

DIAGNÒSTIC DE LABORATORI DE LES MALALTIES DE TRANSMISSIÓ SEXUAL

Antònia Andreu

La solució dels problema de les MTS, com el de totes les malalties de transmissió sexual, passa per la pràctica d'un diagnòstic etiològic que ens permeti una terapèutica correcta i l'adopció de mesures profilàctiques adients, com la detecció de portadors asimptomàtics, que constitueixen un reservori important per la seva difusió. El present treball d'Antònia Andreu ens acosta aquest camp, cada cop més ampli i especialitzat, com són les tècniques de diagnosi d'aquestes malalties.

Des de l'acabament de la Segona Guerra Mundial, hom observa a la majoria de països un augment constant de la incidència de les infeccions sexualment transmissibles. Aquest fet representa un important problema de Salut Pública, amb les conseqüents repercussions socio-econòmiques.

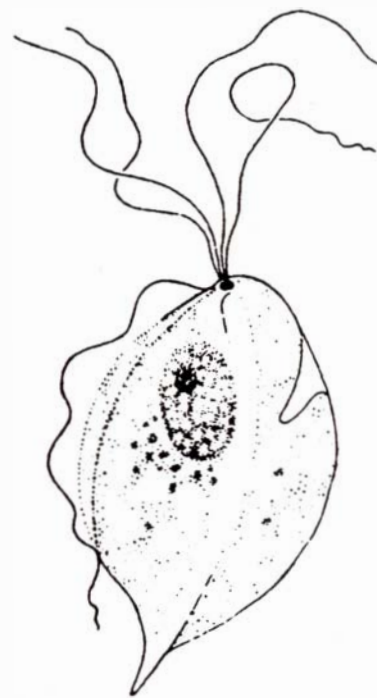
A l'octubre de 1986, i per primera vegada, hom anuncia al Regne Unit un descens del nombre de casos de gonorrea en la població heterosexual. Aquest canvi de tendència sembla conseqüència de la dramàtica aparició d'una nova malaltia de transmissió sexual (MTS), la SIDA.

La distribució de les diferents MTS presenta una considerable variació entre països i àdhuc entre regions d'un mateix país. Com a causes determinants d'aquesta variabilitat, hom podria assenyalar factors socio-culturals, demogràfics i econòmics,

així com factors lligats a l'hoste i als microorganismes.

La solució del problema de les MTS, com el de totes les malalties infeccioses, passa per la pràctica d'un diagnòstic etiològic que ens permeti una terapèutica correcta i l'adopció de mesures profilàctiques adients, com la detecció de portadors asimptomàtics, que constitueixen un reservori important per la seva difusió.

Per al diagnòstic microbiològic de les MTS disposem d'"eines" de treball eficaces que van des de tècniques senzilles a l'abast de qualsevol laboratori, fins a tècniques sofisticades que requereixen personal tècnic altament qualificat i utilitatge costós, només a l'abast de laboratoris d'alt nivell. És per això que potser seria convenient d'establir una classificació dels laboratoris dedicats al diagnòstic de les MTS, a fi de millorar-lo i d'economitzar recursos.



Protozou flagel·lat del gènere Trichomonas.

DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC DE LES MTS

Per a un correcte diagnòstic microbiològic és fonamental l'adequada recollida de la mostra i el seu ràpid transport, en menys de dues hores, al laboratori. Segons les tècniques que emprï aquest hi haurà variacions en la presa de la mostra; per això es fa necessari un acord previ entre el clínic i el microbiòleg.

En línies generals, en les vaginitis i uretritis la mostra més adequada és la secreció presa amb escovilló, que s'enviarà al laboratori en medi de transport (Medi de Stuart, Amies, etc.), encara que quan s'hagi de practicar una tècnica d'immunofluorescència directa serà necessària l'extensió de material cel·lular en un portaobjectes especial. Les adenitis inguinals s'hauran de punccionar amb xeringa estèril. En les úlceres genitals, serà necessari el raspat del fons de la lesió. L'aspiració de la cavitat endometrial és la millor tècnica per a diagnosticar una endometritis. En les anexitis, la mostra més adequada és el pus anexial obtingut mitjançant laparoscòpia o culdocentesi, que, en ser tècniques agressives, són poc utilitzades i generalment substituïdes pel frotis endocervical, que proporciona resultats molt inferiors.

Per a l'estudi microbiològic hom utilitza les tècniques indicades a la taula adjacent.

1. EXAMEN MICROSCÒPIC DE LA MOSTRA

Per a l'examen en fresc, en el moment de la presa es posa la mostra entre un portaobjectes i un cobreobjectes, i és examinada al microscopi, (amb objectiu 40 x i el condensador baix, per a obtenir un millor contrast). És una tècnica molt econòmica i de fàcil realització, però es necessita experiència per a la seva interpretació. És d'una gran especificitat, però, en canvi, és poc sensible.

TÈCNiques DE DIAGNÒSTIC DE LES MTS.

1. EXAMEN MICROSCÒPIC DE LA MOSTRA

Examen en fresc.Camp fosc.

Examen prèvia tinció:blau de metilè
tinció gram,Giemsà,Papanicolau
blau d'acridina

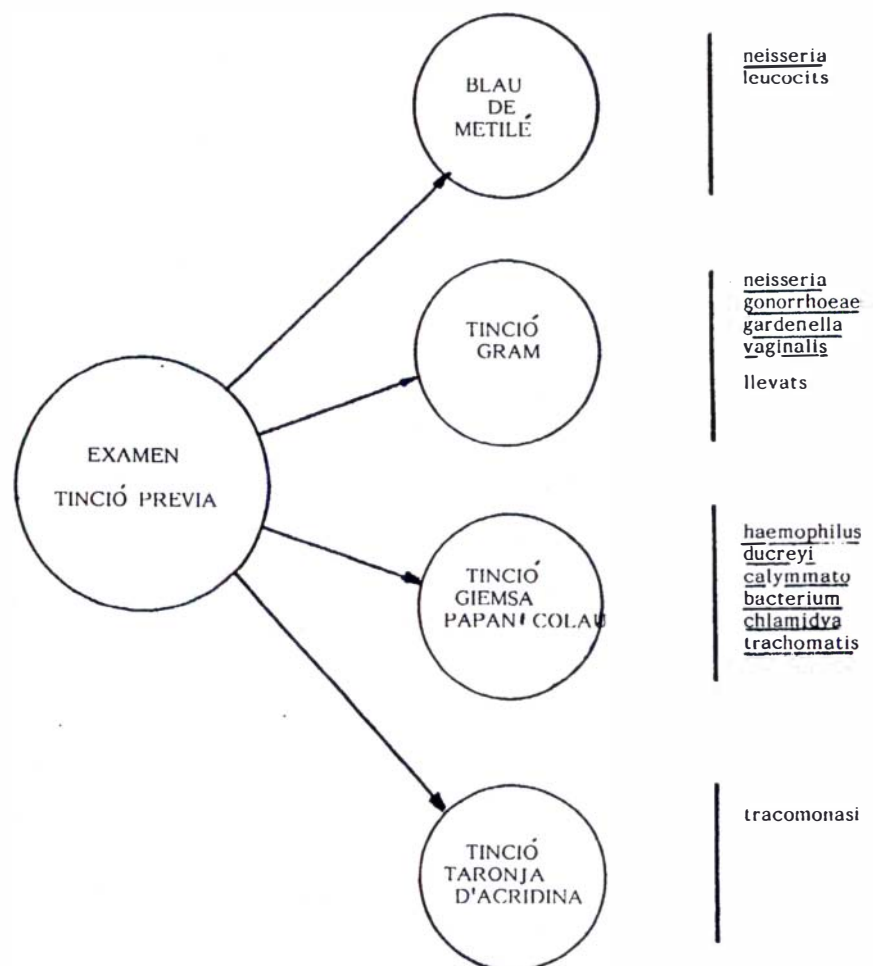
2. DETECCIÓ D'ANTIGEN ESPECÍFIC A LA MOSTRA

3.CULTIU

Medis d'enriquiment,selectius,etc.

Cultius cel·lulars

4. DETECCIÓ D'ANTICOSSOS SÈRICS.



És útil per a la visualització de Trichomonas vaginalis, llevats i Gardnerella vaginalis. L'examen en fresc en camp fosc s'utilitza per al diagnòstic de la sífilis en la seva etapa de xancres.

L'examen microscòpic, prèvia coloració amb blau de metilè, té l'avantatge de conservar millor la morfologia cel·lular que la tinció de Gram, i, per tant, permet la visualització dels leucòcits polimorfonuclears i, en el seu interior, les neissèries fagocitades, imatge característica de la uretritis gonocòccica masculina.

La tinció de Gram permet la divisió dels microorganismes en dos grups, tot depenent de si es tenyeixen positivament o negativament, i permet de fer una estimació quantitativa dels diferents microorganismes visualitzats a la mostra. És útil per al diagnòstic de les infeccions per Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis, Mobiluncus spp i llevats.

Les coloracions de Giemsa i Papanicolau, molt emprades en citologia, tenen poques aplicacions en el diagnòstic microbiològic. El Giemsa seria útil per a la visualització de Haemophilus ducreyi i Calymmatobacterium granulomatis, i el Papanicolau, en el diagnòstic d'infeccions per Chlamydia trachomatis.

Les tècniques tintorials pequen dels mateixos defectes que l'examen en fresc: són tècniques en general específiques, però poc sensibles.

La coloració fluorescent amb Taronja d'acridina, és útil per al diagnòstic de la tricomoniasi; és una tècnica sensible i, a la vegada, específica, amb resultats comparables amb els del cultiu.

L'actual desenvolupament dels anticossos monoclonals ha permès el millorament de la tècnica d'immunofluorescència directa i la seva aplicació al diagnòstic microbiològic: consisteix en aplicar sobre un portaobjectes, en el qual prèviament s'ha estès la mostra, anticossos monoclonals específics marcats amb fluoresceïna i observar-ho al microscopi de fluorescència. S'utilitza per a la detecció de Chlamydia trachomatis i Herpes

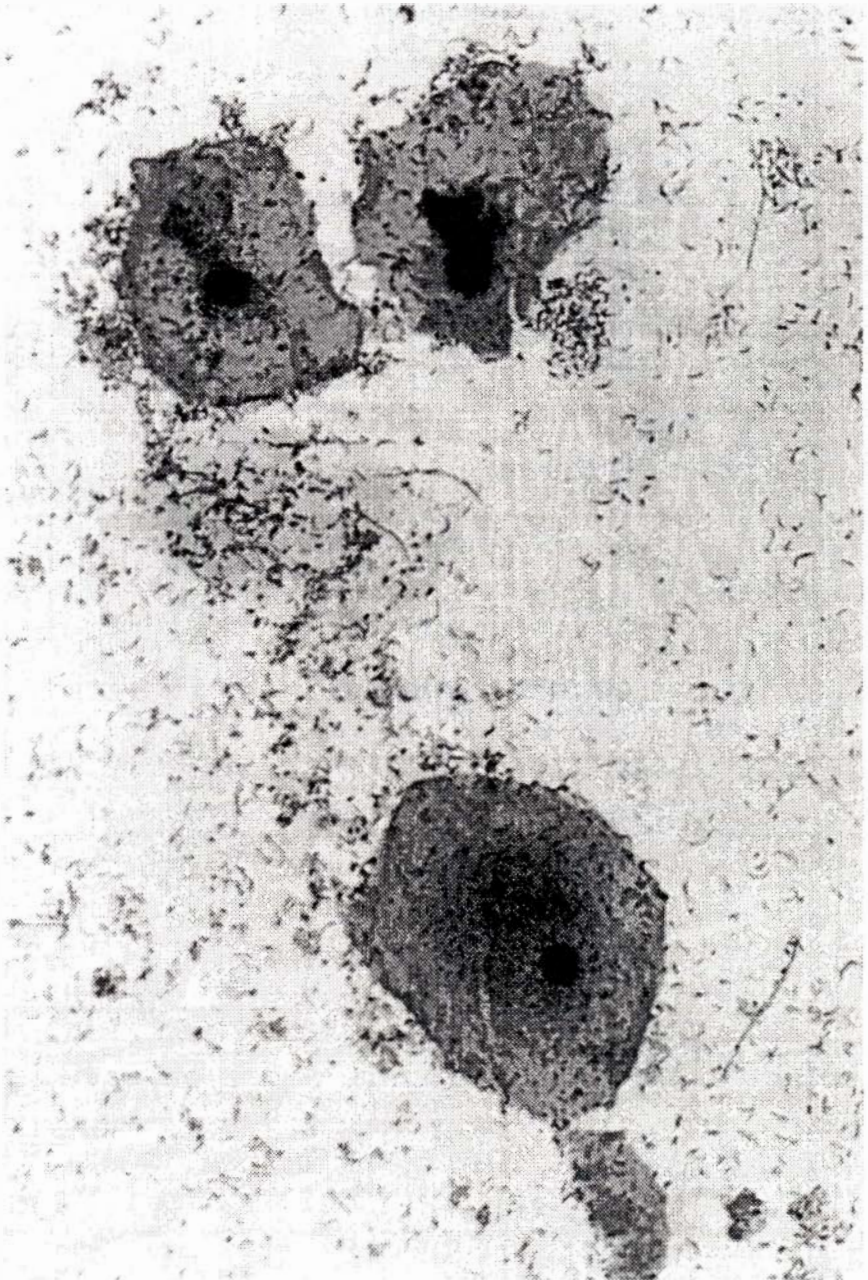
simples. Les perspectives d'aquesta tècnica són molt esperançadores i en el futur hom podrà aplicar-la probablement a la majoria de microorganismes.

2. DETECCIÓ D'ANTIGEN ESPECÍFIC A LA MOSTRA

La tècnica utilitzada per a posar de manifest antigens específics del microorganisme que volem detectar, és l'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Consisteix en la detecció d'aquest antigen mitjançant la seva unió, en una primera fase, amb unes boletes de material inert, i en el seu rentat després

d'un determinat període d'incubació. En una segona fase es fa reaccionar aquest antigen amb anticossos específics contra ell. En la tercera fase, s'afegeix a la reacció anti-anticossos units a un enzim, i, posteriorment, un substrat. La reacció enzim-substrat dona lloc a una coloració, la intensitat de la qual és proporcional a la quantitat d'antigen que hi havia a la mostra. Aquesta coloració es quantifica per espectrofotometria.

Aquesta tècnica s'utilitza per a la detecció de Chlamydia trachomatis i Neisseria gonorrhoeae; és de recent descripció,



Gardnerella vaginalis i Mobiluncus spp, a l'examen microscòpic de la mostra, prèvia tinció de Gram.

AGENTS TRANSMISSIBLES SEXUALMENT I MALALTIES ASSOCIADES

BACTÈRIESNeisseria gonorrhoeae

Urethritis, epididimitis, cervicitis, salpingitis, infecció disseminada, conjuntivitis, prostatitis, corioamionitis, RPM, PP, etc.

Treponema pallidum

Sfilis.

Haemophilus ducreyi^{*}

Xancre tou.

Calymmatobacterium granilomatis^{*}

Granuloma inguinal.

Chlamydia trachomatis

Urethritis, epididimitis, cervicitis, salpingitis, limfogranuloma veneri, conjuntivitis d'inclusió, tracoma, pneumònia, corioamionitis, RPM, PP, etc.

Ureaplasma urealiticum

Urethritis no gonocòccica, síndrome uretral, corioamionitis, etc.

Mycoplasma hominis

Salpingitis, vaginitis?, amnionitis, febre postpart.

Gardnerella vaginalis

Vaginosis bacteriana.

Mobiluncus spp

Vaginosis bacteriana.

Campylobacter spp^{*}

Enteritis, proctitis.

Streptococcus agalactiae^{*}

Sepsis neonatal.

Shigella spp^{*}

Sigelosi.

Salmonella spp^{*}

Salmonel·losi.

VIRUS

Herpes simplex

Herpes genital, herpes neonatal, displàsia cervical i carcinoma?.

Cytomegalovirus^{*}

Mononucleosi infecciosa, infecció congènita, infecció a l'immuno-deprimit, cervicitis?.

Papillomavirus humà

Condiloma acuminat, carcinoma cervical? =

Molluscum contagiosum^{*}

Molluscum contagiosum.

Hepatitis A i B^{*}

Hepatitis.

HIV^{*}

SIDA.

PROTOZOUSTrichomonas vaginalis

Vaginitis.

Giardia lamblia^{*}

Enteritis.

Cryptosporidium^{*}

Enteritis.

Entamoeba histolytica^{*}

Amebiasi.

FONGSCandida spp

Vulvovaginitis, candidasi peneal.

ARTRÒPODSPhthirus pubis

Pediculosis pubis.

Sarcoptes scabiei^{*}

Sarna.

AGENTS TRANSMISSIBLES SEXUALMENT I MALALTIES QUE PRODUÏXEN. Els microorganismes assenyalats amb asterisc, o bé produeixen MTS poc freqüents en el nostre medi, o bé la seva evidència de transmissió sexual és circumstancial o limitada a la població homosexual masculina; malgrat se'ls hagi citat en aquesta taula no ens ocuparem del seu diagnòstic microbiològic.

Mycoplasma hominis i Ureaplasma urealyticum en medi de cultiu A7B i observació al microscopi (x10).

sensible i específica, malgrat no acaba de trobar el seu lloc en el diagnòstic de les MTS.

3. CULTIU

Immediatament que arriben les mostres al laboratori, s'han de sembrar en els medis adequats per tal d'evitar la mort dels microorganismes més sensibles.

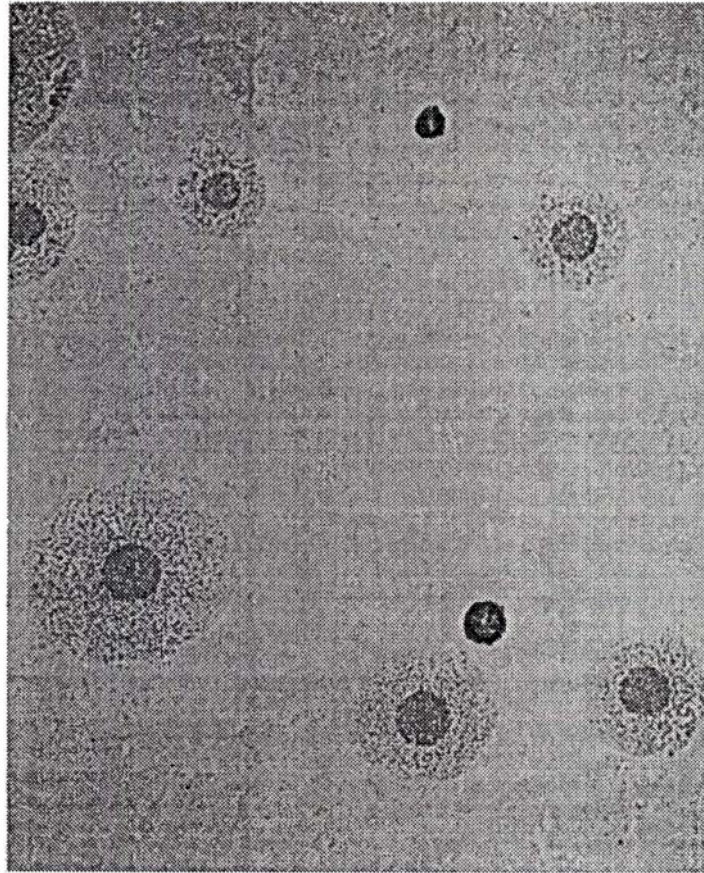
Els medis de cultiu que permeten l'aïllament dels agents etiològics més freqüents, s'han d'utilitzar sistemàticament i simultània en tot estudi de mostra genital. En canvi, aquells que possibiliten la detecció dels agents etiològics rars, només s'hi inclouran en cas de sospita clínica fonamentada.

Per a la detecció d'un mateix microorganisme, generalment poden emprar-se diferents medis amb resultats similars; la utilització d'un o l'altre per part del laboratori, dependrà de la seva disponibilitat econòmica i de la seva pròpia experiència.

Cadascun dels medis serà incubat el temps i a la temperatura i atmosfera adequats al microorganisme al qual està destinat.

En el nostre laboratori s'utilitzen sistemàticament els següents medis de cultiu:

- Medi líquid de Diamond: per a l'aïllament de Trichomonas vaginalis.
- Medi líquid U9B: per a l'enriquiment dels micoplasmes genitals.
- Agar Sabouraud: per a l'aïllament de llevats.
- Agar Bilayer: per a l'aïllament de Gardnerella vaginalis.
- Agar Thayer-Martin: per a l'aïllament de Neisseria gonorrhoeae.
- Agar A7B: per a l'aïllament de micoplasmes genitals.



En cas de sospita de xancrotu s'utilitza Medi de Hammond.

En general, un cop aïllat el germen en aquests medis, se'l sotmet a una identificació, ja sigui mitjançant proves bioquímiques o serològiques, per tal de confirmar-ne la identitat i classificar-ho en espècies.

Actualment, diferents cases comercials disposen de sistemes miniaturitzats o automatitzats que simplifiquen extraordinàriament les tècniques d'identificació bioquímica; en general, tenen l'inconvenient d'un cost elevat, però l'estandarització de les proves, així com l'economia d'espai i temps, són avantatges evidents d'aquests sistemes. Serien d'utilitat en la identificació bioquímica de Neisseria gonorrhoeae i de llevats.

La identificació bioquímica de Neisseria gonorrhoeae es pot completar o substituir per una

prova serològica de coagulació (consistent en una reacció sobre portaobjectes entre antigen i anticòs: l'antigen seria la presumpta soca de gonococ que es vol identificar; l'anticòs estaria constituït per anticòs monoclonals antiproteïna I de la membrana del gonococ units a la proteïna A d'estafilococs no viables).

Per a la identificació de Gardnerella vaginalis no es pot recórrer a aquests sistemes, i es fa necessària la preparació en el laboratori d'una bateria de proves bioquímiques que confirmarien la sospita de Gardnerella vaginalis basada en la presència de "clue cells" (cèl.lules clau) en l'examen microscòpic de la mostra i la morfologia i hemòlisi de la colònia en Agar Bilayer.

El diagnòstic bacteriològic de les infeccions genitals per Mycoplasma hominis i Ureaplasma urealyticum, es basa en

l'aïllament en medis (U9B, A7B) amb sèrum de cavall, extracte de llevat i diversos substrats. En el medi sòlid A7B cadascuna d'aquestes dues espècies adopta una determinada mida i morfologia tan característics, que es fa discutible la necessitat d'una posterior identificació bioquímica.

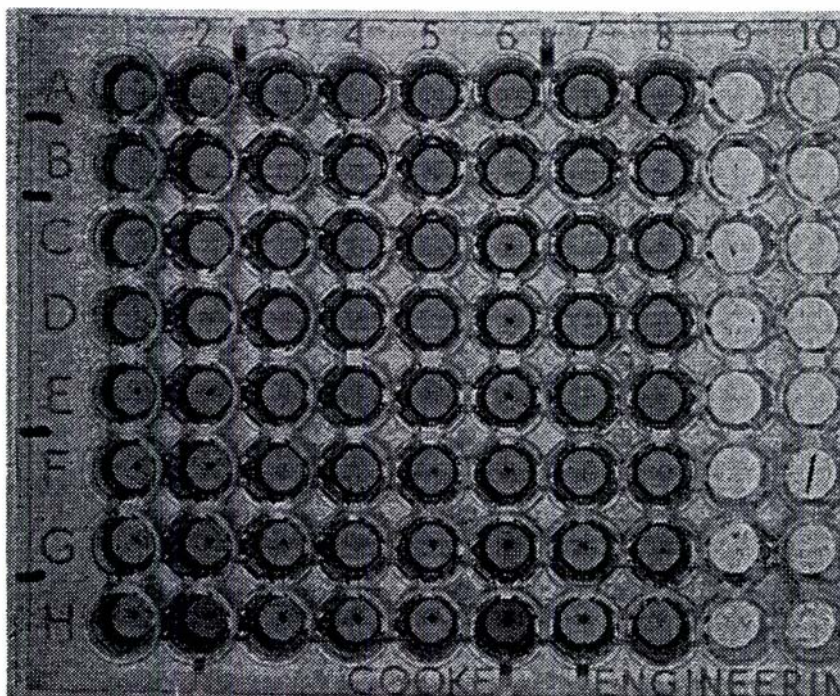
En el diagnòstic de laboratori de les MTS els cultius cel·lulars troben llur aplicació en l'aïllament de Chlamydia trachomatis i de l'Herpes simplex. Es tracta de cultius sofisticats per als quals és necessari el manteniment de línies cel·lulars, i que estan només a l'abast de laboratoris especialitzats.

La introducció de la tècnica d'immunofluorescència directa per al diagnòstic d'aquests dos gèrmens, ha provocat la pèrdua de vigència del cultiu cel·lular.

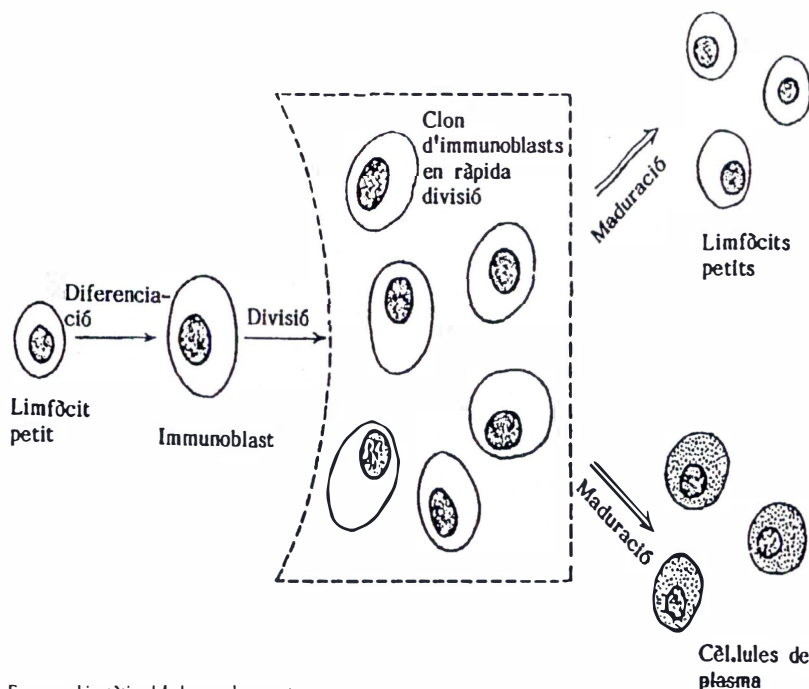
4. DETECCIÓ D'ANTICOSSOS SÈRICS. ESTUDI SEROLÒGIC

La principal aplicació n'és en el diagnòstic de la sífilis, en el qual poden emprar-se reaccions amb antigen no treponèmic o cardiolipínic: aglutinació (VDRL, RPR) o amb antigen treponèmic: immunofluorescència indirecta (FTA-ABS) i hemaglutinació (TPHA). Les reaccions no treponèmiques s'utilitzen per 'screening' i per control de tractaments; les positives han de ser confirmades per reaccions que utilitzin antigen treponèmic.

En el diagnòstic de la Malaltia Inflamatòria pèlvica per Chlamydia trachomatis, semblen també d'utilitat proves serològiques com microimmunofluorescència, fixació de complement, ELISA, i, la més recentment descrita, d'immunoperoxidasa indirecta o IPA. Aquesta última consisteix en fer reaccionar els anticossos anti-Chlamydia trachomatis continguts en el sèrum del malalt amb cèl·lules infectades per aquest microorganisme i fixades sobre un portaobjectes; en una segona fase, se n'afegeix una anti-IgG humana conjugada amb un enzim, el qual posteriorment es fa reaccionar amb un substrat. La reacció enzim-substrat forma un precipitat sobre les cèl·lules infectades, visible amb l'ajuda d'un microscopi.



Reacció d'hemaglutinació en el diagnòstic de la sífilis



Esquema hipotètic del desenvolupament de cèl·lules formadores d'anticossos a partir de limfòcits petits.

ESTUDI DE LA SENSIBILITAT ANTIMICROBIANA

En general, tots els agents etiològics productors de MTS tenen una sensibilitat antimicrobiana constant, raó per la qual no és aconsellable la pràctica de l'antibiograma.

L'excepció a la regla seria Neisseria gonorrhoeae, degut al constant augment de la incidència de soques productores de penicil.lina (PPNG), així com de soques amb resistència cromosòmica a la penicil.lina (CMRNG), i de soques resistents a l'espectinomícina i a les tetraciclins.

Actualment, és obligat l'estudi de la producció de penicil.linasa de tota soca de gonococ aïllada, sigui pel mètode acidomètric ràpid, pel iodomètric o pel de la cefalosporina cromogènica. De tota soca productora de penicil.linasa, se n'hauria d'estudiar també la sensibilitat a altres antimicrobians.

A. Andreu

	TÈCNIQUES MICROSCÒPIQUES				TÈCNIQUES NO MICROSCÒPIQUES			
	Examen en fresc	Tinció de Gram	Tinció amb Taronja d'acridina	IFD amb anticossos monoclonals	Detecció d'antigen a la mostra	Cultiu en medis acel.lulars	Cultiu cel.lular	Detecció d'anticossos sèrics
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>		+++ +			++	+++		
<u>Treponema pallidum</u>	++ *							+++
<u>Haemophilus ducreyi</u>		+				++		
<u>Chlamydia trachomatis</u>				+++	++		+++	++**
<u>Ureaplasma urealyticum</u>						+++		
<u>Mycoplasma hominis</u>						+++		
<u>Gardnerella vaginalis</u>	+	++	++			+++		
<u>Mobiluncus spp</u>	+	++				+		
<u>Trichomonas vaginalis</u>	++		+++			+++		
Herpes simplex				+++			+++	
<u>Candida spp</u>	+	+	+			+++		

+++ = sensibilitat > 95%; ++ = sensibilitat entre el 50-95%;
+ = sensibilitat < 50%; * = camp fosc i frotis del xancre;
** = exclusivament en anexitis

Sensibilitat de les tècniques utilitzades en el diagnòstic etiològic de les MTS.

REFERÈNCIES

Catterall R.D. Biological effects of sexual freedom. Lancet 1983; i: 315-319.

Centers for Disease Control. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. MMWR Supplement 1985; 34 (45).

Comitè d'Experts en Malalties Venèries. Manual de Prevenció i Control de les Malalties Venèries. Ed. Secretaria General Tècnica del Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. 1981.

Eschenbach D., Pollock H.M., Schachter J. Cumitech 17. Laboratory diagnosis of female genital tract infections. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology. Washington DC. 1983.

Gellan C.A., Ison C.A. Declining incidence of gonorrhoeae in London: a response to fear of AIDS? Lancet 1986; ii: 920.

Harns J.R.W. Recent Advances in Sexually Transmitted Diseases. Number two. Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh 1981.

Holmes K.K., Mardh P.A., Sparling P.F., Wiesner P.J. Sexually Transmitted Diseases. Ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York 1984.

Lenette E.H., Balows A., Hausler W.J., Shadomy H.J. Manual of Clinical Microbiology. 4a. ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 1985.

ANTÒNIA ANDREU i DOMINGO va néixer a Montblanc (Tarragona) el 19 de desembre de 1.952.

És llicenciada en Medicina i Cirurgia l'any 1.976, i s'especialitza en Microbiologia l'any 1.979. Actualment és Metge Adjunt del Servei de Microbiologia i Parasitologia de la Ciutat Sanitària "Vall d'Hebró" de Barcelona. És autora de nombroses publicacions de microbiologia.