



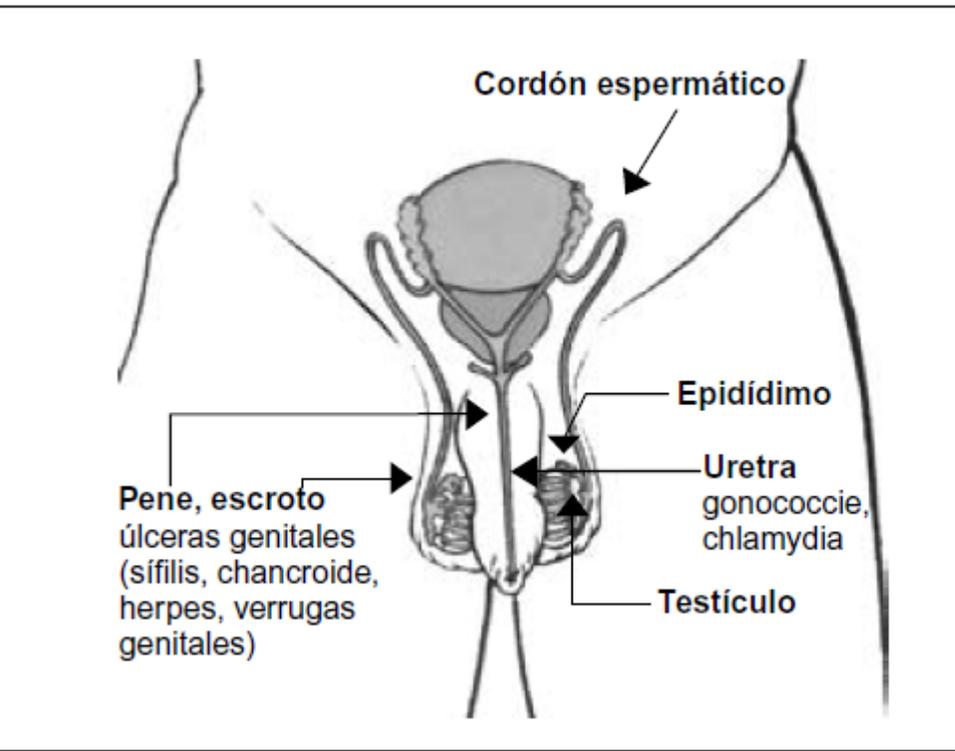
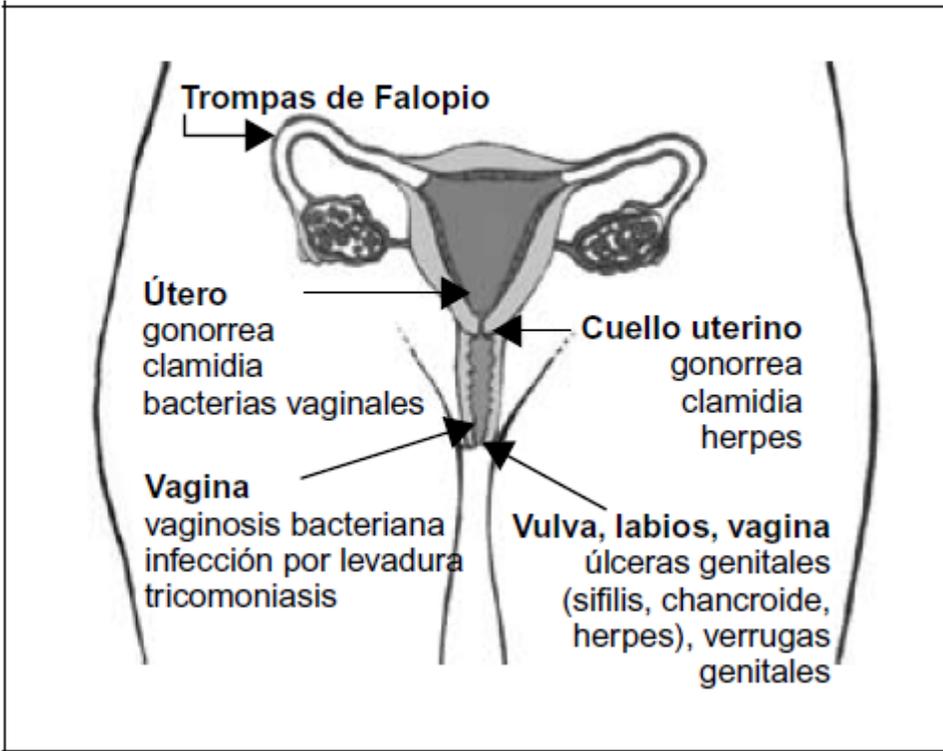
Diagnóstico molecular en Infecciones del Tracto Genital Inferior

Dra. Mariela Sciara
Biología Molecular
Laboratorio CIBIC
msciara@cibic.com.ar



INFECCIONES TRACTO GENITAL INFERIOR

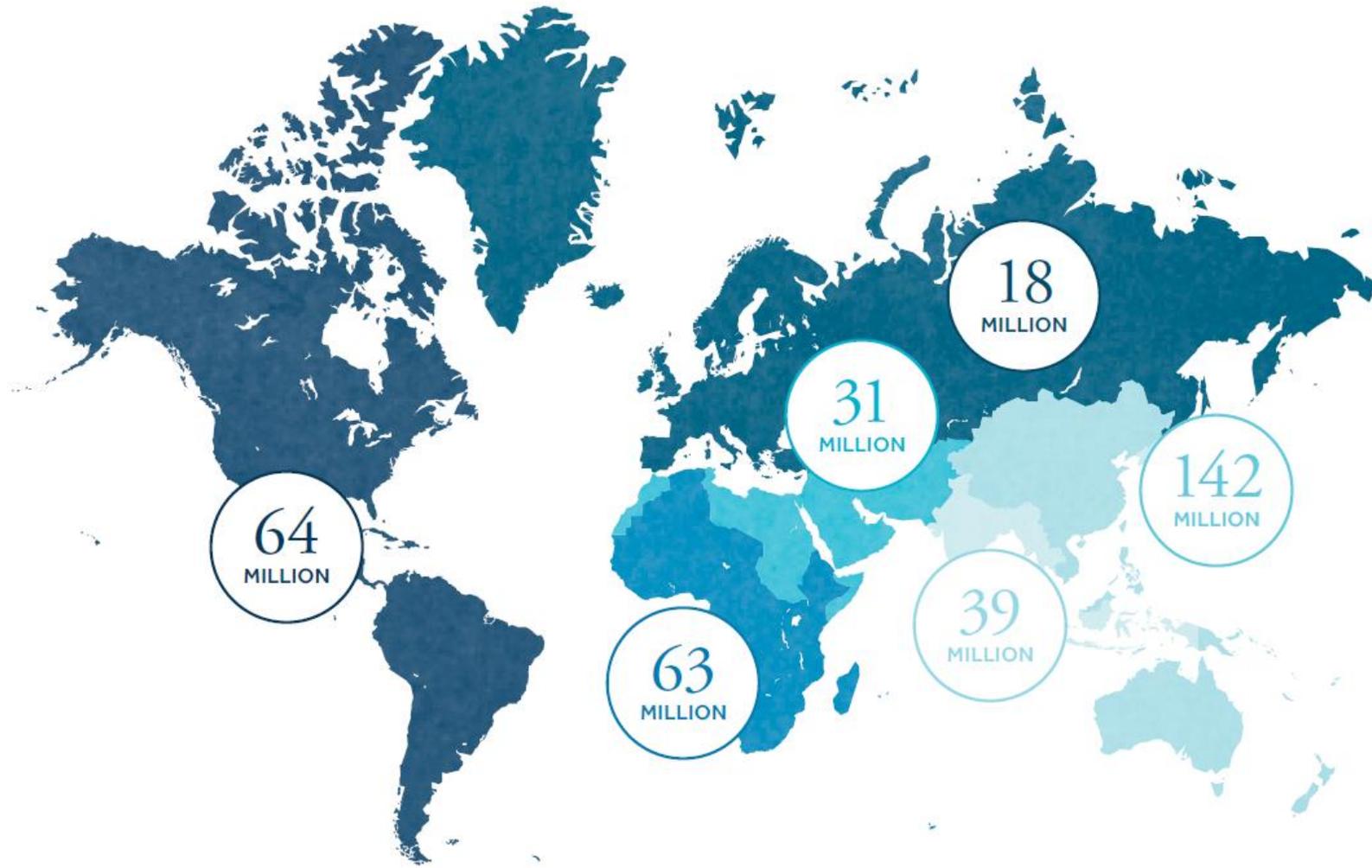
Son infecciones provocadas por uno ó más gérmenes endógenos o exógenos, que suelen ser transmitidas por vía sexual en la mayoría de los casos y que comprometen el futuro reproductivo de los pacientes.



INFECCIONES TRACTO GENITAL INFERIOR

| | Origen | Propagación | Ejemplos |
|--|--|---|---|
| Infecciones de transmisión sexual | Parejas sexuales infectadas | Contacto sexual con pareja infectada | Gonorrea, clamidia, sífilis, chancroide, tricomoniasis, herpes genital, verrugas genitales, VIH |
| Infecciones endógenas | Microorganismos habituales en la vagina | Generalmente no se propaga de persona a persona. El crecimiento excesivo puede provocar síntomas | Candidiasis, vaginosis bacteriana |
| Infecciones iatrogénicas | Endógenas (vagina) ITS (cuello uterino o vagina) Contaminación desde el exterior | Procedimientos médicos (durante embarazo, parto, post parto colocación de DIU). Cuadros ginecológicos. Infección introducida hacia tracto genital superior causando infección en útero trompas y otros órganos intrapélvicos. | EPI post aborto u otro procedimiento transcervical. Complicaciones infecciosas del embarazo y post-parto |

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL



- *Chlamydia trachomatis* 131 millones
- *Neisseria gonorroaeae* 78 millones
- *Treponena pallidum* 6 millones
- *Trichomonas vaginalis* 142 millones
- HSV-2 417 millones
- HPV 291 millones

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

- Problema de salud pública global.
- Alta morbilidad asociada
- Complicaciones clínicas con repercusiones potencialmente graves en salud sexual y reproductiva:
 - ✓ **Infertilidad**
 - ✓ **Muertes fetales y neonatales** - sífilis en el embarazo : 300 000 muertes/año y aumenta el riesgo de muerte temprana.
 - ✓ **Cancer Cervical** - la infección por HPV es responsable de alrededor de 530 000 casos de CCU y 264 000 muertes por CCU/año
 - ✓ **Riesgo de HIV** - sífilis, gonorrea, o HSV incrementa el riesgo de adquirir o transmitir la infección por HIV.
 - ✓ **Consecuencias físicas, psicológicas y sociales** de las ITS comprometen la calidad de vida de aquellos infectados.

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

| | |
|---|---|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | INFECCION CHLAMYDIAL |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar L1-L3) | LINFOGRANULOMA VENEREO |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | GONORREA |
| <i>Treponema pallidum</i> | SIFILIS |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> | CHANCROIDE |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | URETRITIS NO GONOCOCCICA |
| <i>Klebsiella granulomatis</i> | DONOVANOSIS (GRANULOMA INGUINAL) |
| VIRUS HSV tipo 2 | HERPES GENITALES |
| HPV | VERRUGAS GENITALES – CANCER CERVICAL, LARINGEO, BUCAL |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | TRICHOMONIASIS |
| <i>Candida albicans</i> | CANDIDIASIS |

Diagnóstico



ANAMNESIS DIRIGIDA Y EXPLORACION CLINICA METICULOSA

METODOS DIRECTOS

- ✓ Microscopía directa
- ✓ Cultivo
- ✓ Tinciones específicas
- ✓ Inmunohistoquímica
- ✓ Detección de antígenos
- ✓ Inmunofluorescencia
- ✓ Detección de Acidos Nucleicos

GOLD STANDARD

METODOS INDIRECTOS

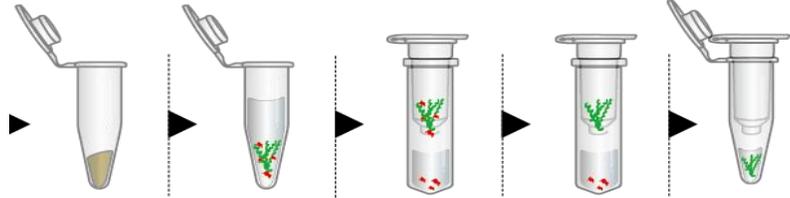
- ✓ Serología

Detección de Ácidos Nucleicos

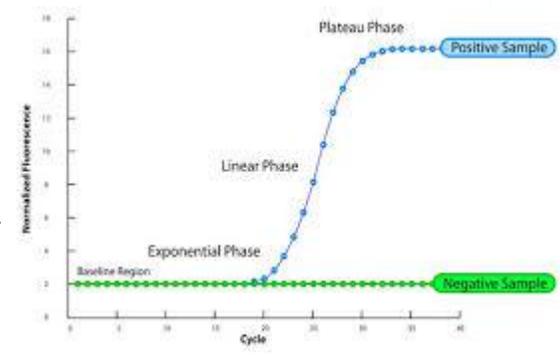
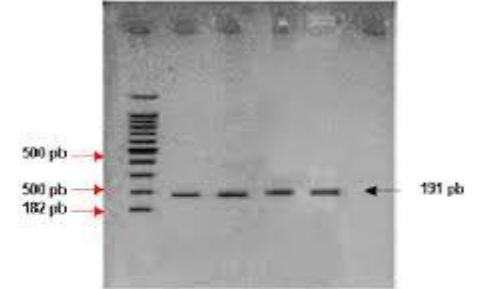
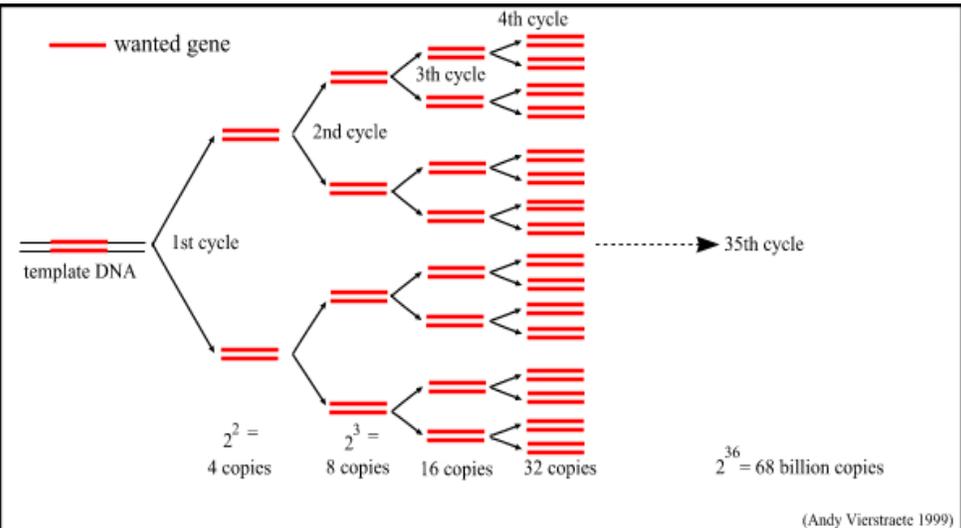
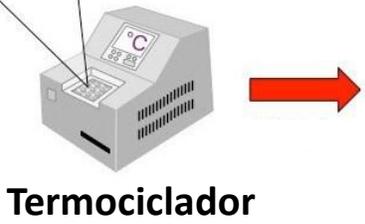
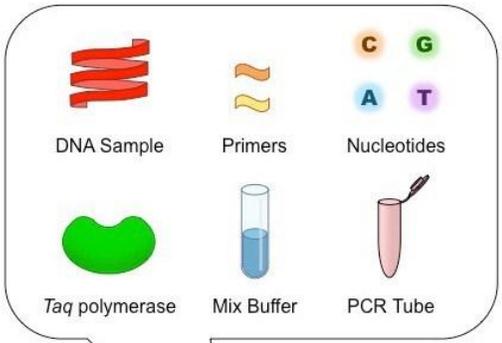
OBTENCION Y CONSERVACION DE LA MUESTRA

LIBERACION Y PURIFICACION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

AMPLIFICACION Y DETECCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS



- ✓ PCR / RT-PCR
- ✓ Real time PCR
- ✓ Secuenciación



Detección de Ácidos Nucleicos

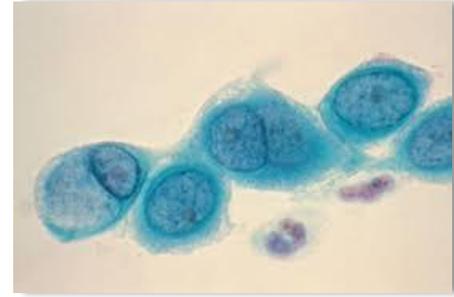
VENTAJAS

- Alta sensibilidad y especificidad.
- El resultado está disponible en unas horas.
- Permiten diagnóstico a partir de muestras no invasivas o de muestras recogidas por el paciente.
- No requieren condiciones de transporte tan estrictas.

DESVENTAJAS

- Pueden producir resultados falsos positivos o negativos.
- Costo elevado.
- Pueden existir inhibidores de la PCR o contaminaciones.
- Tienen requerimientos de validación y control de calidad.

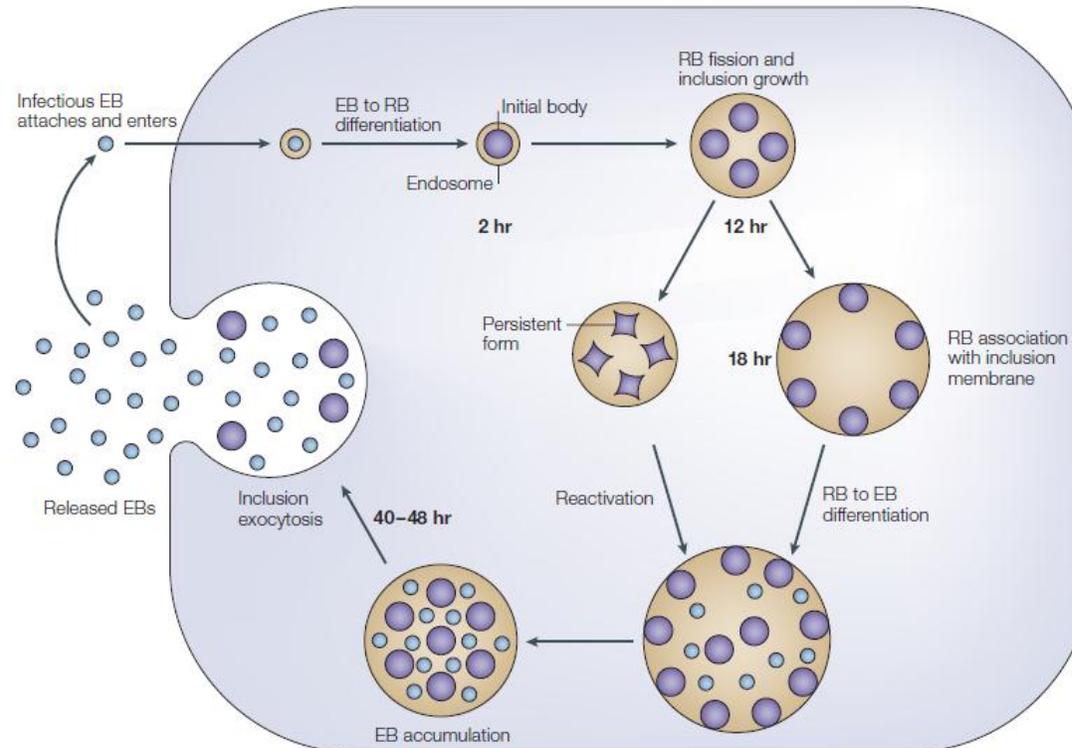
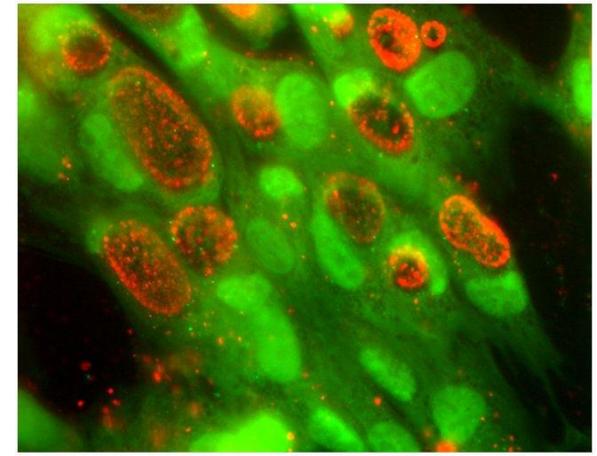
Chlamydia trachomatis



- Patógeno transmitido sexualmente de mayor prevalencia a nivel mundial (OMS):
 - prevalencia global de la infección: 4,4 a 6,6%
 - prevalencia en América Latina: 6 a 40%
- Mayor prevalencia: población sexualmente activa de 14 a 25 años (CDC).
- Se ha demostrado que la presencia de este agente facilita la transmisión del virus de HIV y HPV.

Chlamydia trachomatis

- Bacterias Gram negativas, intracelulares obligadas.
- Ciclo de desarrollo bifásico, consta de una forma infecciosa y resistente al medio ambiente o cuerpo elemental (CE) y una forma replicativa, no infecciosa o cuerpo reticulado (CR).



Chlamydia trachomatis

- **19 serovariedades agrupadas en 3 biovares con diferente tropismo tisular:**
 - TRACOMA (serovares A, B/Ba, C)
 - LINFOGRANULOMA VENEREO (serovares L1, L2/L2a, L3)
 - ENFERMEDAD OCULO-GENITAL NO INVASIVA (serovares D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K)

Chlamydia trachomatis

- 19 serovariedades agrupadas en 3 biovares con diferente tropismo tisular:

TRACOMA (serovares A, B/Ba, C)

LINFOGRANULOMA VENEREO (serovares L1, L2/L2a, L3)

H, I/Ia, J, K)



Ministerio de Salud
Presidencia de la Nación

ALERTA Epidemiológica:

Casos de linfogranuloma venéreo (LGV) en Argentina

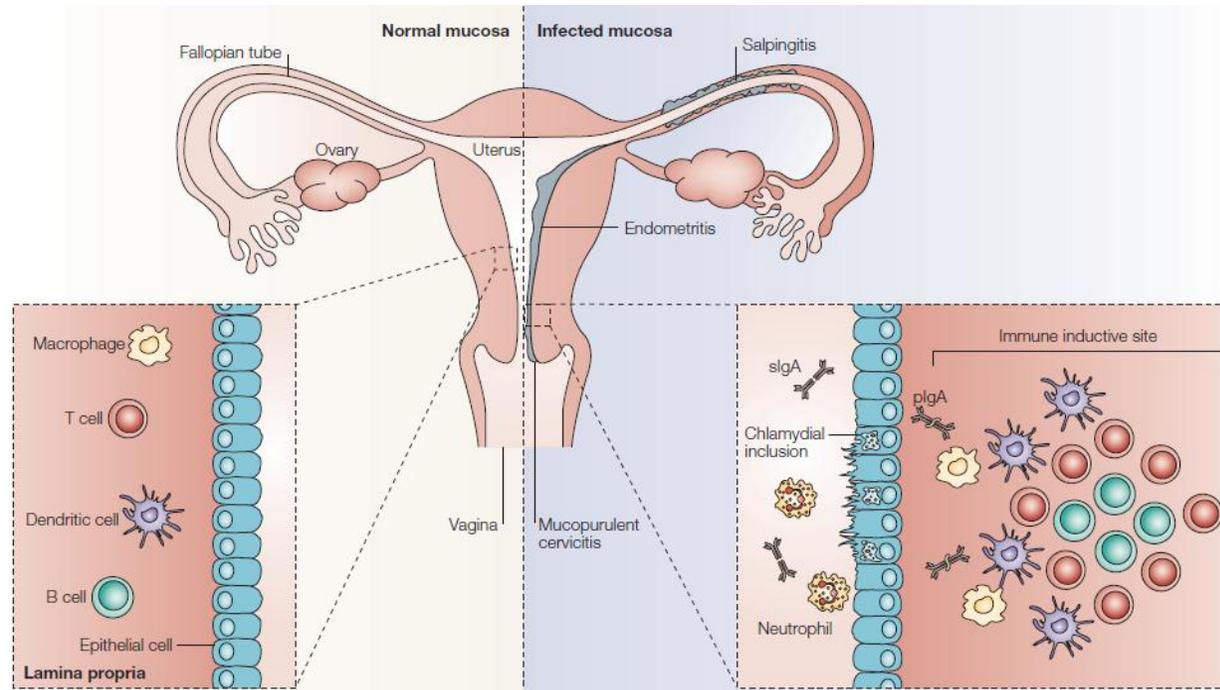
SE 33/2018

Chlamydia trachomatis

- 19 serovariedades agrupadas en 3 biovares con diferente tropismo tisular:
TRACOMA (serovares A, B/Ba, C)
LINFOGRANULOMA VENEREO (serovares L1, L2/L2a, L3)
ENFERMEDAD OCULO-GENITAL NO INVASIVA (serovares D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K)



células del epitelio columnar del endocérvix de las mujeres y el epitelio urogenital de los hombres



Chlamydia trachomatis



- 75% de las infecciones son asintomáticas → incidencia real subestimada.
- Secreción vaginal, edema cervicitis, dolor abdominal.
- Infección no tratada: enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, cervicitis crónica y uretritis.
- Complicaciones: infertilidad, embarazo ectópico o infecciones puerperales entre otras.
- Conjuntivitis y neumonía en recién nacidos



- 50% de las infecciones uretrales son asintomáticas.
- Causa más común de uretritis no gonocócica, epididimitis.
- Infección no tratada: complicaciones en el tracto genital superior: epididimitis.
- Reservorio para transmisión continua a las mujeres.

Infección asintomática → difícil detección → demora en el comienzo del tratamiento → incrementa riesgo de complicaciones y de transmisión a la pareja.

Chlamydia trachomatis

Un diagnóstico rápido y sensible es mandatorio para evitar la demora en el comienzo del tratamiento, disminuyendo el riesgo de la aparición de complicaciones y transmisión a la pareja.

RECOMENDACIÓN DEL CDC (Center for Disease Control and Prevention, EEUU).

SCREENING ANUAL

♀ < 25 años sexualmente activas

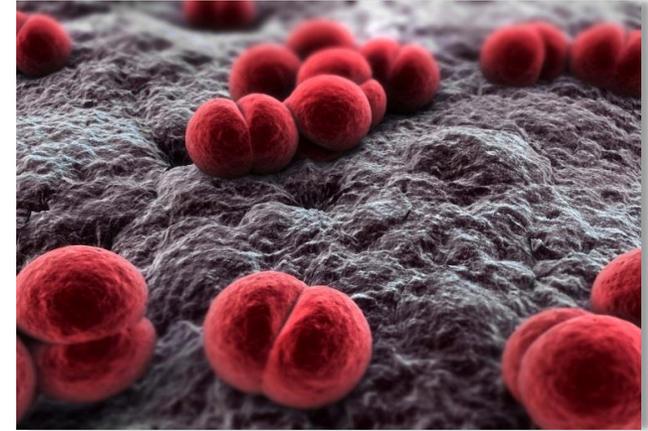
♀ > 25 años con riesgo de infección

Nuevo screening 3 meses post tratamiento

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS COMO METODO DIAGNOSTICO

Neisseria gonorrhoeae

- Diplococo Gram negativo.
- Patógeno transmitido sexualmente de alta prevalencia.
- Coloniza el epitelio columnar de uretra, endocérnix, recto, faringe y conjuntiva en humanos.
- Gran problema de salud pública. Ha desarrollado resistencia casi a todos los antimicrobianos.



Neisseria gonorrhoeae



- Comúnmente infecciones asintomáticas.
- Sitio primario de infección: endocervix y uretra en menor proporción.
- Flujo vaginal alterado, dolor hipogastrio, disuria.
- Infecciones no tratadas: enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, salpingitis, etc.
- Conjuntivitis en recién nacidos
- Infección combinada con *C. trachomatis* o *T. vaginalis*.



- 10% de las infecciones uretrales son asintomáticas.
- Causa más común de uretritis y menos frecuentemente epididimitis o infección diseminada.

Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014

FDA-cleared NAAT

cobas CT/NG test
(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)

FDA-cleared specimen types

Asymptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, clinician-collected vaginal swab, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine.

Asymptomatic men: urine.

Symptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, clinician-collected vaginal swab, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine.

Symptomatic men: urine.

Test Cobas[®] 4800 CT/NG (Roche)

✓ Detección cualitativa de ácidos nucleicos de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.

- Extracción automatizada de ácidos nucleicos a partir de especímenes clínicos (Cobas x 480): **hisopados endocervicales y vaginales, 1er chorro de orina, semen.**



- Detección de CT y NG por PCR en tiempo real (Cobas z 480)

DETECCION DE CT

- ✓ ADN genómico: gen ompA
- ✓ ADN plásmido críptico

DETECCION DE NG

- ✓ ADN región DR-9
- ✓ ADN variante región DR-9

CONTROL INTERNO

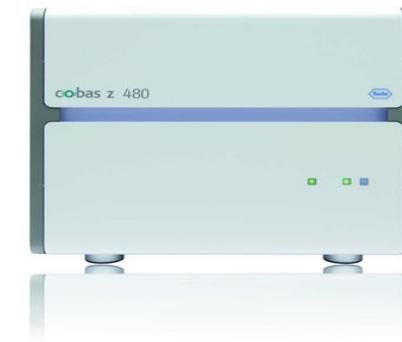
- ✓ Se procesa junto con las muestras
- ✓ Verifica presencia de inhibidores

CONTROL POSITIVO

- ✓ Verifica funcionamiento de la PCR

CONTROL NEGATIVO

- ✓ Verifica que no hay contaminación



Importancia de la búsqueda de *N. gonorroae* en pacientes con sospecha de infección por *C. trachomatis*. Utilidad de la detección simultánea de ambos patógenos. Sciara M. ; Zubillaga E.; Seravalle A. Laboratorio Cibic. Rosario, Argentina

- 195 muestras (flujo vaginal, exudado uretral, semen y orina).
- Solo se había solicitado la detección de *CT*.

| | nº muestras | NG + | % NG + |
|--------------------|-------------|------|--------|
| MUJER | | | |
| Flujo vaginal | 38 | 0 | |
| 1º chorro de orina | 2 | 0 | |
| Total | 40 | 0 | |
| HOMBRE | | | |
| Semen | 114 | 0 | |
| Exudado uretral | 18 | 4 | |
| 1º chorro de orina | 23 | 0 | |
| Total | 155 | 4 | 2,6 |
| Total analizado | 195 | 4 | 2,1 |

Tabla 1. Resultados de la detección de NG por test cobas 4800 según tipo de muestra

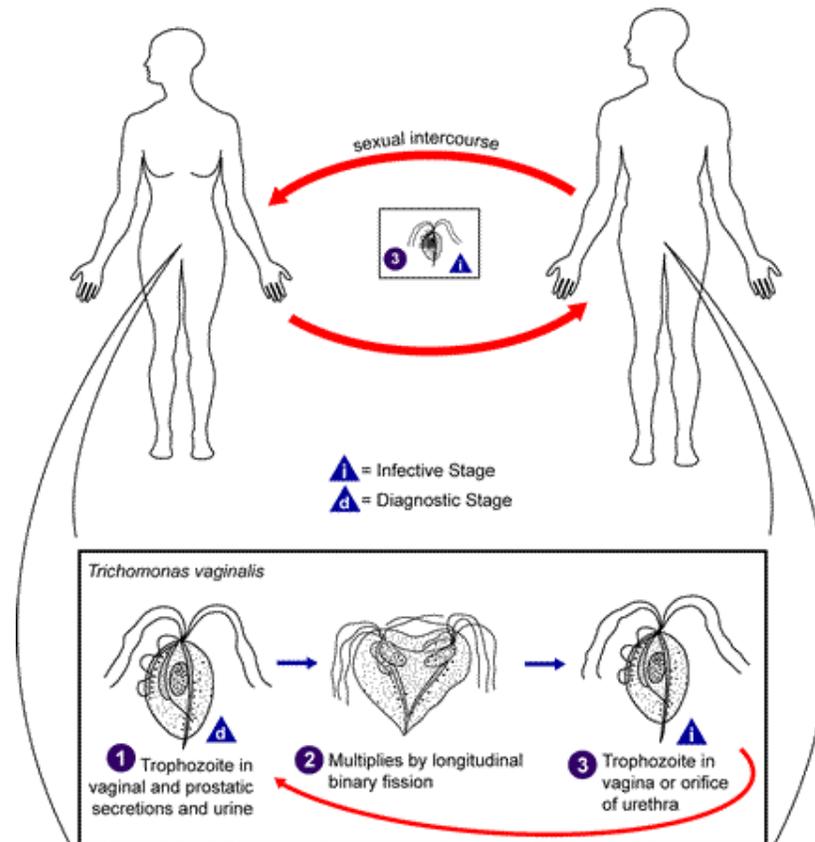
| NG + por Cobas 4800 | RESULTADO ESTUDIO MICROBIOLÓGICO |
|---------------------|--|
| Ex. uretral 1 | Cultivo negativo |
| Ex. uretral 2 | Exámen directo compatible con cultivo negativo |
| Ex. uretral 3 | No se solicitó estudio microbiológico |
| Ex. uretral 4 | No se solicitó estudio microbiológico |

Tabla 2. Resultados del estudio microbiológico en las muestras NG+ por test cobas 4800.

Debería considerarse establecer la búsqueda de *CT* y *NG* en simultáneo por métodos moleculares, otorgando una ventaja significativa en cuanto al tiempo, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico.

Trichomonas vaginalis

- Parásito protozoario móvil flagelado
- Coloniza el epitelio humano del tracto urogenital.
- Mayor incidencia anual de infección que *Chlamydia* y *Neisseria* a nivel mundial. Mayor prevalencia en mujeres sexualmente activas (1-8%).



<https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

Trichomonas vaginalis



- 80% asintomáticas
- Infección y síntomas puede persistir por años.
- Vulvovaginitis, prurito y leucorrea maloliente, eritema vulvar, cervix en fresa (90%), dolor pélvico, cistitis.
- Infección del neonato intra-canal de parto.
- Mayor riesgo de parto pre-término
- Mayor riesgo de contagio por HIV
- Asociada a infección por HPV



- Síntomas mas leves
- Infección puede desaparecer en semanas
- Uretritis no gonocócica, asintomática
- Posible aumento del riesgo de cáncer de próstata.

Diagnóstico



EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

- visualización del parásito móvil en muestra vaginal
- baja sensibilidad
- dependiente del operador

CULTIVO

- alta sensibilidad
- depende de la viabilidad del microorganismo
- demora varios días

PCR

- alta sensibilidad y especificidad
- rápido
- no dependiente de la viabilidad

Treponema pallidum

- **Espiroqueta no cultivable, patógeno exclusivo del humano.**
- **Agente etiológico de la sífilis.**
- **Ingresa al organismo por las mucosas y se disemina por el cuerpo a través de vasos sanguíneos o linfáticos. Puede invadir cualquier órgano incluido el SNC. Puede transmitirse por vía transplacentaria.**
- **No existen portadores sanos.**
- **Según el Ministerio de Salud, los casos en Argentina se han triplicado desde el 2011 al 2017, reportándose alrededor de 11000 casos en ese año.**



Treponema pallidum

PERIODO DE INCUBACION

- En promedio 20 días (3 a 90 días).
- Aparecen anticuerpos treponémicos y no treponémicos (anti cardiolipina)

SIFILIS PRIMARIA

- Lesión erosiva e indolora en la zona de inoculación, generalmente genitales (chancro), altamente infecciosa.
- Infección sistémica. Normalmente involuciona y cicatriza en 3 a 8 semanas. Puede pasar desapercibida.
- Si se diagnostica en este período se cura sin secuelas. La inmunidad adquirida es de corta duración.

SIFILIS SECUNDARIA

- Presentación diseminada.
- Lesiones cutáneas eruptivas, erosivas en mucosas, verrugosas en regiones genitales y perianal. Malestar general con fiebre. El SNC puede estar involucrado.
- La terapia con antibióticos permite su curación. Si no se trata, tras varias semanas entra en periodo de latencia.

SIFILIS LATENTE

- Sin manifestaciones clínicas, pero con progresión de la enfermedad, con recidivas hasta 4 años después de la sífilis secundarias.

SIFILIS TERCIARIA

- 30% desarrollan manifestaciones terciarias. Enfermedad inflamatoria y crónica con muchos tejidos afectados.

SIFILIS CONGENITA

- Madre infectada no tratada.
- Probabilidad de infección fetal mayor en estadíos iniciales, después del 4to mes de gestación.
- Afecta tejidos mucocutáneos y óseos. Alta mortalidad durante el primer año de vida.

Diagnóstico



METODOS DIRECTOS

- Prueba de Infectividad en Conejo (RIT)
- Campo Oscuro: examen inmediato
- Inmunofluorescencia Directa (ac monoclonales contra *T. pallidum*)
- Amplificación del ADN (PCR): lesión, LCR, suero, tejidos

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

- Prueba No Treponémica (anticuerpos anti-cardiolipina) screening, no específica

VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)

USR (Unheated Serun Reagin)

RPR (Rapid Plasma Reagin)

- Prueba Treponémica (anticuerpos treponémicos)

FTA-Abs (Abs anticuerpos treponémicos fluorescentes)

TP HA (Hemaglutinación)

ELISA Indirecto

Mycoplasma / Ureaplasma

- *M. hominis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum* son bacterias pequeñas, fastidiosas, clase *Mollicutes* .
- Carecen de pared celular, no se tiñen, dificultad para su cultivo, no se tratan con penicilina.
- Colonizan normalmente el tracto urogenital de personas sanas sexualmente activas.
- Asociadas patología del tracto urogenital en adultos, y con complicaciones en el embarazo, sepsis post parto, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica neonatal y displasia broncopulmonar.
- Necesidad de diagnóstico preciso en muestras cervicales.



M. genitalium

- Detectado en presencia de infección clínica.
- Cervicitis, EPI

- Uretritis

M. hominis

- Coloniza cervix o vagina de 21-53% mujeres sexualmente activas.
- Asociado a pielonefritis, EPI, corioamnionitis, endometritis post parto, vaginosis bacteriana, artritis, osteoartritis, infecciones de heridas en neonatos (neumonía congénita, meningitis, bacteriemia)

- Coloniza uretra.
- Uretritis no gonocócica, asintomática
- Posible aumento del riesgo de cáncer de próstata.

U. urealyticum

U. parvum

- Coloniza la vagina y el cervix de entre el 40% y 80% de las mujeres adultas saludables
- Asociados a artritis, corioamnionitis, endometritis post parto o parto prematuro, neumonía, bacteriemia, meningitis y enfermedad pulmonar crónica en neonatos.

- Uretritis

Diagnóstico

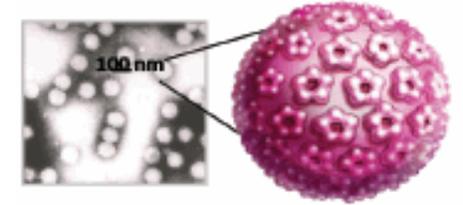
PCR

- alta sensibilidad y especificidad
- rápido
- no dependiente de la viabilidad
- utilidad en la identificación de especies.



Virus Papiloma Humano (HPV)

- Familia *Papillomaviridae*.
- Replica en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas).
- Asociado prácticamente al 100% de los casos de Cáncer Cérvico Uterino (CCU).
- También vinculado con cánceres de vulva, vagina, pene, ano, orofaríngeos.

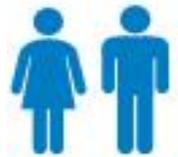


Cápside proteica,
sin envoltura



Genoma: ADN
circular (8.000 pb)

Infección por HPV y CCU



Se cree que entre el 70 y 80% de la población sexualmente activa estará infectada antes de los 50 años de edad.



500.000 nuevos episodios por año.



Se estima que todos los años se diagnostican 500.000 nuevos episodios de cáncer cervical en el mundo, de los cuales el 80% ocurren en países en desarrollo con una mortalidad cercana al 50%.

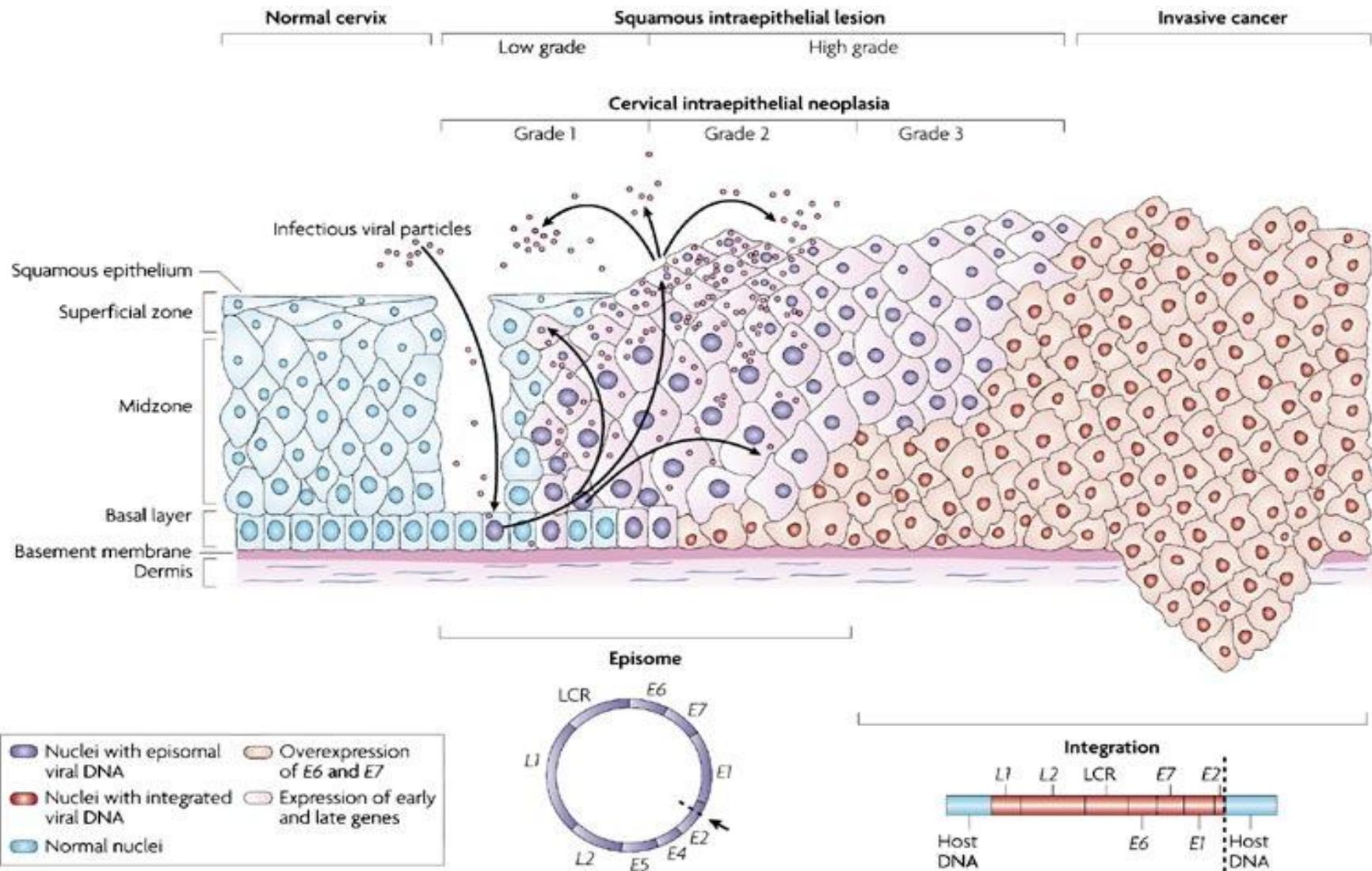


4.000 nuevos episodios por año.

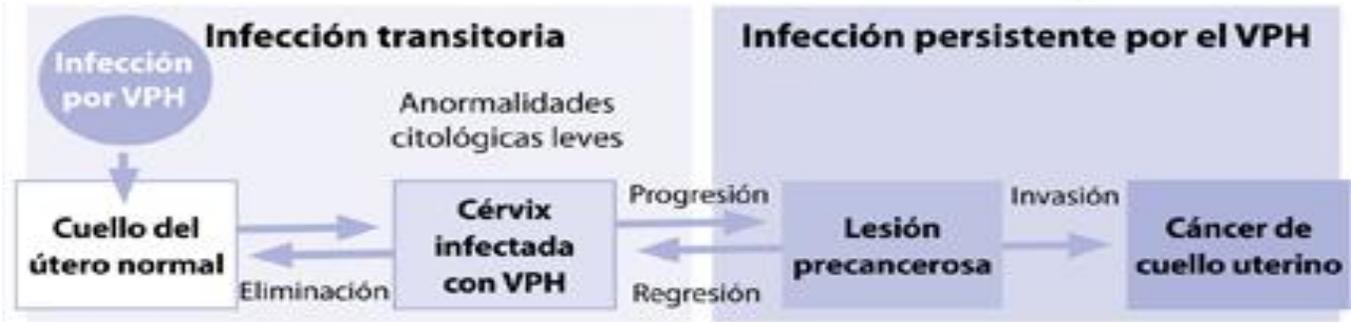
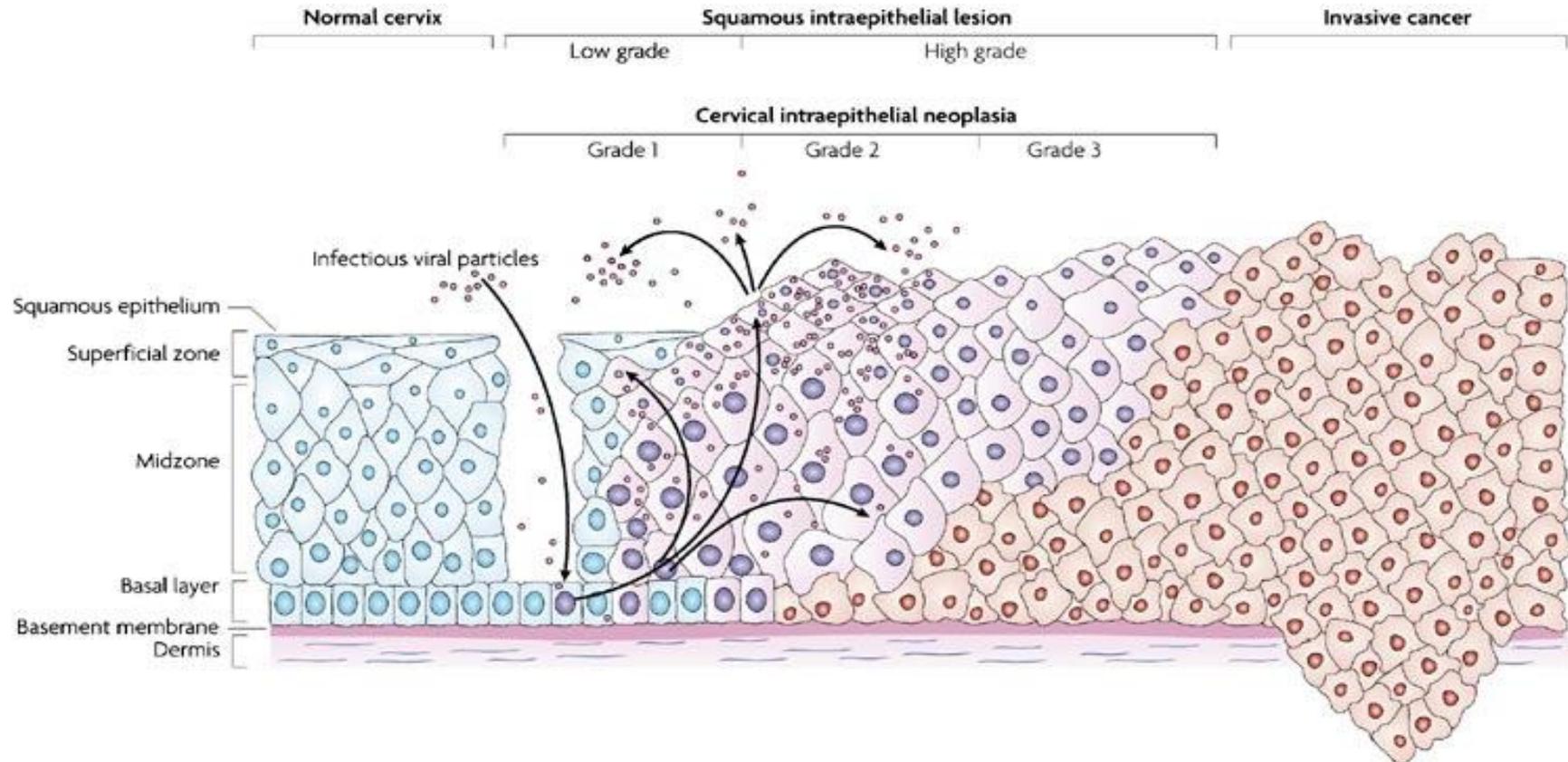
2.000 muertes por año.

De acuerdo a estadísticas del Ministerio de Salud, en Argentina se reportan cerca de 4.000 episodios de neoplasias cervicales invasoras y aproximadamente 2.000 muertes por año.

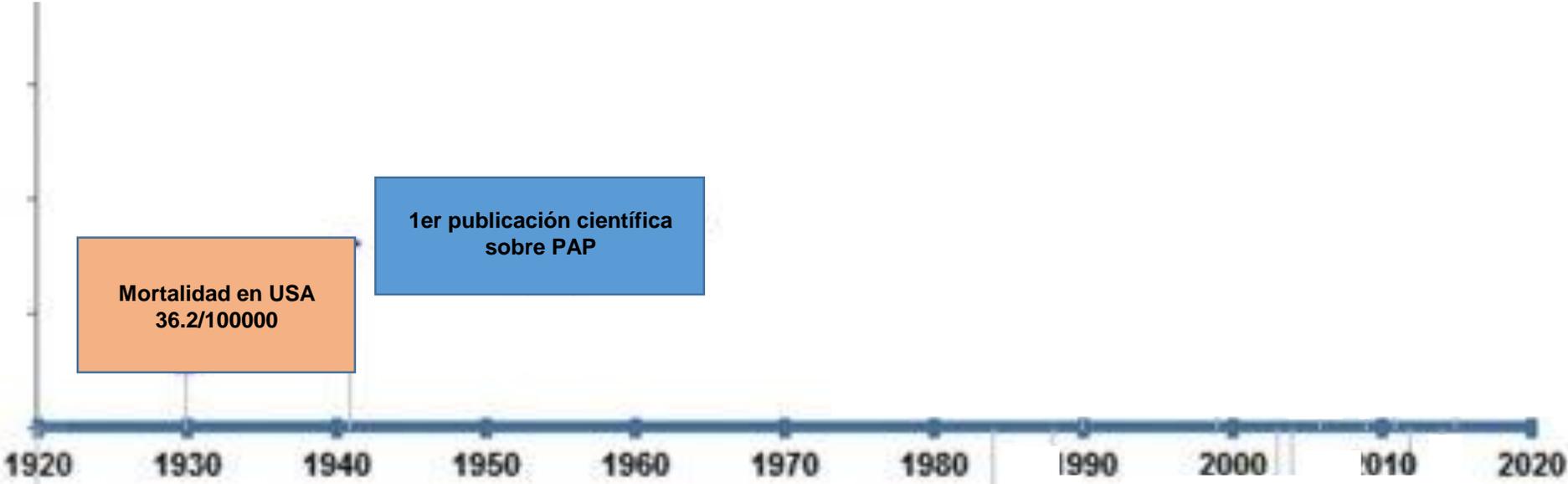
Infección por HPV



Infección por HPV



Detección del CCU



George Papanicolau
Comienza sus trabajos en frotis Vaginales



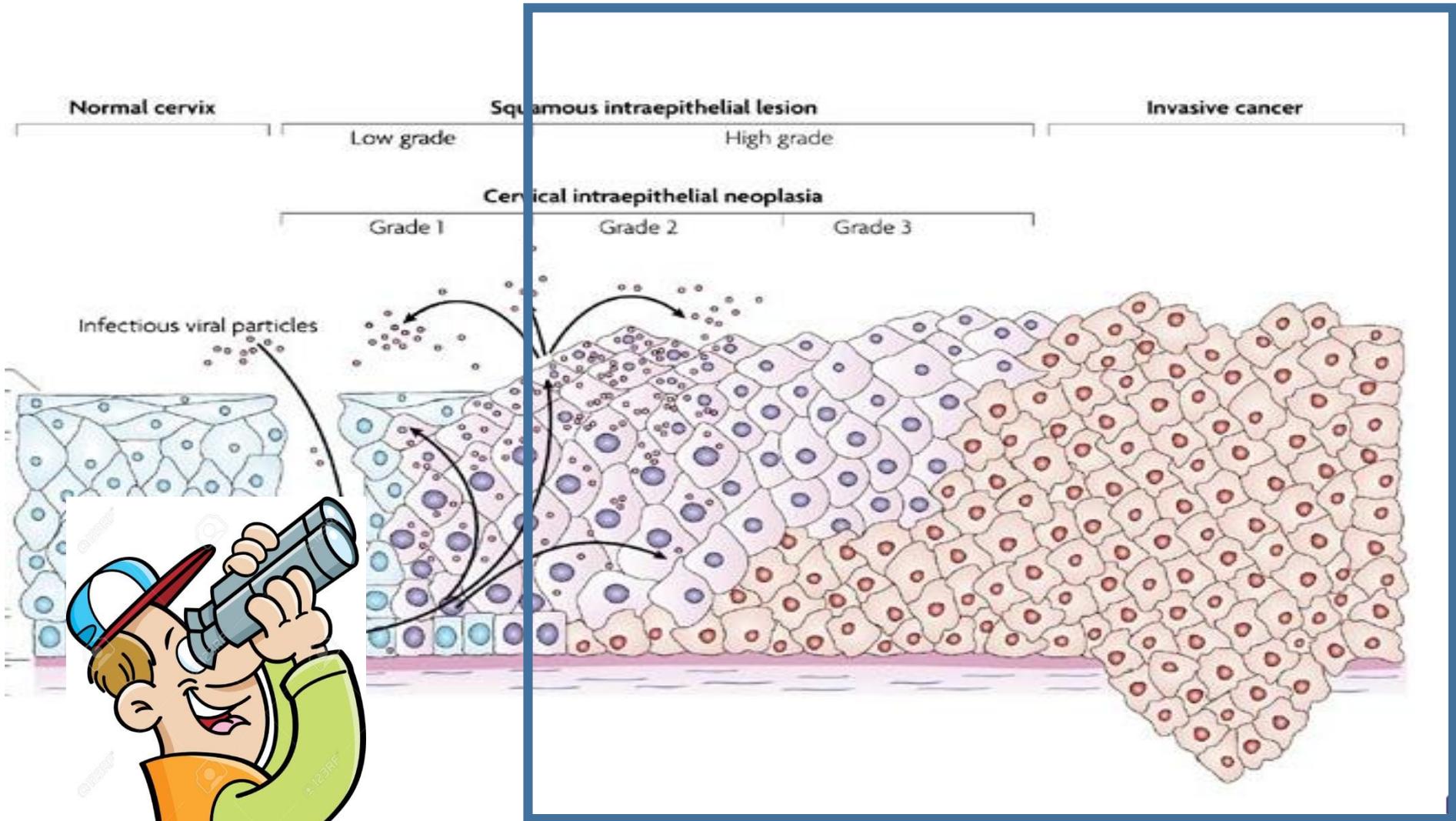
CITOLOGIA DE CUELLO DE UTERO (PAPANICOLAU)
Metodologia de **screening primario** usada en las últimas décadas en Argentin-



Identificar lesiones precursoras de cáncer cervical para prevenir el desarrollo del mismo.

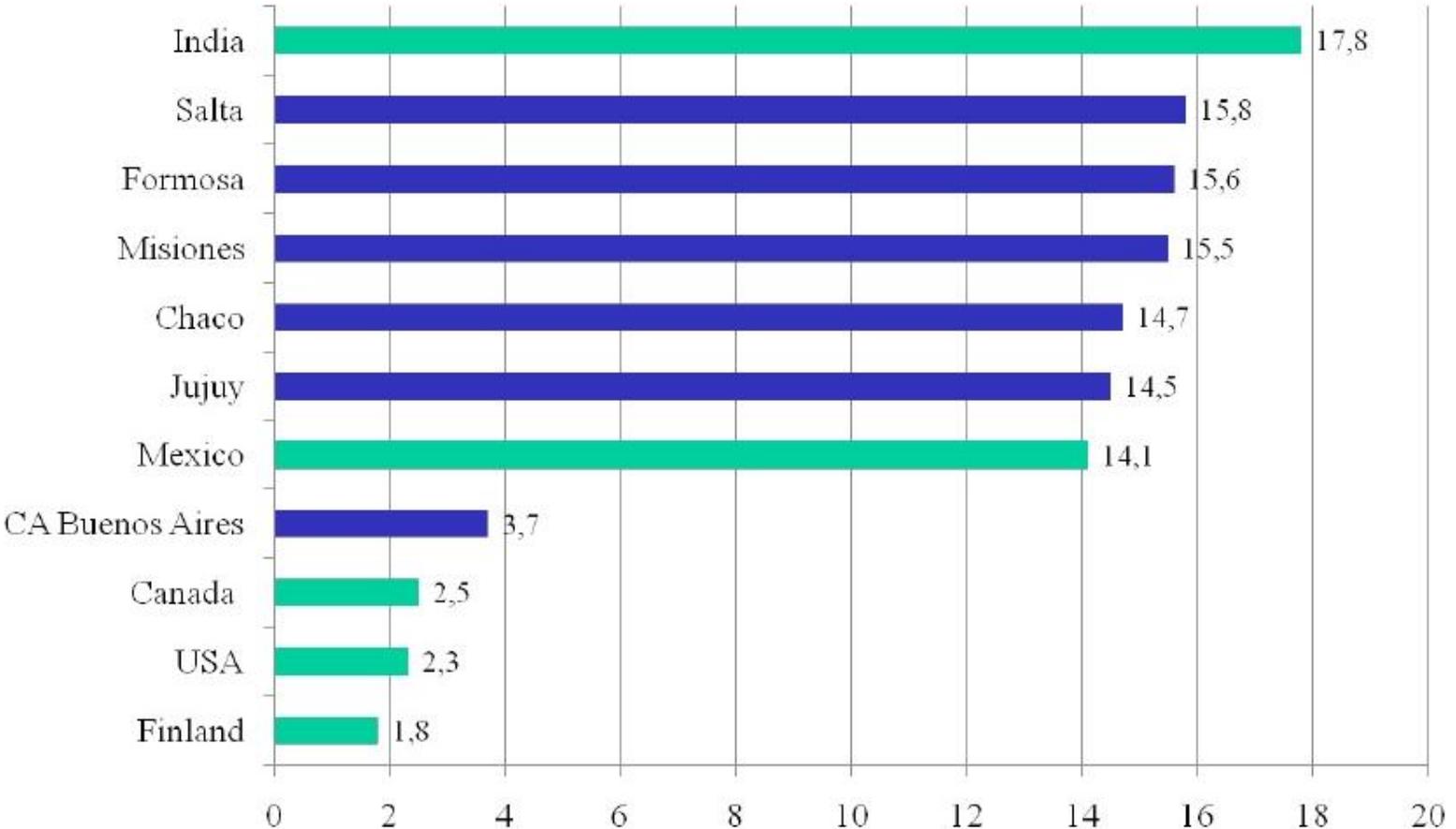
Desempeño del PAP como screening

- ✓ **Sensibilidad de la citología cervical es del 50% → Seguimiento frecuente para lograr buena protección**
- ✓ **Resultados entre laboratorios presentan alta variabilidad**
- ✓ **La citología no detecta mujeres con riesgo sino que detecta mujeres con enfermedad cervical**



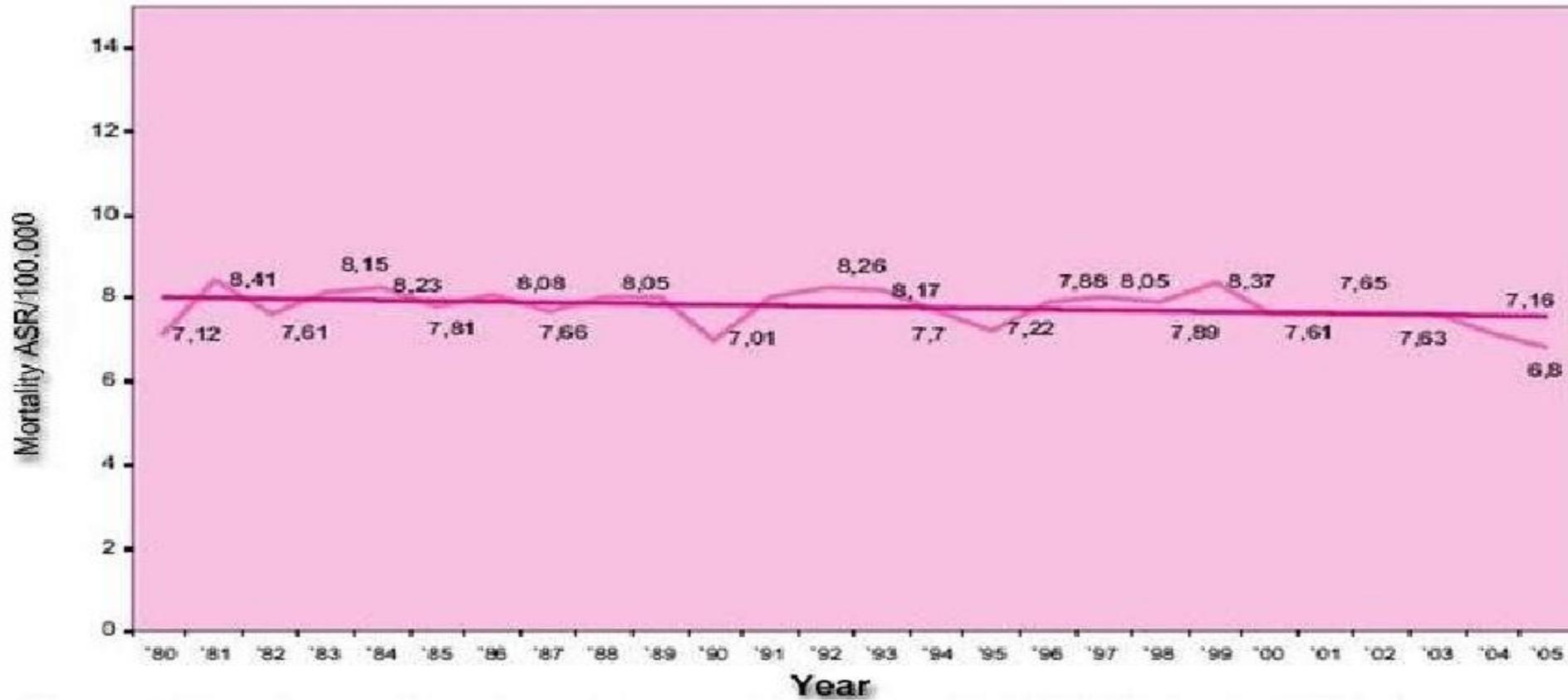
Mortalidad del CCU en Argentina

Mortality (ASR/100.000)



Adapted from Arrosi S. http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/pdf/pub64_ops.pdf

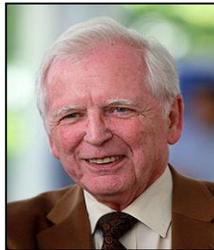
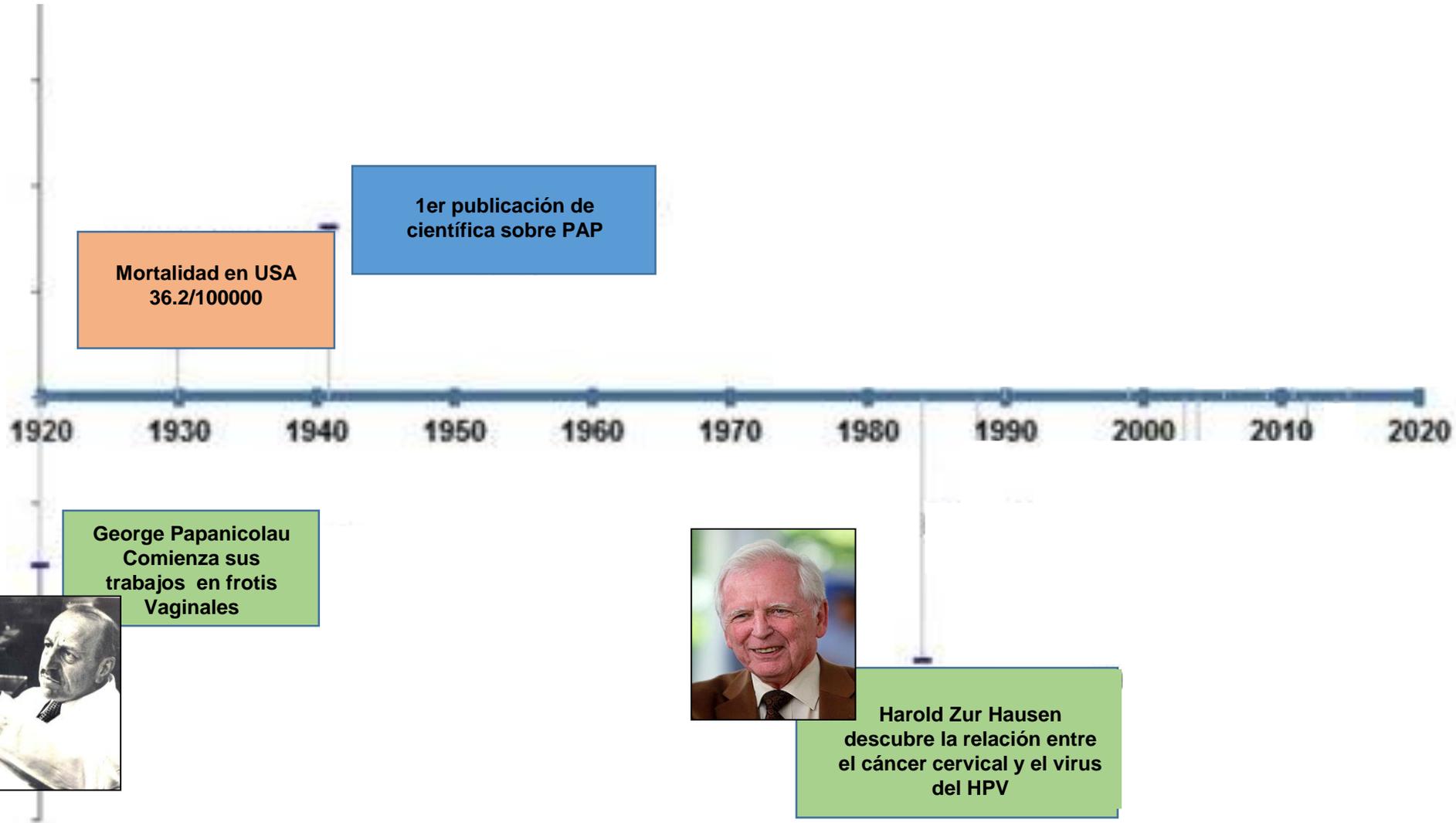
Tendencia de Mortalidad por Cáncer de Cuello Uterino (ASR): Argentina. 1980 - 2005.



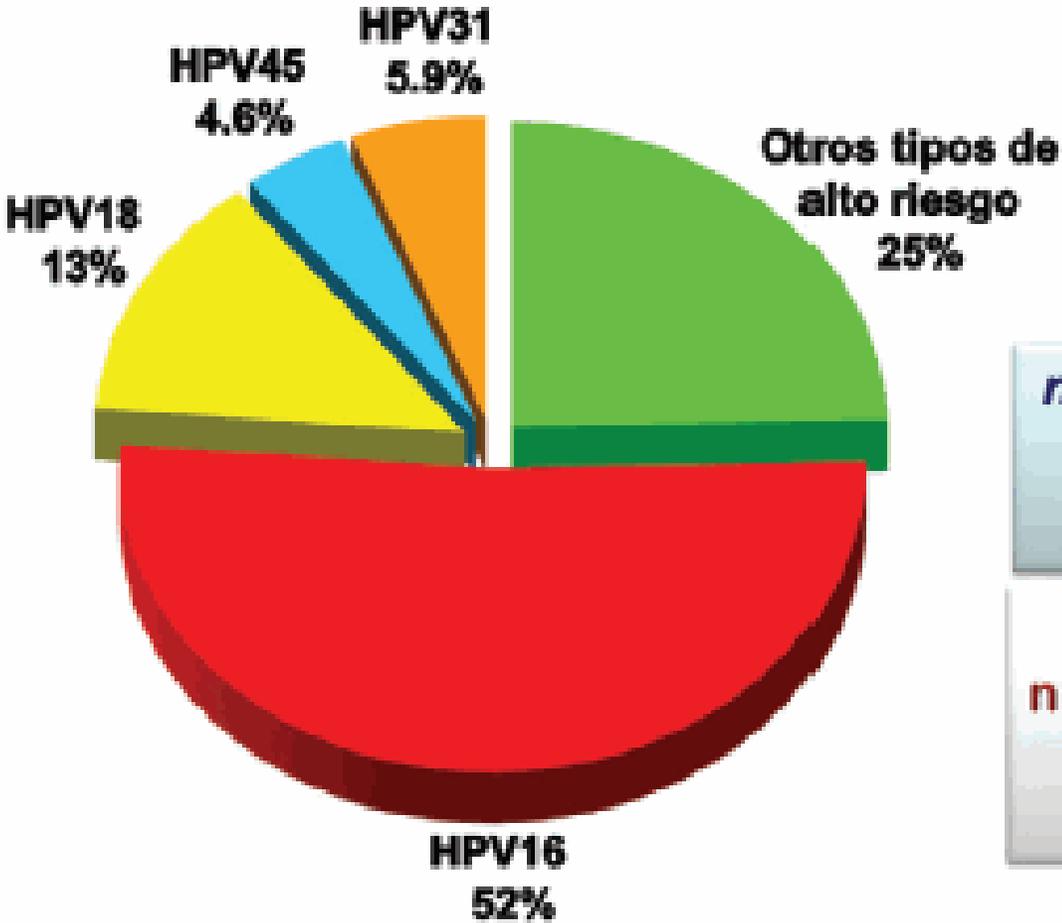
Adapted from Arrosi S. http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/pdf/pub64_ops.pdf



Detección del CCU



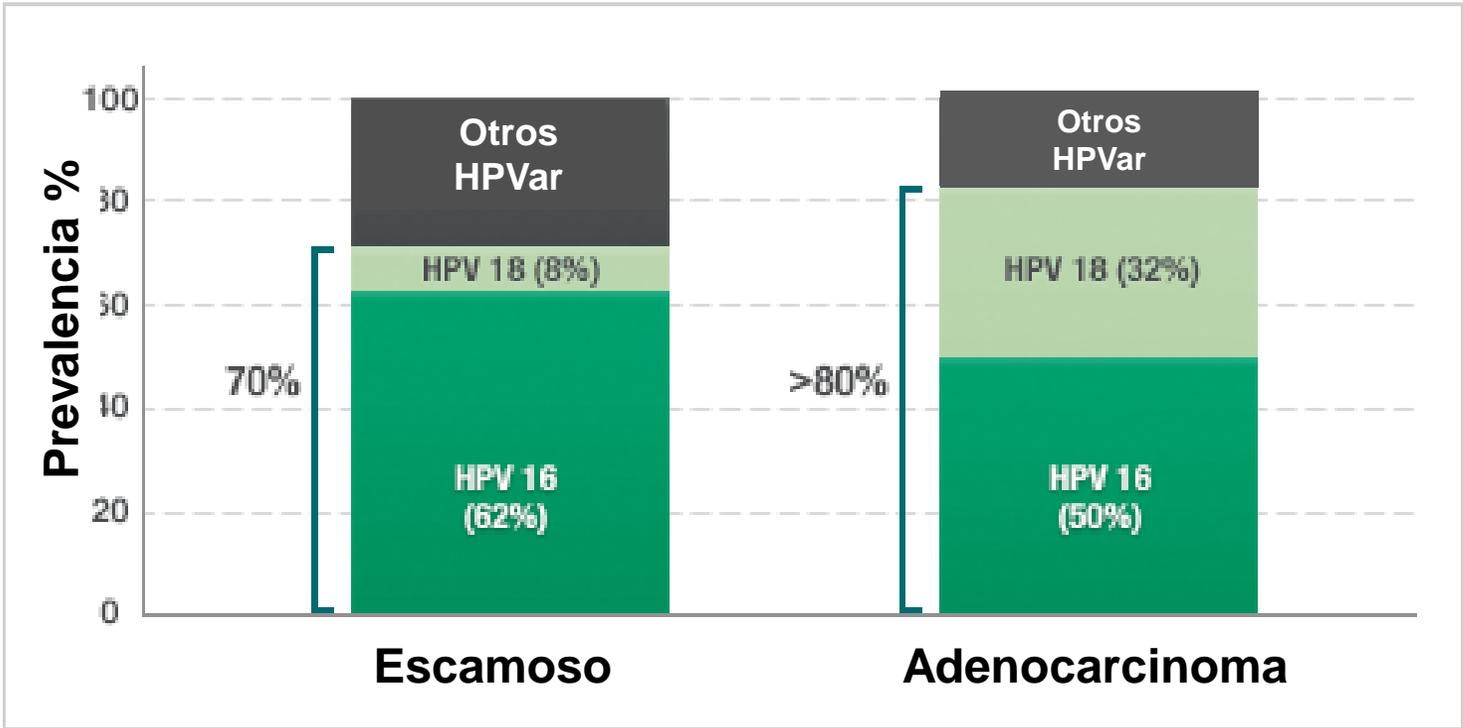
Genotipos de HPV de alto riesgo de cáncer



*n= 5 542 cánceres
61 estudios
16 países*

**En Argentina:
n=1 013 cánceres
HPV16: 59.5%
HPV18: 17.6%**

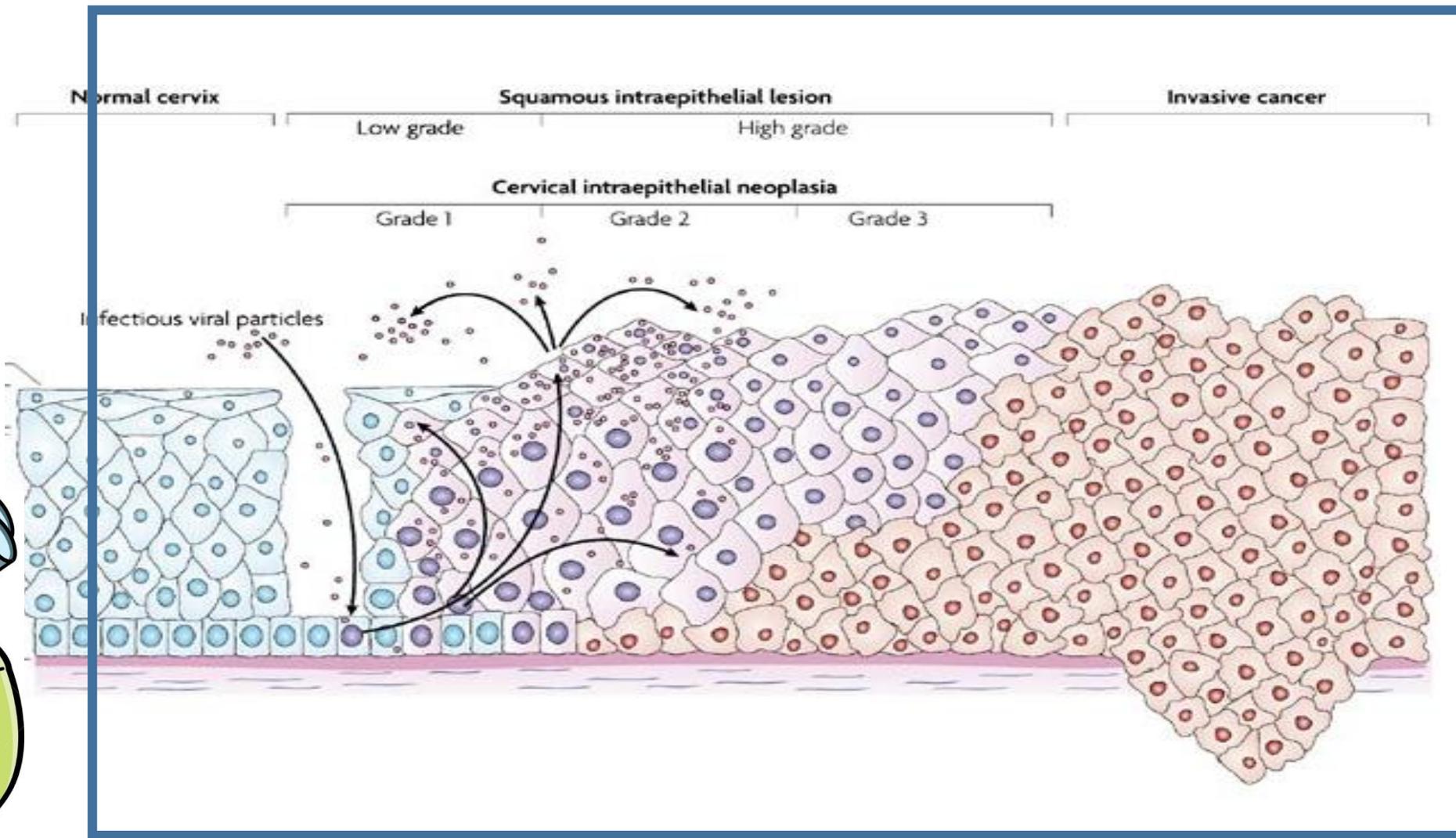
Genotipos de HPV de alto riesgo de cáncer



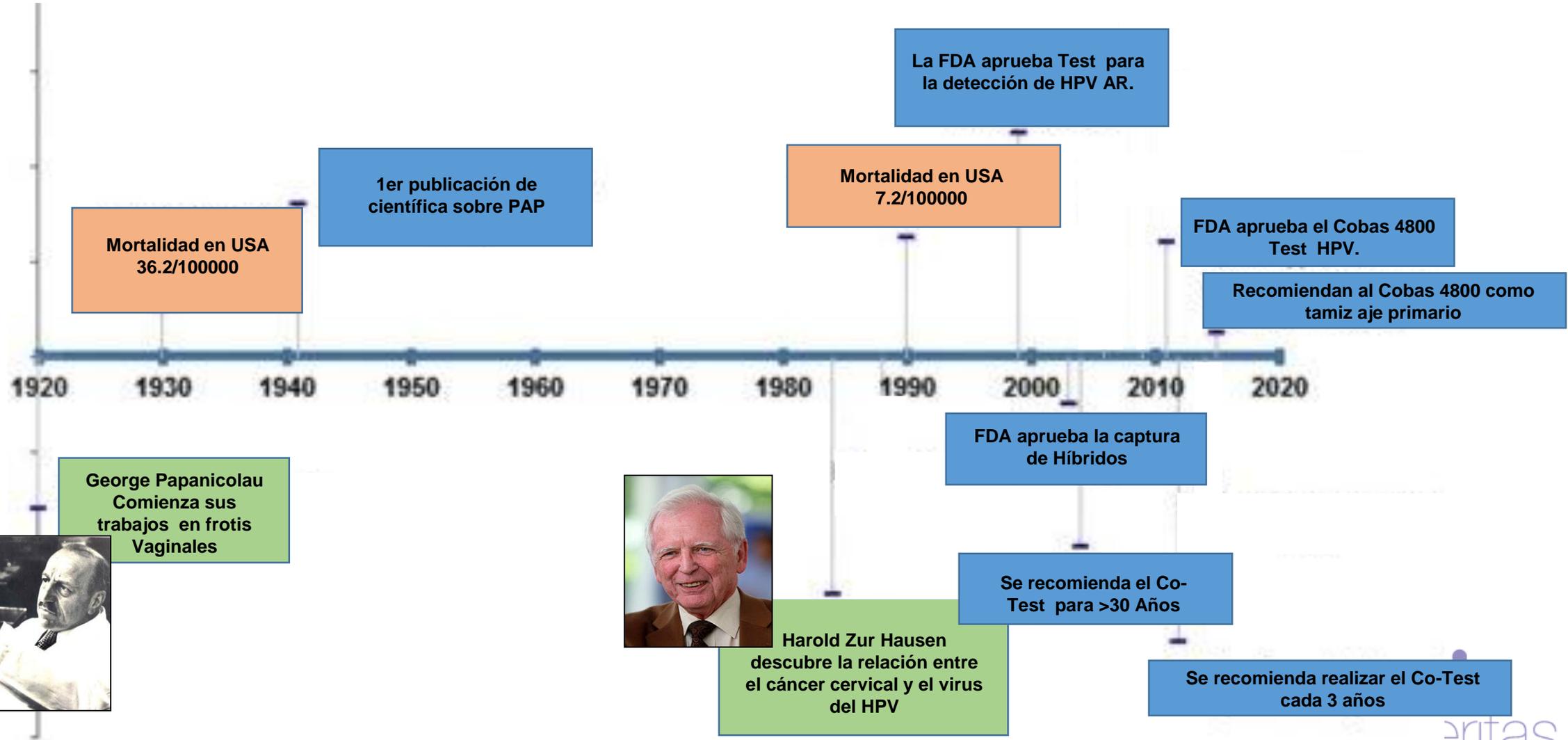
- ✓ HPV de alto riesgo: **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.**
- ✓ **HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35** presentes en el **95%** de los carcinomas de células escamosas.

Infección por HPV

- Existe una asociación de más del 99% entre el **HPV de alto riesgo y el CCU**.
- El **70-80% de las mujeres sexualmente activas**, pueden adquirir la infección por HPV a lo largo de su vida
- Un bajo porcentaje (**5%**) de las infecciones por HPV causan cáncer cervical
- Primeras etapas del CCU se puede tratar fácilmente (**99,7% de éxito**).



Detección del CCU



Test HPV COBAS 4800

Canal 1

- 31 33
- 35 39
- 45 51
- 52 56
- 58 59
- 66 68

Detección de 12 genotipos de HPV en un pool

Canal 2

16

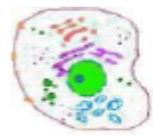
Detecta HPV16

Canal 3

18

Detecta HPV18

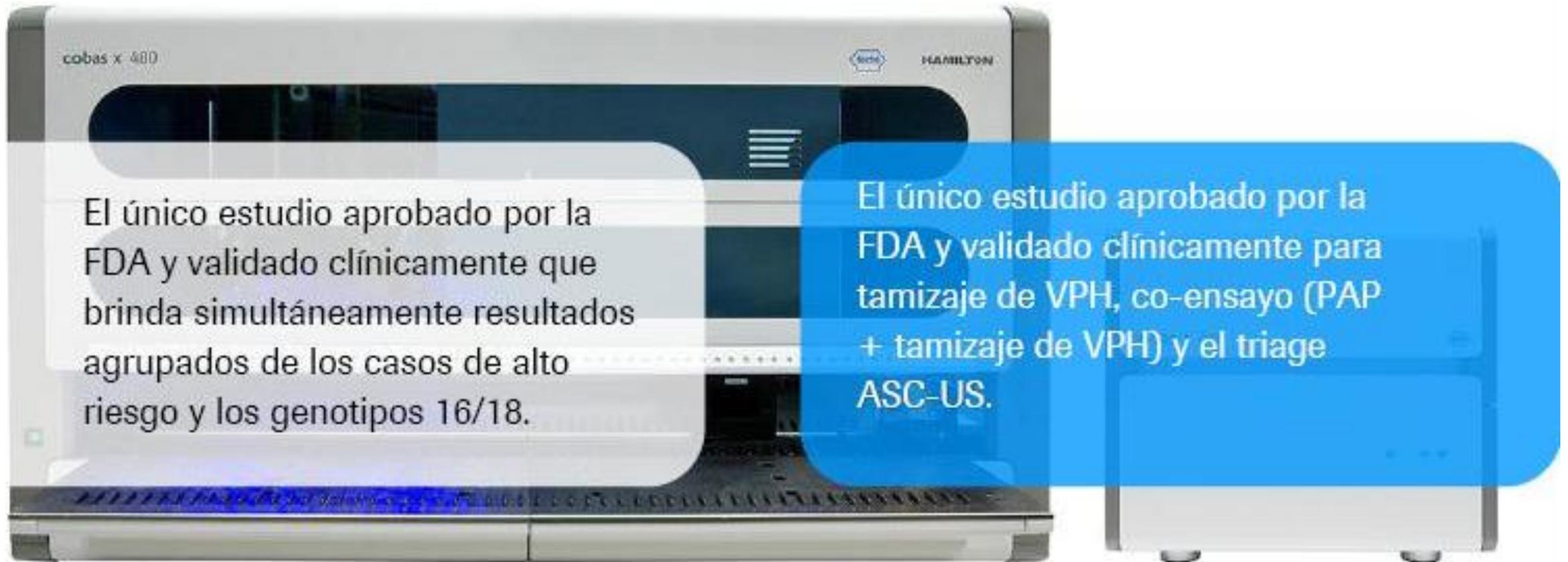
Canal 4



Detecta betaglobina (control interno monitorea que la muestra sea adecuada)



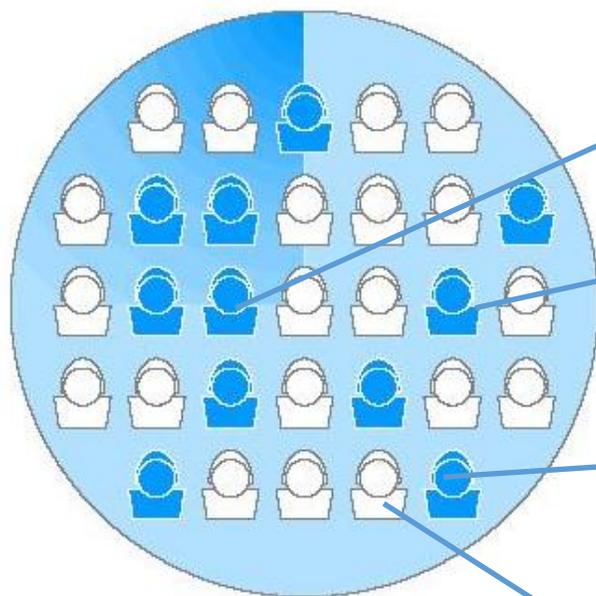
Test HPV COBAS 4800



El único estudio aprobado por la FDA y validado clínicamente que brinda simultáneamente resultados agrupados de los casos de alto riesgo y los genotipos 16/18.

El único estudio aprobado por la FDA y validado clínicamente para tamizaje de VPH, co-ensayo (PAP + tamizaje de VPH) y el triage ASC-US.

Riesgo de desarrollar CIN3+ en 3 años



1 en 4



1 en 9



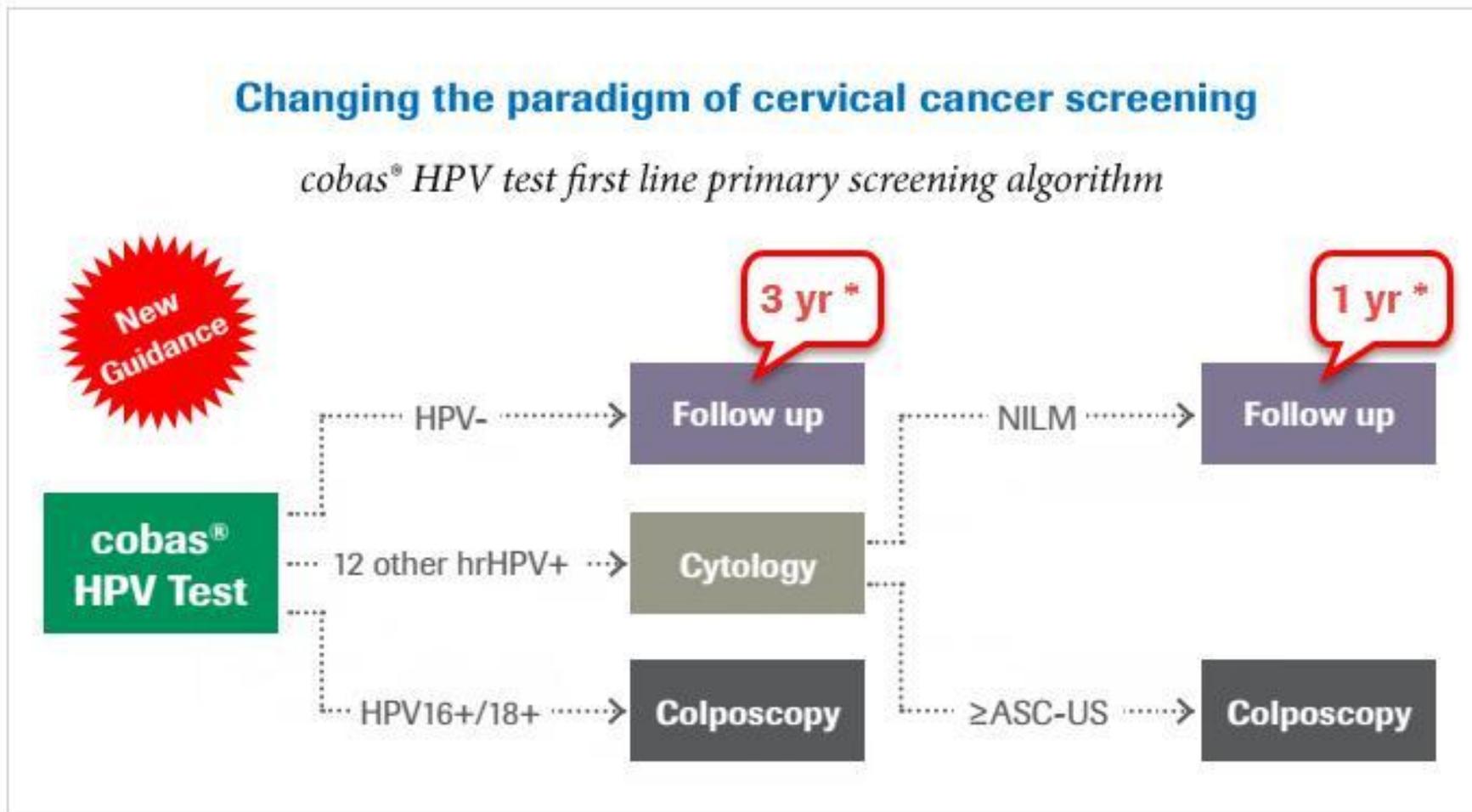
1 en 19

HPV -

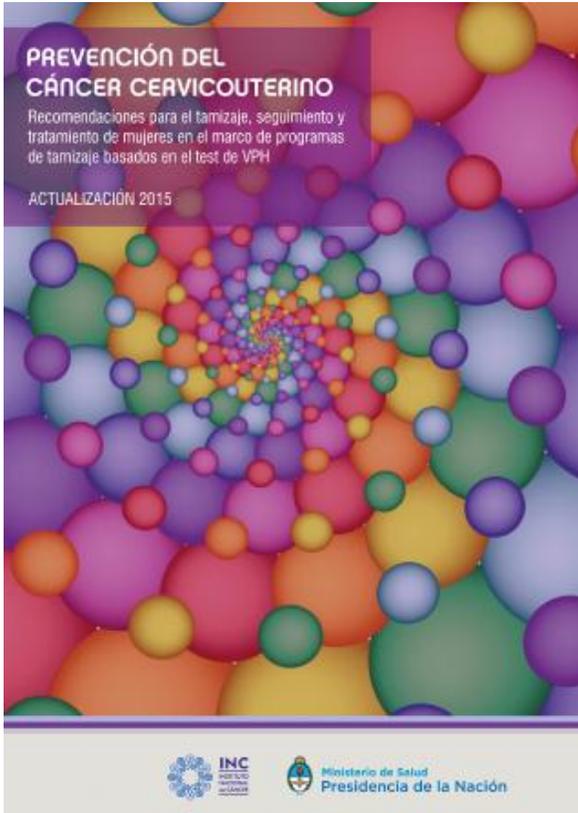
Test HPV para Screening

- **Permite una prevención personalizada y más efectiva del cáncer cervical invasivo.**
- **Permite la detección de lesiones clínicamente relevantes, facilitando el tratamiento pre-cáncer invasivo .**
- **Provee intervalos extendidos de retesteo.**

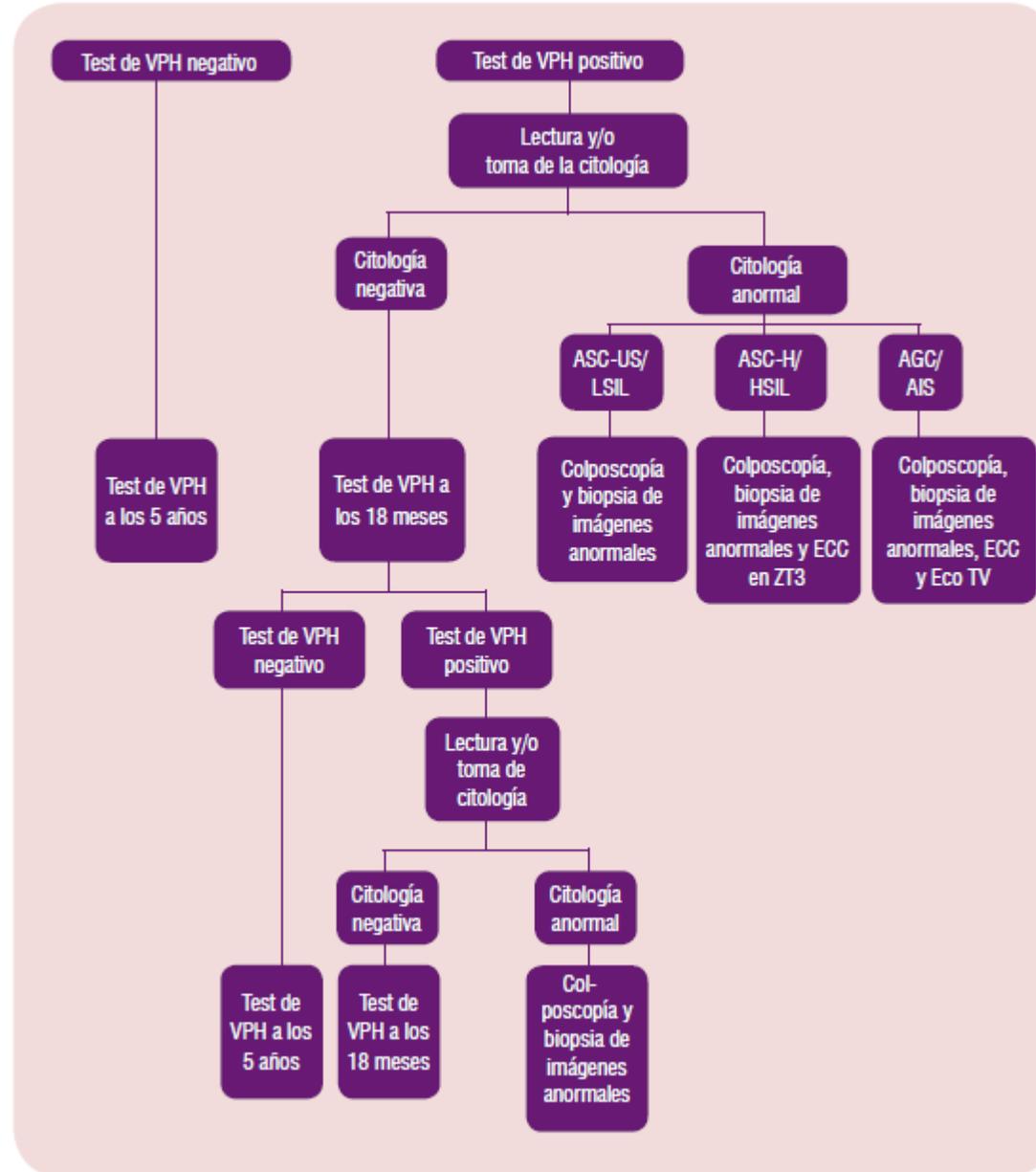
Nuevo paradigma para el screening de CCU



*ASSCP and SGO Interim Clinical Guidance 2015



I. TAMIZAJE DE MUJERES DE 30 y MÁS AÑOS Y POSTERIOR SEGUIMIENTO/MANEJO DE LOS CASOS POSITIVOS CON CITOLOGÍA



- ✓ 2011 a 2014 Se duplicó la capacidad de detección de lesiones precancerosas y cáncer.

GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON
**SEXUALLY TRANSMITTED
INFECTIONS 2016–2021**

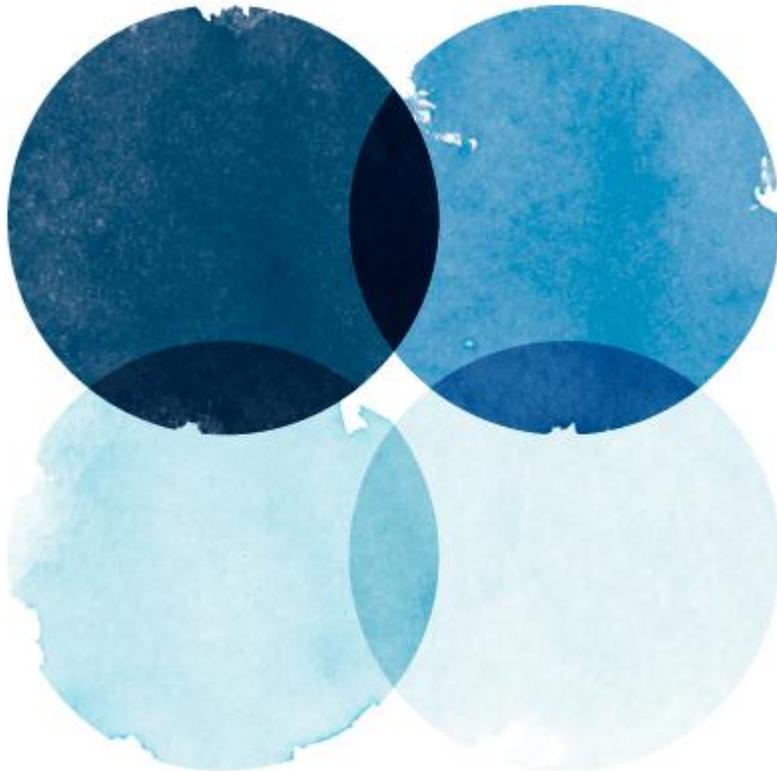
TOWARDS ENDING STIs

GOAL

Ending sexually transmitted infection epidemics as major public health concerns.

2030 TARGETS

90% reduction of *T. pallidum* incidence globally (2018 global baseline).
90% reduction in *N. gonorrhoea* incidence globally (2018 global baseline).
≤ 50 cases of congenital syphilis per 100 000 live births in 80% of countries
Sustain 90% national coverage and at least 80% in every district (or equivalent administrative unit) in countries with the human papillomavirus vaccine in their national immunization programme.



¡Muchas Gracias!