

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE BACTERIAS Y VIRUS

**Aprendizaje basado en problemas
y estudio de casos**

Guía actividades Año 2020

Roxana Cannistraci, Victor Giayetto, Silvia González,
Ana Littvik, Teresa López, Elena Márquez, Gabriela
Peirotti, Silvia Nates, Pedro Rodríguez, Patricia
Biganzoli, Leonardo Ferreyra y Jorge Pavan

Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba



TALLER N 9

Encuentros entre rosas y espinas

¡Como somos los occidentales! A la hora de establecer dicotomías no nos gana nadie. Vamos, que siempre hay un no para un sí, y un blanco para un negro, y los "grises" y los "depende" siempre están como mal vistos (lo que no es de extrañar, ya que implícitamente la mezcla que suponen los *grises* y el relativismo de los *depende* rompen esa "norma social fundamental" según la cual las cosas tienen que ser como son...). Pues bien, no contentos con la oposición hombre - mujer, o masculino - femenino, como se prefiera, y preocupad@s como estabamos por los efectos de dichas dicotomías, ya que no podíamos establecer ni "grises" ni "dependes" en el espinoso tema de la dominación patriarcal, se nos ocurrió liarlo todo un poco más proponiendo otro par más de opuestos, e inventamos el término género, con tan mala pata que enseguida fue contrapuesto al de sexo.

Simone de Beauvoir ya dijo en 1949 que "no se nace mujer, llega una a serlo". Con esta idea rompía radicalmente con aquella vieja y sin embargo tan actual idea según la cual las mujeres (y los hombres, claro... ¿o no está tan claro?) somos como somos porque así nos determina la naturaleza¹. "

¹ *¿Por qué le llaman género cuando quieren decir sexo?: Una aproximación a la teoría de la performatividad de Judith Butler* Eva Patricia Gil Rodríguez Athenea Digital, núm. 2: 30-41 2002

Taller N°9

Enfermedades de transmisión sexual (E.T.S.)

GUÍA PARA EL ESTUDIO

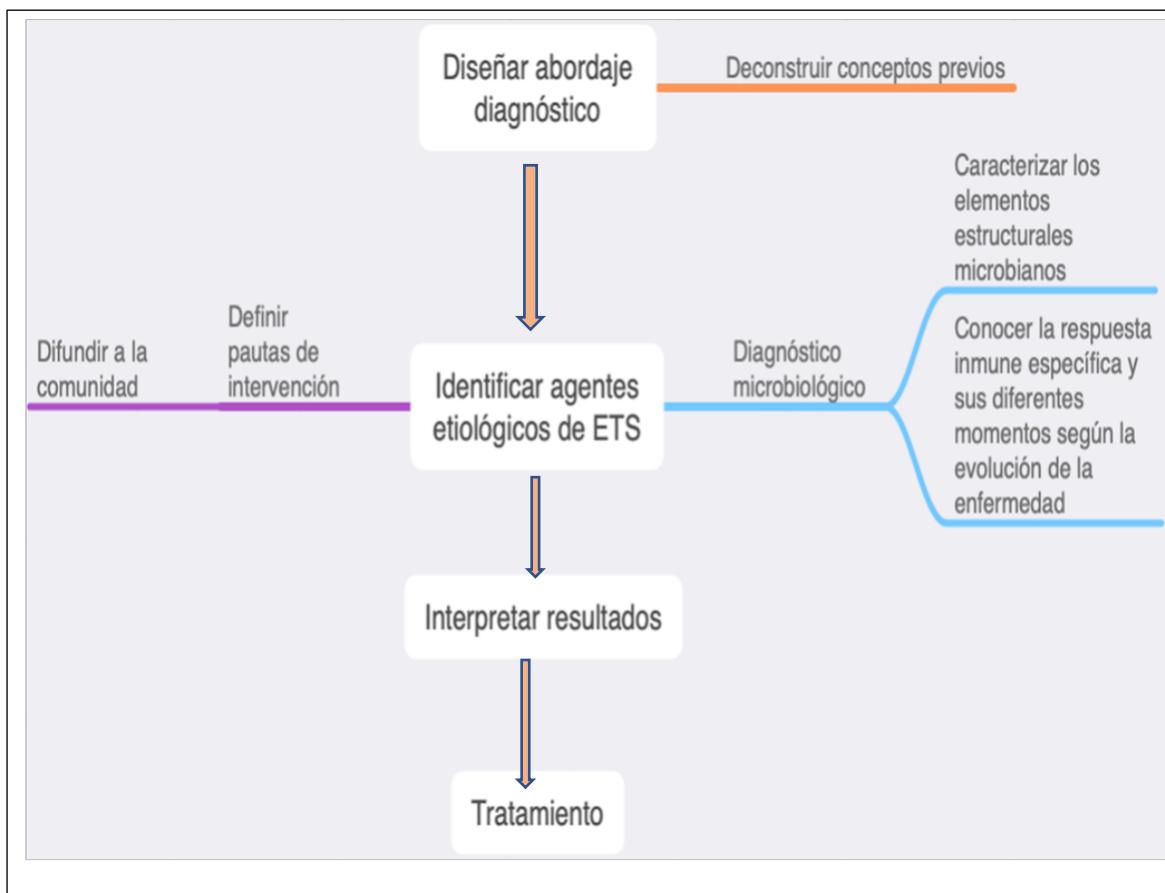
ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

- Etiologías: Bacterias, virus
 - Muestras para el diagnóstico: ¿QUÉ?, CÓMO?, CUÁNDO?

BACTERIAS	Y	VIRUS
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		VIH
<i>Candida pallidum</i>		HTLV
<i>Chlamydia trachomatis</i>		Virus hepatotropos
<i>Ureaplasma hominis</i>		Virus herpes simplex
<i>Ureaplasma ducreyi</i>		Virus papiloma

- Epidemiología
 - Hábitat (reservorios, microbiota normal, vectores)
 - Morfología y tinción bacteriana
 - Mecanismos patogénicos
 - Estructura antigénica
 - Diagnóstico microbiológico.
 - Respuesta inmune
 - Prevención, control y erradicación

MAPA CONCEPTUAL ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL



TEMA: ENFERMEDADES DE TRANSMISION SEXUAL



UN DESLIZ

Esteban Rodríguez de 32 años concurre a la guardia del hospital presentando exudado uretral de cuatro días de evolución. Al interrogatorio le cuenta a Ud. que tiene una pareja estable desde hace dos años, Tamara, sin embargo ha mantenido relaciones sexuales con un desconocido **hace una semana atrás**. Al examen físico comprueba una secreción uretral purulenta sin adenopatía inguinal. Esteban se lamenta de la falta de conciencia por no usar preservativo y por las relaciones que con su pareja al comienzo de notar la secreción. (**Fig. 1**)

El médico establece un diagnóstico inicial y diagnósticos diferenciales **Pregunta1**. Decide dar comienzo al diagnóstico microbiológico, para lo cual realiza un hisopado uretral y enviarlo al laboratorio de microbiología **Preg 2**.

A la media hora recibe el primer informe.

El informe bacteriológico del exudado uretral de Esteban Rodriguez:

Material: Exudado uretral

Examen directo: Coloración de Gram: Se observan diplococos Gram negativos intra y extracelulares (**Fig. 4**). Cultivo: Se informará.



Fig. 1

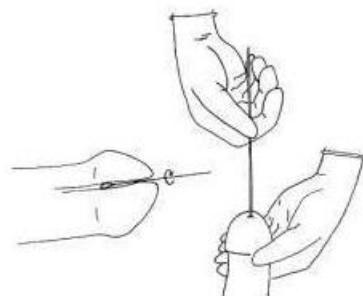


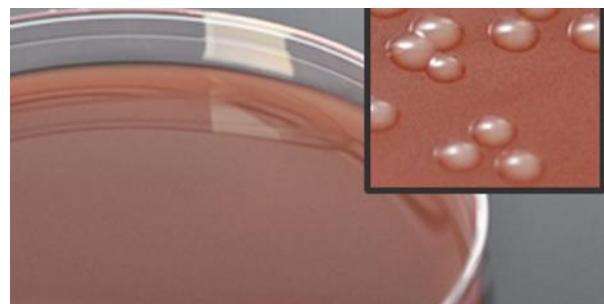
Fig. 3



Fig. 2



En el laboratorio la siembra en medios de Thayer Martin y extendido para la Coloración de Gran



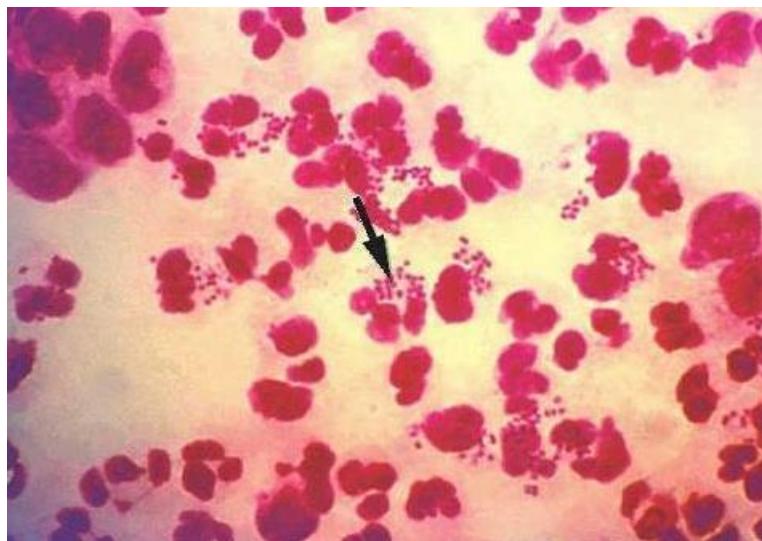


Fig.4

Esta imagen corresponde a la coloración de Gram del exudado uretral del paciente Esteban. **Pregunta 3**

- Doctor, estoy preocupado por mi pareja.

El médico le indica que debe concurrir a su médico, pero además le sugiere una serología para el VIH (detección de anticuerpos para VIH).

Esteban concurre a la próxima consulta en la que su médico ya recibió en un sobre el resultado en el cual no se detectaron anticuerpos anti VIH. **Pregunta 4**

Pregunta 1: cuál es el diagnóstico que realiza tras el interrogatorio y examen físico del paciente. Establezca agentes etiológicos probables.

Pregunta2: especifique toma de muestra, así como transporte y conservación de la misma. Observe figuras 2 y 3, analice conjuntamente.

Pregunta 3: Que probabilidad diagnóstica tiene examen directo en Esteban. Diferencie el mismo método en un hisopado endocervical de Tamara. Para ayudarlo le mostramos la coloración de Gram de la cervicitis de Tamara. **Fig. 5 y 6.**

Pregunta 4: Recuerde el período de ventana inmunológica en la infección por VIH, ¿cuál sería su conducta? (ver material anexo de lectura, infección por VIH)

Finalmente, si el resultado anterior fuera positivo, ¿como confirmaría una infección por el VIH?.

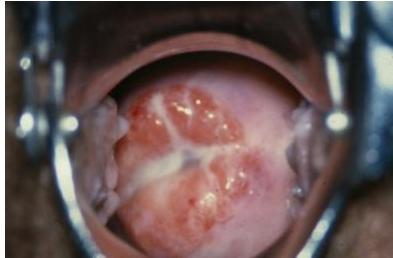


Fig. 5 Cervicitis

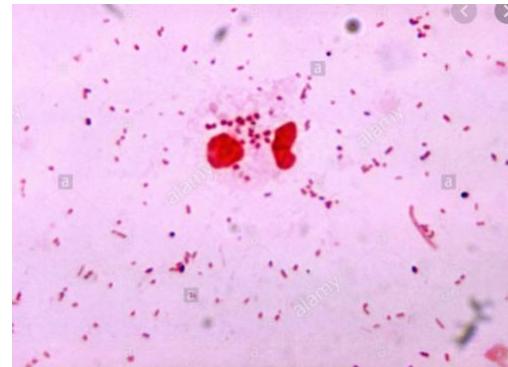


Fig 6: Coloración de Gram



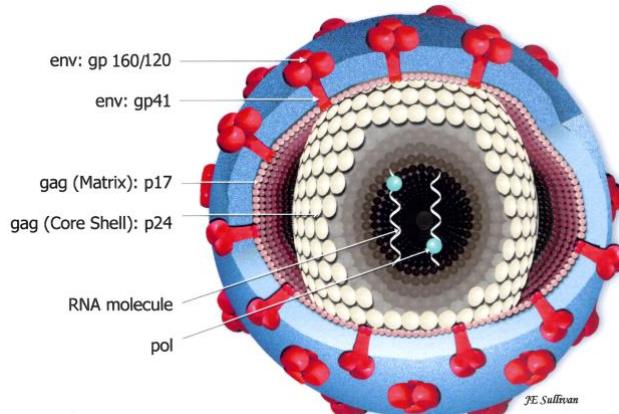
Aunque Esteban había sentido un alivio increíble luego de la última consulta, una semana después, al levantarse, notó otra vez la presencia de secreción uretral y sintió ardor al orinar. Su corazón comenzó a galopar... -Yo pensé que había "zafado..."! ¿Qué raro, ¿no? Si hice todo lo que me dijo el doctor... Y, además, estoy en abstinencia desde hace como quince días... Todo por una "canita al aire" ... ¡esto sólo me puede pasar a mí...!

Si Ud. fuera el doctor que atendió a Esteban...

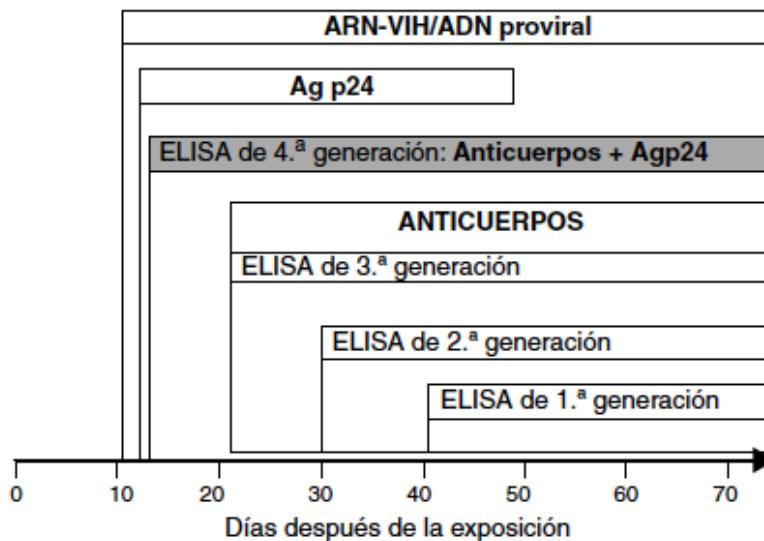
Pregunta 5 ¿cuál sería la probable causa de lo que le sucede ahora?



Diagnóstico de la infección por VIH (material anexo de lectura)



Estructura y proteínas de una partícula de VIH



En el curso de la infección se pueden utilizar varios marcadores víricos para identificar la infección y monitorizar su tratamiento. La cinética y el momento de aparición de cada uno de ellos es distinto y la elección del marcador a detectar va a depender del objetivo del diagnóstico. El primer marcador que aparece tras la infección es el ARN-VIH que se puede detectar por técnicas

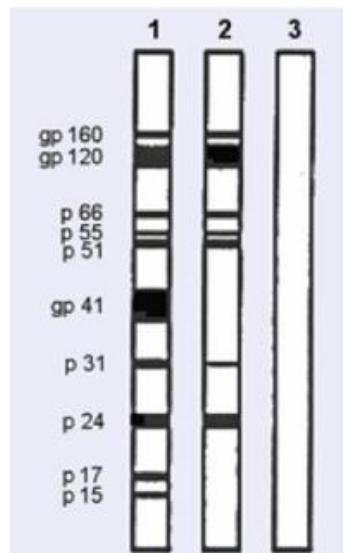
de amplificación a los 10-12 días de la infección². Prácticamente al mismo tiempo que el ARN-VIH, se puede detectar el ADN de VIH integrado en el genoma celular (ADN proviral). El antígeno p24 aparece en suero a los 11-13 días, y se puede detectar aproximadamente durante 1 mes y medio. Los anticuerpos se detectan en el suero a las tres o cuatro semanas de la infección, con una media de 22 días, y alcanzan su concentración máxima a las 10-12 semanas. El intervalo de tiempo que existe entre la infección y la aparición de anticuerpos o seroconversión, se conoce como período ventana y se caracteriza por presencia de ADN proviral, ARN-VIH, antígeno p24 y ausencia de anticuerpos específicos. Se relaciona con el tiempo necesario para el “montaje” de una respuesta inmune, también presente en otras infecciones virales.

La calidad diagnóstica del ELISA viene determinada por la base antigenica utilizada en la captura los anticuerpos específicos presentes en la muestra. Las primeras técnicas se desarrollaron en 1985, usaban como base antigenica un lisado vírico y se detectaban los anticuerpos a los 40 días de la infección. En 1987 se introdujeron las técnicas de segunda generación que incorporaban como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, y nuevos antígenos que permitieron detectar anticuerpos frente a todos los subtipos M, y los grupos N y O, y frente a VIH-2. Se consiguió incrementar la sensibilidad, detectándose los anticuerpos a los 33-35 días tras la infección. En 1994 las técnicas de ELISA adquirieron el formato “en sándwich”, se denominaron ELISA de tercera generación, detectan anticuerpos de clase IgG e IgM, y por ello se acorta el período ventana a 22 días. Estas técnicas se han modificado utilizando sustratos fluorescentes o formatos de quimioluminiscencia, lo que permite la automatización, el procesamiento de un gran número de muestras, la reducción de manipulación y de los costes. Recientemente se han introducido las técnicas de cuarta generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos y antígeno p24, reduciéndose el período ventana a 13-15 días, es decir, se aproxima casi a la detección de ARN-VIH.

Las técnicas confirmatoria que se utiliza más frecuentemente es el Western Blot (WB) que tiene una especificidad superior al ELISA. El Western Blot es una metodología en la cual las distintas proteínas víricas se separan en función de su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se añade e incuba el suero del paciente, la unión antígeno-anticuerpo se detecta mediante una técnica de ELISA. Si el suero posee anticuerpos frente a una proteína se produce una banda coloreada que define la

² Modificado de F. García et al. Enferm Infect Microbiol Clin. 2011;29(4):297-307

reactividad en WB. Un WB reactive debe contener al menos de dos de las tres bandas mayores: anti-gp160/120, anti-p41 y anti-p24.



En este figura vemos tres tiras de WB, en la 1 aparecen todas las bandas, en la 2 contiene al menos dos de las tres bandas mayores: anti-gp160 y anti-p24, en ambas se confirma el diagnóstico de VIH. La banda de la tira 3 es un control negativo.

Las nuevas técnicas de diagnóstico confirmatorio son la detección del ARN viral de HIV o bien a la detección del ADN proviral en leucocitos de sangre periférica, en particular por la sensibilidad y especificidad de los ELISA de cuarta generación. Para seguimiento de la infección y monitoreo de la terapia antiretroviral se utiliza la carga viral plasmática de ARN viral.



¡Me parezco a los Simpson!

En la madrugada de un día agitado se despierta Juan con dolores intestinales y náuseas. Recuerda que desde hace algún tiempo no se siente bien, su materia fecal ha cambiado de color y un tono amarillento de su piel ...

- ¡Me parezco a los Simpson!, exclama.

Decide consultar en la guardia de una clínica donde es atendido por un médico. Al examen físico el médico encuentra una hepatomegalia, piel fría y sudorosa, taquicardia, dolor abdominal, febrícula. Se le informa que debe realizarse una serie de estudios de laboratorio.

Mientras espera los resultados, su pensamiento esta en Carlos, su pareja. Él no la esta pasando muy bien con su hepatitis crónica. Le paso de todo, primero el accidente en un pueblito del norte, una fractura expuesta con compromiso arterial, gran perdida sanguínea, compensada con una trasfusión urgente, aguantar el yeso durante casi sesenta días.

- Alguien sale de laboratorio le llama.
- Estos son sus resultados tiene que llevarlos al médico.

Ud. es un buen amigo de Juan.

Juan preocupado le pregunta.

- ¿Podrías explicarme lo que tengo? ¿cómo me lo “pesqué”? agrega preocupado.

Paciente Juan:

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) resultado positivo

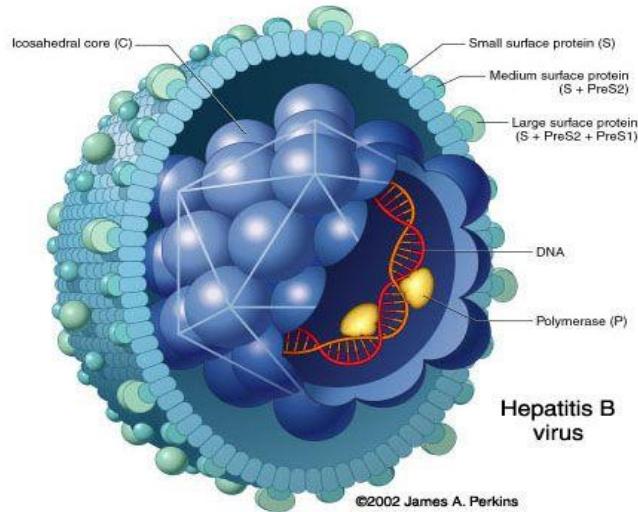
IgM anti antígeno core del virus de la hepatitis B (Anti HBc) resultado positivo

IgM anti virus de la hepatitis A (IgM VHA) resultado negativo

IgG anti virus de la hepatitis A (IgG VHA) resultado positivo



Diagnóstico de la infección por virus hepatotropos (material anexo de lectura)



¡Qué complicado! Va a tener que repasar los marcadores de la cinética viral de Ags y Acs durante la infección por los virus hepatotropos.
Quizás el siguiente cuadro pueda serle de utilidad.

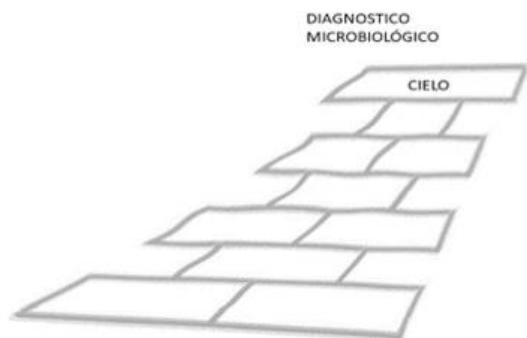
Interpretación	AgHbs	Anti-HBS	IgM anti-HBcore	IgM anti VHA	Anti-VHC totales	ARN VHC	Angi-VHD
Infeción aguda VHB	+		+				
Infeción crónica VHB	+						
Infeción resuelta VHB		+					
Vacunación VHB		+					
Infeción VHA				+			
Infeción VHC					+	+	
Infeción resuelta VHC					+		
Coinfección con VHD	+						+

Aspectos importantes

- ⇒ El virus de la hepatitis A (VHA) corresponde siempre a un modelo de una infección aguda. Además por su modo de transmisión también puede ser una ETS.
- ⇒ La infección crónica del virus de la hepatitis B (VHB) corresponde a la presencia del AgHBs por más de 6 meses.
- ⇒ Otro aspecto está relacionado con los marcadores para virus de la hepatitis C (VHC), que son de aparición tardía (30 a 45 días).
- ⇒ Es importante señalar que el virus de la hepatitis D (VHD) es un virus ARN defectuoso que requiere la infección por el VHB, pues el Anti-HBs constituye la proteína de envoltura del VHD para mediar su entrada a la célula.



La rayuela (Volvemos a esta actividad del primer Taller)





UNA HERENCIA DESEADA y “LA BUBA”

El término sífilis fue introducido por el médico veronés Girolamo Fracastoro, quien publicó un poema "Syphilis sive morbos gallicus" (1530). En él describe la enfermedad y propone ese nombre en honor a un pastor de nombre Syphilo quien se contagió.

Rosa de 40 años de edad. Luego de su tercer hijo pensó no tener más; la falta de trabajo y el abandono que sufrió por parte de su marido la puso en una situación crítica. El destino hizo que se cruzara con José, el pintor de la otra cuadra. El cariño y la necesidad de un compañero fueron decisivos para ensamblar dos familias, José con un hijo y ella con tres. En esta breve historia Rosa se embaraza.

Si bien en la semana 12 de gestación tiene VDRL negativa, a las 28 semanas esto cambia: VDRL positiva 1:128, la que se confirma por otras metodologías. **Pregunta 1.**

Se le indica penicilina a Rosa y a José para que sea administrada cuanto antes ya que la **dosis** y el **tiempo** de administración es importante para su propia evolución y fundamentalmente para evitar la transmisión placentaria, no podía haber demora.

En la semana 34, por rotura prematura de membranas ingresó a sala de partos.

Nació un varón llamado Bruno Quiroga por parto vaginal de 34 semanas, pequeño para la edad gestacional (PEG). Por compromiso respiratorio progresivo debió conectarse a ventilación mecánica. Evolucionó grave con altos requerimientos de oxígeno, deterioro del estado general, ictericia generalizada, petequias y sangrado en sitios de punción.

El diagnóstico de sífilis congénita por técnicas microbiológicas es complejo. Se reciben los resultados de las metodologías diagnósticas (se utilizan las no treponémicas) pertenecientes a Bruno Quiroga (del suero de periférica, no de sangre del cordón): VDRL en sangre en título 1/256. El título de la madre al momento del nacimiento es 1/64, corresponde recordar la transferencia de las inmunoglobulinas de la madre al recién nacido; sin embargo un título en el neonato que cuadriplica el título de la madre, es

diagnóstico de infección congénita. Pero si esto no ocurre no se puede descartar sífilis. La detección de IgM específica es de baja sensibilidad y su interpretación controvertida.³ VDRL en LCR: no se pudo realizar por la gravedad y trombocitopenia marcada. Se completó estudios con serología para Hepatitis B y C que resultaron negativos.

Al examen físico se detectó: abdomen globuloso (**Fig.1**), hepato-esplenomegalia, petequias y descamación palmo-plantar (**Fig 2-3**). Se asumió diagnóstico de Sífilis congénita de aparición precoz con clínica compatible (**Tabla 1**). Si bien los padres refieren haberse administrado el antibiótico indicado a las 28 semanas, el neonatólogo sospecha que los padres no lo hicieron con el tiempo suficiente. Inicia en Bruno el tratamiento con penicilina de inmediato. **Pregunta 2**.

A los 28 días de vida se realiza punción lumbar, resultando el examen físico químico del LCR normal y VDRL en LCR no reactivo **Pregunta 3**.

En ese momento la prueba de VDRL en Bruno dio 1:128. Las radiografía de huesos largos y el fondo de ojo no mostraron alteraciones.

Durante el primer mes de hospitalización evolucionó favorablemente, mejoraron las pruebas hepáticas, se completó el tratamiento antibiótico durante el tiempo indicado en estos casos y fue notoria la buena evolución.

Pregunta 1: como realiza el diagnóstico serológico de sífilis, cuáles son las ventajas y desventajas de las diferentes metodologías

Pregunta 2: El neonatólogo está decidido a llegar al diagnóstico etiológico definitivo. ¿Podrá usted conocer de antemano los estudios que solicitaría y durante cuánto tiempo?

Pregunta 3: que raro una VDRL en LCR? ¿Cuál sería su utilidad?

³ Rosanna W. Peeling, David Mabey, Mary L. Kamb, Xiang-Sheng Chen, Justin D. Radolf and Adele S. Benzaken. Syphilis. Nat Rev Dis Primers. 2017 Oct 12;3:17073. doi: 10.1038/nrdp.2017.73.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Diagnóstico de sífilis congénita (material anexo de lectura)

Tabla 1 Manifestaciones precoces y tardías de sífilis congénita

Signos y síntomas precoces	Signos y síntomas tardíos
Fascie: Rinitis purulenta o serosanguinolenta (14%)	Dentadura: dientes hutchinson, molares en forma de mora
Piel: Condiloma lata, parches mucosos, Ictericia, rash eritematoso, lesiones descamativas palmo-plantares (pénfigo sifíltico) (68%)	Ojos: queratitis intersticial, corioretinitis, glaucoma secundario (uveitis), úlcera corneal
Manifestaciones del sistema nervioso central (SNC): elevación de proteínas y/o del recuento celular del LCR, Neurosífilis (23%)	Oído: hipoacusia o sordera
Hueso: Osteocondritis, pericondritis, desmineralización ósea (78%)	Fascie: nariz en silla de montar, mandíbula prominente
Hematológicos: Leucocitosis, leucopenia, anemia no hemolítica, trombocitopenia, coagulación vascular diseminada	Piel y pliegues: rágades
Nefrológico: Síndrome nefrótico	SNC: retardo mental, hidrocefalia, síndrome convulsivo, atrofia del nervio óptico, parálisis de nervios craneales
Pulmonar: Neumonitis alba (17%)	Hueso: tibia en sable, articulación de clutton
Abdominal: Hepatomegalia, esplenomegalia (71%)	
Generales: Fiebre (42%), linfadenopatías generalizadas (14%), ascitis (9%), hidrops fetal no inmune, PEG.	

Sífilis congénita (SC)

SC es ocasionada por una diseminación hematógena del *Treponema pallidum*, lo que provoca una infección generalizada, comprometiendo prácticamente todos los sistemas y tejidos del organismo, siendo piel, mucosas, huesos, hígado, bazo y sistema nervioso central los más afectados.

Se clasifica en SC precoz (manifestaciones clínicas hasta los 2 años de vida) y SC tardía (manifestaciones clínicas en mayores de 2 años), pudiendo dquirirse la infección durante cualquier trimestre del embarazo. El diagnóstico de SC es complejo debido a que existe paso de anticuerpos IgG maternos (treponémicos y no treponémicos) al feto, lo que dificulta la interpretación de los resultados serológicos. Hasta el momento no hay disponible una prueba diagnóstica específica que permita asegurar la presencia de infección en un RN, pero sí existen elementos que orientan a éste. La tabla 2 enumera los criterios de SC como caso confirmado y probable.

Tabla 2. Criterios de diagnóstico confirmado y probable de SC

Caso confirmado	Caso probable
IgM positiva del RN contra <i>T. pallidum</i>	Hijos de madres con sífilis no tratada o inadecuadamente tratada al momento del parto, independiente de los síntomas
Identificación de <i>T. pallidum</i> en: placenta, cordón umbilical y/o tejido de biopsia mediante microscopía de campo oscuro	RN con serología positiva (que no cumple con el criterio en relación a los títulos maternos) asociada a evidencia de sífilis al examen y/o radiografía de huesos largos alterada y/o aumento de células y proteínas en LCR no atribuibles a otra causa
VDRL reactivo en LCR	
Título del RN de la prueba no treponémica (VDRL o RPR), es 4 veces o 2 diluciones sobre el título materno al momento del parto (considerando que a la madre y al RN se les realizó el mismo examen)	
MHA-TP o FTA-Abs positivo al año de vida	

La severidad de la infección depende del estadio de enfermedad materna y de la edad gestacional a la cual es adquirida la infección. A menor estadio de infección materna mayor es el riesgo de transmisión vertical, presentándose en sífilis primaria un 70-100% de casos de SC, en sífilis secundaria un 67%, en latente precoz 40-83%, latente tardía 10% y terciaria, a pesar de ser dudosa en esta etapa la transmisión, se describe que puede ocurrir hasta en un 8%.

Sigue siendo conflictivo y difícil efectuar la confirmación de sífilis congénita. El desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas como inmunoensayos enzimáticos, inmunoblot específico para IgM o reacción de polimerasa en cadena (RPC), han intentado aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico pero no siempre se cuenta con laboratorio especializado. Los ensayos serológicos han de realizarse en suero del niño y no en sangre de cordón por la posibilidad de contaminación con sangre materna.

La detección de IgM es el método serológico con mayor especificidad en la actualidad y se considera como evidencia de infección congénita por *T. pallidum*, ya que, la IgM no cruza la barrera placentaria, sin embargo, su sensibilidad dista mucho de ser óptima teniendo hasta un 25% de falsos negativos y no siempre se cuenta con dicha prueba.

Aunque se pensó que el uso de la biología molecular, especialmente el rol de la PCR, en el diagnóstico de sífilis sería promisorio en este tipo de casos, hasta ahora la mayor utilidad que tiene este test es en el diagnóstico de lesiones de sífilis primaria con una sensibilidad que fluctúa entre 82-95% y una especificidad entre 95-100%, en el caso de sífilis secundaria la sensibilidad baja a 50%, en la mayoría de los estudios con una especificidad del 100%.

La gran mayoría de los niños no logran diagnosticarse en el período de RN y terminan siendo diagnosticados en forma retrospectiva, gracias al seguimiento serológico con IgG. Si ésta es persistentemente positiva luego del 6 mes de vida o el MHA-TP o FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody-absorption) son positivas al año de vida, se considera SC confirmada.



En la mitología babilónica Innana-Ishtar aparece como una diosa del amor y también como coincidencia de aspectos encontrados. Encarnaba dentro de sí misma polaridades y contrariedades. Ella era, por decirlo de otra manera, una deidad que incorporó paradojas fundamentales e irreductibles. Ella representaba tanto el orden como el desorden, la estructura y la antiestructura. Ishtar es una figura liminal; es andrógina, marginal, ambigua. No está ni aquí ni allá. Ella está en medio.

Inanna-Ishtar as Paradox and a Coincidence of Opposites Author(s): Rivkah Harris Source: History of Religions, Vol. 30, No. 3 (Feb., 1991), pp. 261-278

Inanna-Ishtar

Ella atiende desde muy joven el bar, un bar ubicado en la calle Paraná, cerca de la terminal de colectivos de la Ciudad de Córdoba. Es un bar de características particulares. Creció en ese ambiente de música, humo y alcohol.

En su adolescencia le aparecieron numerosas verrugas en la mano, por lo que acudió una vez a una curandera y luego en varias otras oportunidades. No recuerda si fue el tiempo o la ayuda de la curandera quien hizo que aquellos “testes” - decía ella - le desaparecieran.



Pregunta 1: ¿puede Ud. dar cuenta de la probable etiología? ¿corresponde siempre a una ETS?

Ahora ella se encuentra en su consultorio.

Sentada frente a Ud. está una mujer de 55 años le muestra un un papel arrugado y amarillento que refiere:

Informe de la citología del cérvix uterino: Numerosos coilocitos. Elementos formes con atipia celular. Displasia moderada. CIN III Octubre 2019

Bueno, le refiere, deberá realizar una consulta con el médico ginecólogo.

Además...

Pregunta 2: ¿puede Ud. referir como confirmaría la posible etiología?

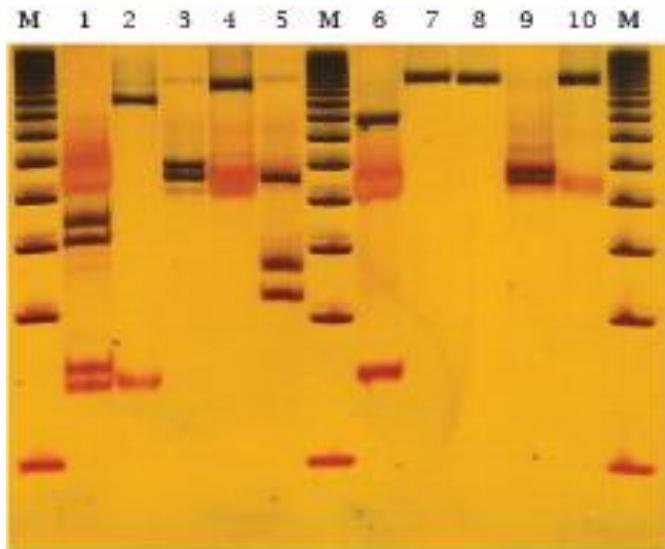


¡Recuerde que en HPV hay genotipos! Sólo se diferencian por sus secuencias genéticas

Detección de VPH por PCR (con “primers” genéricos) y genotipificación por polimorfismos de restricción enzimática (RFLP)

Se basa en el uso de los llamados “primers degenerados” MY09, 11 (Manos y col, 1992); estos permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases, correspondiente a la región L1 del genoma viral. Por ser ésta altamente conservada, es posible de esta manera detectar un amplio espectro de VPHs, que habitualmente infectan el tracto anogenital (cerca de 40 tipos distintos) en una única reacción. La tipificación puede realizarse mediante el análisis del producto amplificado por restricción enzimática (RFLP), usando siete endonucleasa distintas; cada tipo viral puede diferenciarse por un patrón de bandas característico.

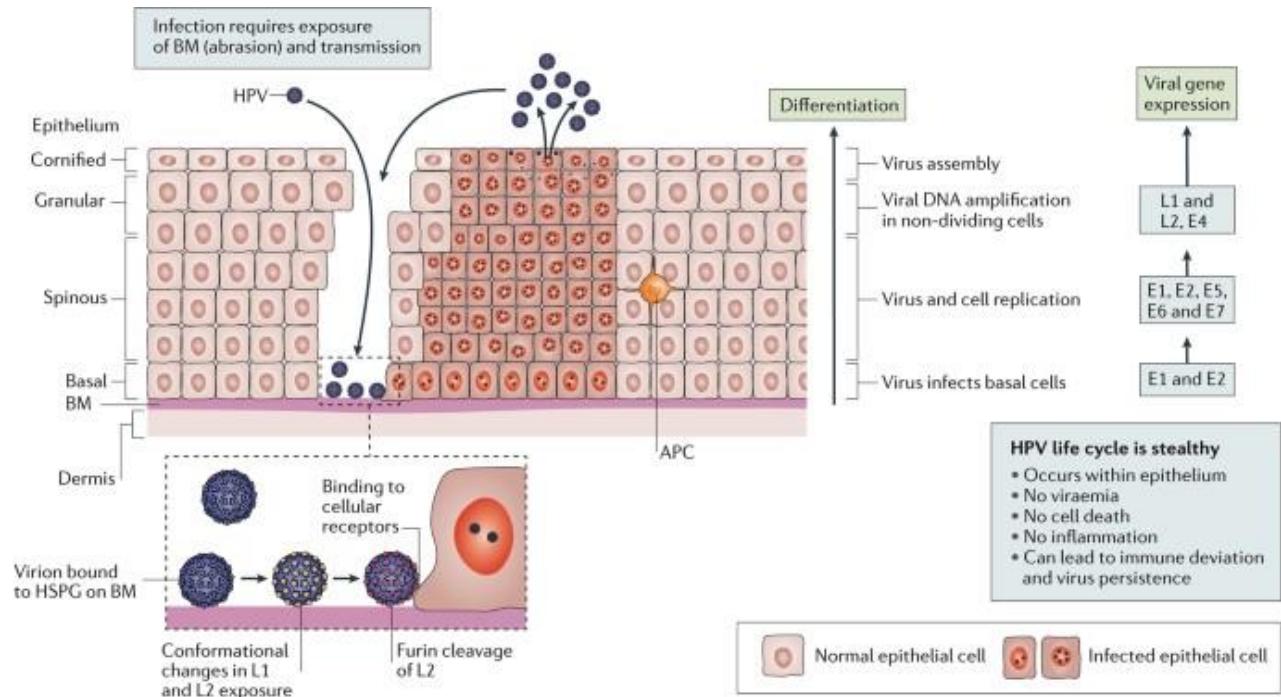
El producto amplificado es digerido por diferentes enzimas de restricción que cortan el ácido nucleico viral en sitios específicos, los que son diferentes para cada genotipo. Finalmente se “corren” en un gel y los diferentes cortes dan lugar a diferentes pesos moleculares de ácido nucleico. La enzima utilizada y el peso molecular correspondiente permiten la lectura del tipo de HPV.



En la figura⁴ se observa luego de una amplificación por PCR de los genotipos HVP 6 y 16. La calle M corresponde a un marcador de peso molecular, el que permite referenciar los diferentes cortes. Las calles 1 a 5 corresponden a productos de amplificación de HPV 6 cortados con las enzimas *Rsa* I, *Dde* I, *Inf* I y *Hae* III. Las calles 6 a 10 a los productos de amplificación de HPV 16 cortados por las mismas enzimas de restricción.

⁴ Patogénesis de la infección viral por HPV. Richard B. S. Roden & Peter L. Stern. Nature Reviews. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer 2018

Pregunta 3. Puede explicar algunos aspectos de la figura siguiente



Nature Reviews | Cancer

En esta figura observa el ingreso de HPV, el cual requiere exposición y lesión de las capas epiteliales. Es posible también observar que el ciclo replicativo de HPV se relaciona con el grado de diferenciación celular. En otros términos a medida que las células se van diferenciando y “ascienden” en el epitelio, los genes de HPV se van expresando desde una infección no productiva en las capas basales, con expresión de genes tempranos (E1, E2, E6 y E7) hacia una infección productiva en las capas más superficiales con síntesis de proteínas estructurales (L1 y L2), las que podrían dar cuenta del efecto citopático (coilocitosis). También se observa una célula presentadora de antígenos (APC). En la transformación neoplásica no hay síntesis de proteínas estructurales.