu$ L and patients on long cART therapy*

Overall the VITROS antibody avidity assay misclassified 6 (8.2%; 95% IC 3.4–17.6%) of 73 patients with CD4 count <200 cell/ $\mu$ L and 12 (8.7%; 95% IC 4.8–15.0%) of 138 patients on cART as recently infected.

#### **Discussion**

The purpose of our study was to evaluate the precision and accuracy of an automated guanidine-based HIV antibody avidity index method to detect recent HIV-1 infections using the VITROS 3600 instrument, which is available to clinical laboratories in Europe and other countries worldwide. The VITROS system has a rapid turnaround, allowing clinical laboratories to run the sensitive HIV diagnostic test followed by the antibody avidity modified version.

The results of the precision study showed that the VITROS HIV antibody avidity assay is highly reproducible with a variance of less than 5%. Accuracy of the assay was shown in the validation study by ROC curves results, which showed that an AI cut off of  $\leq 0.51$  optimized the values for sensitivity and specificity (86.67% and 86.24%, respectively). These data are consistent with a study published by Suligoi et al., in which the authors obtained a sensitivity and specificity of 87.9% and 86.3% using AXSYM antibody avidity assay and an AI lower than 0.9.<sup>22</sup> The selection of an AI cut off depends on the study purpose. For epidemiological HIV surveillance, a higher AI cut off and thus a higher sensitivity may be desirable, whereas a lower cut off, which increases specificity could be used by clinicians to decide on early ART. Overall, the VITROS HIV antibody avidity assay performed well compared to results obtained by BED-CEIA assay, and the proportion of sera correctly classified as LSI was slightly higher with the VITROS antibody avidity assay. After a single 1:10 dilution, this assay can be fully automated using the VITROS 3600 instrument, which leads to better reproducibility. In this comparative study, 10 specimens (6%) had a result within the gray zone using VITROS antibody avidity assay. When these were excluded from analysis, no significant changes in the overall agreement between both assays were observed, a result that is consistent with other study.<sup>6</sup>

The VITROS antibody avidity assay accurately distinguished LSI from RI in patients on cART and patients with CD4 count <200 cell/ $\mu$ L. Misclassification of these groups as RIs could be expected as a consequence of changes in qualitative and quantitative antiviral antibody responses in patients with advanced illness or those on ART.

The performance of recent infection testing algorithm (RITA) assays on as many as new diagnosis as possible has contributed to a better assessment of late diagnosis and its determinants. Nevertheless, incidence estimates rely on having the lowest FRR possible and at present, none of the available serological assays used for detection recent HIV infections are ideal due to the high false recent rates. In order to minimize false recent misclassification and thereby improve the accuracy of incidence estimations, the best approach is the use of more than one serological assays in a multistep parallel or serial algorithm as suggested by the WHO Technical Working Group on HIV Incidence assays.<sup>1</sup> Clinical and laboratory information incorporated into the assay can be used to exclude from testing those with known late or advanced infection and the application of a screening sensitive assay (BED-CEIA) followed by a more specific assay (VITROS antibody avidity assay) may well provide the best balance between cost and minimized FRR in our setting. Formal comparison of a new RITA incorporating more than one serological assay would need to be undertaken to determine the best algorithm for detection of RI and estimation of HIV incidence and therefore consolidate its applicability in Public Health.

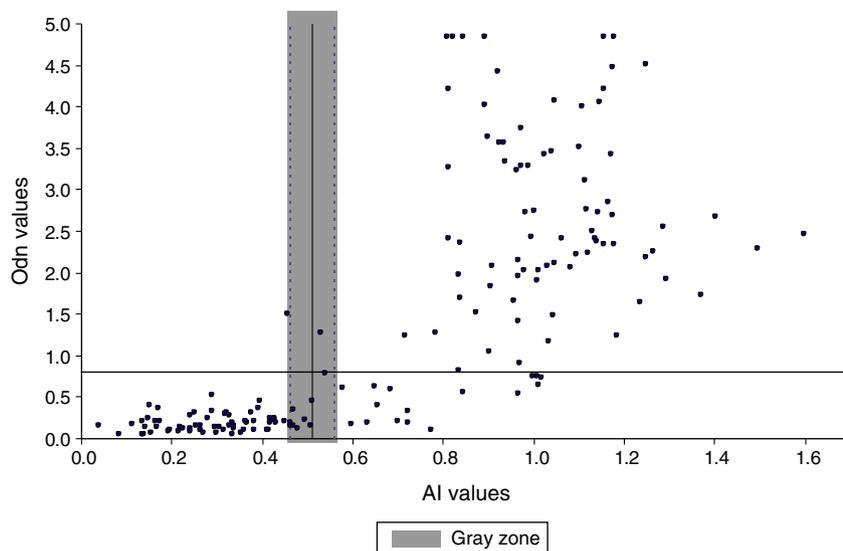


Fig. 3. Correlation between the VITROS antibody avidity assay and BED-CEIA assay.

### Conflict of interest

VITROS® Anti-HIV1+2 reagents were provided by Ortho Clinical Diagnostics (a Johnson & Johnson Company, Madrid, Spain). However, this commercial sponsor had no involvement in study design; collection, analysis, or interpretation of data; writing the manuscript; and the decision to submit the manuscript for publication.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Núria Margall and Aurora Casanova their help in specimen collection. We also thank Ortho Clinical Diagnostics (Spain) for providing us the required reagent kits.

### References

- World Health Organization (WHO). When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level [Internet]. Geneva: WHO. Available from: [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/hiv\\_incidence\\_may13\\_final.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/hiv_incidence_may13_final.pdf)
- Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA*. 1998;280:42–8.
- Hall HI, Song R, Rhodes P, Prejean J, An Q, Lee LM, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA*. 2008;300:520–9.
- Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau C-P, Byers R, Green T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:295–307.
- Chawla A, Murphy G, Donnelly C, Booth CL, Johnson M, Parry JV, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) antibody avidity testing to identify recent infection in newly diagnosed HIV type 1 (HIV-1)-seropositive persons infected with diverse HIV-1 subtypes. *J Clin Microbiol*. 2007;45:415–20.
- Suligoi B, Rodella A, Raimondo M, Regine V, Terlenghi L, Manca N, et al. Avidity index for anti-HIV antibodies: comparison between third- and fourth-generation automated immunoassays. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2610–3.
- Martró E, Suligoi B, González V, Bossi V, Esteve A, Mei J, et al. Comparison of the avidity index method and the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion, two methods using a single serum sample for identification of recent HIV infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6197–9.
- Keating SM, Hanson D, Lebedeva M, Laeyendecker O, Ali-Napo NL, Owen SM, et al. Lower-sensitivity and avidity modifications of the vitros anti-HIV 1+2 assay for detection of recent HIV infections and incidence estimation. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3968–76.
- Longos AF, Mehta SH, Kirk GD, Margolick JB, Brown J, Quinn TC, et al. Incorrect identification of recent HIV infection in adults in the United States using a limiting-antigen avidity assay. *AIDS*. 2014;28:1227–32.
- Guy R, Gold J, Calleja JMG, Kim AA, Parekh B, Busch M, et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:747–59.
- Bärnighausen T, McWalter TA, Rosner Z, Newell M-L, Welte A. HIV incidence estimation using the BED capture enzyme immunoassay: systematic review and sensitivity analysis. *Epidemiology*. 2010;21:685–97.
- Cimerman S, Sucuspir MCA, Lewi DS, Lett RS. Less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay as an adjuvant method for monitoring patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care STDS*. 2007;21:100–5.
- Laeyendecker O, Rothman RE, Henson C, Horne BJ, Ketlogetswe KS, Kraus CK, et al. The effect of viral suppression on cross-sectional incidence testing in the Johns Hopkins hospital emergency department. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:211–5.
- Curtis KA, Longos AF, Kennedy MS, Keating S, Heitman J, Laeyendecker O, et al. Inter-laboratory assessment of a prototype multiplex kit for determination of recent HIV-1 infection. *PLOS ONE*. 2013;8:e77765.
- Laeyendecker O, Brookmeyer R, Cousins MM, Mullis CE, Konikoff J, Donnell D, et al. HIV incidence determination in the United States: a multiassay approach. *J Infect Dis*. 2013;207:232–9.
- Romero A, González V, Granell M, Matas L, Esteve A, Martró E, et al. Recently acquired HIV infection in Spain (2003–2005): introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect*. 2009;85:106–10.
- Romero A, Martró E, González V, Matas L. Comparison of two serological tests for the identification of recent HIV infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED capture enzyme immunoassay. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:553–5.
- Laeyendecker O, Brookmeyer R, Oliver AE, Mullis C, Eaton KP, Mueller AC, et al. Factors associated with incorrect identification of recent HIV infection using the BED capture immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 2012 [Internet] 2011 October 20 [cited 2011 November 4]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22014036>
- Clinical, Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved Guideline. 2nd ed. CLSI document EP-5A2. NCCLS; 2004.
- Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37:360–3.
- Dobbs T, Kennedy S, Pau C-P, McDougal JS, Parekh BS. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2623–8.
- Suligoi B, Galli C, Massi M, Di Sora F, Sciandra M, Pezzotti P, et al. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4015–20.

# Evaluation of the Vitros Syphilis TPA Chemiluminescence Immunoassay as a First-Line Method for Reverse Syphilis Screening

Victoria González,<sup>a,b,c</sup> Gema Fernández,<sup>b</sup> Eva Dopico,<sup>d</sup> Nuria Margall,<sup>e</sup> Juliana Esperalba,<sup>f</sup> Carme Muñoz,<sup>e</sup> Elisabeth Castro,<sup>d</sup> Elena Sulleiro,<sup>f</sup> Lurdes Matas<sup>b,c</sup>

Centre for Epidemiological Studies on HIV/STI in Catalonia (CEEISCAT), Agencia de Salut Pública de Catalunya (ASPC), Generalitat de Catalunya, Badalona, Spain<sup>a</sup>; Department of Microbiology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain<sup>b</sup>; CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain<sup>c</sup>; Laboratori Clínic de l'Hospitalet, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain<sup>d</sup>; Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>e</sup>; Department of Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebró, Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>f</sup>

**We report here the results of the diagnostic performances of Vitros Syphilis TPA (a chemiluminescence treponemal assay) compared with those of two treponemal enzyme immunoassays and of traditional versus reverse syphilis algorithms. Ease of use, automation, and high throughput make the Vitros Syphilis TPA assay a good choice for syphilis screening in high-volume laboratories.**

Syphilis is a global health problem, with 10.6 million adult cases reported in 2008 (1). Classical syphilis screening uses nontreponemal (rapid plasma reagin [RPR] or Venereal Disease Research Laboratory [VDRL]) tests. Reactive specimens are confirmed using treponemal assays (*Treponema pallidum* hemagglutination assay [TPHA]) or fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) tests. Most high-volume laboratories have adopted “reverse-algorithm” syphilis screening to improve efficiency and lower costs (2–5). In order to guide our adoption of these assays, we evaluated the performance of the Vitros Syphilis TPA chemiluminescence immunoassay (CLIA) for routine screening compared to those of two other treponemal enzyme immunoassays, the Enzygnost Syphilis IgG + IgM and the Bioelisa Syphilis 3.0. We prospectively analyzed (i) 317 serum samples from the Laboratori Clínic de l'Hospitalet using the Vitros Syphilis TPA and Bioelisa assays and (ii) 300 serum samples from the Microbiology Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebró using the Vitros Syphilis TPA and Enzygnost assays. Specimens that tested negative by the CLIA and/or enzyme immunoassay (EIA) were considered definitively negative; reactive specimens were tested by the RPR and TPHA tests. Discordant CLIA/EIA and TPHA results were resolved using an FTA-Abs test. Specimens with an absorbance of  $>3.00$  according to the Bioelisa assay were confirmed by the INNO-LIA Syphilis assay (Fujirebio Iberia S.L.U., Barcelona, Spain). The overall efficacy of reverse syphilis screening was evaluated by comparing traditional and reverse-sequence algorithms in 792 prospective serum samples using the RPR and Vitros Syphilis TPA assays, respectively. Of these, 402 were analyzed in the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Microbiology Department and 390 in the Hospital Universitari Santa Creu i Sant Pau Microbiology Department. Specimens with discordant RPR and Vitros Syphilis TPA results were tested using TPAs, and discordant Vitros Syphilis TPA and/or RPR and TPHA results were tested using FTA-Abs assays.

The Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Ethics Committee approved the study. The Vitros Syphilis TPA assay (Ortho Clinical Diagnostics, Inc., High Wycombe, United Kingdom) is a fully automated chemiluminescent immunoassay (double-antigen sandwich) for the qualitative detection of IgG and IgM and was performed on the Vitros 3600 instrument. Antibodies react

with biotinylated recombinant *Treponema pallidum* antigens (TP15, TP17, TP47) and horseradish peroxidase (HRP)-labeled *Treponema pallidum* antigen conjugate (recombinant TP15, TP17, and TP47 antigens). The antibody-antigen complex is captured by streptavidin-coated wells, and unbound materials are washed off. A luminogenic substrate reagent (a luminol derivate and a peracid salt) and electron transfer agent (increasing light production and duration) are added. HRP in the conjugate catalyzes luminol oxidation, producing light, which is read by the system. Bound HRP conjugates are directly proportional to anti-TP antibody concentrations in sera. Vitros results are expressed as a test sample signal/signal at cutoff (S/CO) ratio. Ratios of  $<0.80$ , between 0.80 and 1.20, and  $\geq 1.20$  correspond to negative, indeterminate, and positive results, respectively.

The RPR, TPHA, and Bioelisa (all from Biokit SA, Barcelona, Spain), Enzygnost (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany), and INNO-LIA (Fujirebio Iberia S.L.U., Barcelona, Spain) assays were performed and interpreted according to the manufacturers' instructions (6). The TPHA or FTA test was used as the gold standard for calculations of sensitivities, specificities, and positive (PPV) and negative predictive values (NPV). Correlations between the Vitros Syphilis TPA and Bioelisa or Enzygnost assays were assessed through kappa coefficients (7). There was almost perfect agreement between the Vitros Syphilis TPA and Bioelisa assays ( $\kappa = 0.83$ ; 95% confidence interval [CI], 0.72 to 0.94). Of 317 specimens, 283 were negative and 25 were posi-

Received 13 January 2015 Accepted 14 January 2015

Accepted manuscript posted online 21 January 2015

Citation 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* 53:1361–1364. doi:10.1128/JCM.00078-15.

Editor: E. Munson

Address correspondence to Lurdes Matas, lmatas.germanstrias@gencat.cat. V.G. and G.F. contributed equally to this article.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JCM.00078-15

TABLE 1 Comparison of VITROS Syphilis TPA and Bioelisa Syphilis 3.0 assays to TPHA and/or FTA-Abs tests

Assay ( <i>n</i> = 317)	No. of samples		No. with TPHA result of <sup>a</sup> :		No. with FTA-Abs result of <sup>b</sup> :		Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative				
Bioelisa	32	283	24	8	0	8 <sup>c</sup>	100 (86.16–100)	97.59 (95.09–99.02)	78.12 (60.02–90.68)	100 (98.69–100)
Vitros Syphilis TPA	27	283	24	3	0	3 <sup>c</sup>	100 (86.16–100)	99.30 (97.48–99.89)	92.59 (75.67–98.88)	100 (98.69–100)

<sup>a</sup> TPHA was performed on specimens that tested positive in the screening assay.

<sup>b</sup> FTA-Abs was performed on TPHA-negative specimens.

<sup>c</sup> One result was INNO-LIA indeterminate.

TABLE 2 Comparison of Vitros Syphilis TPA and Enzygnost Syphilis IgG + IgM assays to TPHA and/or FTA-Abs tests

Assay ( <i>n</i> = 300)	No. of samples		No. with TPHA result of <sup>a</sup> :		No. with FTA-Abs result of <sup>b</sup> :		Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative				
Enzygnost	16	283	16	0	NP <sup>c</sup>	NP	100 (79.24–100)	100 (98.69–100)	100 (79.24–100)	100 (98.69–100)
Vitros Syphilis TPA	17	283	16	1	0	1	100 (79.24–100)	99.65 (98.05–99.94)	94.12 (71.24–99.02)	100 (98.69–100)

<sup>a</sup> TPHA was performed on specimens that tested positive in the screening assay.

<sup>b</sup> FTA-Abs was performed on TPHA negative specimens.

<sup>c</sup> NP, not performed.

TABLE 3 Indications for syphilis testing and results in patients with discordant Vitros Syphilis TPA and RPR assay results

Patient no.	Clinical indication <sup>a</sup>	RPR result	TPHA result	Vitros Syphilis TPA result	FTA-Abs result <sup>b</sup>	Final interpretation of the result
1	STI screen in HIV positive patient	1/2	Negative	Negative		True negative
2	Lupus	1/2	Negative	Negative		True negative
3	STI screen in HIV positive patient	1/8	Negative	Negative		True negative
4	Sexual risk	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
5	Pregnant	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
6	STI screen in HIV positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
7	Sexual risk	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
8	STI screen in HIV positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
9	Syphilis follow-up	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
10	Pregnant	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
11	Rash in HCV-positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
12	STI screen in HIV positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
13	STI screen in HIV positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
14	STI screen in HIV positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
15	Syphilis follow-up	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
16	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
17	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
18	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
19	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Positive	Positive	NA	True positive
20	Syphilis follow-up	Negative	positive	Positive	NA	True positive
21	Prison STI screen	Negative	Negative	Positive	Positive	True positive
22	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Negative	Positive	Positive	True positive
23	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Negative	Positive	Negative	False positive
24	Erythematous scaly antecubital plaques	Negative	Negative	Positive	NP	True positive <sup>c</sup>
25	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Negative	Positive	NP	Inconclusive
26	Motor neuropathy	Negative	Negative	Positive	NP	Inconclusive
27	HCV HIV coinfection	Negative	Negative	Positive	NP	Inconclusive
28	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Negative	Positive	NP	Inconclusive
29	Fever	Negative	Negative	Positive	NP	Inconclusive
30	STI screen in HIV-positive patient	Negative	Indeterminate	Positive	Positive	True positive
31	Sexual risk	Negative	Indeterminate	Positive	Positive	True positive

<sup>a</sup> STI, sexually transmitted infection; HCV, Hepatitis C virus.

<sup>b</sup> NA, not applicable; NP, not performed due to insufficient specimen volume.

<sup>c</sup> Six months later, this patient complained of erythematous scaly antecubital plaques suggestive of secondary syphilis and seroconverted for RPR and TPHA.

tive by both tests (24 of which were confirmed by TPHA). One patient tested positive by the Bioelisa assay (absorbance, 5.62) and the CLIA but had negative TPHA, FTA, and RPR results. The INNO-LIA assay was indeterminate (TpN17 band), and the patient had been treated for syphilitic chancre. He subsequently tested positive by Bioelisa, and although his test was never positive according to the TPHA, he was finally classified as positive on the basis of clinical picture. The remaining nine specimens had discordant results. Two were weakly positive by the Vitros Syphilis TPA assay (S/CO ratios, 1.92 and 2.32, respectively) and negative by the Bioelisa assay. Each of the two was negative according to the RPR, TPHA, and FTA tests. The Vitros Syphilis TPA results were considered false positive. The remaining seven specimens were Vitros Syphilis TPA negative and weakly positive by the Bioelisa assay (absorbance, 1.02 to 2.39). All were RPR, TPHA, and FTA negative and also considered false positive. The sensitivities, specificities, PPV, and NPV are shown in Table 1.

Agreement between the Vitros Syphilis TPA and Enzygnost assays was almost perfect ( $\kappa = 0.96$ ; 95% CI, 0.91 to 1.00). Both assays classified 283 specimens as negative and 16 specimens as positive (confirmed by TPHA). The remaining specimen was Vit-

ros Syphilis TPA positive (S/CO ratio, 52.1) and Enzygnost negative. It was RPR positive (titer of 1/4) and TPHA and FTA negative. The patient was a 66-year-old woman from Equatorial Guinea seen in an immigrant screening clinic. The RPR test was considered to be nonspecific, as TPHA and FTA were negative. This result was difficult to interpret and was finally classified as a false-positive Vitros Syphilis TPA. Sensitivities, specificities, PPVs, and NPVs are shown in Table 2. The specificity of the Vitros Syphilis TPA was high and similar to those obtained with the two other enzyme immunoassays; these findings are consistent with those of other studies (8, 9). Of 792 serum samples used to compare traditional and reverse syphilis screening, 723 were negative by the Vitros Syphilis TPA and RPR assays, and 38 were positive by these two assays and confirmed by TPHA. The remaining 31 serum samples were discordant (Table 3). Of these, three were RPR positive (titers of 1/2 and 1/8) and Vitros Syphilis TPA and TPHA negative. These specimens were from two HIV patients and one patient with systemic lupus erythematosus, recognized causes of false reactions in nontreponemal tests (10). Seventeen specimens were RPR negative but Vitros Syphilis TPA and TPHA positive; all were from patients with previous or treated syphilis. Nine specimens were Vitros Syphilis TPA positive and RPR and TPHA neg-

ative (two of which were FTA positive and one of which was FTA negative). Each of the FTA-positive serum samples was considered true positive by Vitros Syphilis TPA. One patient with discordant TPHA and Vitros assay results (RPR negative and insufficient volume for FTA) was considered true positive due to clinical secondary syphilis. Insufficient volume in the remaining five specimens resulted in their exclusion from statistical analysis. Finally, two specimens were Vitros Syphilis TPA positive, TPHA indeterminate, RPR negative, and FTA positive. These were considered Vitros Syphilis TPA true positives. The sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the Vitros Syphilis TPA assay were 100% (95% CI, 93.98% to 100%), 99.87% (95% CI, 99.29% to 99.98%), 98.33% (95% CI, 91.03% to 99.72%), and 100% (95% CI, 99.53% to 100%), respectively. The false-positive rate by reverse screening (excluding the five with insufficient volume) was lower than that reported elsewhere (1/787, 0.13%) (2, 11). Reverse syphilis screening identified 21 RPR-negative and Vitros Syphilis TPA-positive patients, 17 of whom were confirmed as positive by TPHA and 4 by FTA-Abs. In line with the results of other studies, we were unable to reliably distinguish between early and treated late/latent syphilis (2, 12). In conclusion, Vitros Syphilis TPA is highly sensitive and specific. Its ease of use, automation, and high throughput make it ideal for high-volume syphilis screening. However, positive CLIA/EIA results should be tested with a quantitative nontreponemal test and treponemal tests (TPHA and/or FTA) to rule out false positives and guide clinical management.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gregorio Fernández, Noelia López, Pere Berenguer, Susana Bernalte, Desideria Martínez, and Rosa Moreno for their help in specimen processing and Alexandra Montoliu for useful support in statistical analysis. We also thank Ortho Clinical Diagnostics (Spain) for providing the required reagent kits.

Vitros Syphilis TPA reagents were provided by Ortho Clinical Diagnostics. This commercial sponsor had no involvement in the study design, collection, analysis, or interpretation of the data, writing of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication.

#### REFERENCES

1. World Health Organization. 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/>.
2. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. 2012. Direct comparison of the traditional and reverse syphilis screening algorithms in a population with a low prevalence of syphilis. *J Clin Microbiol* 50:148–150. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05636-11>.
3. Lipinsky D, Schreiber L, Kopel V, Shainberg B. 2012. Validation of reverse sequence screening for syphilis. *J Clin Microbiol* 50:1501. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06286-11>.
4. 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* 94:133–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.015>.
5. Marangoni A, Nardini P, Foschi C, Moroni A, D'Antuono A, Bacchi Reggiani L, Cevenini R. 2013. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis system as a first-line method of reverse-sequence screening for syphilis diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 20:1084–1088. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00316-13>.
6. Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A. 2000. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol* 38:1279–1282.
7. Viera AJ, Garrett JM. 2005. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 37:360–363.
8. Marangoni A, Sambri V, Accardo S, Cavrini F, D'Antuono A, Moroni A, Storni E, Cevenini R. 2005. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:1231–1234. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.12.10.1231-1234.2005>.
9. Wellinghausen N, Dietenberger H. 2011. Evaluation of two automated chemiluminescence immunoassays, the Liaison Treponema Screen and the Architect Syphilis TP, and the *Treponema pallidum* particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Chem Lab Med* 49:1375–1377. <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.643>.
10. Liu F, Liu LL, Guo XJ, Xi Y, Lin LR, Zhang HL, Huang SJ, Chen YY, Zhang YF, Zhang Q, Huang GL, Tong ML, Jiang J, Yang TC. 2014. Characterization of the classical biological false-positive reaction in the serological test for syphilis in the modern era. *Int Immunopharmacol* 20:331–336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.011>.
11. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Discordant results from reverse sequence syphilis screening—five laboratories, United States, 2006–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60:133–137.
12. Mishra S, Boily MC, Ng V, Gold WL, Okura T, Shaw M, Mazzulli T, Fisman DN. 2011. The laboratory impact of changing syphilis screening from the rapid-plasma reagin to a treponemal enzyme immunoassay: a case-study from the greater Toronto area. *Sex Transm Dis* 38:190–196. <http://dx.doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181f07e91>.



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections

Gema Fernández<sup>a,\*</sup>, Elisa Martró<sup>a,b</sup>, Victoria González<sup>b,c</sup>, Verónica Saludes<sup>a,b</sup>, Elisabet Bascuñana<sup>a</sup>, Clara Marcó<sup>a</sup>, Belén Rivaya<sup>a</sup>, Evelin López<sup>c</sup>, Pep Coll<sup>d,e</sup>, Lurdes Matas<sup>a,b</sup>, Vicente Ausina<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Microbiology Service, Germans Trias i Pujol University Hospital, Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain

<sup>b</sup> CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centre for Epidemiological Studies on HIV/STI in Catalonia (CEEISCAT), Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPC), Generalitat de Catalunya, Badalona, Spain

<sup>d</sup> IrsiCaixa Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>e</sup> BCN Checkpoint, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2015

Accepted 27 October 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Sexually transmitted diseases

Multiplex PCR

Real-time PCR

*Neisseria gonorrhoeae*

*Chlamydia trachomatis*

*Trichomonas vaginalis*

### ABSTRACT

**Introduction:** Sexually transmitted infections (STI) are currently on the increase worldwide. New molecular tools have been developed in the past few years in order to improve their diagnosis. An evaluation was carried out using a new commercially available real-time PCR assay, Anyplex™ II STI-7 (Seegene, Seoul, Korea), which detects seven major pathogens in a single reaction – *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* – and compared with conventional methods performed in our laboratory.

**Materials and methods:** Two different populations were included, and 267 specimens from different sites of infection (urines, endocervical swabs, rectal swabs, vaginal swabs, urethral swabs and one inguinal adenopathy) were processed for both methods.

**Results:** The parameters of clinical performance were calculated for *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *T. vaginalis*, and the assay achieved sensitivities (SE) from 93.94% to 100%, and specificities (SP) from 96.55% to 100%, with negative predictive values (NPV) from 93.33% to 98.85%, and positive predictive values (PPV) from 96.88% to 100%, with a very good agreement (kappa index from 0.88 to 1).

**Conclusions:** Anyplex™ II STI-7 is a good tool for the reliable diagnosis of STI. Its ease of use and processing allows it to be incorporated into the day to day laboratory work.

© 2015 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

## Utilidad de un nuevo ensayo de PCR multiplex para el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Infecciones de transmisión sexual

PCR multiplex

Real-time PCR

*Neisseria gonorrhoeae*

*Chlamydia trachomatis*

*Trichomonas vaginalis*

**Introducción:** Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son actualmente un problema de salud pública en todo el mundo debido al aumento que han experimentado en los últimos años que implica el desarrollo de nuevas herramientas moleculares para mejorar su diagnóstico. Se ha comparado el nuevo ensayo de PCR en tiempo real, Anyplex™ II STI-7 (Seegene, Seúl, Corea) que detecta los siete microorganismos implicados en las ITS – *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* – en una sola reacción, con los métodos convencionales utilizados en nuestro laboratorio.

\* Corresponding author.

E-mail address: [gemafrivas@gmail.com](mailto:gemafrivas@gmail.com) (G. Fernández).

**Métodos:** Se incluyeron dos tipos de poblaciones, obteniéndose 267 muestras de diferentes lugares de infección (orines, exudados endocervicales, frotis rectales, frotis vaginales, exudados uretrales y una adenopatía inguinal) que fueron procesadas por ambas metodologías.

**Resultados:** Las sensibilidades, especificidades y valores predictivos fueron analizados para *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *T.vaginalis*, alcanzando sensibilidades (SE) de 93,94% a 100%, especificidades (SP) de 96,55% a 100%, valor predictivo negativo (NPV) entre 93,33% y el 98,85% y valores predictivos positivos (PPV) de 96.88% a 100% con muy buena correlación (índice kappa de 0.88 a 1).

**Conclusiones:** Anyplex™ II STI-7 es una buena herramienta para el diagnóstico seguro de las ITS. La facilidad de uso y procesamiento permite su incorporación en el trabajo del día a día del laboratorio.

© 2015 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

## Introduction

Microbiological diagnosis of syndromes that can be caused by multiple pathogens, such as (STIs) may be challenging. Therefore, methods able to detect multiple microorganisms in a clinical specimen at the same time are essential. The need for the development of reliable, affordable, and effective commercial assays for the management of the syndromic diagnosis of STIs is rising, given their high prevalence and their increasing burden worldwide.<sup>1</sup> In 2008, the WHO estimated the total number of incident cases of the four main STIs in adults comprising ages between 15 and 49 years to be 498.9 million. Among them, 105.7 million corresponded to *Chlamydia trachomatis*, 106.1 million to *Neisseria gonorrhoeae*, 10.6 million to *Treponema pallidum*, and 276.4 million to *Trichomonas vaginalis*.<sup>2</sup> More than 30 different bacteria, viruses and parasites can potentially be transmitted through sexual contact, which makes the choice of diagnostic assays a difficult task. A selection of the most relevant pathogens according to local prevalence rates should be targeted.

Conventional diagnostic assays, such as culture and antigen detection assays, lack sensitivity, require viable organisms and thus special shipment conditions and, sometimes, invasive sampling.<sup>3</sup> As nucleic acid amplification tests (NAATs) allow us to overcome some of these limitations, several molecular diagnostic assays have recently been commercialized to assist the syndromic diagnosis of STIs. Nowadays, NAATs are flexible and easy to use. In addition, their implicit multiplexing capacity allows for the detection of multiple pathogens in a single sample and, therefore, their implementation in the clinical microbiology laboratory is increasing. The rising prevalence of STIs reported worldwide may be related, at least in part, to the use of improved diagnosis through the use of molecular technologies.<sup>2</sup>

The detection of multiple pathogens is achieved by NAATs thanks to its ability of multiplexing different assays.<sup>4</sup> Several molecular tests are commercially available for the diagnosis of STIs detecting a number of microorganisms ranging from two (i.e. Abbott RealTime™ CT/NG, Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL), to 18 (i.e. CLART® STIs A&B, Genomica S.A.U., Madrid, Spain), thereby simplifying the diagnostic workflow, reducing the hands-on-time, as well as associated costs. Recently, a rapid test that detects *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in one step and in 90 minutes has been developed for the GeneXpert systems (Cepheid, Sunnyvale, CA). This constitutes the first step toward a highly reliable point-of-care test in the field of STIs.<sup>5</sup> Molecular tools have a high sensitivity and specificity for the diagnosis of the most prevalent STIs, and offer the possibility of using non-invasive specimens.<sup>6,7</sup>

In this study we have evaluated the usefulness of Anyplex™ II STI-7 (Seegene, Seoul, Korea), both for screening and diagnosis of STI. This real-time PCR assay detects seven major pathogens that cause STIs – *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*,

*Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* – in a single reaction.

## Material and methods

### Study design

This was a retrospective cross-sectional observational study designed for the clinical evaluation of the commercial Anyplex™ II STI-7 molecular assay in comparison with conventional diagnostic assays and other molecular assays used for the routine diagnosis of STI at the Microbiology Department of the “Germans Trias i Pujol” University Hospital (HUGTIP, Badalona, Spain). This study was approved by the Ethics Committee at our institution.

### Study population and clinical samples

Two different study populations were included in the present study. Group 1 included 234 individuals attended at the emergency room, the urology and gynecological departments at HUGTIP, primary care centers seeking medical care, as well as young adults ( $\leq 25$  years old) suspected of having an STI and recruited for *C. trachomatis* prevalence studies at sexual and reproductive health centers. After routine microbiological diagnosis (culture and Abbott RealTime™ CT/NG), residual sample volume was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used for the evaluation of the Anyplex™ II STI-7 assay. Group 2 included 33 HIV-negative MSM having high-risk sexual practices that were periodically screened for STIs at the BCN Checkpoint center (a community-based detection center of HIV and other STIs). After being tested by the Abbott RealTime CT/NG PCR Assay, residual sample volume was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used for this evaluation study.

Clinical specimens included 105 first-void urines, 50 rectal swabs, 18 urethral swabs, and three inguinal lymphadenopathy samples from patients suspected for lymphogranuloma venereum (LGV), 38 endocervical swabs and 53 vaginal swabs. All specimens were anonymized prior to testing.

### Conventional microbiological diagnosis

In order to isolate *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis* from patients suspected of having an STI, endocervical, urethral and vaginal swabs were cultured onto Chocolate agar PolyViteX (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), Chocolate agar PolyViteX VCAT3 (bioMérieux), Columbia agar + 5% sheep blood (bioMérieux), Sabouraud dextrose agar (bioMérieux) and Diamond media (Maim SL, Barcelona, Spain). *N. gonorrhoeae* was identified by biochemical methods (Vitek NH cards, bioMérieux), after 48–72 h of incubation in an aerobic atmosphere and *T. vaginalis* was identified by a wet mount examination after 4–5 days of incubation.

**Table 1**  
Specimens tested by the STI-7 assay according to patient group, specimen type and routine diagnosis methods.

Type of sample	Group 1		Group 2	Total
	Tested by culture	Tested by Abbott <i>RealTime</i> CT/NG	Tested by Abbott <i>RealTime</i> CT/NG	
Urine	NA	90	17	106
Urethral swabs	6	12	NA	18
Endocervical swabs	3	35	NA	38
Rectal swabs	NA	33	16	49
Vaginal swabs	53	NA	NA	53
Inguinal adenopathy	NA	3	NA	3
Total	62	173	33	267

NA, not applicable.

139 *Molecular diagnostic assays*140 *Nucleic acid extraction*

141 DNA extraction was performed with NucliSENS EasyMAG  
142 (bioMérieux), which is an automated system able to extract total  
143 nucleic acids from a variety of sample types and volumes. The sys-  
144 tem automates an enhanced magnetic silica version of BOOM®  
145 technology, a very good tool for the universal extraction of RNA  
146 and DNA.<sup>8</sup>

147 *Routine detection of C. trachomatis and N. gonorrhoeae*

148 All tested specimens were collected with the multi-Collect Spec-  
149 imen Collection Kit (Abbott Molecular Inc.), as recommended by the  
150 manufacturer. After nucleic acid extraction, the Abbott *RealTime*<sup>TM</sup>  
151 CT/NG (Abbott Molecular Inc.) assay was performed according to  
152 the manufacturer instructions. This method allows to qualitatively  
153 detection of the plasmidic DNA of *C. trachomatis* and the genomic  
154 DNA of *N. gonorrhoeae*.

155 *Routine C. trachomatis typing*

156 All specimens that were positive for *C. trachomatis* from patients  
157 suspected of having LGV, were subjected to LGV serovar typing by  
158 using the Ct-Dt array (Laboratory Biomedical Products BV, Rijswijk,  
159 The Netherlands).<sup>9</sup>

160 *Detection of seven STI agents by the novel real-time PCR assay*

161 After DNA extraction, detection of *C. trachomatis*, *N. gonor-*  
162 *rhoeae*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, and  
163 *U. parvum* was performed with the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 Detection  
164 assay, CE marked since 2012. This multiplex assay uses the newly  
165 developed TOCE<sup>TM</sup> (tagging oligonucleotide cleavage and exten-  
166 sion) and DPO<sup>TM</sup> (dual priming oligonucleotide) technologies<sup>10,11</sup>.  
167 Additionally, semi-quantitative results are obtained based on  
168 cyclic-CMTA (catcher melting temperature analysis). The reaction  
169 was performed according to the manufacturer in a CFX96 realtime  
170 termocycler (bio-Rad, Hercules, CA, USA).

171 *Statistical analyses*

172 Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values  
173 (PPV and NPV) of the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 Detection assay were cal-  
174 culated were calculated in comparison with the routine diagnostic  
175 methods used at our laboratory for the detection of *C. trachomatis*,  
176 *N. gonorrhoeae*, and *T. vaginalis*, which were considered as the gold  
177 standard with openepi software, [www.openepi.com](http://www.openepi.com) (Emory Uni-  
178 versity, Atlanta, USA). Since *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections  
179 are not routinely tested, no statistical analyses were performed for  
180 these microorganisms.

181 **Results**

182 A total of 267 specimens were tested by the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-  
183 7 assay, including positive ( $n = 154$ , 57.67%) and negative ( $n = 113$ ,  
184 42.32%) specimens according to routine diagnostic assays (culture  
185 and/or Abbott *RealTime*<sup>TM</sup> CT/NG) and are described in [Table 1](#).  
186 Among specimens with a positive result by Abbott *RealTime*<sup>TM</sup>  
187 CT/NG ( $n = 118$ ), 77 were positive for *C. trachomatis* and 24 *N.*  
188 *gonorrhoeae* in single infection, 9 (7.63%) showed a coinfection  
189 with *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. Ten out of 94 (10.63%) *C.*  
190 *trachomatis* positive specimens were typed as LGV (serovar L2)  
191 [Table 2](#).

192 Sensitivity, specificity, PPV, NPV values and kappa coefficient  
193 ( $\kappa$ ) of the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 assay for *C. trachomatis*, *N. gon-*  
194 *orrhoeae*, and *T. vaginalis* in comparison with routine diagnostic  
195 methods used in our laboratory by type of sample are shown in  
196 [Table 3](#). The  $\kappa$  coefficient obtained shows a very high agreement  
197 between both methods with  $\kappa$  values from 0.88 to 1 ( $\kappa$  coefficient  
198 CI 95%). Out of the 267 specimens, there were 11 discrepancies,  
199 4 urines, 4 rectal swabs and 3 vaginal swabs. All of the vaginal  
200 swabs were tested in women who present leucorrhoea and seek  
201 medical attention. The rest of the discrepancies corresponded to  
202 MSM having high-risk sexual practices, which were asymptomatic  
203 or paucisymptomatic.

204 Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 additionally detected *M. hominis*, *M. geni-*  
205 *tialium*, *U. parvum* or *U. urealyticum* in 162 (60.67%) out of 267  
206 specimens either in single or in mixed infections. *U. parvum* was the  
207 most frequent detected microorganism (34.08%). A frequent com-  
208 bination that it was already described was the association between  
209 *U. parvum* and *C. trachomatis* ([Table 4](#)).

210 One or more of these four microorganisms were detected in 59  
211 (52.21%) out of 113 specimens that were negative by the routine  
212 diagnostic assays used but in only 7 cases had been considered with  
213 clinical significance ([Table 5](#)).

214 Overall, the assay was easy to perform and the results gener-  
215 ated by the software are easy to interpret, leading to diagnosis in  
216 3 hours.

**Table 2**  
Specimens with a positive result by methods used for routine diagnosis.

Microorganism	Abbott CT/NG (N)	Positive samples by culture (N)
<i>C. trachomatis</i>	77	NA
<i>C. trachomatis</i> (LGV serovar)	8	NA
<i>C. trachomatis</i> (LGV serovar) and <i>N. gonorrhoeae</i>	2	NA
<i>C. trachomatis</i> and <i>N. gonorrhoeae</i>	7	NA
<i>N. gonorrhoeae</i>	24	3
<i>T. vaginalis</i>	NA	33
Total	118	36

NA, not applicable.

**Table 3**  
Performance of STI-7 in comparison with routine methods.

Microorganism	Routine method	Type of sample	STI-7								$\kappa$	
			N	TP	TN	FP	FN	SE (%)	SP (%)	PPV(%)		NPV(%)
<i>C. trachomatis</i>	PCR	Urine	106	40	62	1	3	93.02	98.41	97.56	95.38	0.92
		Endocervical	38	16	22	0	0	100	100	100	100	1
		Rectal	49	28	19	0	2	93.33	100	100	90.48	0.91
		Urethral	18	3	15	0	0	100	100	100	100	1
<i>N. gonorrhoeae</i>	PCR	Urine	106	6	100	0	0	100	100	100	100	1
		Endocervical	38	3	35	0	0	100	100	100	100	1
		Rectal	49	16	31	0	2	88.89	100	100	93.94	0.91
		Urethral	18	9	9	0	0	100	100	100	100	1
<i>T. vaginalis</i>	Culture	Vaginal	53	31	19	1	2	93.94	95	96.88	90.48	0.88

TP, true positives; TN, true negatives; FP, false positives; FN, false negatives; SE, sensitivity; SP, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value,  $\kappa$ , Kappa coefficient.

**Table 4**  
Distribution of genital ureaplasma and mycoplasma by specimen.

Microorganism	Detection		Type of sample						Single infection	Mixed infection
	N	% <sup>a</sup>	Endocervical	Urine	Urethra	Vagina	Rectum	Adenopathy	N (%) <sup>b</sup>	N (%) <sup>b</sup>
<i>U. parvum</i>	91	34.08	24/38	39/106	2/18	25/53	0/49	1	26(9.37)	65(24.34)
<i>M. genitalium</i>	20	7.49	4/38	8/106	1/18	2/53	5/49	0	3(1.12)	17(6.36)
<i>M. hominis</i>	66	24.72	15/38	17/106	1/18	23/53	10/49	0	6(2.24)	60(22.47)
<i>U. urealyticum</i>	67	25.09	7/38	17/106	5/18	16/53	22/49	0	21(7.86)	46(17.22)

<sup>a</sup> Percentages are expressed as proportion of patients where the indicated microorganism was detected from all tested patients.

<sup>b</sup> Percentages are expressed as proportion of single/multiple infections from the total of detections.

## Discussion

The present study aimed to evaluate in the clinical setting a molecular real-time PCR-based assay (Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7) for the diagnosis of STIs in comparison with the reference methods used at our institution. The detection of seven different pathogens from a variety of clinical specimens in a single reaction is an important advantage offered by this molecular method for the differential diagnosis of many common syndromes, such as urethritis and cervicitis. In addition, microorganisms usually not detected by conventional diagnostic methods can be identified by this assay, thus reducing the cases in which a microbiological diagnosis cannot be achieved for a given STI.

*C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* are major causative agent of urethritis and cervicitis.<sup>12</sup> Given the difficulty in growing this microorganism in culture, over the last years classical microbiological methods have been replaced by NAATs in many laboratories.<sup>13</sup> In our study, the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 assay detected *C. trachomatis* with 94.6% sensitivity and 99.2% specificity, and *N. gonorrhoeae* with 93.8% sensitivity and 100% specificity in comparison with the

**Table 5**  
Characteristics of subjects with *Ureaplasma* or *Mycoplasma* in single infection with clinical significance (in the absence of other STI agents).

Type of sample	Conventional method (Abbott RealTime CT/NG + culture)	STI-7 result	Clinical data
Urethral	Negative*	<i>U. parvum</i>	Urethritis
Urethral	Negative	<i>M. genitalium</i>	Urethritis
Endocervical	Negative	<i>U. parvum</i>	PDI
Endocervical	Negative	<i>U. parvum</i>	PDI
Endocervical	Negative	<i>M. genitalium</i>	PDI
Endocervical	Negative	<i>U. parvum</i>	PDI
Endocervical	Negative	<i>U. parvum</i> / <i>M. hominis</i> / <i>U. urealyticum</i>	PDI

\* Only tested by culture. PDI, pelvic inflammatory disease.

Abbott RealTime<sup>TM</sup> CT/NG. Thus, a low proportion of discrepant results were obtained for *C. trachomatis* in urine specimens (one false-positive and two false-negatives) and in rectal swabs (two false negatives), and for *N. gonorrhoeae* (two false-negatives), while endocervical and urethral specimens lead to consistent results. Rectal swabs constitute a challenging clinical specimen and, in fact, this sample type is not included in the Abbott RealTime<sup>TM</sup> CT/NG CE mark, although several studies have demonstrated its usefulness.<sup>14,15</sup> Urine is commonly used as an alternative, easier to collect specimen, but may have a lower diagnostic yield in comparison with endocervical or urethral specimens, which are the preferred sample type for the diagnosis of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. Additionally, the obtained false-negative results by the STI-7 assay could be explained in part by a potentially lower DNA integrity due to an additional freeze-thaw cycle (specimens were first tested by the Abbott assay and then frozen until tested by the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 assay). On the other hand, we cannot completely rule out the possibility of a false-positive result by the Abbott assay in these seven cases. However, this possibility is very unlikely in real-time PCR assays where no post-PCR processing is necessary, and the negative control included in each run was always negative. Regarding the false-positive result (a *C. trachomatis* detection in a urine sample), the Anyplex<sup>TM</sup> II STI-7 semi-quantitative result of ++ (amplification detected at a PCR cycle number between 30 and 40) argues against a false-positive result. Thus, specificity could rise to a 100% if this result was considered a true positive, in agreement with a previous study with the prior version of the assay.<sup>16</sup> The STI-7 assay was also compared with culture for *N. gonorrhoeae*, and the overall agreement was good among the 62 specimens tested by both methods, although the number of positive specimens by culture ( $n = 3$ ) was too low to draw definitive conclusions, which is a limitation of our study. Previous studies using molecular methods for the detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* have showed a good agreement with other molecular methods or classic culture for *N. gonorrhoeae*.<sup>4,17,18</sup> In addition, these studies have demonstrated that molecular tools can increase the detection rate of these pathogens in samples from different origins (rectal, vaginal, pharyngeal, urine), and even reduce the number of false positive

results due to the presence of flora belonging to different species of *Neisseria*.<sup>16,19</sup> Additionally, a previous study showed a good correlation between this assay and an in-house molecular assay for the detection of *N. gonorrhoeae* in extragenital sites.<sup>14</sup> Therefore, although the studied population was heterogeneous, there was a good agreement between the two molecular methods used both in the MSM group and in group 1 (including hospital departments, primary care, and sexual and reproductive health centers). Consequently, this multiplex PCR could be useful for diagnosing STIs in symptomatic patients as well as for the screening of STIs in selected populations at risk. The microscopic observation of *T. vaginalis* after culture is subjective, leading to a variable sensitivity in comparison to other diagnostic methods such as molecular tools. Thus, the inclusion of this protozoan parasite in the Anyplex™ II STI-7 assay can provide useful information to improve the syndromic diagnosis of STIs. In our study, sensitivity (93.94%) and specificity (96.55%) of the Anyplex™ II STI-7 test in comparison with culture was good. Importantly, *T. vaginalis* was detected by this assay and considered clinically relevant (one urine specimen, one endocervical swab and one inguinal adenopathy) that had not been previously tested by culture, since there was no clinical suspicion of an infection by this pathogen. Regarding the lymphadenopathy, *T. vaginalis* was also detected by culture in a vaginal swab from the same patient.

The results obtained for *Mycoplasma* and *Ureaplasma* are difficult to interpret, as we did not search for them actively with conventional diagnostic methods, which is a limitation of our study. It should be taken into consideration that these microorganisms were mostly detected in mixed infections rather than in single infection, as reported in a previous study using the Anyplex™ II STI-7 assay.<sup>20</sup> Besides, they were more prevalent in urine and vaginal swabs than in the other sample types. A positive PCR test for at least one of these microorganisms was obtained in 59 out of 113 patients with a negative result for the most relevant pathogens (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis*). Among them, only in seven cases (12.06%) the detected microorganism was considered clinically relevant (Table 5). Given that *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* are part of the flora from the genitourinary tract of healthy and sexually active people,<sup>21</sup> a follow-up specimen might be useful to confirm their pathogenic role. The identification of these potentially pathogenic microorganisms is highly relevant given that the first-line treatment may not be appropriate for *Ureaplasma* and *Mycoplasma* infections. Nowadays it is believed that *Mycoplasma* plays a significant role in genitourinary tract pathologies and constitutes a risk factor for the development of nongonococcal urethritis and acquisition of HIV infection.<sup>22,23</sup> In the study population, *U. parvum* showed the highest detection rates (34.08%), followed by *U. urealyticum* with (25.09%). Despite the controversial role played by *Ureaplasma* and *Mycoplasma*, Horner et al.<sup>22</sup> conclude that *U. urealyticum* and *M. genitalium* were associated with 15–25% of both chronic and acute cases of non-gonococcal urethritis. Additionally, *M. genitalium* has been studied as a cause of urethritis and cervicitis after a first-line treatment relapse<sup>24</sup> due to their prevalence and resistance to macrolide treatments. NAAT is the recommended method to detect *M. genitalium*,<sup>1</sup> and the Anyplex™ II STI-7 assay could be a good choice to detect it.

Overall, the present study demonstrates that the Anyplex™ II STI-7 Detection assay is a simple and reliable method for the diagnosis of STIs able to improve the diagnostic methods used in our center. In addition, its multi-sample option and multiplex detection ability is strongly recommended for the detection of multi-etiological syndromes such as STIs, even in asymptomatic carriers and low prevalence populations. Although the detection of *U. urealyticum*, *U. parvum* and *M. hominis* must be carefully interpreted in the clinical setting, especially in non-genital samples such as urine or rectal swabs, this assay can be a useful tool for diagnostic

screening programs and also for epidemiological studies in Public Health.

### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

EM holds a Miguel Servet contract (MS09/00044) funded by ISCIII (Spanish Government). This study was partially funded by Werfen, S.A., distributor of Seegene in Spain. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors declare that they have no conflict of interests

### References

- Magnus U, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Switzerland: World Health Organization; 2013. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf) (accessed 24.03.2014).
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. Geneva: WHO; 2012. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf) (accessed 24.03.14).
- Hocking JS, Guy R, Walker J, Tabrizi SN. Advances in sampling and screening for chlamydia. *Future Microbiol.* 2013;8:367–86.
- Otero Guerra L, Lepe Jimenez JA, Blanco Galán MA, Aznar Martín J, Vázquez Valdés F. Utility of the molecular biology techniques in the diagnosis of sexual transmitted diseases and genital infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:42–9.
- Tabrizi SN, Unemo M, Golparian D, Twin J, Limnios AE, Lahra M, et al. Analytical evaluation of GeneXpert CT/NG, the first genetic point-of-care assay for simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1945–7.
- Chernesky MA, Jang DE. APTIMA transcription-mediated amplification assays for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6:519–22.
- McKechnie ML, Kong F, Gilbert GL. Simultaneous direct identification of genital microorganisms in voided urine using multiplex PCR-based reverse line blot assays. *Methods Mol Biol.* 2013;943:229–45.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheimvan Dillen PME, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495–503.
- Quint K, Porras C, Safaeian M, González P, Hildesheim A, Quint W, et al. Evaluation of a novel PCR-based assay for detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3986–91.
- Cho CH, Chulthen B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, et al. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol.* 2013;57:338–42.
- Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:e40.
- Bhalla P, Baveja UK, Chawla R, Saini S, Khaki P, Bhalla K, et al. Simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in genitourinary specimens from men and women attending an STD clinic. *J Commun Dis.* 2007;39:1–6.
- Parra-Sánchez M, Palomares JC, Bernal S, González MT, Sivianes N, Pérez L, et al. Evaluation of the cobas 4800 CT/NG Test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA in urogenital swabs and urine specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;4:338–42.
- Walsh A, Rourke FO, Crowley B. Molecular detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital and extragenital specimens using the Abbott CT/NG RealTime assay and an in-house assay targeting the porA pseudogene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:561–7.
- Heras E, Llibre JM, Martró E, Casabona J, Martín-Iguacel R, Sirera G. Lymphogranuloma venereum proctocolitis in men with HIV-1 infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:124–6.
- Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, et al. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis.* 2013;17:1134–40.
- Whitley DM, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies. *Pathology.* 2005;37:364–70.

- 413 18. Lee SJ, Park DC, Lee DS, Choe HS, Cho YH. Evaluation of Seeplex STD6 ACE Detection  
414 kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *J Infect*  
415 *Chemother.* 2012;18:494-500. 423
- 416 19. Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, Hogan TR, Hjelmevoll SO, Garland SM,  
417 et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for the  
418 detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J Clin Microbiol.*  
419 2011;49:3610-5. 424
- 420 20. Berçot B, Amarsy R, Goubard A, Aparicio C, Loeung HU, Segouin C, Gueret  
421 D, et al. Assessment of co-infection of sexually transmitted pathogen  
422 microbes by performing the molecular kit Anyplex II STI-7. *J Clin Microbiol.*  
2015;53(March):991-3. 425
- 426 21. Weinstein SA, Stiles BG. A review of the epidemiology, diagnosis and evidence-  
427 based management of *Mycoplasma genitalium*. *Sexual Health.* 2011;8:143-58. 428
- 428 22. Uusküla A, Kohl PK. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as  
429 sexually transmitted agents. *Int J STI AIDS.* 2002;13:79-85. 430
- 430 23. Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of *Mycoplasma*  
431 *genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal ure-  
432 thritis. *Clin Infect Dis.* 2001;32:995-1003. 433
- 433 24. Pond MJ, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST. High prevalence  
of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: the  
need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. *Clin*  
*Infect Dis.* 2014;58:631-7.

UNCORRECTED PROOF