

# Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales

Luis Otero Guerra<sup>a</sup>, José Antonio Lepe Jiménez<sup>b</sup>, María Antonia Blanco Galán<sup>c</sup>, Javier Aznar Martín<sup>b,d</sup> y Fernando Vázquez Valdés<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de Cabueñes. Gijón. Asturias. España.

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. España.

<sup>c</sup>Unidad de Microbiología. Hospital Santa Cristina. Madrid. España.

<sup>d</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Sevilla. España.

<sup>e</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Monte Naranco. Área de Microbiología. Facultad de Medicina. Oviedo. Asturias. España.

Históricamente, el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual ha sido difícil. La introducción en el diagnóstico microbiológico de las técnicas de biología molecular y su aplicación a muestras no invasivas ha permitido importantes avances en su diagnóstico. En general, la detección de *Neisseria gonorrhoeae* mediante técnicas de biología molecular proporciona un diagnóstico presuntivo y requiere confirmación por cultivo en zonas de baja prevalencia. Para *Chlamydia trachomatis*, estas técnicas se consideran como las más sensibles y específicas, tanto para estudios de cribado poblacional, como para el diagnóstico de pacientes sintomáticos. El diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por cultivo es muy lento, por ello, las técnicas moleculares son las únicas que pueden aportar información diagnóstica relevante. Para *Treponema pallidum*, las técnicas moleculares pueden aportar ventajas en el diagnóstico directo de la infección. Respecto a la donovaniosis, las técnicas moleculares no están establecidas para el diagnóstico sistemático, aunque se recomiendan en manos expertas. En el caso de *Haemophilus ducreyi*, las dificultades del cultivo y su baja sensibilidad aconsejan el uso de métodos moleculares. En el herpes genital, las técnicas moleculares han comenzado a recomendarse para el diagnóstico sistemático y pueden convertirse en la técnica de referencia en poco tiempo. Para otras infecciones genitales, como vaginosis bacteriana, vulvovaginitis candidiásica y tricomoniasis, los métodos moleculares para el diagnóstico están poco establecidos. Respecto a las verrugas genitales, las técnicas de cribado y genotipado disponibles para muestras endocervicales podrían utilizarse para ciertas poblaciones, aunque no se han validado para este cometido.

**Palabras clave:** Biología molecular. Enfermedades de transmisión sexual. Gonococia. *Neisseria gonorrhoeae*. *Chlamydia trachomatis*. Herpes genital.

Utility of molecular biology techniques in the diagnosis of sexually transmitted diseases and genital infections

Historically, the diagnosis of sexually transmitted diseases (STDs) has been difficult. The introduction of molecular biology techniques in microbiological diagnosis and their application to non-invasive samples has produced significant advances in the diagnosis of these diseases. Overall, detection of *Neisseria gonorrhoeae* by molecular biology techniques provides a presumptive diagnosis and requires confirmation by culture in areas with a low prevalence. For *Chlamydia trachomatis* infections, these techniques are considered to be the most sensitive and specific procedures for mass screening studies, as well as for the diagnosis of symptomatic patients. Diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infection by culture is very slow and consequently molecular techniques are the only procedures that can provide relevant diagnostic information. For *Treponema pallidum*, molecular techniques can provide direct benefits in the diagnosis of infection. Molecular techniques are not established for the routine diagnosis of donovaniosis, but can be recommended when performed by experts. Molecular methods are advisable in *Haemophilus ducreyi*, because of the difficulties of culture and its low sensitivity. In genital herpes, molecular techniques have begun to be recommended for routine diagnosis and could soon become the technique of choice. For other genital infections, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidosis and trichomoniasis, diagnosis by molecular methods is poorly established. With genital warts, techniques available for screening and genotyping of endocervical samples could be used for certain populations, but are not validated for this purpose.

Correspondencia: Dr. F. Vázquez Valdés.  
Servicio de Microbiología. Hospital Monte Naranco.  
Avda. Dres. Fernández-Vega, 107. 33012 Oviedo. España.  
Correo electrónico: fvazquez@uniovi.es

**Key words: Molecular biology. Sexually transmitted diseases. Gonorrhoea. *Neisseria gonorrhoeae*. *Chlamydia trachomatis*. Herpes genitalis**

## Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) causan enfermedades que tienen como consecuencia discapacidad, infertilidad y muerte, además de facilitar la transmisión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En los últimos años, las ITS están experimentando un incremento en su incidencia. Por ello, han de renovarse los esfuerzos para intentar su control. Uno de los pilares fundamentales es el diagnóstico etiológico mediante técnicas rápidas, sensibles y específicas.

Históricamente, el diagnóstico de las ITS ha sido difícil: infecciones polimicrobianas, microorganismos de cultivo difícil (*Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* o *Haemophilus ducreyi*), bajo número de microorganismos y antígenos insuficientes para la estandarización técnica. La introducción en la década de los años noventa de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), la incorporación de nuevas muestras no invasivas, como la orina (primera parte de la micción), y la secuenciación del genoma de patógenos, como *C. trachomatis*, *T. pallidum* o *Mycoplasma genitalium*, han permitido importantes avances en su diagnóstico. A continuación, se hace una revisión de las principales novedades que en el campo de la biología molecular han experimentado las ITS.

### *Neisseria gonorrhoeae*

Aunque el cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de la gonococia, no hay duda de que los métodos moleculares tienen una serie de ventajas, como que mejoran la sensibilidad, son útiles para el cribado (tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos), permiten efectuar el diagnóstico a partir de muestras no invasivas (orina) y de muestras recogidas por el propio paciente, son fiables y requieren condiciones de transporte menos estrictas (no precisan de organismos viables). Como desventajas, ocasionalmente producen re-

sultados falsamente positivos o negativos, tienen un coste alto, pueden presentar contaminación de arrastre e inhibición de la reacción, tienen requerimientos elevados de control de calidad y no aportan datos de resistencia antimicrobiana<sup>1,2</sup>.

A partir de la medicina basada en pruebas, se considera que la detección de *N. gonorrhoeae* mediante las TAAN proporciona un diagnóstico presuntivo (grado de recomendación C), y se requiere confirmación por cultivo en zonas de baja prevalencia. En muestras rectales y faríngeas, las TAAN parecen tener más sensibilidad que el cultivo (grado de recomendación C), pero aún no se recomiendan para estas muestras. En mujeres, son válidas las muestras de orina, si no se va a hacer examen con espéculo (grado de recomendación C). La TAAN está recomendada para orina y otras muestras no invasivas (nivel de evidencia II, grado de recomendación B), si bien su sensibilidad es menor que con muestras endocervicales (nivel de evidencia III), por lo que también puede hacerse en muestras vaginales o tampones (nivel de evidencia III)<sup>3</sup>.

Los métodos de detección de ácidos nucleicos se clasifican en: a) métodos de hibridación, y b) métodos de amplificación. Entre los métodos de hibridación tenemos el GenProbe PACE II (Gen-Probe, San Diego, Estados Unidos) y el ensayo de Digene Hybrid Capture II (Digene Corp, Gaithersburg, Estados Unidos). Ambos utilizan una sonda específica de oligonucleótido, y tienen sensibilidad y especificidad inferior al cultivo. Los métodos de amplificación (TAAN) pueden ser de desarrollo casero (usados en centros de investigación) o comerciales. En la tabla 1 se detallan las características de estos últimos.

Los sistemas comerciales, como el COBAS Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics, Sussex, Reino Unido), tienen una alta sensibilidad y especificidad para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en pacientes sintomáticos y como cribado en poblaciones de alta prevalencia, con valor predictivo positivo (VPP) > 80%, pero en poblaciones de baja prevalencia el VPP para *N. gonorrhoeae* es inaceptable, y ocasiona falsos positivos con otras *Neisseria* spp. y *Lactobacillus*<sup>4</sup>. Aunque para el diagnóstico de la gonococia rectal y faríngea actualmente se recomienda realizar cultivo, las TAAN han puesto de manifiesto que en varones

TABLA 1. Características de los métodos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos para *Neisseria gonorrhoeae*

Característica	Amplicor Roche	SDA ProbeTec Becton Dickinson	LCx Abbott	APTIMA Gen-Probe
Gen diana	Metiltransferasa ADN citosina	Homólogo de la proteína invertidora del gen multicopia pilina	Proteína de opacidad	ARN ribosómico 16S
Tecnología de amplificación	PCR	SDA	LCx	TMA
S (%) -mezcla de orinas*	65-100 (no afectada con 3-4 orinas)	85-100 86,5 (3-4 orinas)	88-97 95,8 (10 orinas)	91-98,5
E (%)	94-100	98-100	98,5-100	98,7-100
Reacción cruzada con otras <i>Neisseriae</i>	<i>N. cinerea</i> , <i>N. flavescens</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i>	<i>N. cinerea</i> , <i>N. flavescens</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. subflava</i>	Ninguna identificada	Ninguna identificada

LCR: reacción en cadena de la ligasa; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SDA: amplificación por desplazamiento de cadena; TMA: amplificación mediada por transcripción.

\*En general, decrecen el límite de detección en un factor de 10.

que tienen relaciones sexuales con varones, la sensibilidad del cultivo es baja (50%). Por ello, las TAAN podrían mejorar el control de la gonococia en esta población.

Los métodos moleculares se utilizan también para tipificar cepas. Los principales métodos de genotipificación descritos<sup>5</sup> son: electroforesis en campo pulsado, tipificación opa (basada en la familia de genes *opa*), secuencias del gen porina (*por*), de fragmentos de *por* y también de *pB* (gen de la subunidad B de la proteína unida a transferrina). Los 2 primeros son más diferenciadores, pero requieren la comparación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) complejos en geles de agarosa o acrilamida. Los 2 últimos se usan juntos para tipificar secuencias multiantígeno (NG-MAST), y tienen la ventaja de que, al basarse en secuencias, sus resultados son fácilmente comparables entre diferentes laboratorios. La concordancia de genotipos de aislados conocidos de contactos sexuales es mayor por NG-MAST que por *opa*.

En años recientes, se están incorporando nuevos métodos moleculares con capacidad de detectar resistencia a penicilina y quinolonas. Uno es el método de sonda de hibridación en la plataforma LightCycler para detectar variaciones en *ponA* y *penA* (2 de los 5 genes que al menos están implicados en la resistencia cromosómica a penicilina: *penA*, *penB*, *mtfR*, *ponA* y *penC*) con buena correlación con la concentración mínima inhibitoria (CMI)<sup>6,7</sup>. Otros son la detección de resistencia a quinolonas<sup>8</sup> mediante la secuenciación o uso de microchips, que requieren recursos amplios, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (RT-PCR) con sondas tipo Taq-Man, que puede dar falsos positivos por errores del laboratorio o falsos negativos por baja concentración de ADN.

#### *Chlamydia trachomatis*

Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estadounidenses recomiendan las TAAN a partir de diversos estudios multicéntricos realizados en todo el mundo, al ser más sensibles y específicas tanto para estudios de cribado poblacional, sea cual sea la prevalencia, como para el diagnóstico de pacientes sintomáticos. Se estima que tienen una especificidad entre el 95 y el 98%, y una sensibilidad entre el 88 y el 90%. Hoy día las técnicas basadas en amplificación de ácidos nucleicos se reconocen como método de referencia para diagnosticar infección por *C. trachomatis*<sup>1</sup> (grado de recomendación A)<sup>9</sup>.

Los sitios de elección para toma de muestras para TAAN son cérvix, uretra y orina (grado de recomendación A)<sup>9</sup>. La Food and Drug Administration (FDA) estadounidense no ha aprobado las tomas de faringe, recto y vulvo-vaginal para métodos de detección de ácidos nucleicos, pero varios estudios demuestran su utilidad<sup>10-12</sup>. Dependiendo del tipo de muestra que se vaya a procesar y de la técnica que se vaya a utilizar para detectar e identificar *C. trachomatis*, se utilizará un tipo específico de torunda y medio de transporte que suministrará la casa comercial respectiva, teniendo en cuenta que el moco y los microbicidas presentes en geles vaginales pueden interferir en la detección de los ácidos nucleicos. En un reciente estudio multicéntrico, dirigido por los CDC, se observó que la sangre menstrual no afectaba a los resultados. Hay varias técnicas para eliminar las sustancias inhibitorias, como la utilización de torundas secas, la dilución de las

muestras, el tratamiento por calor, una combinación de calor y dilución, congelación-descongelación, y el mantenimiento de las muestras a 4 °C. En orinas de mujeres, se puede reducir la inhibición de la amplificación eliminando la orina residual del fondo del tubo. La FDA no ha aprobado la mezcla (*pool*) de muestras para realizar estas pruebas, dado que si la prevalencia de *C. trachomatis* en la población estudiada es baja, aumentan los falsos negativos, debido a que la concentración de ADN en las mezclas es menor.

Las actuales TAAN pueden detectar una sola copia genómica y no necesitan que el microorganismo sea viable. Detectan genes que están presentes en múltiples copias, como los genes del plásmido críptico que están presentes en 10 copias. También son muy específicas, aunque puede haber falsos positivos y falsos negativos. Son las más adecuadas para cualquier población y tipo de muestra, incluso recogidas por el propio paciente. Las técnicas de hibridación usan sondas de ADN específicas marcadas con moléculas quimioluminiscentes, que son complementarias de una secuencia específica de ácido ribonucleico (ARN) ribosómico de *C. trachomatis* (PACE 2, Gen-Probe). Su sensibilidad es del 65%, similar al cultivo e inferior a la de las TAAN, ya que detectan ARN que se altera fácilmente cuando los microorganismos no son viables. Respecto a las TAAN, hay varias comercializadas actualmente, y algunas en desarrollo. PCR Amplicor (Roche) se dirige al plásmido críptico específico que está presente en más del 99% de las cepas. Su sensibilidad y especificidad son del 99 y del 98%, respectivamente. La segunda generación comercial utiliza un analizador automatizado (COBAS Amplicor PCR) y tiene más sensibilidad y especificidad, tanto en muestras de orina como en urogenitales, y tanto en varones como en mujeres. Además, incorpora control de inhibidores. Está aprobada por la FDA.

La amplificación mediada por transcripción (TMA, Gen-Probe) tiene como diana el ARN ribosómico. Es un sistema isotérmico que utiliza amplificación, diana enzimática y detección quimioluminiscente en un solo tubo, y está aprobada por la FDA. Actualmente hay una nueva técnica de TMA: APTIMA Combo 2 (AC2, Gen-Probe) que detecta *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, con escasos problemas de inhibidores de amplificación. Tiene una sensibilidad del 94,2% en torundas endocervicales, y del 94,7% en orina. La especificidad es del 97,6% en endocérvix y del 98,9% en orina. Tiene la mayor sensibilidad de todas las TAAN comercializadas para muestras no invasivas, que pueden contener pequeñas cantidades de ácidos nucleicos. Las torundas vaginales recogidas por la propia paciente son la muestra de elección para el cribado poblacional en mujeres, así como la orina en los varones<sup>13</sup>. Actualmente, se está evaluando la automatización para un gran volumen de muestras (sistema TIGRIS). Otra técnica utilizada es el SDA (Probetec, Becton-Dickinson, Sparks, Estados Unidos), que es una técnica de amplificación con desplazamiento de hebra homogéneo y detección mediante transferencia de energía fluorescente. Es un sistema automatizado, cerrado y de rápidos resultados, aprobado por la FDA. Su sensibilidad es del 95,3% en orina y torunda comparada con PCR Amplicor. Los espermocidas y los aerosoles producen interferencias en la prueba. Está en desarrollo una RT-PCR (Rotor-Gene 3000m, Corbett Robotics, Australia), con amplificación en

una sola reacción de 3 dianas: plásmido críptico, MOMP (*major outer membrane protein*) y un control interno. Detecta todas las genovariedades, incluidas las del linfogranuloma venéreo (LGV), sin reacción cruzada con bacterias de faringe o tracto vaginal. Esta técnica demostró un 100% de correlación con resultados de PCR Amplicor (Roche), y puede utilizarse también para detectar *N. gonorrhoeae*.

Los métodos de subtipificación molecular se basan en el gen *Omp1* de la proteína externa principal (MOMP), mediante el análisis de polimorfismos de restricción de fragmentos largos o la secuenciación de fragmentos de genes amplificados por PCR. No se ha observado asociación entre gravedad clínica y subtipo, y las manifestaciones clínicas de la infección no parecen estar influidas por la serovariedad infectante<sup>14</sup>.

Las TAAN no están aprobadas para diagnóstico de LGV en muestras rectales, pero los datos disponibles apoyan su uso (nivel de evidencia III, grado de recomendación B). La confirmación de LGV se puede hacer mediante RT-PCR con cebadores y sondas específicos, genotipificación (con el gen *Omp1*) o el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *Crp* (nivel de evidencia III, grado de recomendación B). En proctitis, cualquier prueba positiva de TAAN se investigará mediante RT-PCR y genotipificación (nivel de evidencia III, grado de recomendación B)<sup>15</sup>, y así comprobar si se trata o no de las variedades de *C. trachomatis* causantes de LGV.

Hay una nueva variante de *C. trachomatis* (variante swCT) que contiene una supresión de 377 pares de bases en el plásmido críptico, la región diana para las TAAN fabricadas por Roche (Cobas Amplicor y Cobas Taqman 48). Las técnicas que no usan el plásmido críptico como diana de detección (Probetec, Becton Dickinson; Aptima Combo 2, Gen-Probe; Real Art Ct Kit, Qiagen) sí pueden detectar esta variante. Hasta el momento, esta variante parece restringida a Suecia, aunque se han detectado casos aislados en Dinamarca, Noruega, Irlanda y Francia en individuos en contacto con pacientes suecos. Esta situación parece deberse a que las técnicas que se usan en Suecia (Cobas Amplicor y Cobas Taqman, Roche), que no detectan la variante swCT, han podido seleccionar esta cepa. Por el contrario, en la cercana Dinamarca, el uso mayoritario de la técnica de SDA (Becton-Dickinson) que sí las detecta no ha favorecido su selección<sup>16</sup>.

Por último, está aumentando la evidencia de que, además de *C. trachomatis*, otras *Chlamydia* spp. y nuevos microorganismos identificados como *Chlamydia-like*, que son flora comensal vaginal, pueden estar implicados en enfermedad obstétrica en humanos, como pérdidas fetales, partos prematuros, etc. Para establecer con claridad su patogenia, se están desarrollando nuevos métodos diagnósticos que permitirán en los próximos 10 años establecer nuevas estrategias preventivas<sup>17</sup>.

#### *Micoplasmas genitales*

Las principales especies de micoplasmas implicados en ITS son *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *M. genitalium*. Las 2 primeras pueden diagnosticarse fácilmente mediante técnicas de cultivo. El diagnóstico de *M. genitalium* es difícil. El cultivo es muy lento (semanas o meses) y de escaso rendimiento. La serología sólo aporta información para estudios epidemiológicos. Por ello,

las técnicas de biología molecular son las únicas que pueden aportar información diagnóstica relevante. Se ha demostrado que *M. genitalium* es productor de enfermedad tanto en varones (uretritis no gonocócica), como en mujeres (cervicitis, uretritis y EIP). Debido a la escasa carga de organismos de *M. genitalium*, deben emplearse técnicas diagnósticas de la máxima sensibilidad. Ello se consigue con las técnicas moleculares, aunque no hay ningún equipo comercializado. Las muestras a estudiar son el exudado uretral, el cervical y la orina de la primera parte de la micción, tanto en varones como en mujeres.

La PCR es el principal método descrito. Se han probado diversas dianas por diferentes autores, y las principales son el gen del ARNr 16S<sup>18</sup>, el de la adhesina *MgPa*<sup>19</sup>, y el gen *gap* que codifica la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa<sup>20</sup>, desarrollada mediante RT-PCR. Se han descrito también métodos que detectan 2 genes de forma simultánea (ARNr 16S y adhesina *MaPa*), y metodologías distintas a la PCR, como la TMA (Gen-Probe, uso investigational), que tiene por diana el ARN ribosómico<sup>21</sup>. El uso de estas metodologías en desarrollo investigacional y de ejecución casera debe hacerse con sumo cuidado, empleando todos los controles de calidad posibles para evitar resultados erróneos y sólo en casos especiales, en los que no se haya alcanzado el diagnóstico etiológico, a pesar de haber buscado los microorganismos patógenos habituales.

#### *Treponema pallidum*

El diagnóstico habitual es el serológico, pero en estadios muy tempranos de la infección su sensibilidad es baja. Por ello, las pruebas de diagnóstico directo adquieren importancia en estos primeros estadios. Sin embargo, tanto la microscopia de campo oscuro como la inmunofluorescencia presentan limitaciones de sensibilidad y especificidad, y requieren personal experimentado.

Las técnicas de biología molecular pueden aportar ventajas en el diagnóstico directo de la infección por *T. pallidum*. Por el momento, no hay técnicas comercializadas, y las descritas en la bibliografía se han desarrollado en centros de referencia. Se han descrito diferentes técnicas que amplifican genes de *T. pallidum*. Mediante una RT-PCR que amplifica una región de 366 pb del ARNr 16S, se obtiene una extraordinaria sensibilidad (10<sup>-3</sup> organismos), lo que condiciona la existencia de contaminaciones cruzadas<sup>22</sup>, por lo que se precisa la realización de un *Southern blot* para confirmar su especificidad. La PCR que amplifica el gen de la ADN polimerasa I presenta una sensibilidad de 10-25 organismos, pero es muy laboriosa<sup>23</sup>. Posteriormente, se desarrolló en formato RT-PCR<sup>24</sup>. Una de las técnicas más referenciadas<sup>25</sup> amplifica el gen de la proteína de 47 kDa. Su éxito estriba en que se ha presentado en formato multiplex frente a otras 2 causas de úlceras genitales: *Haemophilus ducreyi* y virus del herpes simple (VHS) tipos 1 y 2. Su sensibilidad varía entre el 91 y el 95%. Esta técnica no se ha comercializado. Otros campos de interés de la biología molecular de *T. pallidum* son la tipificación mediante RFLP de los genes *tpr* y *arp*<sup>26</sup>, así como la detección de resistencia a antimicrobianos mediante RT-PCR<sup>27</sup>.

#### *Donovaniosis*

*Klebsiella granulomatis* es la causa de la donovaniosis o granuloma inguinal, una enfermedad ulcerada y crónica

ca de la región genital. La enfermedad es endémica en la India, Papúa-Nueva Guinea, Australia y el sur de África. No hay un método de referencia para el diagnóstico de la donovanososis, y en general la microscopía es la única técnica disponible<sup>28</sup>. Las técnicas moleculares no están generalmente incorporadas al diagnóstico sistemático, aunque son recomendables en manos expertas (nivel de evidencia II, grado de recomendación B)<sup>29</sup>. Las técnicas de PCR se realizan a partir de material de biopsia de la úlcera y amplifican una región de 700 pb del gen *phoE*<sup>30,31</sup>.

### *Haemophilus ducreyi*

Debido a las dificultades del cultivo y su baja sensibilidad para el diagnóstico de las infecciones por *H. ducreyi*, actualmente se considera de elección el uso de métodos moleculares<sup>32,33</sup>. Las sondas de ADN (detectan 10<sup>4</sup> UFC), y sobre todo la PCR, son técnicas prometedoras, aunque no hay sistemas comerciales. La PCR presenta una sensibilidad del 95% comparada con el cultivo y el cultivo tiene una sensibilidad del 75% cuando se compara con la PCR. Emplea cebadores derivados de las secuencias internas de la región espaciadora intergénica ribosómica *rrS* (16S), *rrL* (23S) y *recD*. Se ha descrito un formato multiplex (*H. ducreyi*, *T. pallidum* y VHS tipos 1 y 2) no comercial para úlceras genitales, que detecta entre 1 y 10 organismos, aunque presenta problemas de inhibiciones. Debido a los altos costes de las técnicas moleculares, en países en vías de desarrollo es necesario seguir investigando en técnicas rápidas y sencillas, como la inmunocromatografía, basada en el receptor de la hemoglobina HgbA, abundante en la proteína de la membrana externa de *H. ducreyi*, aunque su sensibilidad es menor<sup>34</sup>.

## Herpes genital

El diagnóstico clínico en las formas atípicas del herpes genital es poco sensible y específico, y requiere confirmación microbiológica. El aislamiento del virus en cultivo celular se considera el método de referencia diagnóstico, pero es lento, y aunque tiene una especificidad virtualmente del 100%, su sensibilidad (entre el 30-90%) está muy influida por los valores de excreción de virus, la calidad de la muestra y las condiciones de transporte. Sin embargo, permite realizar estudios de sensibilidad a los antivirales y de clonalidad. Debido a los problemas de sensibilidad del cultivo, las técnicas moleculares, sobre todo la PCR, han comenzado a recomendarse para el diagnóstico sistemático. Pero, aunque el uso de la PCR es un estándar para diagnosticar la infección del sistema nervioso central por el VHS, no ocurre lo mismo en la infección genital, en parte influenciado por los problemas de amplificación del ADN viral por inhibidores en las muestras que presentaban las técnicas más antiguas.

Se han descrito numerosos protocolos de amplificación de señal o de diana para la detección de los VHS en muestras genitales, algunos de los cuales se han comercializado en algún momento (Hybrid capture II, Digene, Estados Unidos). Respecto a las técnicas de PCR, en general amplifican secuencias conservadas de los genes que codifican las glucoproteínas de superficie gD y gB, la ADN polimerasa o timidín quinasa viral. Los formatos cualitativos de PCR anidada y multiplex han sido, hasta hace po-

co tiempo, los más empleados. Hay muchos estudios que comparan el cultivo celular frente a técnicas moleculares para la detección del VHS en muestras mucocutáneas<sup>35-39</sup>, y muestran que la PCR incrementa el porcentaje de detección del VHS en un 11-41% en comparación al cultivo. Debido a ello, muchos autores consideran que las técnicas de PCR deberían recomendarse como método diagnóstico para el herpes genital (nivel de evidencia Ib, grado de recomendación A)<sup>35-39</sup>. Actualmente, se han redefinido los criterios óptimos de positividad de las técnicas de PCR, con la disminución del umbral de detección de 500 a 50 copias/ml, lo que ha mejorado aún más la sensibilidad sin afectar a la especificidad<sup>40</sup>.

Entre los métodos moleculares disponibles actualmente, parece que la RT-PCR, que amplifica una región de 225 pb del gen de la ADN polimerasa, es el más aceptado. Esta técnica incrementa un 25% el número de muestras positivas, y permite identificar el tipo viral de los aislamientos y disminuir el tiempo medio de respuesta a unas 4 h<sup>41</sup>. La posibilidad de genotipado a partir del análisis de las curvas de fusión es un valor añadido a este tipo de técnicas, debido al diferente pronóstico de las infecciones por VHS1 y VHS2<sup>42</sup>. Estas técnicas aportan a veces resultados difíciles de interpretar, y se han propuesto técnicas de secuenciación o pirosecuenciación para resolver estos problemas, aunque con difícil aplicación en el diagnóstico sistemático<sup>43,44</sup>.

### *Trichomonas vaginalis*

Para el diagnóstico molecular de este parásito, se han diseñado 2 tipos de pruebas: a) hibridación molecular con sondas genéticas (Affirm VP III, Becton-Dickinson), que requiere 45 min, con una sensibilidad y especificidad del 83 y el 100%, respectivamente, en comparación con el cultivo y el examen en fresco, y b) detección por PCR, que se ha desarrollado de forma casera, con distintos ADN diana y cebadores, con una sensibilidad mayor que el cultivo (nivel de evidencia II, grado de recomendación B). Las dianas más usadas son: gen ribosomal 18S del parásito, gen ribosomal 16S-like TV1/TV2<sup>45</sup>, secuencia A6p, TVA5/TVA6<sup>46</sup>, secuencia de 2000 pb repetitiva en el genoma de *Trichomonas vaginalis* TVK3/TVK7<sup>47</sup>, betatubulina, BTUB9/BTUB2<sup>48</sup>, IP1/IP2<sup>49</sup> y familia de genes Tv- E650, OP/IP<sup>50</sup>. Los métodos tradicionales de PCR requieren detección postamplificación de productos, que es laboriosa y puede dar errores. La RT-PCR Roche LightCycler mejora la precisión y elimina la necesidad de un procesado postamplificación, y tiene una sensibilidad del 90,1% y una especificidad del 100%. Mediante una única torunda como la BD ProbeTec ET Culturette *direct dry swab system*, se puede detectar *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *T. vaginalis*<sup>51</sup>, con un límite de detección para *T. vaginalis* de < 0,2 organismos por reacción (40 copias/ml) con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 99,6%, donde la sensibilidad es un 40% mayor que la del cultivo<sup>52</sup>. Para el análisis filogenético, se han realizado técnicas, como el RAPD (ADN polimórfico ampliado al azar) para estudiar asociaciones con el origen geográfico, resistencia a metronidazol y gravedad de la enfermedad, pero no se ha encontrado asociación con virulencia in vitro. Actualmente, y aunque su coste es elevado, las técnicas moleculares tendrán interés como métodos diagnósticos simultáneos de varias infecciones.

## Verrugas genitales

El diagnóstico de las verrugas genitales y la infección subclínica por papilomavirus se realiza mediante la visualización y, en algunos casos, la aplicación de ácido acético y/o empleo de lente de aumento<sup>53</sup>. La biopsia de la verruga genital no está recomendada de forma habitual, y tiene indicaciones muy precisas, como son los casos de pigmentación, hemorragia, estudio de pacientes inmunodeprimidos o no respuesta al tratamiento. No hay datos que indiquen que la identificación del genotipo infectante aporte valor añadido al diagnóstico sistemático (nivel de evidencia IV, grado de recomendación C)<sup>53,54</sup>.

Sin embargo, aunque las verrugas genitales se asocian generalmente a tipos de riesgo bajo, en ciertas circunstancias se han encontrado en una pequeña proporción de pacientes genotipos de alto riesgo, sobre todo en aquellos con inmunodeficiencia. Además, algunos de estos pacientes pueden estar infectados por varios genotipos<sup>55</sup>. Por lo tanto, el estudio molecular podría tener justificación en algunas ocasiones, como es el caso de la prevención del cáncer anal, una entidad rara asociada a papilomavirus de alto riesgo<sup>56</sup>, cuya incidencia parece aumentada en ciertas poblaciones de pacientes infectados por el VIH, así como en la prevención del cáncer de pene en pacientes procedentes de países poco desarrollados de América Latina, África y Asia<sup>57,58</sup>. Además, estudios recientes ponen de manifiesto la necesidad del conocimiento previo del tipo y la carga viral en la predicción del resultado del tratamiento con imiquimod, por lo que en ciertas ocasiones el diagnóstico molecular en el condiloma acuminado podría tener interés clínico<sup>59</sup>.

Las técnicas moleculares disponibles para muestras cervicales podrían utilizarse, aunque no validadas para este cometido, en las circunstancias antes descritas, para el tratamiento de las verrugas genitales. En general, parece razonable que en este tipo de muestras la detección del genotipo infectante podría ayudar a una estratificación más precisa del riesgo. Por lo tanto, la necesidad de determinar el genotipo infectante debe ser la premisa para emplear técnicas moleculares en el estudio de las verrugas genitales. Los métodos basados en la amplificación de señal, en general, y de captura de híbridos, en particular –de gran interés en el cribado del cáncer de cérvix–, pueden ser menos interesantes para este cometido al no detectar específicamente el genotipo infectante, aunque hay publicaciones que evalúan su uso<sup>60</sup>. Sin embargo, las técnicas de PCR convencional o en tiempo real mediante consensos MY09, MY011 o PGMY pueden ser más útiles para detectar genotipos individuales e infecciones mixtas, complementándolas con técnicas de RFLP, hibridación inversa o incluso secuenciación. Un enfoque alternativo podría ser el empleo de cebadores específicos para investigar genotipos individuales basados en polimorfismos E6 y E7<sup>61</sup>. Las técnicas de RFLP, que son poco interesantes para determinar el genotipo infectante en muestras de cérvix, dada la dificultad de interpretación en el caso de infecciones mixtas, pueden emplearse con seguridad para este cometido, donde la presencia de infección por múltiples genotipos es menos habitual<sup>62,63</sup>. Las técnicas de PCR con *line blot hybridization*, con capacidad de detectar 37 genotipos del virus del papiloma humano mediante hibridación selectiva con oligonucleótidos inmovilizados en

membranas de nilón, podrían adaptarse adecuadamente al estudio de este tipo de muestras, aunque se hayan evaluado principalmente en muestras cervicales<sup>64</sup>.

## Otras infecciones genitales: vaginosis bacteriana y vulvovaginitis candidiásica

Una característica común en estas infecciones es que los microorganismos implicados forman parte de la microbiota vaginal normal. La vaginosis bacteriana es el resultado de la infección por comunidades bacterianas complejas, en la que muchos de los microorganismos no son cultivables. A partir de lo mencionado anteriormente, los métodos moleculares para el diagnóstico de la vaginosis están poco establecidos y, en general, se comparan a la tinción de Gram que se considera el método de referencia diagnóstico, aunque no hay evidencia suficiente que lo respalde. La problemática respecto al diagnóstico de las candidiasis es muy similar. Sólo se debe dar significación a los hallazgos de *Candida* en el contexto clínico de una vulvovaginitis. Los métodos moleculares están poco desarrollados, y su principal utilidad está en los casos en los que se necesiten resultados más rápidos que los que ofrece el cultivo. Por ello, las referencias de la bibliografía suelen comparar estas técnicas con la microscopía.

En general, habría que agrupar los métodos moleculares en los que están comercializados y los que están en fase de investigación. Entre los comercializados, se encuentra un nuevo método de hibridación molecular, semiautomatizado, basado en la utilización de sondas de ADN (Affirm VPIII, Becton-Dickinson) que detecta *T. vaginalis*, *Candida* spp. y altas concentraciones de *Gardnerella vaginalis*. La evaluación de la hibridación de ADN en mujeres con síntomas de vaginosis refleja una sensibilidad del 87,7% y una especificidad del 96% frente a la tinción de Gram<sup>65</sup>. Igualmente, se ha demostrado que es más sensible que el examen en fresco para detectar la presencia de *Candida* spp.<sup>66</sup>.

### Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae Infections- 2000. MMWR. 2002;51(N. RR-15):1-38.
- Smith DW, Tapsall JW, Lum G. Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid and detection tests for Neisseria gonorrhoeae in Australia: A position paper on behalf of the Public Health Laboratory Network. Clin Infect Dis. 2005;29:358-65.
- Bignell C, Ison CA, Jungmann E. Gonorrhoea. Sex Transm Infect. 2006;82(Suppl IV):iv6-9
- Mangold KA, Regner M, Tajuddin M, Tajuddin AM, Jennings L, Du H, et al. Neisseria species identification assay for the confirmation of Neisseria gonorrhoeae-positive results of the COBAS Amplicor PCR. J Clin Microbiol. 2007;45:1403-9.
- Bilek N, Martin IM, Bell G, Kinghorn GR, Ison CA, Spratt BG. Concordance between Neisseria gonorrhoeae genotypes recovered from known sexual contacts. J Clin Microbiol. 2007;45:3564-7
- Vernel-Pauillac F, Merien F. A novel real-time duplex PCR assay for detecting penA and ponA genotypes in Neisseria gonorrhoeae: Comparison with phenotypes determined by the E-test. Clin Chem. 2006;52:2294-6.

7. Vernel-Pauillac F, Falcot V, Whiley D, Merien F. Rapid detection of a chromosomally mediated penicillin resistance-associated ponA mutation in *Neisseria gonorrhoeae* using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;255:66-74.
8. Siedner MJ, Pandori M, Castro L, Barry P, Whittington WL, Liska S, et al. Real-time PCR assay for detection of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1250-4.
9. Jespersen DJ, Flatten KS, Jones MF, Smith TF. Prospective comparison of cell cultures and nucleic acid amplification tests for laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5324-6.
10. Cosentino LA, Landers DV, Hillier SL. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3592-6.
11. Shafer MA, Moncada J, Boyer CB, Betsinger K, Flinn SD, Schachter J. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4395-9.
12. Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA, Martin DH, Van Der Pol B, Rice PA, et al. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3784-9.
13. Chong S, Jang D, Song X, Mahony J, Petrich A, Barriga P, et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. *J Clin Microbiol.* 2003;41:778-82.
14. Vázquez F, Otero L, Ordás J, Junquera ML, Varela JA. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:392-411.
15. Herring A, Richens J. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect.* 2006;82(Suppl IV):S23-S225.
16. Results of a Europe-wide investigation to assess the presence of a new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Euro Surveill.* 2007;12(10).
17. Baud D, Regan L, Greub G. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organism in adverse pregnancy outcomes. *Current Opinion Infect Dis.* 2008;21:70-6.
18. Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2003;41:261-6.
19. Svenstrup HF, Jensen JS, Björnelius E, Lidbrink P, Birkelund S, Christiansen G. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3121-8.
20. Jensen JS, Uldum SA, Søndergård-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1991;29:46-50.
21. Wroblewski JK, Manhart LE, Dickey KA, Hudspeth MK, Totten PA. Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3306-12.
22. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1348-52.
23. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1941-6.
24. Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *J Clin Microbiol.* 2007;45:93-6.
25. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol.* 1996;34:49-54.
26. Pope V, Fox K, Liu H, Marfin AA, Leone P, Peña AC, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *Clin Microbiol.* 2005;43:3743-6.
27. Pandori MW, Gordones C, Castro L, Engelman J, Siedner M, Lukehart S, et al. Detection of azithromycin resistance in *Treponema pallidum* by real-time PCR. *J Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3425-30.
28. Vázquez F, Lepe JA, Otero L, Blanco MA, Aznar J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:32-7.
29. Richens J. Donovanosis (granuloma inguinale). *Sex Transm Infect.* 2006;82(Suppl 4):S21-S22.
30. Mackay IM, Harnett G, Jeoffreys N, Bastian I, Sriprakash KS, Siebert D, et al. Detection and discrimination of herpes simplex viruses, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and *Calymatobacterium* (Klebsiella) *granulomatis* from genital ulcers. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1431-8.
31. Carter J, Bowden FJ, Sriprakash KS, Bastian I, Kemp DJ. Diagnostic polymerase chain reaction for donovanosis. *Clin Infect Dis.* 1999;28:1168-9.
32. Johnson SR, Martin DH, Cammarata C, Morse SA. Alterations in sample preparation increase sensitivity of PCR assay for diagnosis of chancroid. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1036-8.
33. Totten PA, Kuypers JM, Chen CY, Alfa MJ, Parsons LM, Dutro SM, et al. Etiology of genital ulcer disease in Dakar, Senegal, and comparison of PCR and serologic assays for detection of *Haemophilus ducreyi* infection. *J Clin Microbiol.* 2000;38:268-73.
34. Patterson K, Olsen B, Thomas C, Norn D, Tam M, Elkins C. Development of a rapid immunodiagnostic test for *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3694-702.
35. Scoular A, Gillespie G, Carman WF. Polymerase chain reaction for diagnosis of genital herpes in a genitourinary medicine clinic. *Sex Transm Infect.* 2002;78:21-5.
36. Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis.* 2003;188:1345-51.
37. Slomka MJ, Emery L, Munday PE, Moulds M, Brown DW. A comparison of PCR with virus isolation and direct antigen detection for diagnosis and typing of genital herpes. *J Med Virol.* 1998;55:177-83.
38. Koenig M, Reynolds KS, Aldous W, Hickman M. Comparison of Light-Cycler PCR, enzyme immunoassay, and tissue culture for detection of herpes simplex virus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;40:107-10.
39. Van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *J Clin Microbiol.* 2003;41:576-80.
40. Magaret AS, Wald A, Huang M, Selke S, Corey L. Optimizing PCR Positivity Criterion for Detection of Herpes Simplex Virus DNA on Skin and Mucosa. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1618-20.
41. Ramaswamy M, McDonald C, Smith M, Thomas D, Maxwell S, Tenant-Flowers M, et al. Diagnosis of genital herpes by real time PCR in routine clinical practice. *Sex Transm Infect.* 2004;80:406-10.
42. Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16:92-8.
43. Issa NC, Espy MJ, Uhl JR, Smith TF. Sequencing and Resolution of Amplified Herpes Simplex Virus DNA with Intermediate Melting Curves as Genotype 1 or 2 by LightCycler PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1843-45.
44. Adelson ME, Feota M, Trama J, Milton RC, Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol.* 2005;33:25-34.
45. Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, Gottlieb A, Soto G, Tuero I, et al. 18S Ribosomal DNA-Based PCR for Diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2683-7.
46. Riley DE, Roberts MC, Takayama T, Krieger JN. Development of a Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol.* 1992;30:465-72.
47. Kengne P, Veas F, Vidal N, Rey JP, Cuny G. *Trichomonas vaginalis*: Repeat DNA Target for Highly Sensitive and Specific Polymerase Chain Reaction Diagnosis. *Cell Mol Biol.* 1994;40:819-31.
48. Madico G, Quinn TC, Rómpalo, Mckeck JR KT, Gydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3205-10.
49. Shao MF, Lin PR, Liu JY. Colorimetric One-Tube Nested PCR for Detection of *Trichomonas vaginalis* in Vaginal Discharge. *J Clin Microbiol.* 1997;35:132-8.
50. Paces J, Urbánková V, Urbánek P. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biol Parasitol.* 1992;54:247-56.
51. Caliendo AM, Jordan JA, Green AM, Ingersoll J, Diclemente RJ, Wingood GM. Real-time PCR improves detection of *Trichomonas vaginalis* infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005;13:145-50.
52. Simpson P, Higgins G, Qiao M, Waddell R, Kok T. Real-time PCRs for detection of *Trichomonas vaginalis* beta-tubulin and 18S rRNA genes in female genital specimens. *J Med Microbiol.* 2007;56:772-7.
53. Maw R, on behalf of the HPV Special Interest Group of BASHH. Anogenital warts. *Sex Transm Infect.* 2006;82:40-1.
54. Guidelines for treatment of genital warts. *MMWR.* 1998;47:88-9.
55. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3316-22.
56. Frisch M, Fenger C, Van den Brule AJ, Sørensen P, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomavirus. *Cancer Res.* 1999;59:753-7.
57. Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamson M, Papenfuss MR, Dunne EF, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:1107-14.

58. Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Vaught LC, Kornegay JR, et al. Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis.* 2003;187:1064-70.
59. Sanclemente G, Herrera S, Tyring SK, Rady PL, Zuleta JJ, Correa LA, et al. Human papillomavirus (HPV) viral load and HPV type in the clinical outcome of HIV-positive patients treated with imiquimod for anogenital warts and anal intraepithelial neoplasia. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21:1054-60.
60. Roka F, Roka J, Trost A, Schalk H, Zagler C, Kirnbauer R, et al. Anal human papillomavirus testing with Digene's hybrid capture 2 using two different sampling methods. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:62-6.
61. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV detection methods. *Dis Markers.* 2007;23:273-81.
62. Wang TS, Chou HF, Liu WM, Choo KB. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence-labeled PCR fragments. *J Med Virol.* 1999;59:536-40.
63. Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes.* 1992;6:145-52.
64. Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Schiffman M. Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol.* 2008;46:109-17.
65. Gazi H, Degerli K, Kurt O, Teker A, Uyar Y, Caglar H, et al. Use of DNA hybridization test for diagnosing bacterial vaginosis in women with symptoms suggestive of infection. *APMIS.* 2006;114:784-7.
66. Brown HL, Fuller DD, Jasper LT, Davis TE, Wright JD. Clinical evaluation of Affirm VP1 in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12:17-21.