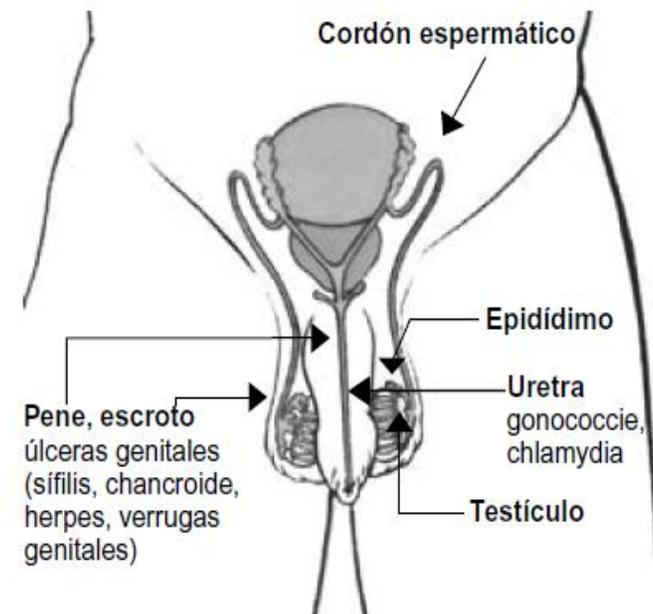
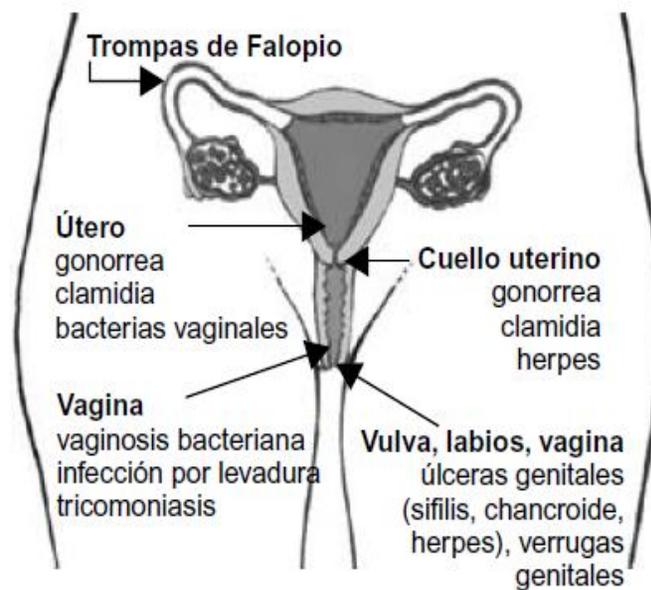


Diagnóstico Molecular en Infecciones del Tracto Genital Inferior

Dra. Mariela Sciara
Especialista Biología Molecular
Laboratorio Cibic

INFECCIONES TRACTO GENITAL INFERIOR

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



INFECCIONES TRACTO GENITAL INFERIOR

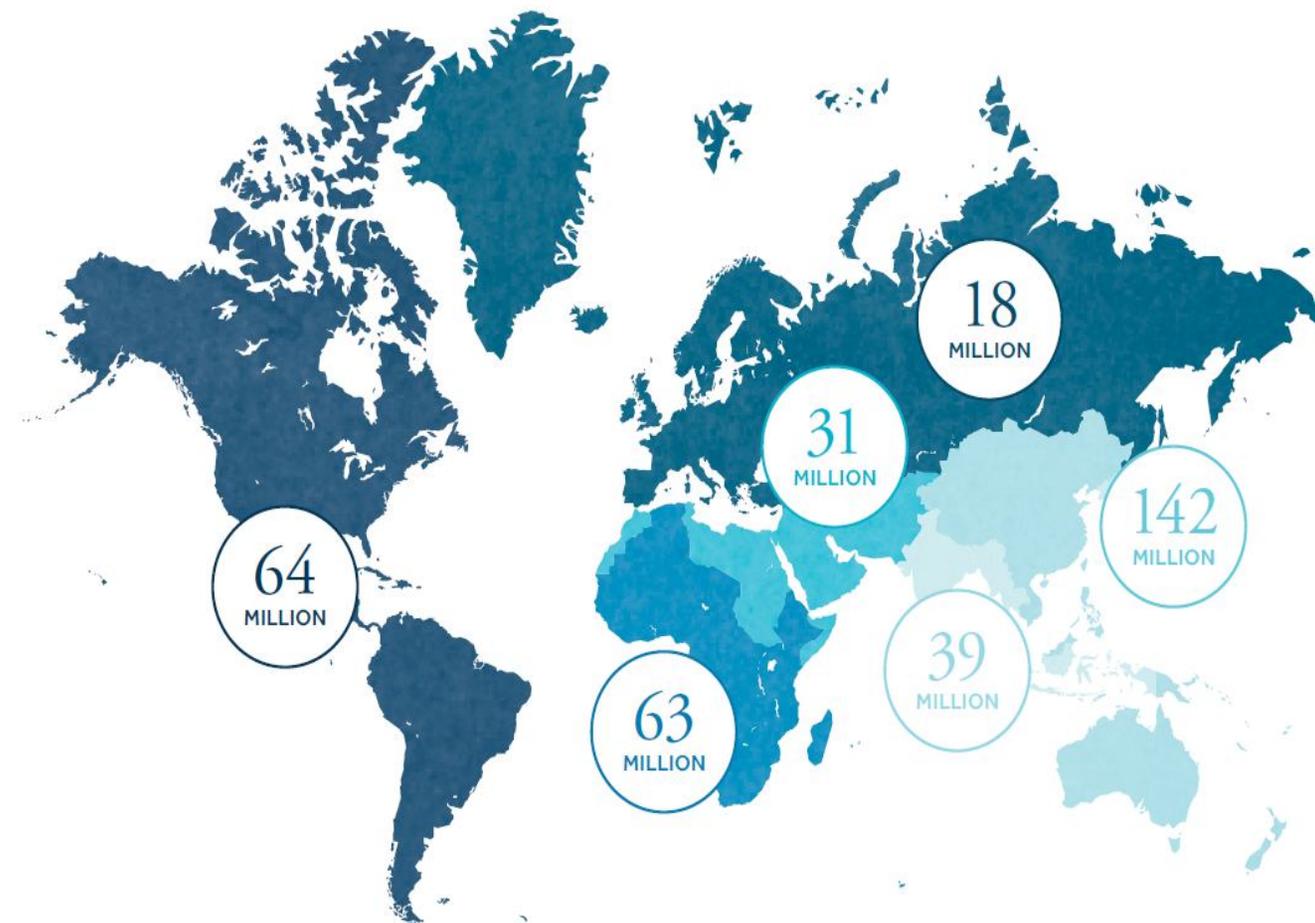
	Origen	Propagación	Ejemplos
Infecciones de transmisión sexual	Parejas sexuales infectadas	Contacto sexual con pareja infectada	Gonorrea, clamidia, sífilis, chancroide, tricomoniasis, herpes genital, verrugas genitales, VIH
Infecciones endógenas	Microorganismos habituales en la vagina	Generalmente no 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 (en embarazo, parto, post parto, 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

- >30 virus, bacterias y parásitos
- Enfermedades de mayor incidencia:

SIFILIS	curables
GONORREA	
CLAMIDIOSIS	
TRICOMONIASIS	
HVB	
HSV	
HIV	
HPV	

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL



INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

2016

376 millones de infecciones – más de 1 millón / día

- *Trichomonas vaginalis* 156 millones
- *Chlamydia trachomatis* 127 millones
- *Neisseria gonorrhoeae* 87 millones
- *Treponema pallidum* 6 millones
- **HSV-2** 417 millones
- **HPV** 291 millones

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

- Se propagan predominantemente por contacto sexual.
- Pueden transmitirse de forma vertical durante el parto o por hemoderivados.
- Problema de salud pública global.
- Mayoritariamente asintomática, alta morbilidad asociada.
- Algunas ETS como HSV-2 y sífilis pueden aumentar el riesgo de infección por HIV.
- 2016: > 988000 embarazadas contrajeron sífilis → > 200000 muertes fetales o de recién nacido.

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

- **Consecuencias graves para la salud sexual y reproductiva:**
 - ✓ **Infertilidad**
 - ✓ **Transmisión materno-infantil**
 - ✓ **Cancer Cervical** - infección por HPV: 530000 casos de CCU y 264000 muertes por CCU/año
- **Consecuencias físicas, psicológicas y sociales** de las ITS comprometen la calidad de vida de aquellos infectados.

INFECCIONES TRANSMISION SEXUAL

<i>Chlamydia trachomatis</i>	INFECCION CHLAM YDIAL
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar L1-L3)	LINFOGRANULOMA VENEREO
<i>Neisseria gonorrhoeae</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

- ✓ Clínica similar (leucorrea, secreción uretral, úlcera, prurito) → diagnóstico diferencial difícil



MÉTODOS DIRECTOS

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

MÉTODOS INDIRECTOS

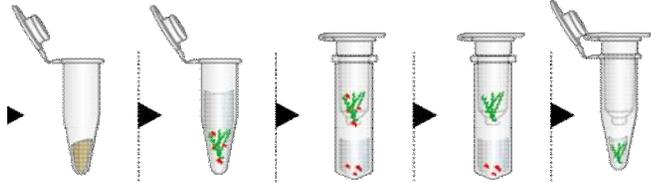
- ✓ Serología

Detección de Ácidos Nucleicos

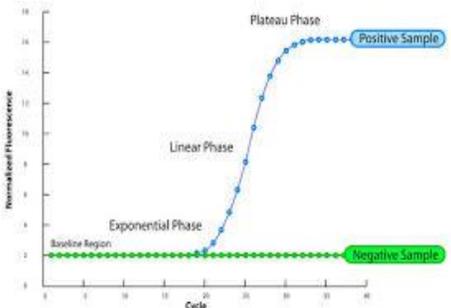
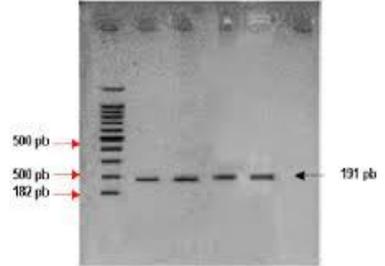
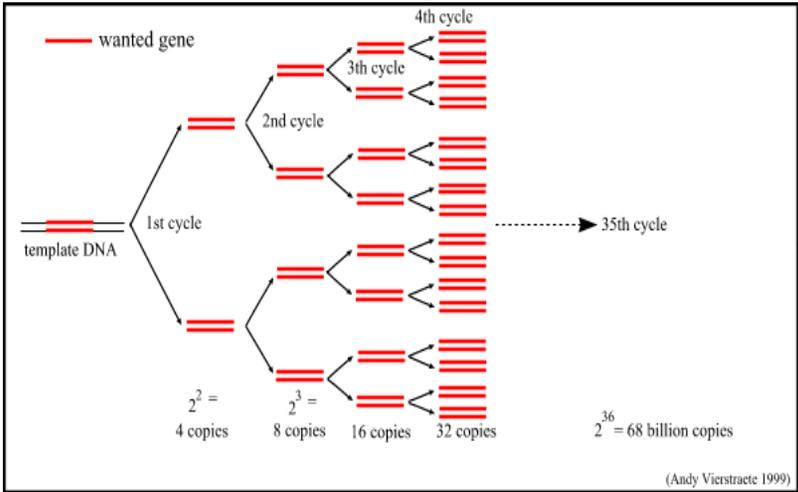
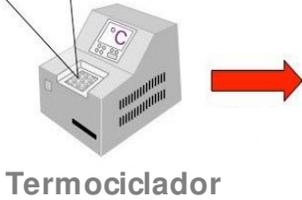
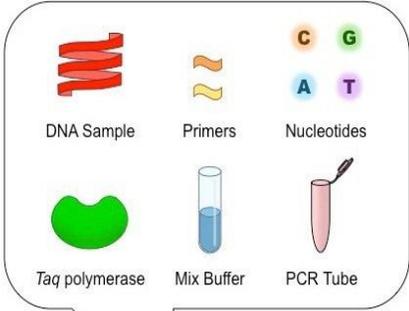
OBTENCION Y CONSERVACION DE LA MUESTRA

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



✓ VENTAJA

- 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

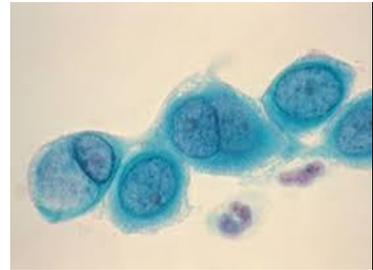
- Pueden producir resultados falsos positivos o negativos.
- Costo elevado.
- Pueden existir inhibidores de la PCR o contaminaciones.
- Tienen requerimientos de validación y control de calidad.

- ***Chlamydia trachomatis***
- ***Neisseria gonorrhoeae***
- ***Trichomonas vaginalis***
- ***Treponema pallidum***
- **HPV**

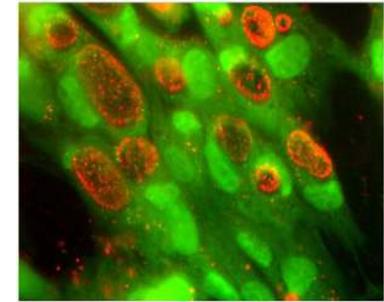
Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis

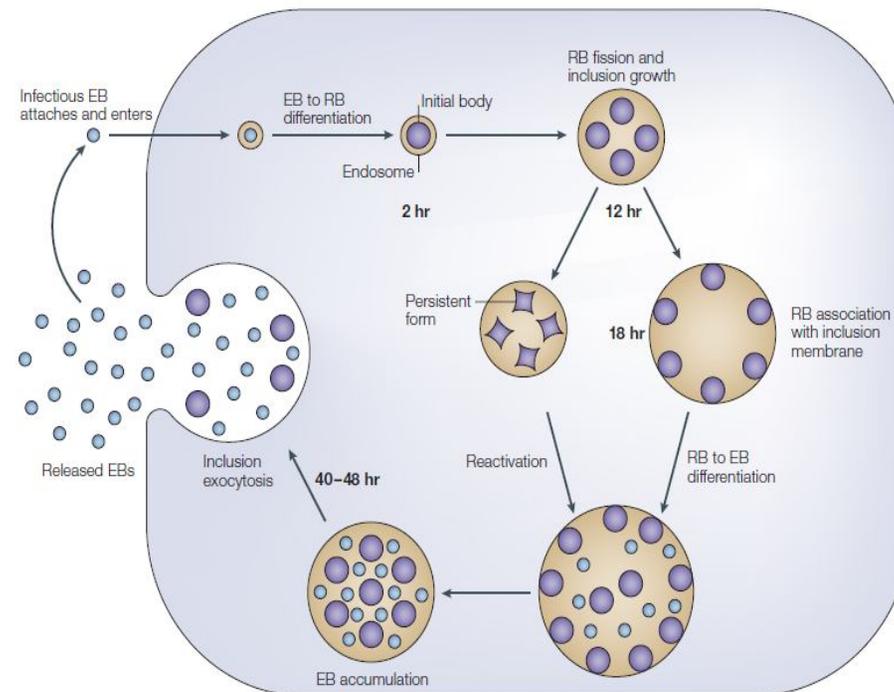
- Patógeno bacteriano transmitido sexualmente de mayor prevalencia a nivel mundial (OMS):
 - prevalencia global de la infección: 4,4 a 6,6%
 - prevalencia en América Latina: 6 a 40%
- Mayor prevalencia → población sexualmente activa de 14 a 25 años (CDC).
- Se ha demostrado que la presencia de este agente 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 (A, B/ Ba, C)

LINFOGRANULOMA VENEREO (L1, L2/ L2a, L3)

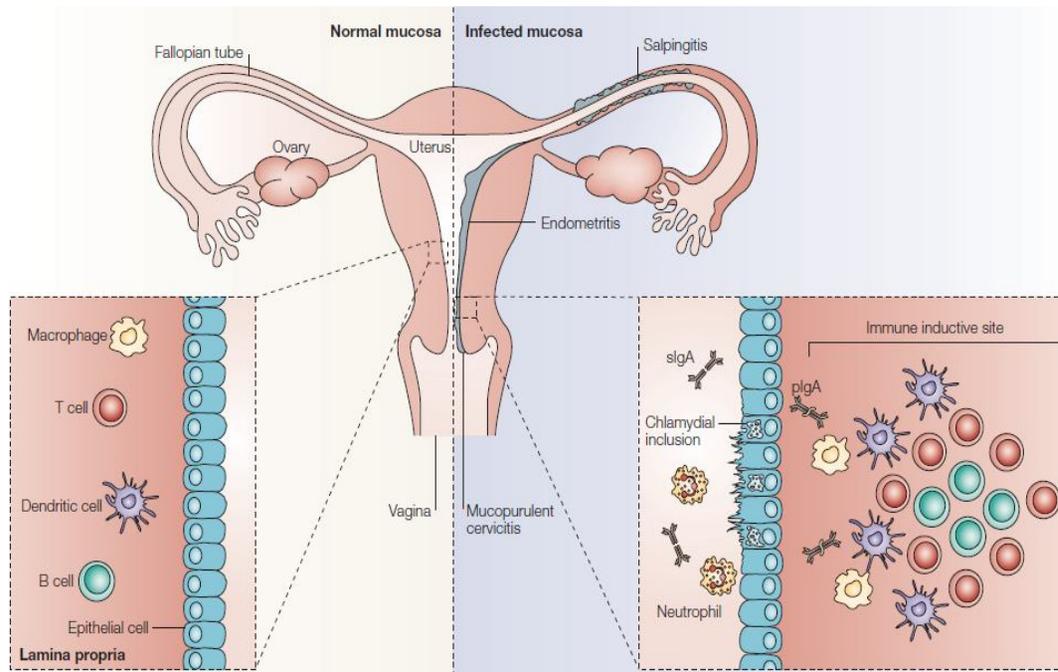
ENFERMEDAD OCULO-GENITAL NO INVASIVA (D/ Da, E, F, G/ Ga, H, I/ Ia, J, K)

Chlamydia trachomatis

ENFERMEDAD OCULO-GENITAL NO INVASIVA (D/ Da, E, F, G/ Ga, H, I/ Ia, J, K)



- epitelio columnar del endocérvix de las mujeres
- epitelio urogenital de los hombres



Chlamydia trachomatis

- Infecciones a menudo asintomáticas, de difícil prevención.
- No siempre desencadenan respuesta inmune efectiva → infecciones de larga evolución y complicaciones crónicas.
- Principales factores de riesgo:
 - ✓ Edad <25 años
 - ✓ Conductas sexuales de riesgo (relaciones desprotegidas, múltiples parejas sexuales)
- Puede producir infecciones oculares o pulmonares en recién nacidos.

Chlamydia trachomatis

mujer

75% de las infecciones son asintomáticas → incidencia real subestimada.

Infección no tratada: enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, cervicitis crónica y uretritis.

Secreción vaginal, edema, cervicitis, dolor abdominal.

Complicaciones: infertilidad, embarazo ectópico o infecciones puerperales entre otras.

Conjuntivitis y neumonía en recién nacidos

hombre

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.

Diagnóstico

SIGNOS CLINICOS

CULTIVO en líneas celulares

INM UNOFLUORESCENCIA DIRECTA

INM UNOCROM ATOGRAFIA

PCR

- ✓ Complejo
- ✓ Baja sensibilidad
- ✓ Baja sensibilidad
- ✓ alta sensibilidad y especificidad
- ✓ rápido
- ✓ no dependiente de la viabilidad



Chlamydia trachomatis

Infección asintomática → difícil detección

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

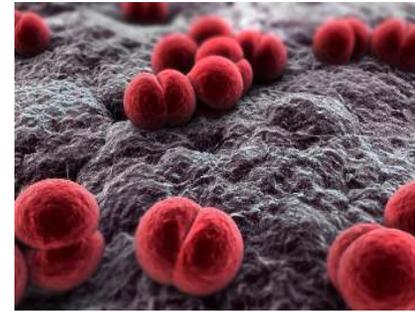
Nuevo screening 3 meses post tratamiento

DETECCION DE ACIDOS NUCLEICOS COMO METODO DIAGNOSTICO

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria gonorrhoeae

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



Neisseria gonorrhoeae

mujer

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*.

hombre

10% de las infecciones uretrales son asintomáticas.

Causa más común de uretritis y menos frecuentemente epididimitis o infección diseminada.

Diagnóstico

SIGNOS CLINICOS

EXAM EN MICROSCOPICO DIRECTO

CULTIVO

PCR

- ✓ visualización de diplococos Gram -
- ✓ dependiente del operador

- ✓ alta sensibilidad
- ✓ depende de la viabilidad del microorganismo

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



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 (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 haya 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 Cíbic. Rosario, Argentina



- 195 muestras (flujo vaginal, exudado uretral, semen y orina): Test Cobas 4800 CT/ NG .
- Solicitud médica: solo 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

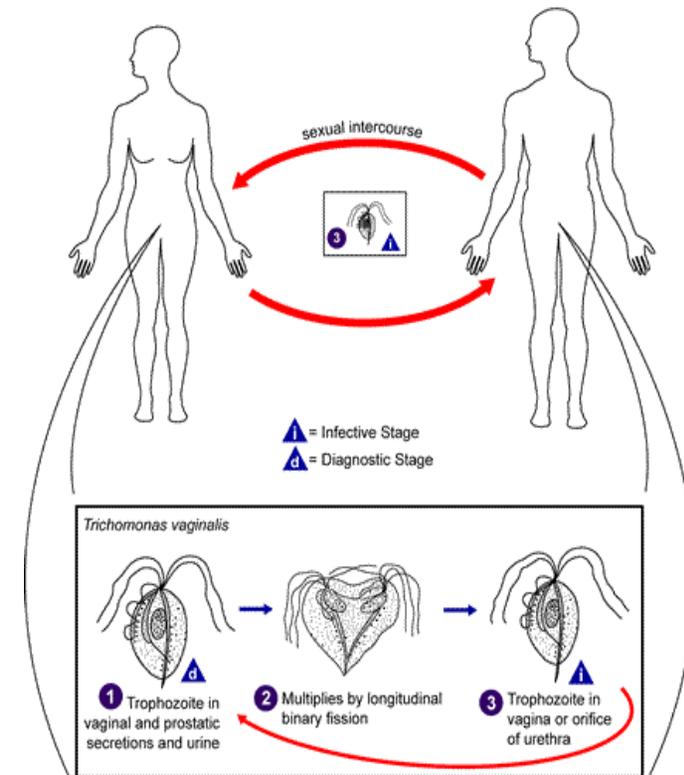
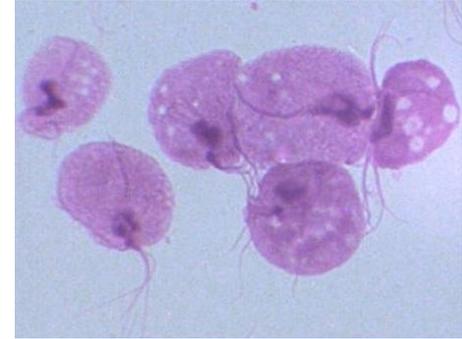
Tabla 2. Resultados del estudio microbiológico en las muestras NG+ por test cobas 4800.

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

Trichomonas vaginalis

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



Trichomonas vaginalis

mujer

80% asintomáticas

Infección y síntomas puede persistir por años.

Vulvovaginitis, prurito y leucorrea maloliente, eritema vulvar, cérvix en fresa , dolor pélvico, cistitis.

Infección del neonato intra-canal de parto.

M ayor riesgo de parto pre-término

M ayor riesgo de contagio por HIV

Asociada a infección por HPV

hombre

Síntomas mas leves

Infección puede desaparecer en semanas

Uretritis no gonocócica, asintomática

Diagnóstico

SIGNOS CLINICOS

- ✓ pH vaginal >4,5
- ✓ leucorrea claramente espumosa

EXAM EN MICROSCOPICO DIRECTO

- ✓ visualización del parásito móvil
- ✓ baja sensibilidad
- ✓ dependiente del operador

CULTIVO

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

PCR

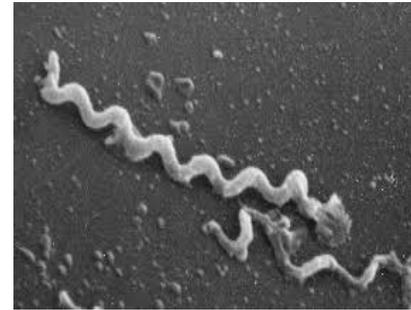
- ✓ alta sensibilidad y especificidad
- ✓ rápido
- ✓ no dependiente de la viabilidad



Treponema pallidum

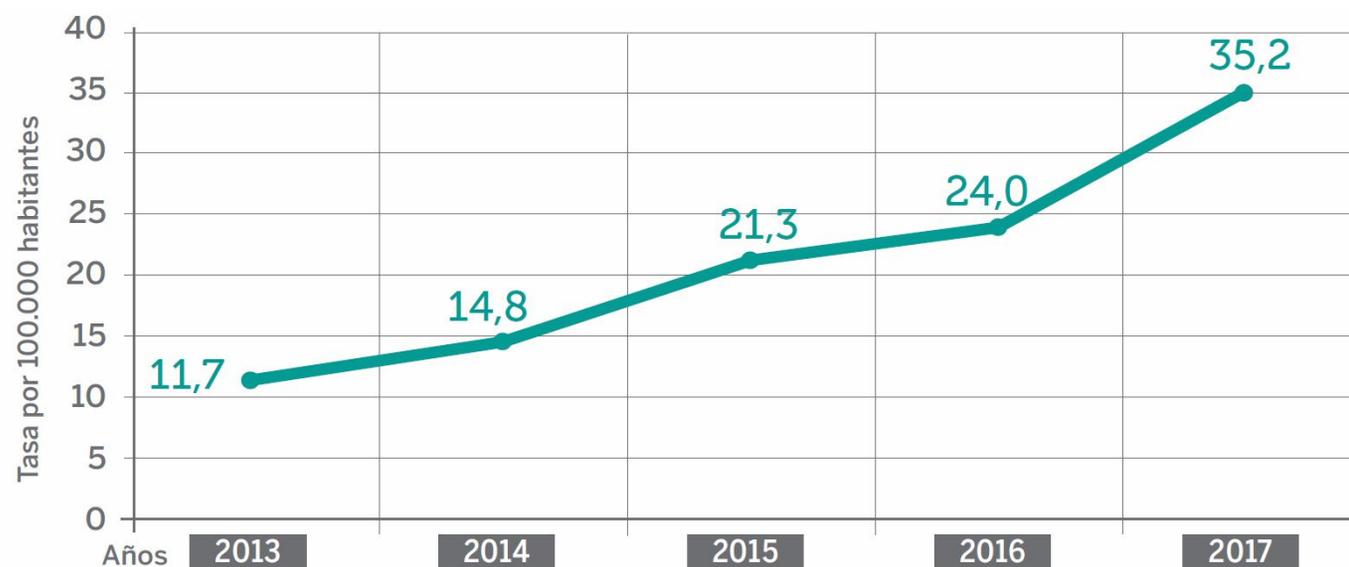
Treponema pallidum

- 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.
- Transmisión por contacto sexual, puede transmitirse por vía sanguínea y transplacentaria.
- No existen portadores sanos.
- La incidencia en la última década ha aumentado.



Treponema pallidum

- Desde 2011 al 2017 los casos en Argentina se han triplicado: 11000 casos en 2017.

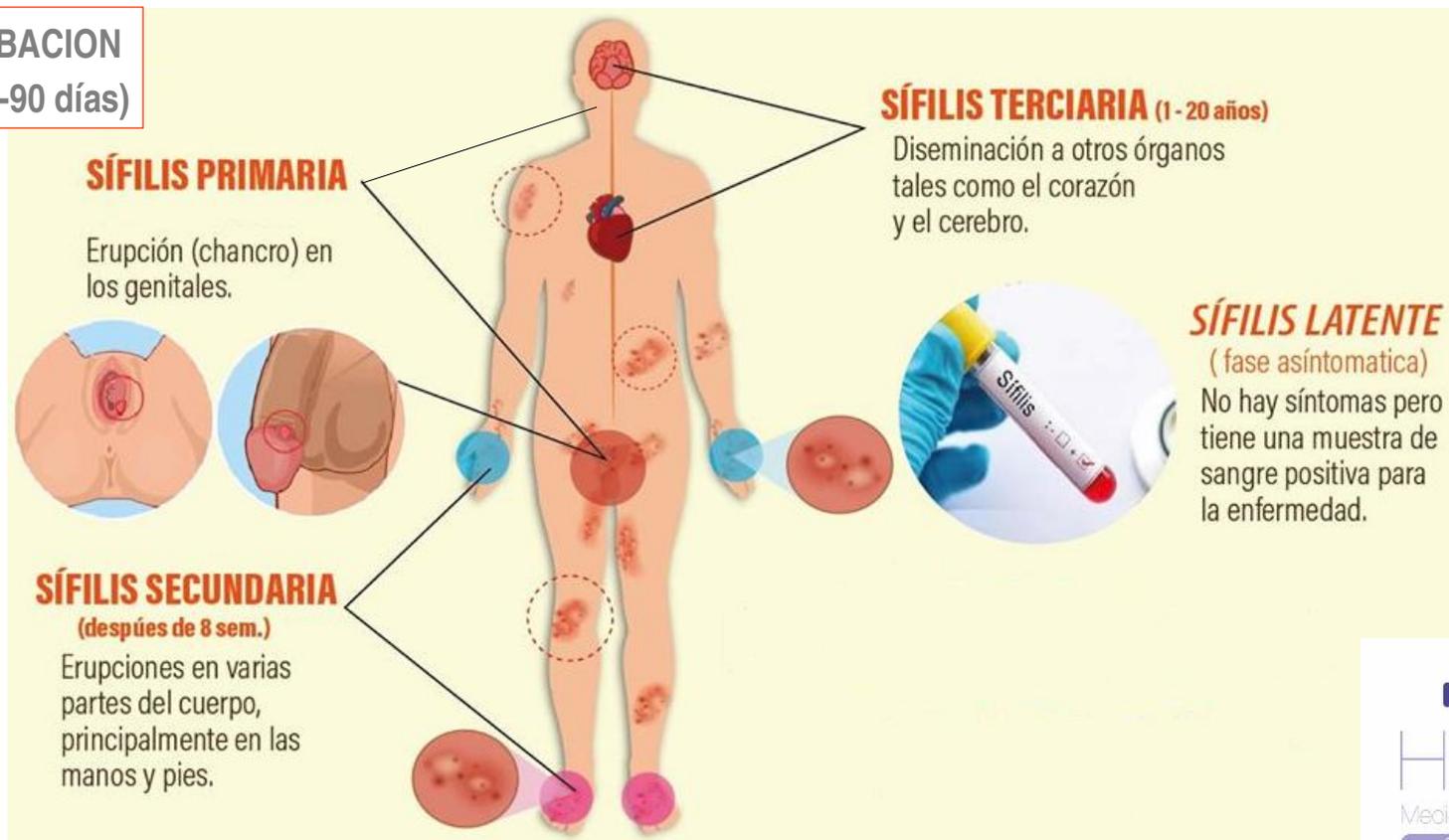


Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, módulo de vigilancia clínica (C2).

Treponema pallidum

- Infección crónica en ausencia de tratamiento.
- Gran variedad de expresiones clínicas que se suceden con ritmo cronológico:

PERIODO DE INCUBACION
promedio 20 días (3-90 días)

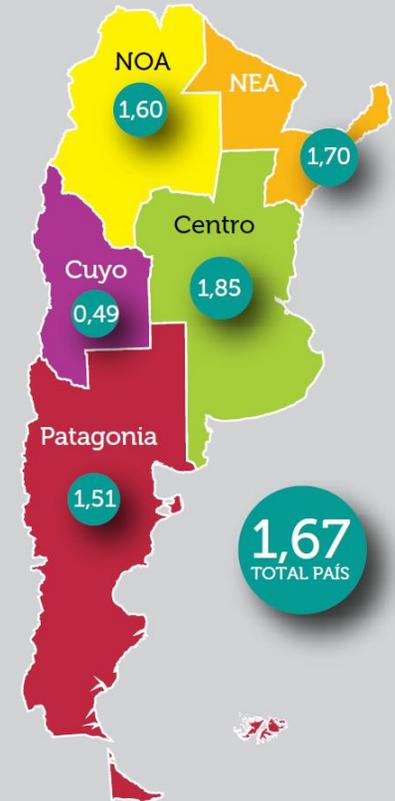


Treponema pallidum

SIFILIS CONGENITA

- Madre infectada no tratada que transfiere la infección al feto.
- 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.
- En Argentina, la prevalencia de sífilis congénita oscila entre 0,5 y 4,5 por 1.000 recién nacidos vivos.

Tasa de sífilis congénita por 1.000 nacidos vivos 2017



Fuente: Dirección de Epidemiología (SNVS-SIVILA-C2/DEIS)

Diagnóstico



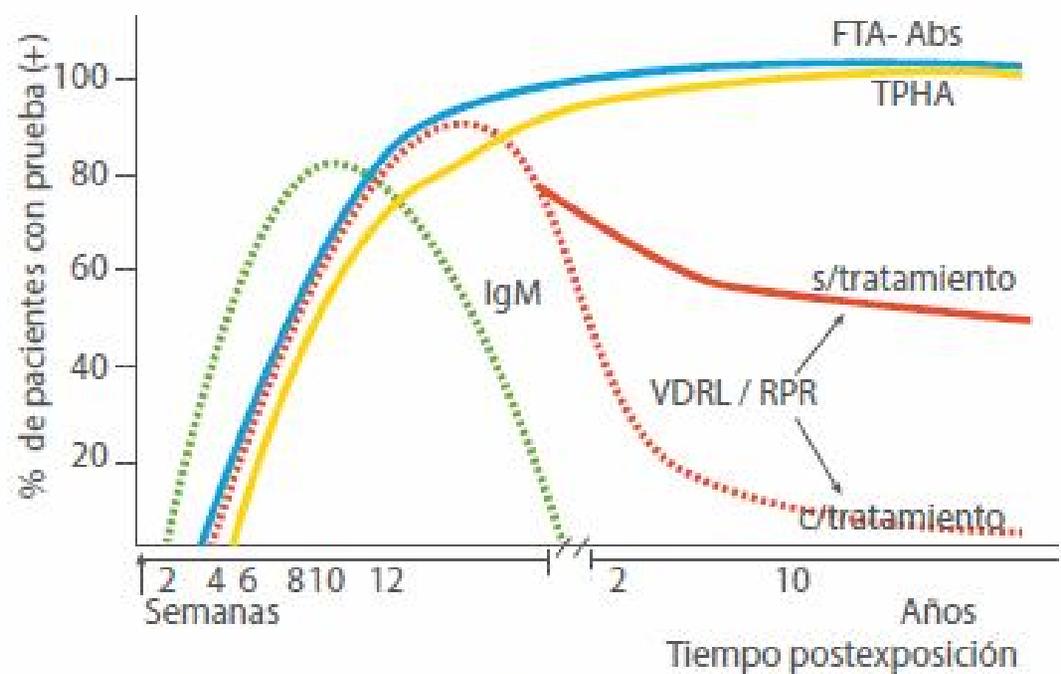
MÉTODOS DIRECTOS

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

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

- **Prueba No Treponémica o reagínicas** (anticuerpos anti-cardiolipina - screening, no específica)
 - VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory)
 - RPR** (Rapid Plasma Reagin)
 - ELISA** no treponémico
- **Prueba Treponémica** (anticuerpos treponémicos)
 - FTA-Abs** (Abs anticuerpos treponémicos fluorescentes)
 - TP- HA** (Hemaglutinación)
 - ELISA Indirecto**
 - Enzimoimmunoensayo de membrana treponémico**

Diagnóstico



Estadio clínico de sífilis	lesión primaria	lesión secundaria		latente (asintomático)	terciario
	primario	secundario			

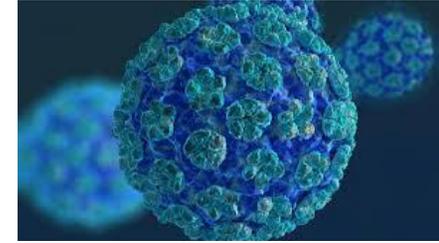


Peeling R et al. (2004) Bull World Healthy Org 82:439-46

Virus Papiloma Humano

HPV

HPV



- Virus ADN, familia *Papilomaviridae*.
- 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.

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.

3ra causa de muerte por enfermedad oncológica en mujeres

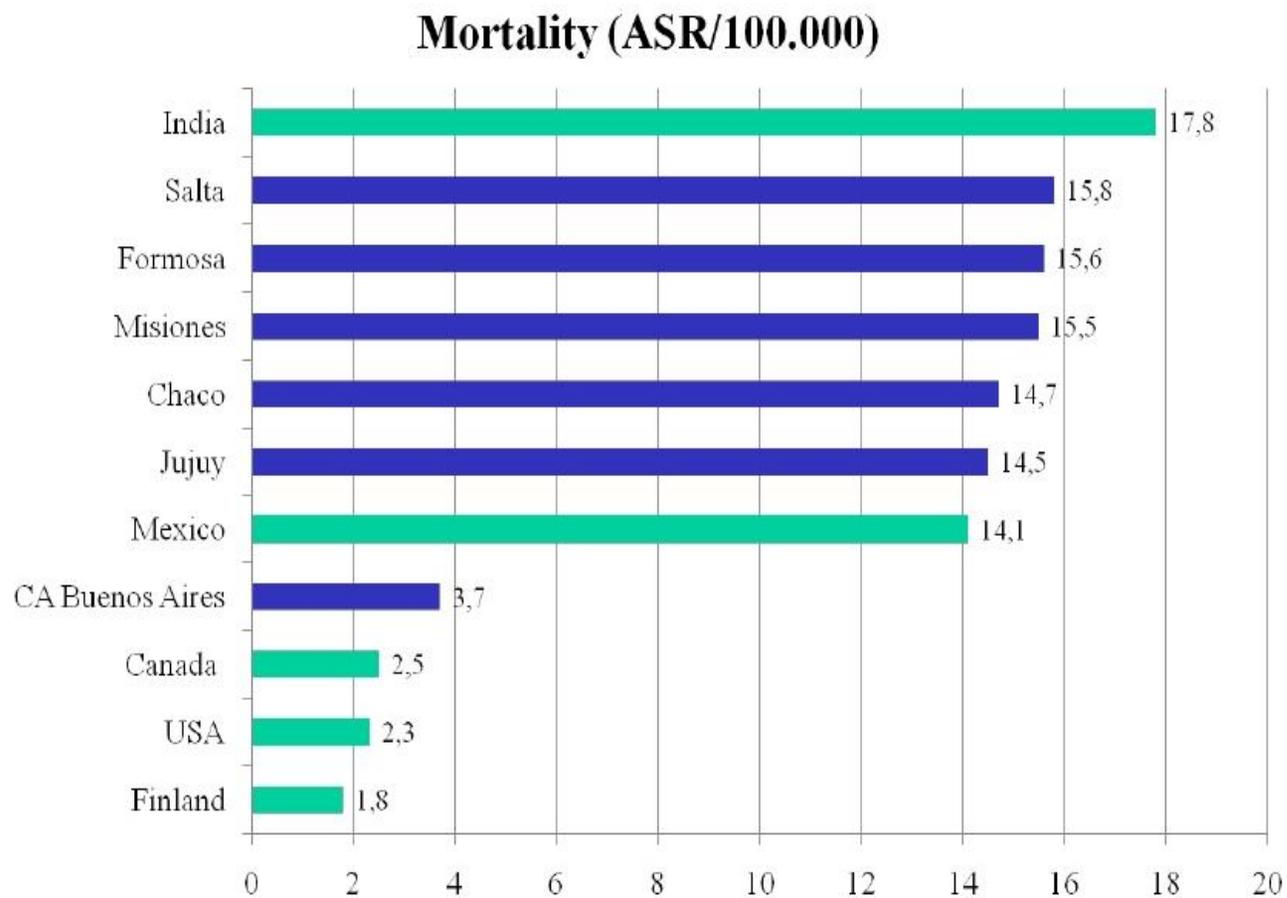


Hérítas

Medicina de precisión

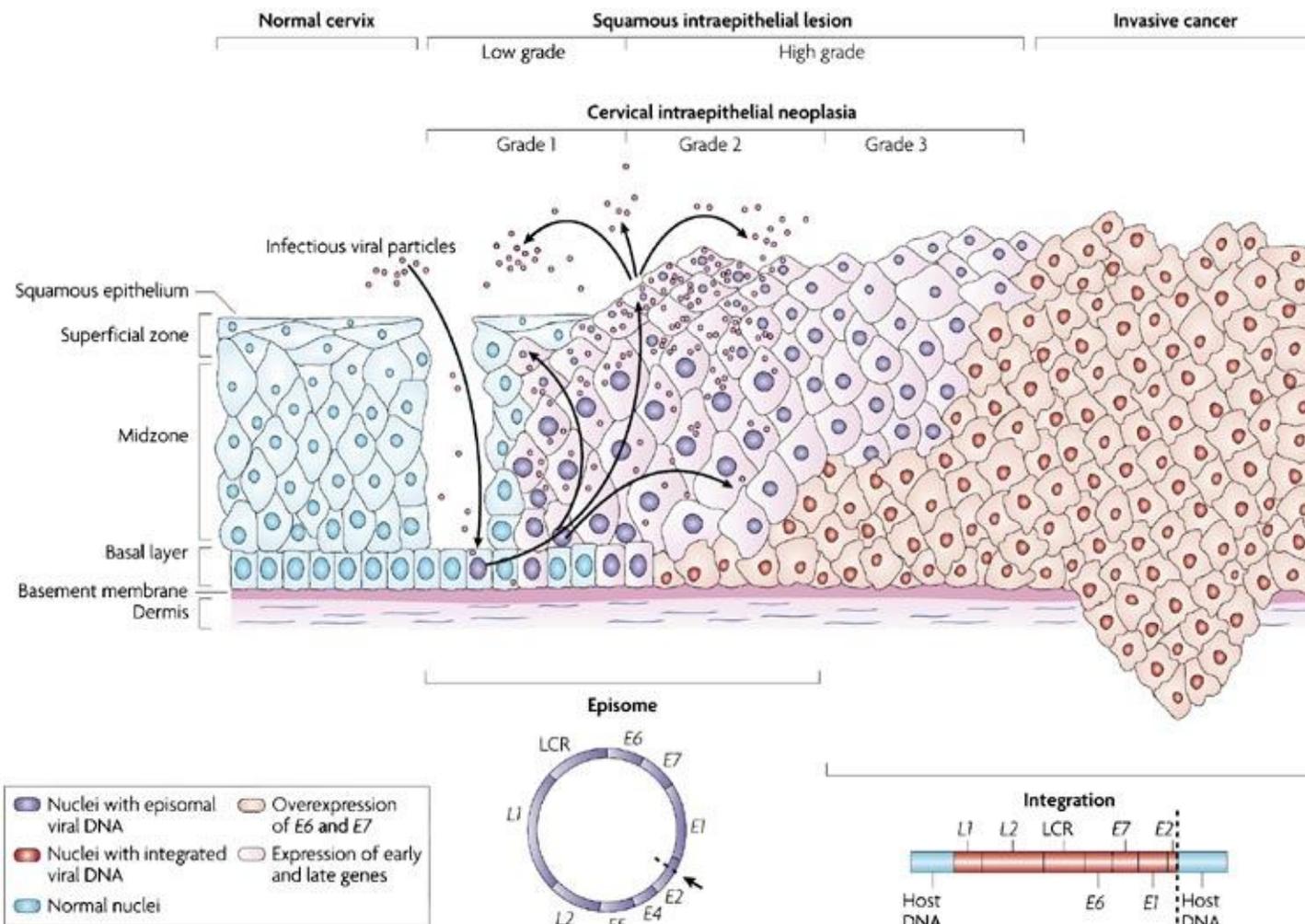
CIBIC + INDEAR

Mortalidad del CCU en Argentina



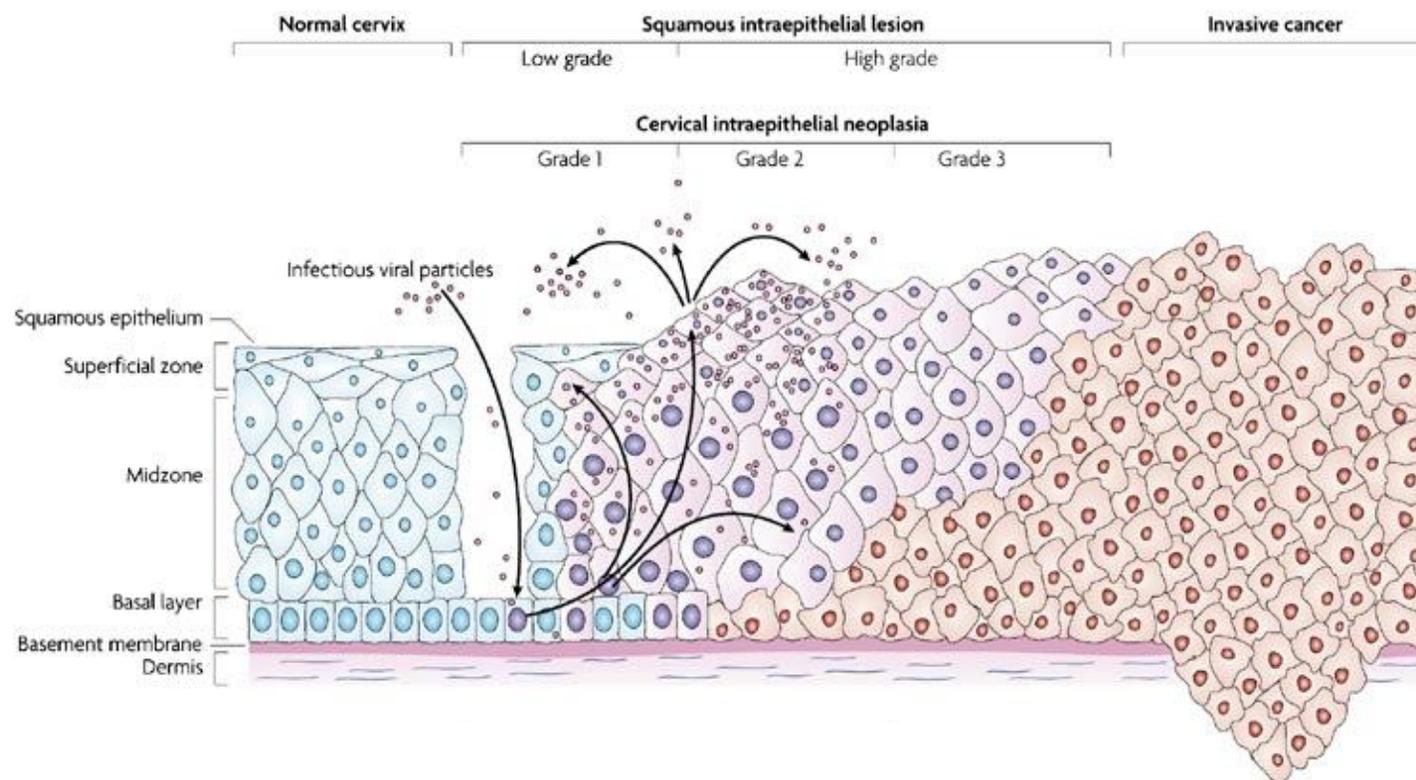
Adapted from Arrosi S. http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/pdf/pub64_ops.pdf

Infección por HPV



Nature Reviews | Cancer

Infección por HPV



Nature Reviews | Cancer

CITOLOGIA DE CUELLO DE UTERO (PAPANICOLAU)

Metodología de **screening primario** usada en las últimas décadas en Argentina

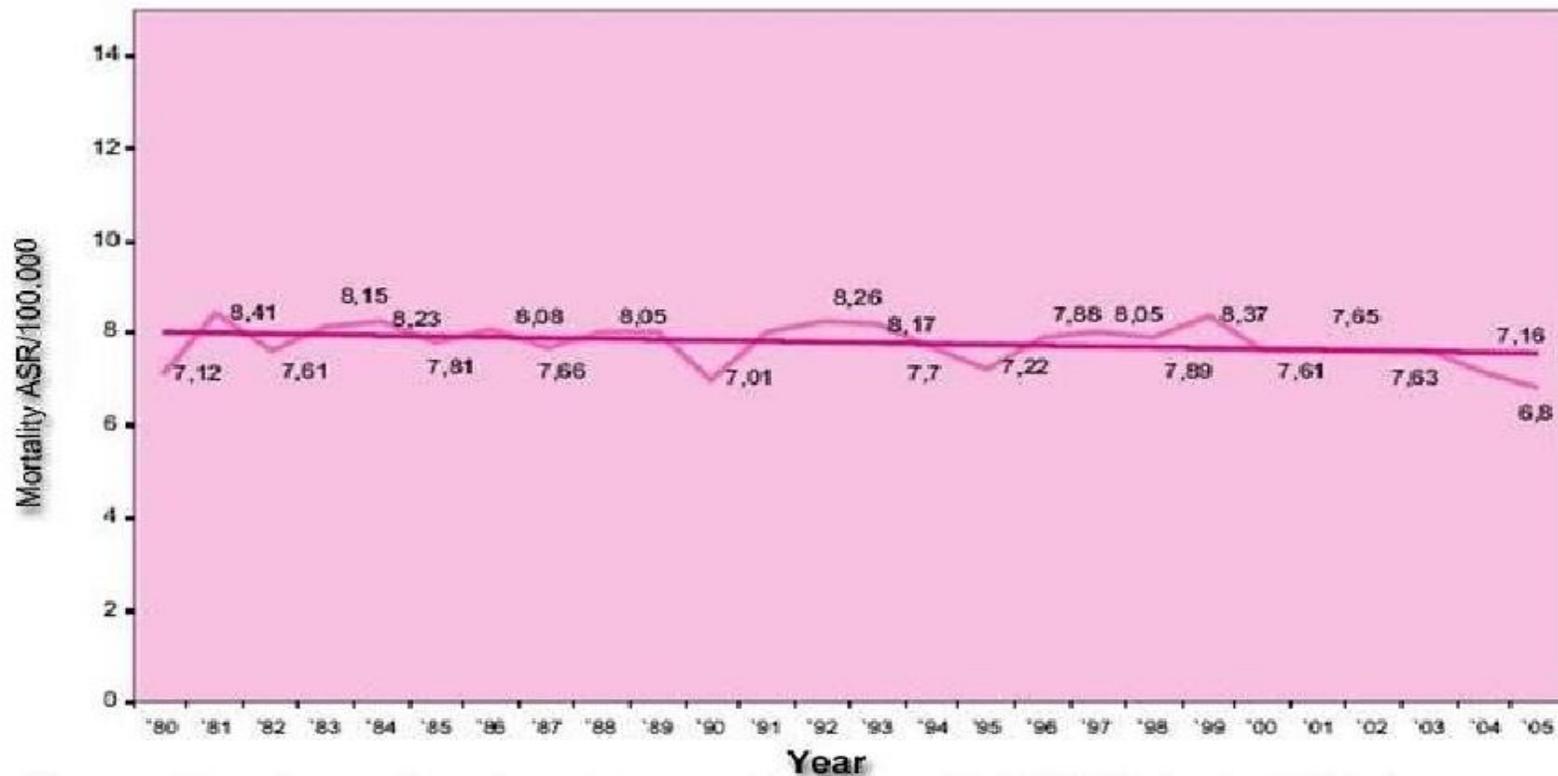
Identificar lesiones precursoras de cáncer cervical para prevenir el desarrollo del mismo.

Sensibilidad de la citología cervical es del 50% → Seguimiento frecuente para lograr buena protección

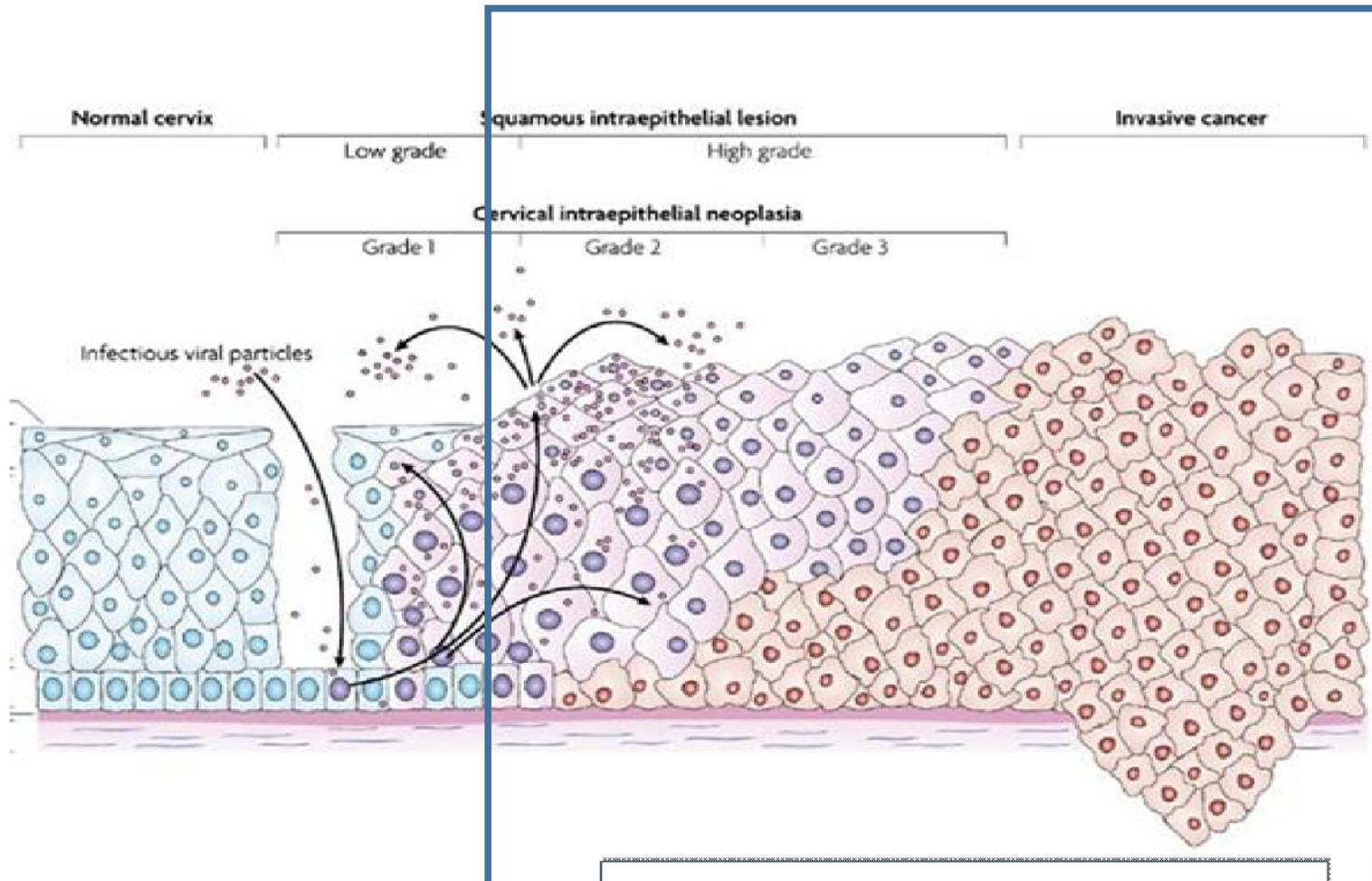
Alta variabilidad de los resultados del laboratorio

Detecta mujeres con enfermedad cervical, no mujeres en riesgo.

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

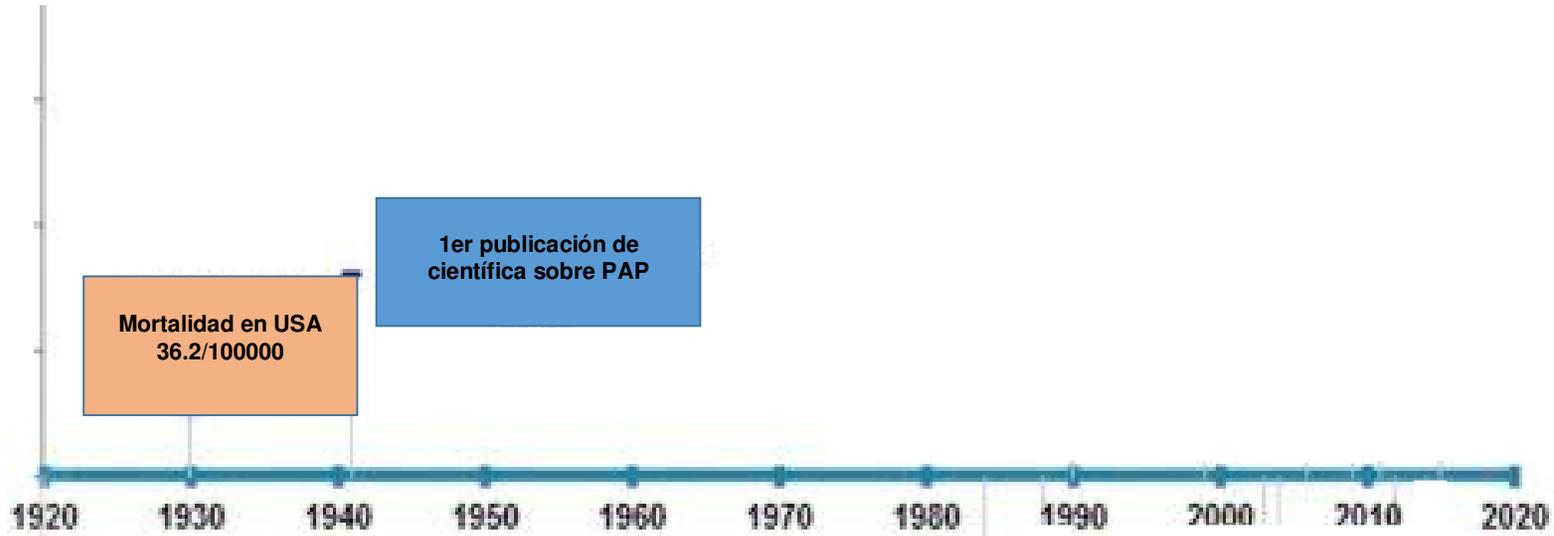


Adapted from Arrosi S. <http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/pdf/pub>



**CITOLOGIA DE CUELLO DE UTERO
(PAPANICOLAU)**

Infección por HPV y CCU



George Papanicolaou
Comienza sus
trabajos en frotis
Vaginales



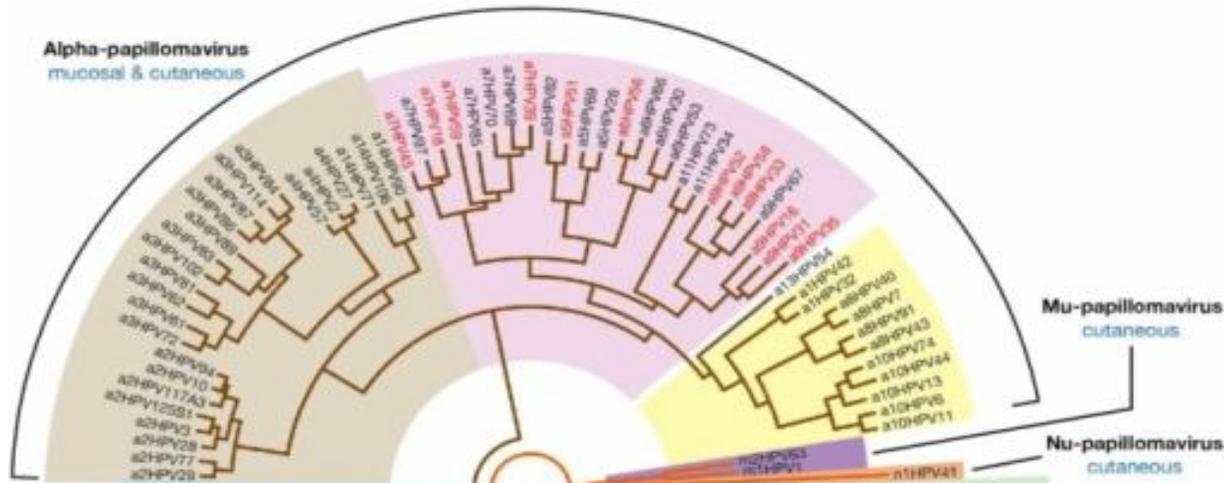
Harold Zur Hausen
descubre la relación entre
el cáncer cervical y el
virus del HPV



Genotipos de HPV

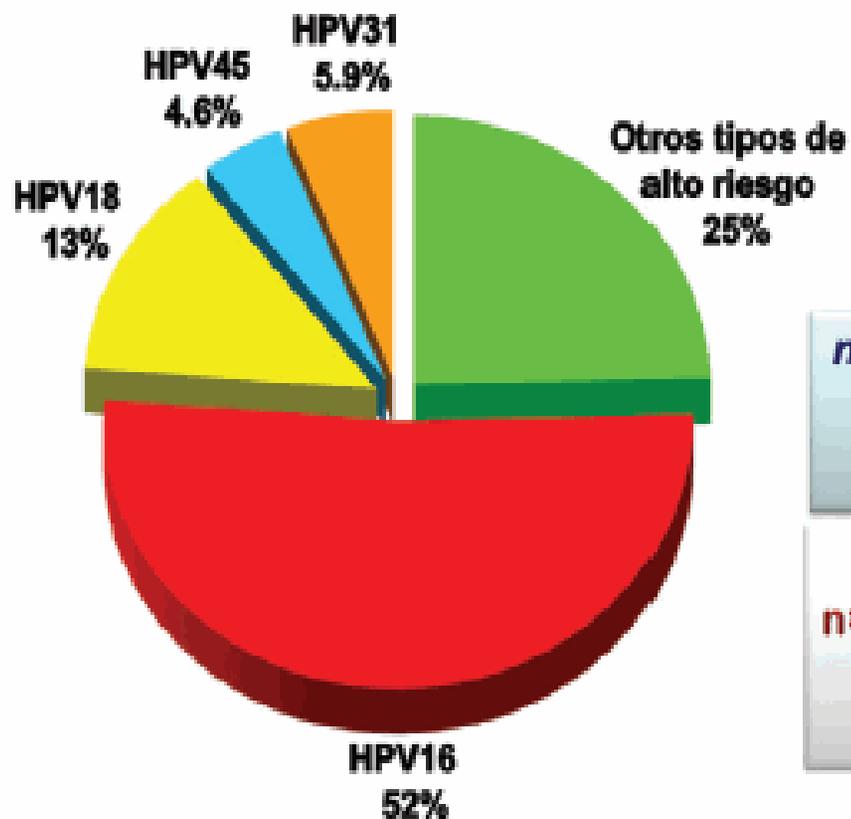
40

afectan tracto
anogenital



- ✓ HPV de **bajo riesgo** oncogénico: asociados con lesiones benignas
- ✓ HPV de **alto riesgo** oncogénico: asociados con cáncer cervical
- ✓ HPV tipo cutáneos: asociados con verrugas

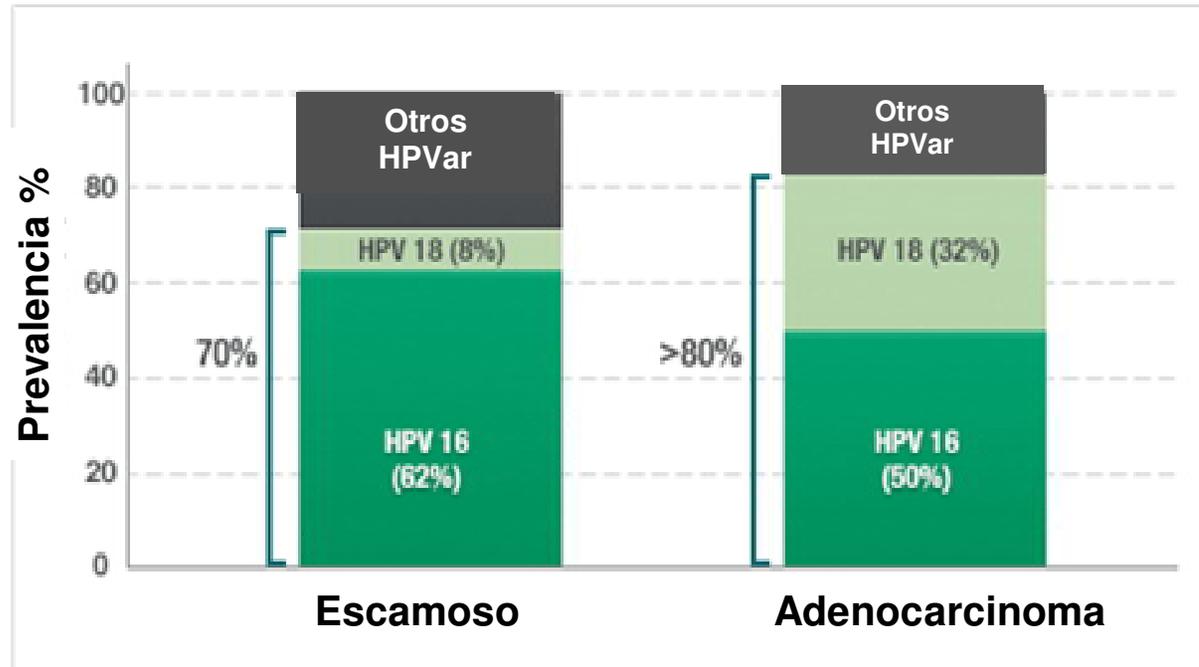
Genotipos de HPV de alto riesgo de cáncer



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



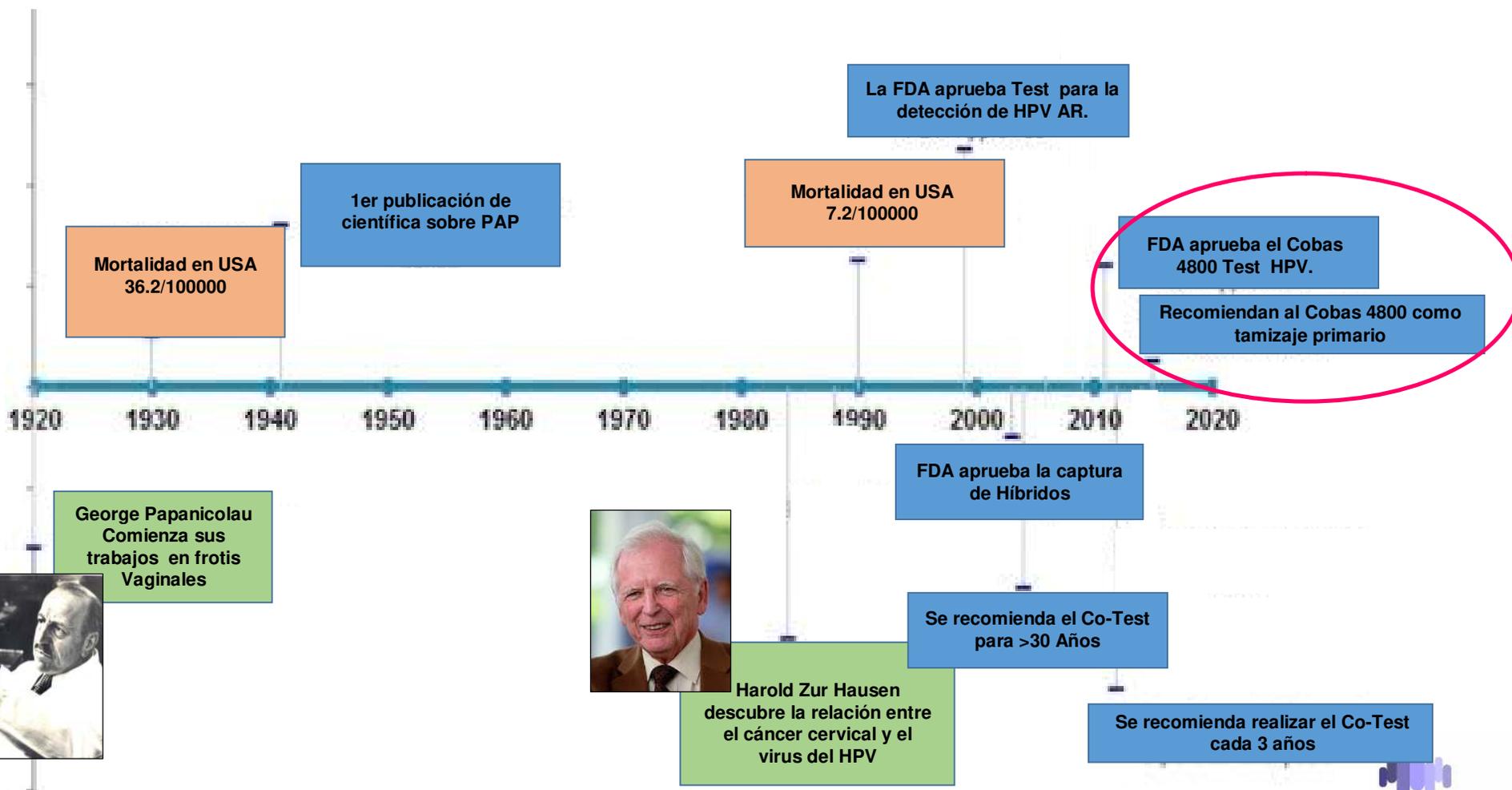
✓ HPV de alto riesgo: **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.**

presentes en el 95% de los carcinomas de células escamosas.

Infección por HPV y CCU

- Existe una asociación de mas 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



Detección de 12
genotipos de HPV

CANAL 2



Detecta
HPV16

CANAL 3



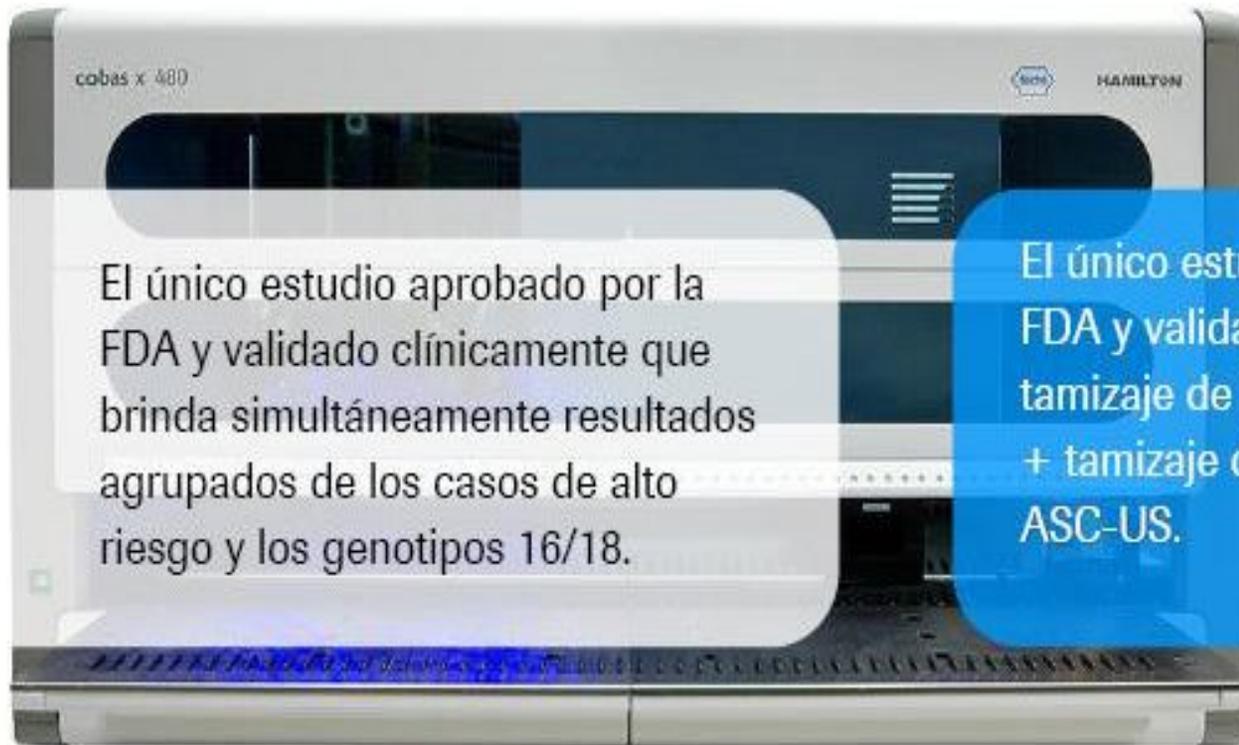
Detecta
HPV18

CANAL 4



Detecta betaglobina
(control interno de
muestra adecuada)

Test HPV Cobas 4800

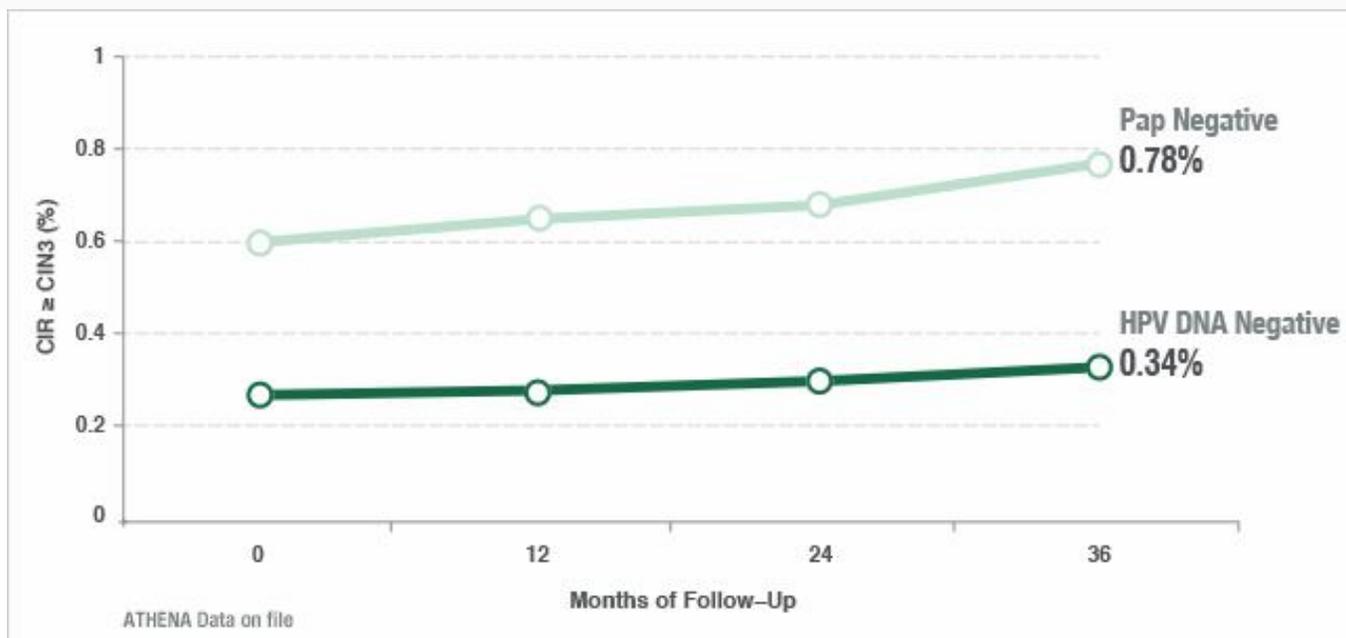


El único estudio aprobado por la FDA y validado clínicamente que brinda simultáneamente resultados agrupados de los casos de alto riesgo y los genotipos 16/18.

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.

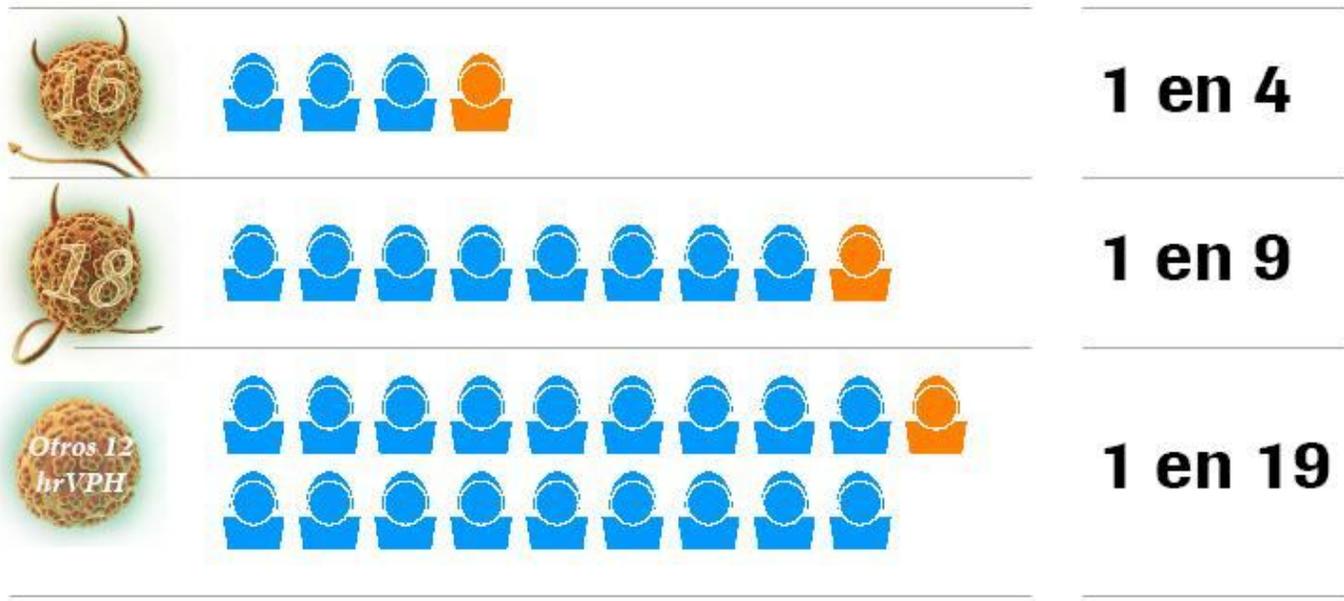
Incidencia CIN3 en PAP (-) vs HPV (-)

Tasa de incidencia acumulada de 3 años de \geq CIN3 de Papanicolaou negativo versus ADN VPH negativo



Estratificación de las pacientes: medicina personalizada

Riesgo de desarrollar CIN3+ en 3 años



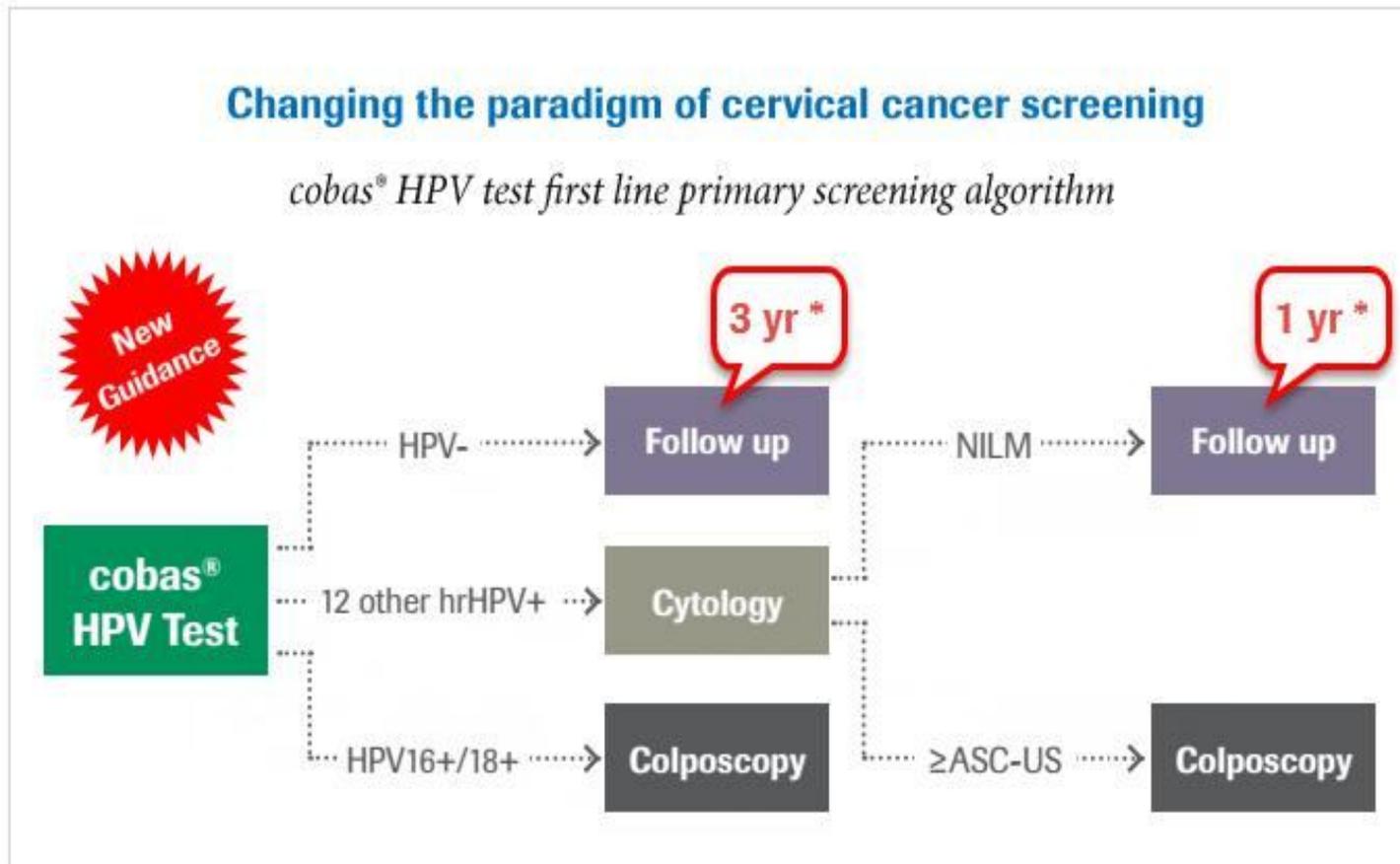
Test HPV para SCREENING

Permite una prevención personalizada y más efectiva del cáncer cervical invasivo.

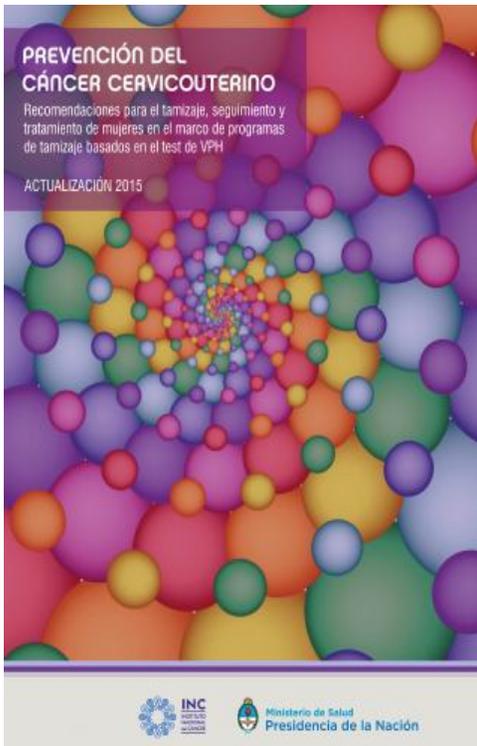
Permite la detección de lesiones clínicamente relevantes, facilitando el tratamiento pre-cáncer invasivo.

Provee intervalos extendidos de retesteo.

Nuevo paradigma para el screening de CCU

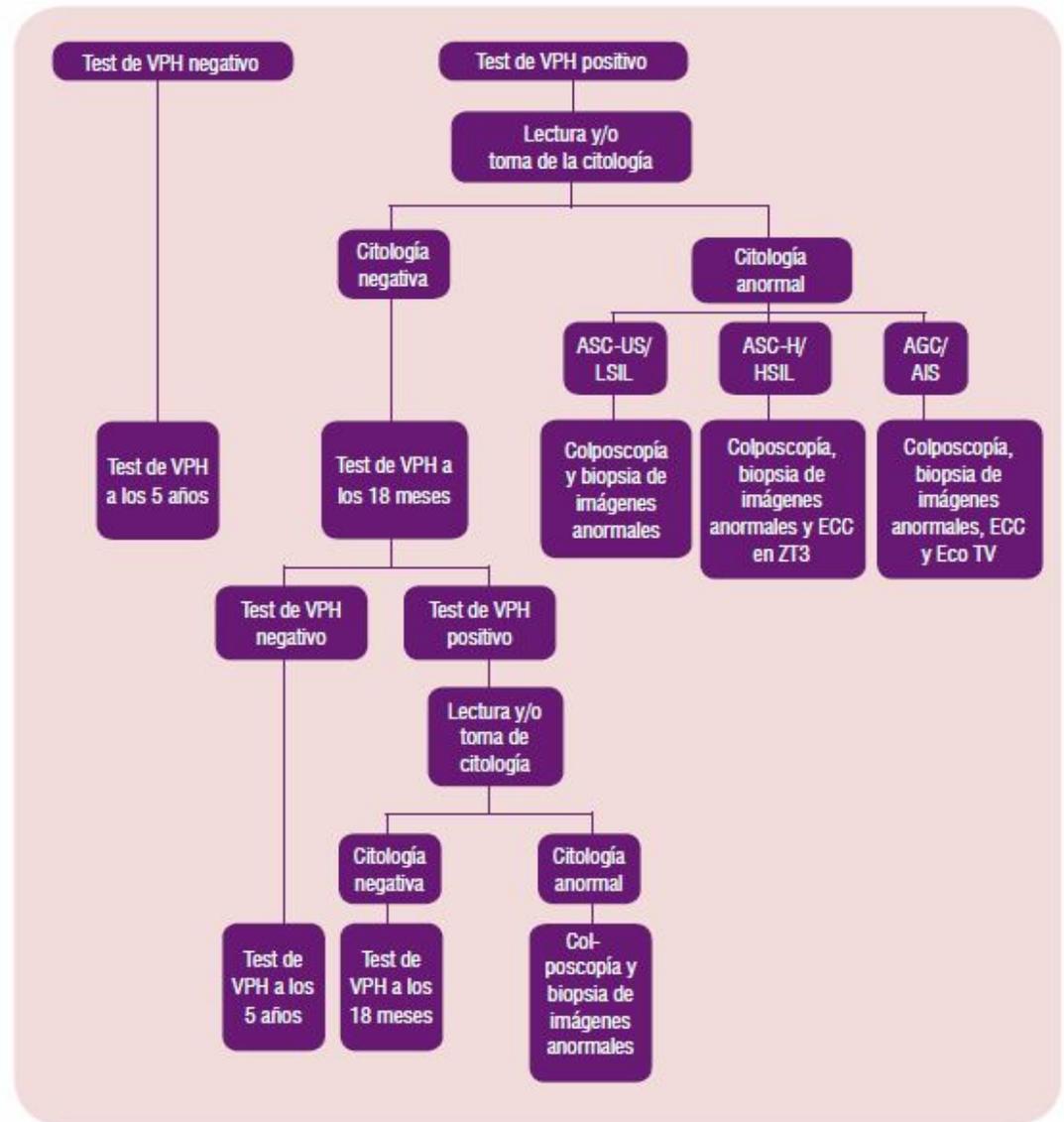


*ASSCP and SGO Interim Clinical Guidance 2015



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

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



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.

¡M uchas gracias!