



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en adolescentes y adultas jóvenes embarazadas en tres centros de salud del Estado de Morelos

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
Regina Berenice Hurtado Arroyo**

**CODIRECTORES
Dra. Antonia Herrera Ortiz
Dra. Dayana Nicté Vergara Ortega**

CUERNAVACA, MORELOS

Mayo, 2022



Cuernavaca, Morelos a 28 de febrero de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Regina Berenice Hurtado Arroyo**, con el título del trabajo: **Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en adolescentes y adultas jóvenes embarazadas en tres centros de salud del Estado de Morelos.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR	FIRMA
PRESIDENTE: BIOL. NAYELI SÁNCHEZ GUEVARA	_____
SECRETARIO: DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ	_____
VOCAL: DRA. ANTONIA HERRERA ORTIZ	_____
SUPLENTE: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO	_____
SUPLENTE: DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN	_____



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GONCIZ | Fecha:2022-03-28 18:34:43 | Firmante
GCcOv6Sv4kQp1C8kxjBT3K1MhwaHx37C9v4DnApsuONZqVnO65vnm7w4T0rC2NfVurCqjgKXtEY2507jC9416-mX5bcNfTyX7L8im1D7003DkDw6aZanHNgGhVZ3MD
m7pAMW6o1Hk8wJannCC1TVSLD16PQdMOxkCZLpYDre98vKFFPv7vAeWheU3ryC2ytcRucp3ReG654A+e3DRvAWA90kg33frcUa87FTYBc0SLdFec+cmkai4Jfvm7ZP
Nhe13w663nVv+U8v7oVg7nspY2uV7hrRgDhWVQZ5oyvcc0S27H8a+8KnlWUo9Om7==

MIGUEL ANGEL SANCHEZ ALEMÁN | Fecha:2022-03-21 11:33:16 | Firmante
DSX7x1p2dCa9R4XDFvYtHRVE+qOvVmM55pTW0E DnlqPQKMO4b87CFSS5O1100Dm1jgCTC3vU54eUeV7vAeUulNRHEM4T3Dw0CAmryeYACIMucaTjD6K0HjYerYHwW6D
pE10Mk0BRCaK00SBDCC3gALLVhq252gDwd1FDkwhH8EYotJN3d81YACUHS500ZUym6G9GestDUk98MYdCZDVBRv8KRu7vA85Jee4X0bgJst4HGv9c2N800hCec
s119L+8uk6LLFq002ADMIceE1rj7v7KUP6UaF0kK7bD5+3ge1UeDeGc7vrbwFahA==

ANTONIA HERRERA ORTEZ | Fecha:2022-03-03 16:03:04 | Firmante
IymR78Wkbcv5NHC4pAc5gT+mcvduCAem4DFZJg0DngWqV2A83pCaoFvL5eYhAu6ahduAW8OT4ubF8hYN4hH7r12Nvz0GhwarGc+ZaMPhVee0030GhX5c0P45Gj
Jvay7BL30uWAKUc3cCOnQVhYAZP6DL0esgq0MAG+eFm4Tusun1gRBDH0G21stYJAHeCadmHL7ok6Comh0tS3XvHUEngKZ18DcHCh2gPestj0C0KHW+audPevLUT6U
ZaMqWALUKeyF+U8v7oVg7nspY2uV7hrRgDhWVQZ5oyvcc0S27H8a+8KnlWUo9Om7==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2022-03-09 11:46:05 | Firmante
JmvG4jg+AKqP0+mPE2H6A+DooEjE1HhUTQaeRcOulAokUPrZLw5CudbLEDT0rE+mADOMgyGym33Fp+185hdeVbURqPJC7ogZdgpLrRe3h0njerIANP6SEgory6C0Hf
LethC6+UQhMgptAl+eHDAay7bJzoGEhg+CpCkhaRq7uAuvpGoab0EexpW8F1g7hPSYCMkOV8goCJUP60Gmna055gLIe3wP8Uha3CdaHAuqDAM6PmRG688qeds3Rk
TLthLg6b5CmV6vAD6p70c1q40CMIyds+hbV7uP0KICN7Dna92C4p0d7Zg==

MAYELI SANCHEZ GONZALEZ | Fecha:2022-03-11 18:58:45 | Firmante
cFevPWAksooLUw6Fmldgpa4gCM6F0Ca0ag5DKVjgT4CauNn25vVYS40DUX1V1ULLYKVG26U+55wPypR7YSY0GqdrhM8Yp0VY5CP01gJvF3eFD15Tz5CaJ0AG5wcd
PL6wKjYpQvDw8GE13cbUeJha5+RR88g5Sp48aZidT1EKumu+eDudqPqzV6RwASAeFCqddmzgh800x00BCqW6hC6Kq6eWwG1M2+RWAoodUNDHMECmo+OgH
m38h5TS8jByvV7a5pEMU2DEabCgXa106WU00kRfZ3gmOCeymV001ld0dURMwG5VEDTbg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR, ingresando la siguiente clave:



7qgma5MvQ

https://efirma.uaem.mx/nc/Repudicard2RcAD4c7Hk36b1BbJn2emLbawk



Dedicatoria:

A mi madre, eres la persona más importante en mi vida, sé que las palabras me sobran para describir lo agradecida que estoy por a verte tenido y seguirte teniendo a mi lado en todo momento de mi corta vida. Por ti conocí el amor incondicional, sé que siempre estarás ahí para apoyarme. Te dedico este logro y todos lo que nos esperan.

¡Te amo ma!

A la Doc. Antonia, gracias por la oportunidad de ser parte del equipo de trabajo del laboratorio y por todos los aprendizajes que día a día tuve con usted.

A mi codirectora Nicté, Gracias por toda la paciencia y excelente enseñanza que nos diste, eres de las personas más dedicadas que conozco.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	9
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1. CLASIFICACIÓN DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	13
3.2. MORFOLOGÍA	13
3.3. CICLO DE VIDA.....	15
3.4. CLASIFICACIÓN POR SEROTIPOS	16
3.5. INFECCIONES CAUSADAS POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	17
3.6. DIAGNÓSTICO	18
3.7. TRATAMIENTO	24
3.8. EPIDEMIOLOGÍA.....	24
3.9. EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO Y MORELOS.....	26
4. JUSTIFICACIÓN.....	29
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVO GENERAL	30
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	31
7.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	31
7.2. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	32
7.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO POR COLUMNAS	34
7.4. DETECCIÓN POR PCR TIEMPO REAL	34
7.4.1. CURVA ESTÁNDAR	35
7.5. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	36
7.6. CÁLCULO DE LA PREVALENCIA	36
8. RESULTADOS.....	38
8.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	38
8.2. ELISA	38
8.3.1. PCR PUNTO FINAL PARA B-GLOBINA	40
8.3.2. PCR TIEMPO REAL PARA B-GLOBINA.....	41
8.4. OBTENCIÓN DEL CONTROL POSITIVO PARA <i>C. TRACHOMATIS</i>	42
8.5. ANÁLISIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL PCR PARA OMP A DE <i>C. TRACHOMATIS</i>	42
8.6. ESTANDARIZACIÓN DEL PCR PUNTO FINAL.....	43
8.7. SECUENCIACIÓN.....	45

8.8. PCR PUNTO FINAL DE LAS MUESTRAS POSITIVAS A <i>C. TRACHOMATIS</i> POR ELISA.....	47
8.9. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE DISOCIACIÓN PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL PCR TIEMPO REAL...	48
8.10. RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS POR PCR PARA B-GLOBINA.....	50
8.11. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	50
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES	55
11. PERSPECTIVAS.....	56
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	59
ANEXO 1. CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	59
ANEXO 2. CUESTIONARIO PARA ADOLESCENTES Y JÓVENES EMBARAZADAS	61
ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ADN	66
ANEXO 4. PURIFICACIÓN DE ADN A DE GELES DE AGAROSA	68
ANEXO 5. PCR B-GLOBINA.	69
ANEXO 6. CONDICIONES DE REACCIÓN Y CORRIDA PARA EL PCR TIEMPO REAL BETA GLOBINA 161 PB.	70
ANEXO 7. CONDICIONES PCR OMPA <i>C. TRACHOMATIS</i>	71
ANEXO 8. CONDICIONES DE REACCIÓN Y CORRIDA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL PCR TIEMPO REAL <i>C. TRACHOMATIS</i> 129 PB.....	72

RESUMEN

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 se produjeron 106 millones de nuevos casos de clamidiasis urogenital en adultos en el mundo (Infante et al., 2012). Por esto, se considera como una de las infecciones de transmisión sexual bacterianas más frecuentes a nivel mundial. Se ha demostrado que del 70 al 90% de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la mujer son asintomáticas, por lo tanto, no todas se detectan, ya que generalmente el diagnóstico es clínico y en etapas avanzadas de la infección pudiendo persistir por meses o años (Ostos y Melina, 2003, Infante et al. 2012). *C. trachomatis* genera tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV), enfermedades del tracto urogenital, conjuntivitis y neumonías en recién nacidos, entre otras complicaciones (Roca, 2007). Aunado a esto, en México solo el LGV es de notificación obligatoria, la cual es sólo una de las condiciones patológicas causadas por *C. trachomatis*. De manera que, se desconoce la magnitud real de los casos de infección por esta bacteria presentes en el país y en el estado de Morelos (Canto-de Cetina et al., 2003). El presente trabajo está enfocado en calcular la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en adolescentes y adultas jóvenes embarazadas de tres centros de salud de Morelos. El estudio incluye a adolescentes embarazadas de diez a diecinueve años, y jóvenes adultas embarazadas de veinte a veinticuatro años que acudieron a los servicios de salud del estado de Morelos para la atención del embarazo, aceptaron participar en el estudio mediante la firma de los consentimientos informados y que otorgaron una muestra de sangre venosa y una de exudado vaginal. Las mujeres embarazadas se captaron en tres centros de Salud en Morelos: Cuernavaca, Tlaltenango y Yautepec. El diagnóstico de la presencia de *C. trachomatis* se realizó mediante dos métodos, con las muestras de suero se realizó el ensayo de ELISA indirecto (Anti-*Chlamydia trachomatis* IgM); mientras que, con las muestras de exudado vaginal se realizó el diagnóstico molecular por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real. Se utilizaron los dos tipos de diagnóstico para tener una mayor sensibilidad de detección. Con los resultados de ambos ensayos se determinó la prevalencia de la infección por *C.*

trachomatis en las embarazadas; comparando por grupos de edad, diez a catorce, quince a diecinueve y veinte a veinticuatro años. Se reclutaron 491 mujeres, de las cuales el 261 (53.1%) pertenecen al grupo de edad de 20 a 24 años; 313 (63.7%) son de Yautepec y 178 (36.3%) de Cuernavaca (CS Tlaltenango y CS Cuernavaca). Se analizaron por ELISA 487 muestras. De acuerdo a los puntos de corte dados por el fabricante, se obtuvieron cinco muestras en zona gris y cuatro positivas. Posteriormente, estas muestras se volvieron a analizar para corroborar el resultado, y el resultado indicó únicamente tres muestras positivas de las 487 muestras del estudio. Por lo anterior, la prevalencia de anticuerpos para *C. trachomatis* es de 0.66%. Se procesaron 229 muestras por PCR tiempo real de las cuales 50 muestras fueron positivas para *C. trachomatis*, dando una prevalencia cruda de 21.8%. Sin embargo, considerando los resultados de β -globina (control interno del procesamiento), la prevalencia se calculó de la siguiente manera: de las 154 muestras con resultado de β -globina y *C. trachomatis*, 28 fueron negativas para ambos genes, por lo que se consideraron inválidas. De modo que, el cálculo de prevalencia se basa en 126 muestras, de las cuales 37 fueron positivas para *C. trachomatis*, por lo que la prevalencia encontrada fue de 29.6%.

INTRODUCCIÓN

La clamidiasis es una infección de importancia mundial dada la prevalencia y consecuencias que ésta presenta. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 se produjeron 106 millones de nuevos casos de clamidiasis urogenital en adultos en el mundo. Por esto, se considera como una de las infecciones de transmisión sexual bacterianas más frecuentes a nivel mundial. En Estados Unidos de América (EUA) se presentan cuatro millones de casos anualmente, con un alto costo estimado de 2.4 billones de dólares.

Se ha demostrado que del 70 al 90% de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la mujer son asintomáticas, pudiendo persistir por meses o años. La mayor incidencia de *C. trachomatis* se presenta en la adolescencia y en mujeres menores de 25 años, por lo que el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de EUA ha recomendado el diagnóstico precoz de la infección en mujeres jóvenes sexualmente activas para prevenir sus complicaciones. El diagnóstico de *C. trachomatis* en el hombre es de utilidad para su propio bienestar evitando el desarrollo de uretritis y epididimitis, así como la transmisión de la infección a la mujer; sin embargo, la infección suele ser asintomática en 6 a 11% de los casos, especialmente en los adolescentes.

La enfermedad es causada por *C. trachomatis*, una bacteria Gram negativa que se observa con forma de cocos, no móviles, de vida parasitaria intracelular obligada y que presenta una morfología esférica u ovalada.

El género *Chlamydia* contiene 12 especies reconocidas en la familia *Chlamydiaceae*, de las cuales tres especies son consideradas patógenas para el ser humano:

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia psittacii*

- *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydia trachomatis es causante de tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV), enfermedades del tracto urogenital, conjuntivitis y neumonías en recién nacidos, entre otras complicaciones.

La mayoría de las infecciones son asintomáticas, por lo tanto, no todas se detectan, ya que generalmente el diagnóstico se basa en los síntomas y se realiza en etapas avanzadas de la infección. En ocasiones se confunde con otras infecciones de transmisión sexual (ITS) tales como gonorrea.

Aunado a esto, en México solo el LGV es de notificación obligatoria, la cual es sólo una de las condiciones patológicas causadas por *C. trachomatis*. De manera que, se desconoce la magnitud real de los casos de infección por esta bacteria en el país. Los reportes que existen se basan en estudios de alcance reducido, por lo que es importante investigar más a detalle. Así mismo, las adolescentes son particularmente sensibles o susceptibles a adquirir la infección por sus características biológicas y de comportamiento sexual. Por lo tanto, es importante realizar investigaciones en este grupo de edad.

Chlamydia psittaci ha sido aislada en cerca de 500 especies de aves pertenecientes a más de 30 géneros, donde causa infecciones latentes o clínicamente poco relevantes. En situaciones de estrés para el animal, pueden convertirse en infecciones severas afectando al tracto intestinal y respiratorio; la forma respiratoria se puede presentar como un resfriado común o una neumonía y el tiempo de incubación es de seis a diecinueve días. Se inicia con fiebre, escalofríos y cefalea severa, en algunas ocasiones se puede presentar inflamación (Matta et al., 2001).

La transmisión de *C. psittaci* a humanos está estrechamente relacionada al contacto con aves domésticas, con pavos, patos, así como con algunos mamíferos (gatos); aunque pueden existir otras aves en calidad de portadores asintomáticos.

La vía de transmisión a humanos es por polvo de heces u orina desecadas o por secreciones del animal infectado (Alonso et al., 2012).

La transmisión a humanos es posible, pero es poco común. La psitacosis humana suele afectar más a varones jóvenes, aunque este dato podría estar sesgado por razones ocupacionales de exposición. Desde principios del siglo XX se han sucedido brotes epidémicos, y han estado asociados en numerosas ocasiones a la importación de aves psitácidas desde Sudamérica a Europa o a América del Norte. En los últimos años, se han descrito en varios países europeos, numerosos casos de infecciones humanas asociadas a brotes de clamidiasis aviar, especialmente en explotaciones de pavos y patos (Alonso et al., 2012; Matta et al., 2001).

Chlamydia pneumoniae es un microorganismo con una amplia distribución geográfica y temporal, que tiene un amplio rango de hospederos. Existen tres biovars aceptados: humano, caballo y koala. El biovar humano que infecta exclusivamente a los humanos sin reservorio animal es un patógeno reconocido de las vías respiratorias, responsable de aproximadamente el 10% de las neumonías comunitarias y el 5% de los casos de bronquitis y sinusitis en adultos (Alonso et al., 2012). Es una causa común de infección respiratoria aguda. Se disemina de una persona a otra por aerosoles, tiene un período de incubación de 7 a 21 días. Todas las edades se ven afectadas, excepto el grupo de menores de 5 años en zonas con estaciones. Se han documentado casos de contagio en personal de laboratorio, así como brotes epidémicos de infección respiratoria por *C. pneumoniae* en familias y poblaciones cerradas, tales como, campamentos militares y residencias de ancianos (Alonso et al., 2012; Matta et al., 2001). A pesar de que las cepas humanas son genéticamente muy homogéneas entre sí, las reinfecciones son frecuentes, sugiriendo que la inmunidad inducida es incompleta o de corta duración, o ambas. En los casos sintomáticos, la infección producida por *C. pneumoniae* se puede diferenciar en aguda o crónica. La infección aguda está relacionada con otitis, sinusitis, resfriado común, bronquitis o neumonía; mientras que, la infección persistente o crónica, que podría estar asociada con las formas aberrantes de

Chlamydia generadas durante el ciclo biológico está relacionada con procesos no infecciosos como asma, artritis, aterosclerosis, enfermedad coronaria, infarto del miocardio, esclerosis múltiple o incluso el Alzheimer. Si bien, esta última asociación es aún controvertida y se necesitan estudios que la demuestren definitivamente (Alonso et al., 2012; Matta et al., 2001).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Clasificación de *Chlamydia trachomatis*

La clasificación de esta bacteria se basa en técnicas moleculares, incluyendo análisis de ADN; así como en características fenotípicas, rango de hospederos, tipos de patologías asociadas y el análisis filogenético del operón ribosomal (Martínez et al., 2001).

Dominio: Bacteria

Filo: *Chlamydiae*

Orden: *Chlamydiales*

Familia: *Chlamydiaceae*

Género: *Chlamydia*

Especie: *Chlamydia trachomatis*

Biovars: Tracoma, 14 Serotipos: de la A a la K, Ba, Da y Ia.

LGV (Linfogranuloma Venéreo), Cuatro serotipos: L1, L2, L2a y L3.

3.2. Morfología

Chlamydia trachomatis es un microorganismo procarionte de vida intracelular parasitaria obligada ya que no puede sintetizar ATP (Adenosín trifosfato) por sí solo, es no móvil e invade el citoplasma de la célula infectada. Se caracteriza por ser Gram negativa y tener comúnmente una morfología esférica. Presenta dos cuerpos de distinta morfología, el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR) (Black, 1997).

Los cuerpos elementales son diminutas estructuras infecciosas, tienen el cuerpo más pequeño con un tamaño de 200 a 400 nm de diámetro, son bastante rígidas debido a la alta concentración de puentes disulfuro en la capa externa de su membrana. Con la tinción de Giemsa se tiñen de púrpura y de rojo con la tinción de

Macchiavello. Son las formas de transporte extracelular sin actividad metabólica. La mayor parte de ADN se encuentra en el nucleoide central y la mayor parte del ARN está en los ribosomas; además presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos que inducen la fagocitosis y no se pueden replicar (Ostos y Melina, 2003) (Figura 1).

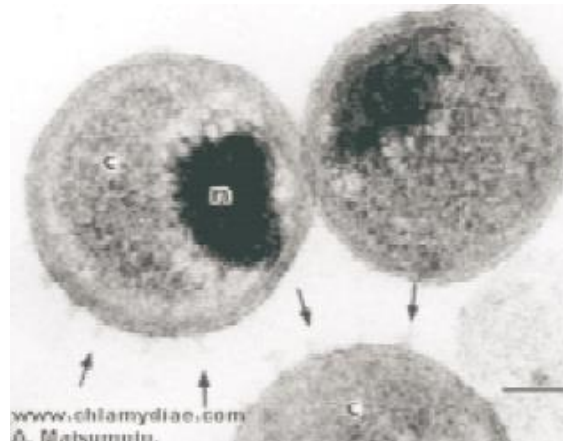


Figura 1. Cuerpo elemental (Tomada de Ostos y Melida, 2003).

Los cuerpos reticulados son el producto de la diferenciación de los cuerpos elementales por la fagocitosis que lleva a cabo la célula hospedera. Estos tienen un tamaño de 600 a 1,000 nm, son no infecciosos, se replican por fisión binaria, tienen el ADN disperso, su morfología es bacilar, carecen de nucleoide denso y tienen actividad metabólica. Por la tinción de Giemsa se tiñen de color azul (Figura 2) (Ostos y Melina, 2003).

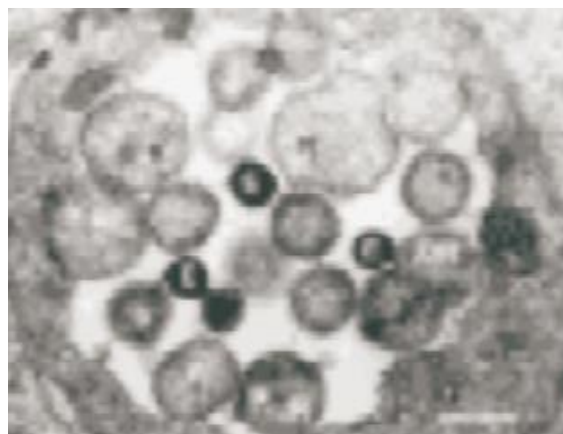


Figura 2. Cuerpo reticulado (tomada de Ostos y Melida, 2003).

3.3. Ciclo de vida

Chlamydia trachomatis tiene un ciclo de vida bifásico con dos formas funcionales y metabólicamente distintas. El cuerpo elemental, que es la partícula infectante, para adherirse a la célula hospedera requiere sulfato de heparina, parecido a la glucosamina glucano, sobre la superficie de la *Chlamydia*. Estos receptores son más abundantes en el epitelio de mujeres jóvenes por la inmadurez del tejido, lo cual lo hace más susceptible al microorganismo. A continuación de la adhesión, el cuerpo elemental es endocitado por la célula por medio de una vacuola. Al momento que se introduce, el cuerpo elemental se reorganiza en un cuerpo más grande dando como producto al cuerpo reticular en un tiempo de seis a ocho horas. Este cuerpo no es infeccioso, pero es altamente replicativo y con actividad metabólica. Dentro de la vacuola, el cuerpo reticular aumenta de tamaño y empieza a dividirse continuamente por fisión binaria. En un lapso, la vacuola está llena de cuerpos elementales que fueron el producto de la fisión binaria de los cuerpos reticulados, formando una inclusión en el citoplasma de la célula hospedera. Finalmente, se presenta lisis celular, lo que libera a los nuevos cuerpos elementales para infectar otras células. El ciclo reproductivo dura entre 24 a 48 horas (Roca, 2007) (Figura 3).

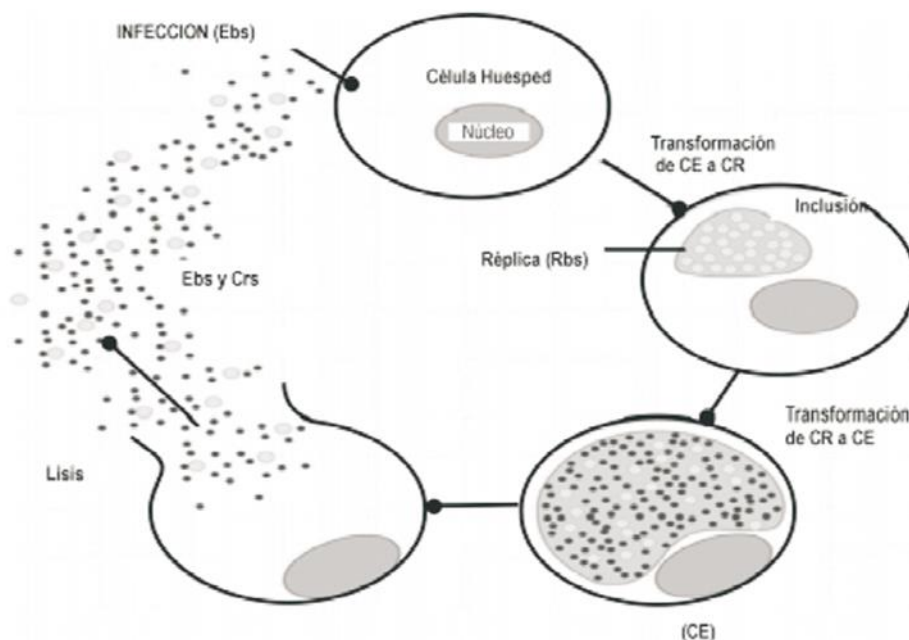


Figura 3. Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis* (Tomada de Ostos y Melida, 2003).

3.4. Clasificación por serotipos

Chlamydia trachomatis está clasificada en dos biovares (tracoma y LGV) que se agrupan a su vez en 18 serotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3 y L3a (Tabla 1). En esta clasificación se distinguen mediante anticuerpos monoclonales contra la proteína principal de la membrana externa (MOMP, del inglés "Major Outer Membrane Protein"), codificada por el gen *Omp 1*, altamente conservado en todas las cepas de *C. trachomatis* aisladas de diferentes regiones geográficas. El biovar tracoma contiene 14 serotipos, designadas con las letras A a la K, más Ba, Da, e Ia, que infecta solamente las células escamo-columnares de las membranas mucosas. Los serotipos A a la C, se asocian con tracoma endémico, los serotipos D a K causan infecciones de transmisión sexual. El biovar LGV consta de los serotipos L1, L2, L2a y L3, que son agentes etiológicos del linfogranuloma venéreo y tienen la capacidad de invadir tejido linfático. Ambos biovares se distinguen por su diferente virulencia en animales de laboratorio y su crecimiento en cultivos celulares (Martínez et al., 2001).

Tabla 1. Clasificación de *C. trachomatis*.

Biovar	Serotipos	Tropismo tisular	Infección
Tracoma	A-C	Células epiteliales - Tracoma	Tracoma endémico causante de ceguera
	D - K	Células epiteliales - Tracoma	Urogenital, conjuntivitis y neumonía neonatal.
LGV	L1, L2,L3	Células linfáticas - LGV	LGV

No se ha encontrado relación causal entre los biovars con la severidad de la enfermedad. Los análisis de serotipos a través de MOMP no han permitido asociar cepas con su grado de severidad, es decir, con su virulencia. Se requiere un análisis más allá de esta proteína. Se han identificado varios factores de virulencia candidatos, entre ellos la familia de proteínas autotransportadoras de membrana externa polimórfica, la citotoxina, los efectores de secreción tipo III, las proteínas de respuesta al estrés, entre otros (Byrne, 2010).

3.5. Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*

Las manifestaciones clínicas de la infección por *C. trachomatis* varían entre hombres y mujeres, y pueden ser genitales o extragenitales (Tabla 2). Las infecciones genitales mayoritariamente son asintomáticas, en el hombre en un 50% y en la mujer un 70%, esto conlleva a que las infecciones no sean diagnosticadas, pudiendo perdurar hasta por 20 años y transformándose en infecciones crónicas con diversos efectos subclínicos hasta el grado de la infertilidad. Sin embargo, la infección por *C. trachomatis* puede producir cuadros clínicos diversos. En los últimos años, las investigaciones efectuadas han demostrado que además de producir el LGV, es la causa de infecciones oculares y neumonías en niños recién nacidos (Black, 1997; Roca, 2007).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la infección por *C. trachomatis* (Matta et al., 2001).

Infección genital	Primarias	Secuelas
Mujer	Cervicitis, leucorrea abundante, cuello uterino friable, disuria, dolor pelviano, dolor a la palpación y con la movilización del cuello uterino.	Enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico, salpingitis, infertilidad de causa tubarica.
Hombre	Secreción uretral, disuria, dolor testicular.	Epididimitis, prostatitis.
Infecciones extragenitales	Primarias	Secuelas
Rectal	Secreción, dolor rectal, sangre en heces.	Proctitis.
Orofaringea	Faringitis, dolor de garganta leve.	
Ganglios linfáticos	Inflamación linfática.	
Ocular	Conjuntivitis.	Cicatrización tracomatosa conjuntival, tracoma que causa ceguera.
Neumonía neonatal	Neumonía	

En mujeres puede ocasionar uretritis, cervicitis, bartolinitis, endometritis, sangrado uterino irregular, salpingitis y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI). *C. trachomatis* es responsable de daños en los cilios y obstrucción de las trompas de Falopio, lo que aumenta el riesgo de embarazos ectópicos y explica la infertilidad (Urbina et al., 2010; Zamboni et al., 2016). Así mismo, la infección durante el embarazo se ha asociado con muerte fetal, parto prematuro, ruptura prematura de las membranas y bajo peso al nacer. También puede afectar al recién nacido, dando lugar a neumonía infantil y oftalmia neonatal (Urbina et al., 2010).

En hombres, la uretritis no gonocócica (UNG) es la manifestación más común producida por *C. trachomatis*. Esta también puede causar inflamación de la próstata, el recto, la uretra, epididimitis y orquitis, y alteraciones de la ultra estructura espermática lo que puede ser una causa de infertilidad (Matta et al., 2001).

3.6. Diagnóstico

Para la identificación y diagnóstico de la infección por *C. trachomatis*, se han desarrollado diversas técnicas, tales como el cultivo, las pruebas inmunológicas y moleculares. A continuación, se describen algunas de ellas:

A) Aislamiento-Cultivo

Es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de las infecciones del tracto genital causadas por *C. trachomatis*, tanto en hombres como en mujeres. Esto se debe a su alta especificidad, ya que es casi imposible confundir, con el uso actual de anticuerpos mono-clonales para teñir los cultivos, artefactos con inclusiones intracelulares. Sin embargo, su sensibilidad es baja del 70 al 85% (Martínez, 2001). Las muestras más indicadas para la realización del cultivo son las uretrales de hombres y mujeres asintomáticos(as), nasofaríngeas, rectales y vaginales de niñas prepúberes y en casos de abuso sexual. Debido a que *C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada, requiere de una célula hospedera para su desarrollo y multiplicación. Por consecuencia, las líneas celulares más utilizadas para el cultivo son células McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa 229 (carcinoma humano), BHK-21 (células de ovario de hámster) y recientemente BGMK (células de riñón de mono verde africano). El aislamiento también puede realizarse por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollos embrionarios de 6-8 días de edad. Antes de inocular la muestra se puede sonicar para romper las células hospederas y permitir que los cuerpos elementales se separen. La línea celular más utilizada es la McCoy tratada con ciclohexamida. El cultivo se propaga en una monocapa sobre un cubreobjetos inoculando las muestras; si hay suficiente número de cuerpos elementales de *C. trachomatis* ellos infectan las células y crecen para formar inclusiones citoplasmáticas; luego de ser infectadas, las inclusiones son visualizadas después de 48-72 horas de incubación por tinción con anticuerpos específicos marcados con fluorescencia. Los anticuerpos se unen al lipopolisacárido de la *C. trachomatis*, mientras que otros reconocen específicamente la proteína de membrana MOMP. La visualización directa de las inclusiones, que posee una morfología distintiva,

contribuye al 100% de especificidad del diagnóstico por cultivo (Ostos y Melida, 2003; Cervantes, 2009).

El cultivo ya no es considerado una prueba diagnóstica idónea dado que sus limitaciones son bien conocidas, entre ellas se pueden mencionar: el tiempo de obtención del resultado significativamente largo, la toma de muestra es traumática, requiere condiciones de manipulación más exigentes para preservar la viabilidad de la muestra, es técnicamente compleja y uno de los puntos más importantes, es que es mucho menos sensible que la prueba de amplificación de ácidos nucleicos. Por esto, se ha visto la necesidad de crear un nuevo estándar de oro con técnicas moleculares para poder realizar un buen diagnóstico para *C. trachomatis* (Martínez, 2001; Unemo et al., 2014).

B) Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis* fueron las primeras técnicas en utilizarse. Estas pruebas identifican y en algunos casos, valoran el grado de respuesta de los anticuerpos frente a los antígenos de la bacteria. Estas pruebas pueden ayudar al diagnóstico o tamizaje de dichas infecciones, tales como como artritis reactiva, EPI, embarazo ectópico, infertilidad de causa tubárica, pueden servir para el diagnóstico de la neumonía neonatal y el LGV. En las infecciones agudas primarias por *C. trachomatis* se detectará IgM específica, pero también IgG e IgA. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos sistémica puede no ser detectable después de una infección urogenital sin complicaciones. Las concentraciones elevadas de anticuerpos frente a *C. trachomatis* pueden persistir mucho tiempo después de que se haya erradicado la infección. Debido a una sensibilidad y especificidad baja, la determinación de los anticuerpos anti-*Chlamydia* tiene un valor poco factible para el diagnóstico de las

infecciones agudas, y no debe usarse en el diagnóstico de las infecciones sin complicaciones causadas por esta especie (Unemo et al., 2014). De entre las pruebas serológicas, podemos destacar dos, la prueba de ELISA (por sus siglas en inglés ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) y los ensayos de inmunofluorescencia directa.

B.1. Determinación de Antígenos-ELISA

Es una prueba de diagnóstico basado en la detección inmunohistoquímica de antígenos de lipopolisacáridos (LPS) de género específico. La técnica del inmunoensayo enzimático para la determinación del antígeno de *Chlamydia* permite el análisis de diferentes tipos de muestras y un gran número de estas; los resultados se obtienen aproximadamente cuatro horas después. Se detectan antígenos lipopolisacáridos específicos de los cuerpos elementales de la muestra, los cuales son más abundantes y más solubles que la proteína MOMP. El fundamento de esta técnica consiste en que *C. trachomatis* cuando está presente en la muestra, se une al anticuerpo monoclonal anti-LPS (IgM murina) usado como el reactivo detector, presente en la placa comercial, formando un complejo que se revela al adicionar el conjugado del anticuerpo anti-inmunoglobulina humana con la peroxidasa y, posteriormente, el sustrato de la enzima. Se desarrolla un color amarillo-naranja en proporción a la cantidad de antígeno presente en la muestra y se detecta por medio de un detector espectrofotométrico. Una desventaja de esta técnica es que los LPS puede dar reacciones cruzadas con los LPS de otras bacterias Gram negativas y producir falsos positivos. Esta técnica sin utilizar reactivos bloqueadores de anticuerpos, presenta una especificidad de cerca del 97%, y con reactivos bloqueadores alrededor del 99% (Ostos y Melida, 2003; Cervantes, 2009).

B.2. Ensayo de inmunofluorescencia directa

Utiliza anticuerpos monoclonales contra el antígeno especie-específico de los lipopolisacáridos de la membrana y sobre la proteína MOMP de *C. trachomatis*.

Estos anticuerpos son marcados con fluoresceína para permitir la visualización de los cuerpos elementales en el microscopio con los frotis celulares recogidos del ojo, la uretra o el endocérvix. Este ensayo tiene una sensibilidad del 80 al 90% y una especificidad de 98-99% (Ostos y Melida, 2003; Cervantes, 2009).

Se han reportado dos ensayos directos con anticuerpo fluorescente, la tinción directa de MicroTrak (Trinity Biotech, Irlanda) y la tinción directa de Pathfinder (BioRad Laboratories, EUA); estos se comercializan para la tinción de los frotis recogidos de la uretra, el endocérvix, el recto, la orofaringe y la conjuntiva, lo cuales son destinados a la visualización de los cuerpos elementales de las *Chlamydias*. La inmunofluorescencia directa se usa con mayor frecuencia para la tinción de frotis conjuntivales, en países desarrollados. Estos ensayos ofrecen la ventaja de la obtención rápida de los resultados, una especificidad alta y la detección de microorganismos no viables. Cabe señalar, que ningún otro ensayo comercializado tiene especificaciones reglamentarias para las muestras conjuntivales ni tiene la capacidad de evaluar la calidad de la muestra directamente. Sin embargo, la sensibilidad de la inmunofluorescencia directa es inferior a la de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos; es difícil e inadecuada para un diagnóstico y exige microscopías realizadas por personal con gran experiencia. Los resultados negativos deben interpretarse con cuidado debido a la baja sensibilidad de estas pruebas (Ostos y Melida, 2003; Unemo et al., 2014).

C) Técnicas moleculares

Con el reciente desarrollo de métodos moleculares para detectar patógenos específicos, se ha mejorado el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual basados en pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Las cuales pueden realizarse a partir de una gran variedad de muestras cuya toma es menos traumática, tales como de orina, hisopados vaginales y flujo vaginal, disminuyendo así la necesidad de muestras invasivas. Estos métodos están basados en la amplificación del ADN utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por

sus siglas en inglés) y la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR, por sus siglas en inglés) (Cervantes, 2009).

La PCR es una técnica que permite detectar un bajo número de copias de ADN de *C. trachomatis*, lo que la hace más sensible que otras pruebas. Uno de los métodos comerciales disponible es el AMPLICOR CT PCR (Roche Molecular System), este ensayo automatizado proporciona un control interno y una mezcla maestra para PCR, la cual amplifica un gen específico de *C. trachomatis* y un control interno.

En el ensayo LCR se emplean cuatro oligonucleótidos sintéticos (dos por cadena de ADN), los cuales hibridan sitios específicos en el plásmido críptico, una vez hibridados, el intervalo complementado por la ADN polimerasa es sellado por la enzima ligasa; este proceso de dos pasos de llenado y cerrado del intervalo hace que la LCR sea muy específica. El producto de la LCR se detecta en un aparato automatizado que usa un sistema de captura inmunocolorimétrico. Las técnicas de amplificación son muy útiles para el diagnóstico de uretritis en hombres o uretritis y cervicitis en mujeres (Cervantes, 2009).

Los ensayos moleculares presentan varias ventajas, entre ellas, dan la posibilidad del diagnóstico con recursos limitados y no dependen de la viabilidad del microorganismo. Estos métodos se pueden adaptar a una estandarización casera con una alta calidad de extracción y detección (Ostos y Melida, 2003). Así mismo, disminuyen la necesidad de condiciones de transporte y conservación estrictas de la muestra y elimina el análisis por medio de la microscopia.

Finalmente, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos tienen características de desempeño superior a cualquier otro tipo de prueba para detectar las infecciones por *C. trachomatis*: son altamente sensibles y con un alto grado de especificidad, siendo los más sensibles de todas las pruebas existentes (Unemo et al., 2014).

D) Genotipificación

El análisis por la técnica de RFLP del gen Omp-1, es simple y rápido, es una herramienta poderosa para estudios epidemiológicos. Este método permite la asociación de serotipos y genovariantes. La técnica se realiza amplificando el gen Omp-1, luego se procede a digerir el producto obtenido mediante enzimas de restricción, el resultado es el patrón de bandas por electroforesis para cada *Chlamydia*. Otra técnica es el método de secuenciación directa. Es una técnica reconocida como estándar de oro para la genotipificación de cepas, que permite identificar variantes de genes que caracterizan los serotipos de *C. trachomatis* (Cervantes, 2009).

3.7. Tratamiento

Las infecciones genitales causadas por *C. trachomatis* en adultos se pueden tratar con 100 mg de doxiciclina cada doce horas durante una semana, o bien con una sola dosis oral de 1 g de azitromicina.

En mujeres embarazadas se puede tratar con eritromicina, azitromicina o también con amoxicilina en dosis de 500mg cada ocho horas por vía oral de diez a veinte días.

En recién nacidos se emplea eritromicina de 50 mg por kg de peso por día, repartida en cuatro tomas, durante dos semanas. Dada la fácil transmisión de *C. trachomatis* y la frecuencia de generar enfermedades asintomáticas, se recomienda que los compañeros sexuales de la persona infectada sean evaluados y tratados. Así también, se sugiere que padres recientemente diagnosticados evalúen a sus recién nacidos (Roca, 2007).

3.8. Epidemiología

Como se ha mencionado antes, *Chlamydia* es el agente causal de una de las infecciones de transmisión sexual bacteriana más comunes en el mundo. De

acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se detectan 92 millones de nuevas infecciones por *C. trachomatis* (Infante et al., 2012).

Los costos en salud pública para el tratamiento y las secuelas de esta infección alcanzaron los \$2.4 billones de dólares por año en EUA (Dean y Millman, 1997). En este mismo país, se reportaron 4.5 millones de casos anualmente, durante 2011 fueron informados 1, 412,791 casos de infecciones por *C. trachomatis*, siendo más frecuentes en la población menor de 25 años y en mujeres en edad reproductiva (Occhionero et al., 2015).

En 2008 en personas entre 15 y 49 años, se reportaron 105,7 millones de nuevos casos, sin considerar los 100,4 millones que ya estaban infectados por *C. trachomatis* (OMS, 2008).

Las infecciones por *C. trachomatis* existen en todas las sociedades. En los países en desarrollo, en poblaciones vulnerables, en grupos socioeconómicos bajos y en gente que vive en áreas urbanas. Las mujeres presentan más infecciones asintomáticas en comparación con los hombres (Ostos y Melina, 2003). Se plantea que tres de cada cuatro mujeres infectadas, no presentan síntomas o se manifiestan de forma leve; razón por la cual no se detecta tempranamente la infección (Infante et al., 2012).

Los adolescentes y mujeres jóvenes son más vulnerables para adquirir este tipo de infecciones, debido a la inmadurez genital, además que se encuentran dentro del intervalo de edad de mayor actividad sexual, el riesgo de abuso sexual, y ciertas condiciones socioculturales, entre ellas la vulnerabilidad. También puede estar relacionado que a edades tempranas se establecen patrones de comportamiento sexual de alto riesgo. Además existe una base biológica, cuya condición se conoce como ectopia cervical, caracterizada porque la unión de las células escamosas y columnares que se encuentra más expuesta hacia el exterior del útero y constituye el hospedero primario de *C. trachomatis* (Infante et al., 2012; Frontela et al., 2006).

El riesgo se incrementa en niñas y adolescentes cuya inmadurez genital impide que su mucosa funcione como una barrera protectora; el moco cervical en ellas es más permeable, por lo tanto, más susceptible a agentes infecciosos. La mayor prevalencia de ITS entre los adolescentes y adultas jóvenes también refleja las dificultades para acceder a los servicios de prevención de ITS, incluyendo la capacidad de pago, servicios diseñados para adultos y preocupaciones sobre confidencialidad (Canto-de Cetina et al., 2003).

La infección por *C. trachomatis* durante el embarazo se ha asociado con muerte fetal, parto prematuro, ruptura prematura de las membranas y bajo peso al nacer. También puede afectar al recién nacido, dando lugar a neumonía infantil y oftalmia neonatal. Debido a todos los antecedentes, hay una necesidad urgente de desarrollar intervenciones adecuadas de salud pública para lograr un efectivo diagnóstico y tratamiento para las ITS incluyendo clamidiasis (Occhionero et al., 2015).

3.9. Epidemiología en México y Morelos

Algunos estudios realizados en México han demostrado una prevalencia de entre 4 y 28% de *C. trachomatis*, en mujeres no embarazadas, consideradas como de bajo riesgo para las ITS; de 16.6% en trabajadoras sexuales y de hasta 10 a 12% en embarazadas (Canto-de Cetina et al., 2003).

En México no se conocen la prevalencia nacional y el impacto causado por esta infección en diferentes grupos de mujeres, debido a la relativa dificultad para establecer el diagnóstico, ya que la metodología de laboratorio es técnicamente demandante y costosa (Canto-de Cetina et al., 2003). Aunado a esto, como ya se mencionó antes, en México solo se tienen registros obligatorios de la forma más agresiva de clamidiasis, es decir, solo se reporta el LGV.

Según los datos reportados por la Dirección General de Epidemiología, en el año 2004 en Morelos, la tasa de incidencia por 100,000 habitantes de LGV por *Chlamydia* en mujeres adolescentes de 15-19 años fue de 1.18, es más alto al total nacional que resultó de 0.47. En el año 2011, en Morelos la incidencia aumentó a 1.26 para el grupo de 10 a 14 años, cuando a nivel nacional fue de 0.31. Para el año 2013, la tasa de incidencia en adultas jóvenes fue de 2.34 en Morelos, superando el 1.18 reportado a nivel nacional. Con el paso de los años la incidencia para Morelos fue decayendo para los tres grupos de edad, a comparación que a nivel nacional (Figura 4), hasta el grado que para el 2016 no se reportan casos nuevos para LGV, como lo muestra la Figura 5.

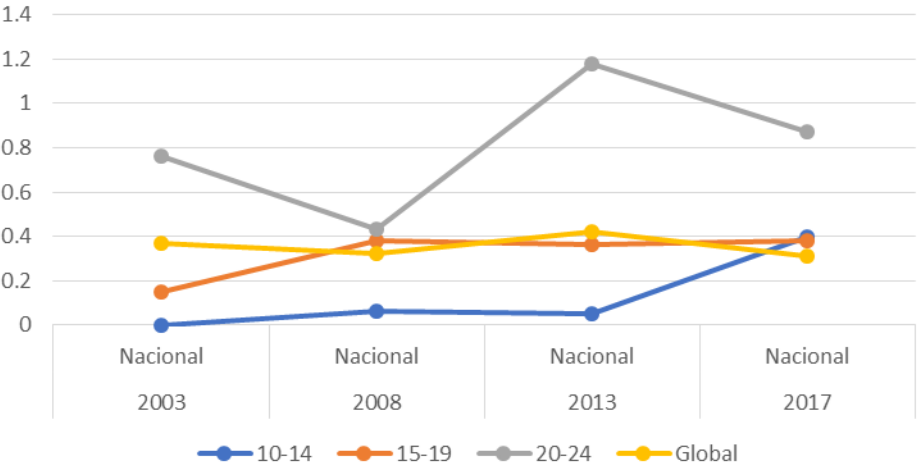


Figura 4. Tasa de incidencia de linfogranuloma venéreo (LGV) a nivel nacional.

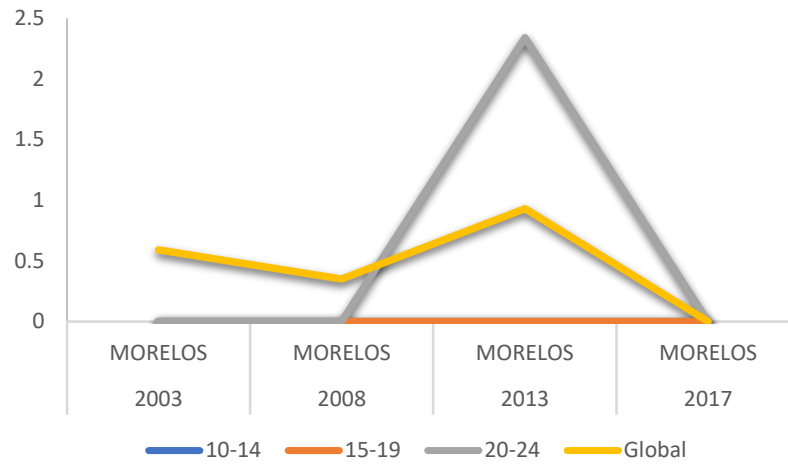


Figura 5. Tasa de incidencia de linfogranuloma venéreo (LGV) en Morelos.

4. JUSTIFICACIÓN

Las adolescentes y las mujeres jóvenes se infectan con mayor frecuencia con *C. trachomatis*, debido a la inmadurez genital, el riesgo de abuso sexual, comportamientos sexuales de riesgo y ciertas condiciones socioculturales, entre ellas la vulnerabilidad. El riesgo se incrementa en adolescentes porque su inmadurez genital impide que la mucosa funcione como una barrera protectora, además de que el moco cervical es más susceptible a agentes infecciosos. Así mismo, el embarazo puede incrementar el riesgo de esta infección, afectando no sólo a la mujer embarazada sino tener posibles consecuencias para el producto.

Se desconoce la magnitud real de casos de clamidiasis existentes en el país, debido a un mal diagnóstico y dado que la infección por sí sola no es de notificación obligatoria, lo cual ocasiona un sub-registro de los casos. Solo se notifica obligatoriamente el linfogranuloma venéreo ya que ocasiona mayor daño a la salud por ser una infección sistémica. Aunado a esto, se carece de estudios específicos sobre clamidiasis en adolescentes y adultas jóvenes embarazadas en el estado de Morelos. Por lo que, este estudio permitirá estimar la prevalencia de clamidiasis en esta población en riesgo, con ello dando el primer dato a nivel estatal.

5. HIPÓTESIS

La prevalencia de *Chlamydia trachomatis* de las adolescentes embarazadas será diferente a la prevalencia en adultas jóvenes embarazadas.

6. OBJETIVO GENERAL

- Calcular la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en adolescentes y adultas jóvenes embarazadas de tres centros de salud de Morelos.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar la presencia de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis* en muestras de suero de las embarazadas.
- Estandarizar un PCR en tiempo real para la detección de *C. trachomatis*.
- Detectar la presencia de *C. trachomatis* en muestras de exudado vaginal de las embarazadas.
- Estimar la prevalencia de *C. trachomatis* en las embarazadas.

7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

En la figura 6 se muestra la estrategia metodológica del presente trabajo.

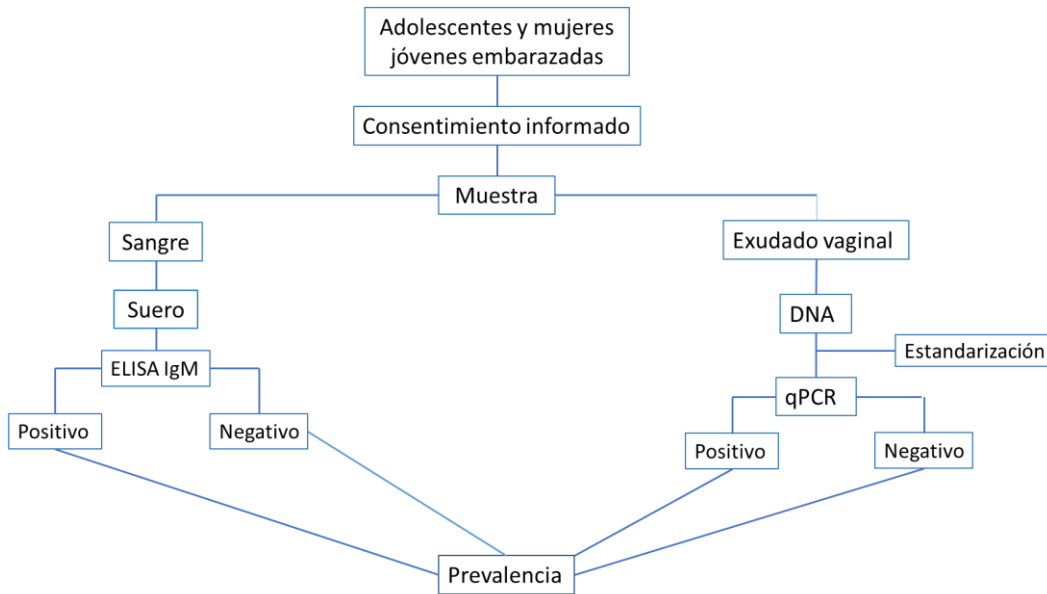


Figura 6. Estrategia metodológica.

7.1. Población de estudio

Este proyecto forma parte de un proyecto principal, “*Participación de la microbiota vaginal para el riesgo de las infecciones de transmisión sexual durante el embarazo adolescente y en adultas jóvenes*”, cuyo objetivo es evaluar la participación de la microbiota vaginal en el riesgo de ocurrencia de infecciones de transmisión sexual durante el embarazo adolescente y en adultas jóvenes.

Para el estudio se incluyó a adolescentes embarazadas de 10 a 19 años y jóvenes adultas de 20 a 24 años, que acudieron a los servicios de salud de Morelos para la atención del embarazo y aceptaron participar en el estudio. Los criterios de inclusión fueron: que firmaran el consentimiento informado (Anexo 1), que contestaran el cuestionario sociodemográfico y de comportamiento sexual (Anexo 2) y que otorgaran una muestra de sangre venosa de 6 ml y una muestra de exudado vaginal

en cada una de las visitas de revisión ginecológica. Se invitaron a las mujeres de tres centros de Salud en Morelos: Cuernavaca, Tlaltenango y Yautepec.

Se llevaron a cabo dos pruebas para el diagnóstico de la presencia de *C. trachomatis*, primero a las muestras de suero se les realizó el ensayo de ELISA (IgM). Posteriormente, las muestras de exudado vaginal se procesaron por PCR en tiempo real (qPCR, del inglés quantitative Polymerase Chain Reaction). Se utilizaron los dos tipos de diagnóstico debido a la sensibilidad de los métodos, teniendo una mayor posibilidad de detección.

Con los resultados de ambos ensayos se determinó la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en las embarazadas, comparando por grupos de edad, 10-14, 15-19 y 20-24.

7.2. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Este ensayo sirve para la determinación *in vitro* semicuantitativa de anticuerpos humanos de la clase de inmunoglobulina IgM contra *C. trachomatis* en suero, lo anterior para el diagnóstico de tracoma, infección del tracto urogenital y LGV.

Mediante la determinación de anticuerpos contra el antígeno MOMP pueden detectarse de forma fiable infecciones por *C. trachomatis* persistentes. Este ensayo se realiza con el estuche comercial, Anti-*Chlamydia trachomatis* ELISA IgM, de la casa comercial EUROIMMUN. Este contiene tiras de microplaca, cada una de ellas con ocho pocillos de reactivo separables, recubiertos con antígenos de *C. trachomatis* purificados. En el primer paso del ensayo, se incuban los pocillos de reacción con muestras de suero diluidas de las participantes. En el caso de ser positivas, los anticuerpos específicos de la clase IgM, se ligan a los antígenos correspondientes. Para detectar los anticuerpos ligados, se lleva a cabo una segunda incubación usando una anti- IgM humana conjugado a una enzima, el cual

cataliza posteriormente una reacción espectrofotométrica que se lee a las longitudes de onda con dos filtros de 450 nm y de 620 nm (reacción colorimétrica). Los resultados se calcularon utilizando la razón (Ratio) del valor de extinción del control o de la muestra, entre el valor de extinción del calibrador 2 (el valor de la extinción es valor de la absorbancia a 620nm – el valor de absorbancia a 450nm). Una vez obtenidas las razones, las muestras se catalogaron como negativas, positivas o indeterminadas a IgM contra *C. trachomatis* con base al punto de corte establecido (tabla 3).

Las muestras que resultaron positivas y las que se localizaron en la zona gris, se procesaron nuevamente con el mismo método para su confirmación. Cuando se presentó un resultado discordante entre el primer y segundo resultado, las muestras se procesaron por una tercera ocasión.

Tabla 3. Puntos de corte para la interpretación de resultados de ELISA.

Razón	Resultado
<0.70	Negativo -
≥0.70 a ≤ 1.10	Dudoso/Zona Gris/Indeterminado
≥1.10	Positivo +

7.3. Extracción de ácido desoxirribonucleico por columnas

La extracción de ADN se realizó partir de 200 µl del exudado vaginal utilizando el estuche comercial Quick-ADN Miniprep Plus Kit de la casa comercial ZYMO research (Anexo 3. Extracción de ADN). Brevemente, a 200 µl de exudado vaginal se le agregan 200 µl de buffer de biofluido y de 20 µl de Proteinasa k y se incuba durante 10 min para permitir la lisis celular. Posteriormente se agregan 420 µl de buffer de unión genómica se homogeniza y la mezcla se colocó en una columna y un tubo colector que contiene una membrana de sílice en la que se une el ADN, centrifugando a 12,000 xg por 1 min. En seguida, se desecha el líquido y tubo colector y el ADN se lavó una vez con 400 µl de buffer de pre-lavado y luego 2 veces con 700 µl de buffer de lavado. Finalmente el ADN se eluye de la columna con 40 µl de buffer de elusión previamente calentado a 70°C e incubando a temperatura ambiente durante 7 min. El ADN obtenido se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop.

7.4. Detección por PCR tiempo real

En el PCR tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, durante la amplificación y mediante detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñado para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. El sistema de detección por fluorescencia empleado en este ensayo fue el marcador SYBR Green (Costa, 2004)

Para la detección de *C. trachomatis* por PCR punto final y tiempo real, se utilizaron los oligonucleótidos OmpA-F 5'-GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC-3' y OmpA-R

5'-CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA-3', los cuales amplifican un fragmento de 129 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis* y la amplificación es por PCR en tiempo real. (Dutilh et al., 1989). Para corroborar que el producto amplificado correspondía al gen, se purificó el fragmento y se secuenció.

Cabe mencionar que la detección de cada una de las muestras se realizó por duplicados para poder dar un correcto resultado. Como control interno de amplificación se utiliza el gen correspondiente a β -globina humana, los oligonucleótidos que se utilizan amplifican un fragmento de 161 pb del gen R2qbeta: (CCG CTG TCA GAA GCA AAT GTA AGC AATAGGCCAAGGACAGGTACG) y GH20 (GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC) (Vergara, 2017).

A continuación en la tabla 4 se muestra la mezcla de reacción para la amplificación de β -globina humana bajo las siguientes condiciones.

Reactivo	Una reacción	Concentración final
SYBR	6 μ l	-
GH20 (2.5mM)	0.36 μ l	0.075 mM
R2qbeta (2.5mM)	0.36 μ l	0.075 mM
Agua	4.28 μ l	cbp
ADN	1 μ l	-

*cbp: excipiente

La detección se lleva a cabo por esta metodología debido a que presenta mayor sensibilidad que el PCR punto final, requiere una menor cantidad de muestra y es más eficaz el análisis de los resultados.

7.4.1. Curva estándar

La curva estándar se realizó a partir de la amplificación de diluciones de ADN de una muestra, la cual ya se conoce su concentración de ADN. Para realizar la curva se ocupó el valor de Ct (del inglés cycle threshold), que equivale al número de ciclos que se necesita para que cada muestra alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de las Cts entre las diluciones permite saber la

eficiencia de la amplificación del producto deseado en base a la disminución de la concentración de ADN y nos da a conocer hasta que concentración de ADN puede ser detectada por el ensayo. Estas diluciones deben realizarse, ya sea por triplicado o cuadruplicado (Aguilera et al., 2014).

7.5. Purificación del producto de PCR

Este método permite separar el producto de PCR de interés de subproductos contaminantes, primers y dNTPs. La cantidad de ADN recuperada variará en función del tamaño de la banda. La luz UV empleada para visualizar los productos puede romper el ADN produciendo paradas y ruidos durante la secuenciación. Se trata de un método fácil y barato que está dando muy buenos resultados en el secuenciador automático. Para el estudio, el producto obtenido de la amplificación correspondiente al gen omp A, se corrió por medio de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cortó la banda correspondiente al gen omp A, posteriormente la agarosa se fundió y se extrajo el ADN por un sistema de extracciones por columnas, utilizando el estuche comercial ADN pure extreme de fermentas (como se muestra en el anexo 4), hasta eliminar totalmente la agarosa.

7.6. Cálculo de la Prevalencia

La prevalencia se define de acuerdo con la OMS, como el número de casos existentes de una enfermedad u otro evento de salud dividido por el número de personas de una población en un período específico. Cada individuo es observado en una única oportunidad, cuando se constata su situación en cuanto al evento de interés.

El cálculo de la prevalencia es mediante la siguiente formula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de muestras positivas}}{N^{\circ} \text{ de muestras totales procesadas}} \times 100$$

Para el presente estudio el cálculo de la prevalencia se llevó a cabo por medio de las dos técnicas utilizadas, obteniendo resultados particulares para cada una de ellas, uno por la técnica ELISA y otro por el PCR.

8. RESULTADOS

8.1. Población de estudio

Se reclutaron 491 mujeres para el estudio principal. De estas, 313 (63.7 %) son de Yautepec, 171 (34.8 %) de Cuernavaca y 7 (1.4 %) de Tlaltenango. De las 491, 12 (2.4%) fueron de edades entre 10 a 14 años, mientras que para el rango de edad de 15 a 19 años fueron 218 (44.3%) y 261 (53.1%) de las edades de 20 a 24 años.

De las 491 mujeres, la distribución por trimestre de embarazo, fue de 131 (26.6%) de primer trimestre, seguido de 193 (39.3%) para el segundo trimestre, para el tercer trimestre se encontraron 165 (33.6%) y finalmente de trimestres desconocidos, 2 (0.4%).

Para el análisis de datos, los centros de Leyva y Tlaltenango se unificaron por conveniencia del estudio, debido que no se captaron suficientes mujeres en el centro de Tlaltenango y también debido a que estos dos centros se encuentran en el mismo municipio, Cuernavaca.

8.2. ELISA

De las 491 mujeres reclutadas en el estudio principal, para el presente trabajo se analizaron 487. La detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* se realizó utilizando el estuche comercial *Anti-Chlamydia trachomatis* ELISA IgM de la casa comercial EUROIMMUN, por el lote 180903AK, con el procedimiento descrito por el fabricante y detallado en la metodología.

Del total de muestras procesadas, inicialmente se obtuvieron cinco muestras en zona gris y cuatro positivas, las cuales se volvieron a procesar para corroborar el resultado. En la Tabla 5 se presentan que las muestras que se encontraban en la zona gris se mantuvieron en su mismo estatus, por lo que se consideraron

negativas, mientras que la muestra M169 dio un resultado discordante, cambiando de positiva a negativa. Por lo que esta muestra, se examinó una tercera vez, y en esta ocasión tuvo resultado en zona gris.

Las muestras M405 y M414 que dieron positivas en su primer resultado, se corroboró por el mismo método, obteniendo por segunda ocasión el mismo resultado, positivas a *C. trachomatis*. Para la muestra M449 la comprobación de su estatus que se llevó a cabo por medio de un PCR punto final a partir de la muestra vaginal de la participante, siendo positiva para este. Con los anteriores resultados solo se obtuvieron tres muestras positivas de las 487 muestras del estudio, mientras que 484 muestras fueron negativas para *C. trachomatis*.

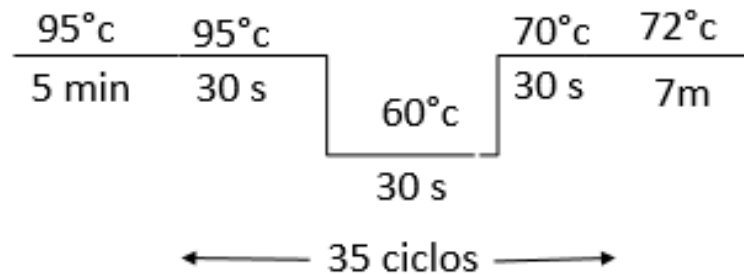
Por lo anterior, la prevalencia de anticuerpos para *C. trachomatis* en las muestras analizadas fue 0.6%.

Tabla 5. Resultados de la muestras positivas y en zona gris.

Muestra	Estatus Inicial	1er resultado	1ra repetición	2da repetición	Estatus final
M210-1	Zona gris	0.73	0.03	0.54	Negativa
M176-1		0.98	0.30	-	Negativa
M181-1		0.73	0.18	-	Negativa
M020-1		0.903	0.34	-	Negativa
M229-1		0.79	0.64	-	Negativa
M169-1	Positiva	1.12	0.16	0.81	Negativa
M405-1	Positiva	2.38	2.68	-	Positiva
M414-1	Positiva	2.84	3.79	-	Positiva
M449-1	Positiva	1.27	Positiva PCR	-	Positiva

8.3.1. PCR punto final para β -globina

Para corroborar la calidad de ADN obtenido y para la familiarización del método, se realizó un PCR punto final para β -globina humana con la mezcla de reacción mostrada en el anexo 5, ya que este se utilizará posteriormente como un control interno para corroborar si las muestras son óptimas para su posterior procesamiento por medio del PCR tiempo real para *C. trachomatis*. Por lo tanto, se comprobó que el método fuera adecuado para una correcta amplificación de β -globina. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a la mezcla de reacción que se muestra en el anexo 5. Se corrió el PCR de punto final con las siguientes condiciones de amplificación:



El producto de PCR, se separó en un gel de agarosa al 2.5%, con 1 μ l de buffer de carga, y 1 μ l de bromuro de etidio en 30 ml de TAE 1X por 30 min a 75 volts. Se usó un marcador de peso molecular de 75pb-1kb.

En la Figura 7 se visualiza el producto de PCR de 140 pb que corresponde al peso esperado del producto para β -globina humana, confirmando una correcta amplificación. Con este resultado se concluye que el ADN obtenido de la extracción tiene una calidad óptima para su uso posterior.

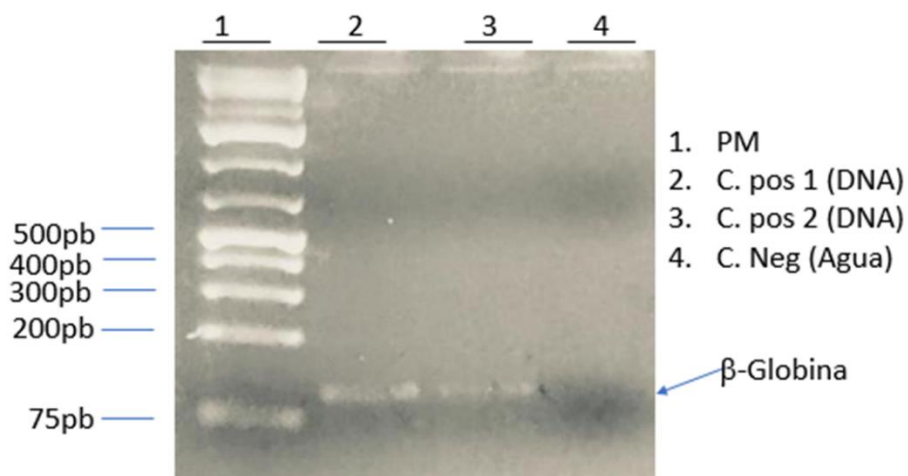


Figura 7. Gel de electroforesis para β -globina. Se llevó a cabo la electroforesis de los productos de PCR como se describe en metodología. PM: marcador de peso molecular, 1kb; C. pos: control positivo (*ADN de células o lo que haya sido*); C. Neg: control negativo (agua). El producto esperado de B- globina es de 140 pb.

8.3.2. PCR tiempo real para β -globina

Para el PCR en tiempo real de β -globina, se estandarizó la amplificación de un producto de 161pb, para corroborar la calidad de ADN obtenido de las extracciones que se realizaron de cada una de las muestras de exudado vaginal de las participantes del estudio. El protocolo estandarizado se muestra en el anexo 6, con las condiciones de mezcla y corrida.

Con las condiciones anteriores, las muestras que amplifiquen el producto esperado con una T_m de 82.35 con un intervalo de variación de ± 0.9 y con un C_t máximo a 35 ciclos, se consideraron positivas para β -globina, considerándose como muestras viables.

Tabla 6. Mezcla de reacción.

Reactivo	Una reacción	Concentración final
SYBR	6 μ l	-
GH20 (2.5mM)	0.36 μ l	0.075 mM

R2qbeta (2.5mM)	0.36 µl	0.075 mM
Agua	4.28 µl	cbp
ADN	1 µl	-

*cbp: excipiente

8.4. Obtención del control positivo para *C. trachomatis*

Para para la amplificación del fragmento de ompA por PCR en tiempo real se utilizó como control positivo ADN de cultivo células McCoy, las cuales el primero están infectada con un serotipo L2 del biovar LGV de *C. trachomatis*, el segundo se desconoce la cepa de *C. trachomatis* con la cual está infectada. El ADN se obtuvo siguiendo el protocolo ya descrito en la metodología. El ADN obtenido de acuerdo con la extracción se cuantificó, obteniendo la concentración que se observa en la tabla 6.

Tabla 7. Concentración de ADN de la extracción del control positivo.

ADN	A260/280	A260/230
12.8 ng/µl	1.71	0.27
30 ng/µl	1.6	0.22

8.5. Análisis de oligonucleótidos para el PCR para omp A de *C. trachomatis*

Se realizaron los análisis correspondientes en el software BLAST y Oligo analyzer para corroborar la especificidad y condiciones de los oligonucleótidos MOMP1 (forward) y MOMP2 (reverse) para *C. trachomatis*, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 8):

Tabla 8. Condiciones de los oligonucleótidos.

***C. Trachomatis* Gen OmpA**

1194 pb

Secuencia de referencia NCBI: KM369942.1		
Producto: 129 pb		
	Oligo Forward	Oligo Reverse
Secuencia	CCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC	CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA
Longitud	23pb	21pb
% CG	56.50%	57.10%
Tm	60.6	60.4
Hairpin	0ΔG, 0.41.3ΔG, 059ΔG, 0.79, 0.91, 0.92.	-0.38ΔG, -0.18Δ, 0.04Δ y 0.61ΔG
Self dimer	3.61, -3.17, (6)-3.14, (3)-1.6, (2) - 1.57	7.05, -5.09, -5.02,-4.62, -3.61, - 3.14,-3.07 y -1.9(3)
Hetero dimer	6.75, -5.09, (4) -3.14, -3.07, (3)-1.95, (2) -1.57, -1.34	

En la siguiente secuencia ompA se muestra la ubicación de los oligonucleótidos analizados.

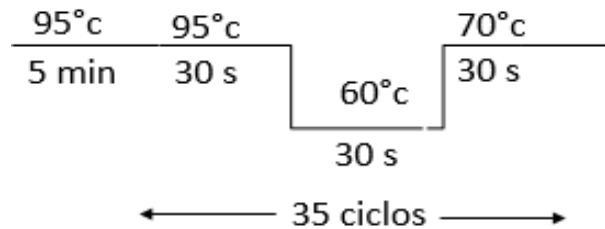
Secuencia de ompA (KM369942.1)

5'-
 ATGAAAAAAGCTCTTGAAATCGGTATTAGTATTT**CCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC**TGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCTGCTGAACCAA
 GCCTTATGATCGACGGAATGGGAAGGTTTCGGCGGAGATCCT**TGCGATCCTTGCAACCACTTGG**TGTGACCTATGCATGCGCGTTGGTTAC
 TACGGAGACTTTGTTTTGACCGCTGTTTTGAAAAGTAAAGAAATTTGAGATGGGAGCGGCGCCTACTACCAGCGATGTAGAAGGCTT
 ACAAGATCCAACAACAAATGTTGCTCGTCCAAATCCCGCTTATGGCAAACACATGCAAGTGTGAAATGTTTACGAACGCTGCTTACATGG
 CATTAAATATCTGGGATCGTTTTGATGATTTTGTACATTGGGAGCAACTACCGGTTATTTAAGAGGAAACTCCGCTTCCCTAACTTAGTTG
 GATTATTCGGAACAAAAACAAATATTCTAAGTTTAAATACAGCGAATCTTGTTCCTAACACTGCTTTGGATCGAGCTGTGGTTGAGCTTTATA
 CAGACACCACCTTTGCTTTGGAGCGTAGGTGCTCGTGCAGCTCTCTGGGAATGTGGGTGTGCAACGTTAGGAGCTTCTTTCCAATATGCTC
 AATCTAAACCTAAAGTAGAAGAGTTAAATGTTCTTTGTAATGCATCCGAATTTACTATTAATAAGCCGAAAGGATATGTTGGGGTGAATTTT
 CACTTGATATTACCGCAGGAACAGAAGCTGCGACAGGACTAAGGATGCCTCTATTGACTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCT
 AAATATGTTCACTCCTTACATTGGAGTTAAATGGTCTAGAGTAAGTTTGTGCAACGATCCGATCGCTCAGCCTAAATGGCTGAAGCAAT
 CTTGGATGCACTAACCAATCGCTGGTAAAGGAGCTGTGGTCTCTCCGGAAGGATACGATGGCTGAACAAGAAATCTTCTTGCAGTTGAA
 CAAGCTGAATCTAGAAATTCGGTATTGCAGTGAATATTGTAGGCAGATAAATCGCAGACGTTGGACCGCTTGATCGATGAGAGGCACACGT
 AAATCAATTCGTTCTAA-3'

Se obtuvo una especificidad del 100% para ambos oligonucleótidos para *C. trachomatis* por medio del Software BLAST.

8.6. Estandarización del PCR punto final

Derivado del análisis de oligonucleótidos, se propusieron las siguientes condiciones para la corrida del PCR punto final para *C. trachomatis*. La mezcla de reacción que se muestra en el anexo 6.



El producto de PCR obtenido se separó en un gel de agarosa al 2%, con 1 µl de buffer de carga y 1 µl de bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis por 30 min a 75 volts. El producto se obtuvo sin contaminación (figura 8), el control positivo se observó entre la banda de 75pb y 200pb, aproximadamente de 129pb, el tamaño esperado de acuerdo a la predicción informática. Sin embargo, se observó un exceso en la concentración de oligonucleótidos en los dos controles, por lo que se realizó un ensayo para disminuir la concentración de oligonucleótidos. Para lo cual, se utilizaron las siguientes concentraciones: 1µM, 0.5µM, 0.250 µM y 0.125 µM.

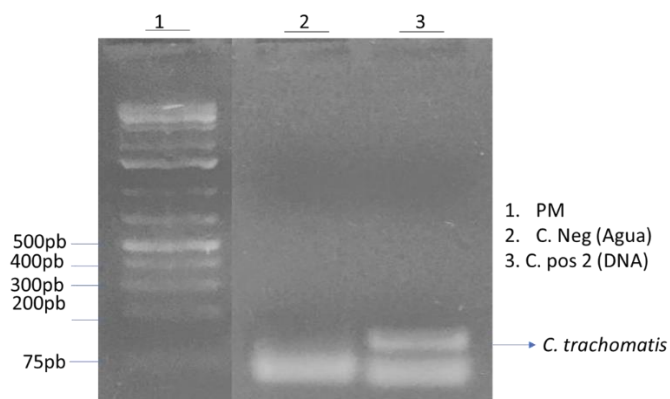


Figura 8. Gel de electroforesis para el gen OmpA de *C. trachomatis*.

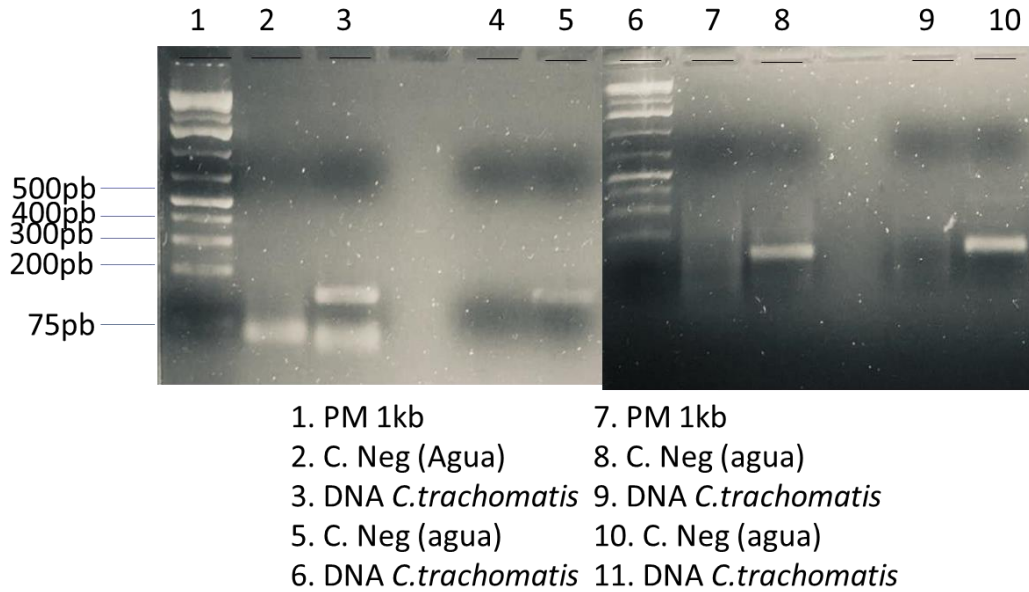


Figura 9. Geles de electroforesis para el gen *OmpA* de *C. trachomatis* a cuatro concentraciones de oligonucleótidos. las líneas 2 y 3 corresponde 1 μM ; las líneas 4 y 5 a 0.5 μM , las líneas 7 y 8 0.250 μM y las líneas 9 y 10 a 0.125 μM de cada oligo.

En la figura 9 se pudo observar que en las cuatro concentraciones de oligonucleótidos probadas se obtuvo un resultado positivo, pero se mejoró la nitidez del producto esperado con la concentración menor, la de 0.125 μM de oligonucleótidos, así como la desaparición de la banda de exceso de oligonucleótidos. Por lo tanto, estas fueron las condiciones utilizadas para escalar al PCR en tiempo real.

8.7. Secuenciación

Para corroborar que el producto obtenido de la amplificación correspondiera al gen *omp A*, se purificó el producto del gel de agarosa, utilizando el estuche comercial ADN pure extreme de fermentas. El producto de la purificación se secuenció, con ambos oligonucleótidos, el forward y el reverse. Se obtuvieron las secuencias *OmpA1*(GCCTTATGATCGACGGAATTCTATGGGAAGGTTTCGGCGGA_gATCCTTGCGATCCTTGCACTTGGGA) y *OmpA2*

(GTCGATCATAAGGCTTGGTTCAGCAGGATTCCCCACAGGCAGAGCTTGCAAG GAGGAAGCAGAACTCAAAGCGGCAG). Como se pueden observar en los electroferogramas (Figura 10 y 11).

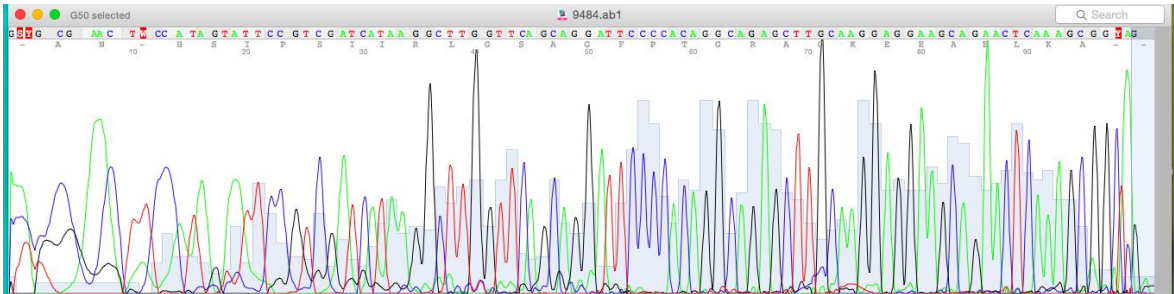


Figura 10. Electroferograma para OMP1.

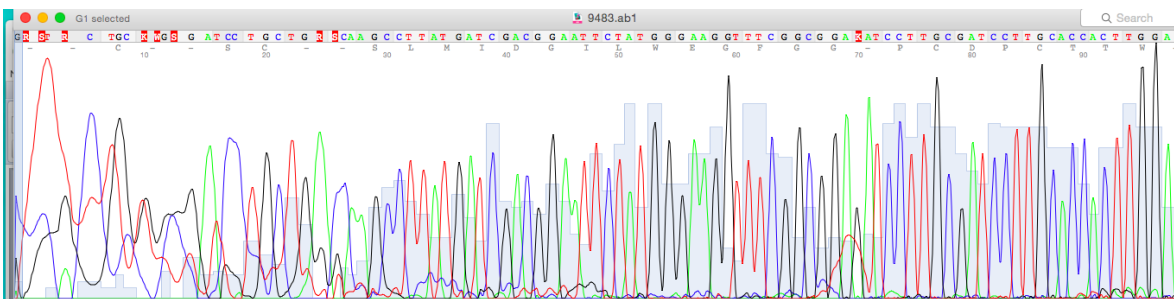


Figura 11. Electroferograma para OMP2.

La secuencia completa del amplicón (129 pb) se obtuvo realizando la visualización y alineamiento de las dos secuencias anteriores, con el programa el 4peaks.

CTGCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTCCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCT
GCTGAACGCCTTATGATCGACGGAATTCTATGGGAAGTTTTCGGCGGAGATC
CTTGCGATCCTTGCACTTGGGA.

La secuencia del producto amplificado está contenida dentro de la secuencia de referencia del gen *ompA* (NCBI: KM369942.1) utilizada para diseñar los oligonucleótidos de acuerdo al alineamiento realizado con el programa clustalW (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Esta secuencia se analizó en BLAST, observándose que el producto amplificado corresponde en efecto al gen *ompA* de *C. trachomatis* (Figura 12).

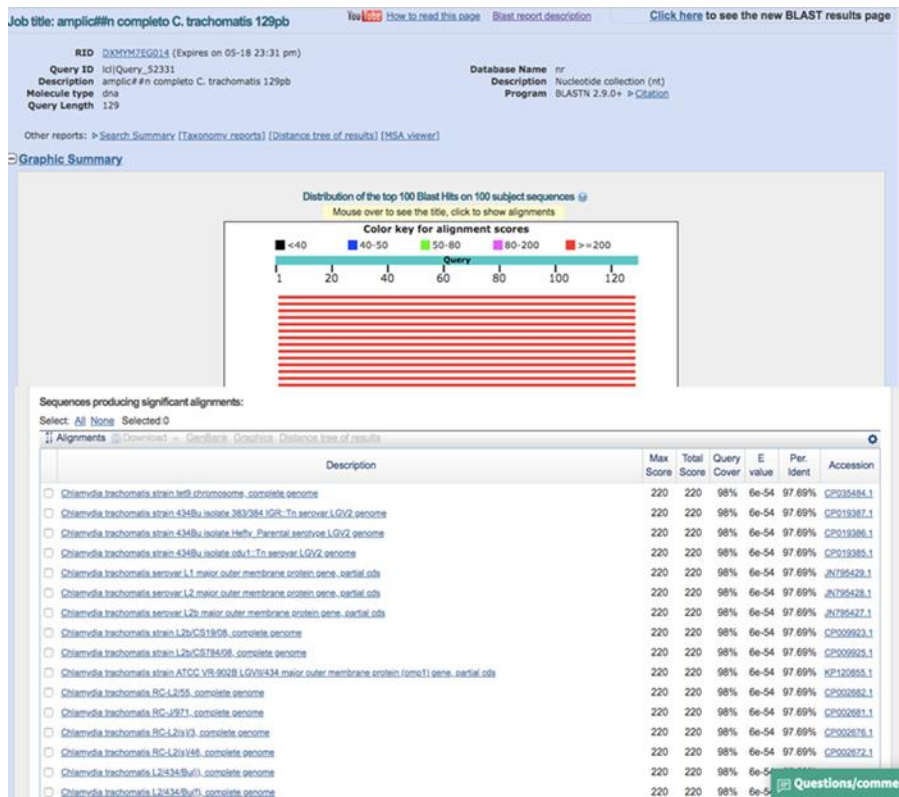


Figura 12. Blast del producto amplificado.

8.8. PCR punto final de las muestras positivas a *C. trachomatis* por ELISA

Se realizó un PCR punto final para la comprobación de las muestras M405, M449 y M414, que se obtuvieron positivas por medio de ELISA, en el cual se emplearon las condiciones del mix y del ciclo ya descritas, que previamente se estandarizaron para *C. trachomatis*. Los productos del PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 2%, con 2 µl de PM (marcador de peso molecular), 1 µl de buffer de carga y 2µl de SAFE GREEN (este es el sustituto del bromuro de etidio), en una cámara de electroforesis por 30 min a 75 volts.

En la Figura 13, se pudo observar que las muestras M405, M449 y M414, se encuentran entre la banda de 100 pb y 150 pb, encontrándose en el mismo rango que el control positivo de 129 pb, siendo así la demostración de ser positivas para *C. trachomatis*.

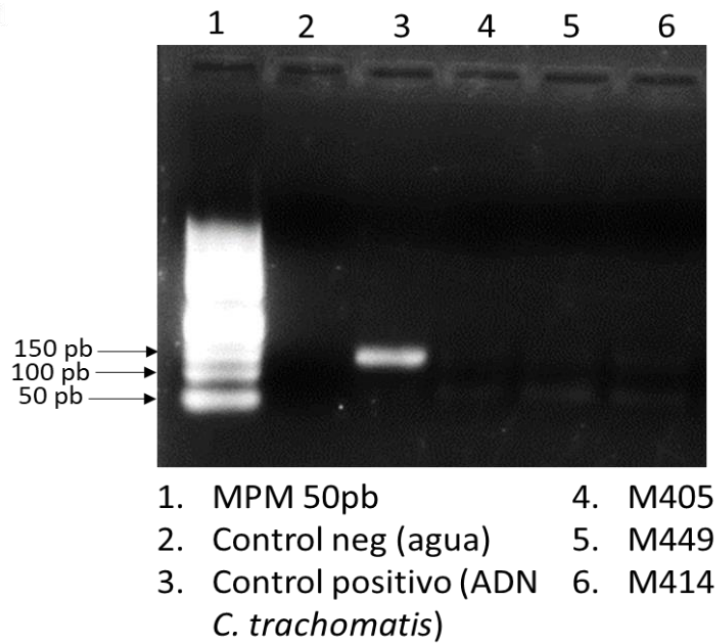


Figura 13. Gel de electroforesis para las muestras positivas de ELISA.

8.9. Obtención de la curva de disociación para la estandarización del PCR tiempo real

Derivado a la correcta estandarización del PCR punto final para *C. trachomatis*, se ocuparon las mismas condiciones del ciclo y con el siguiente mezcla de reacción que se mostraran a continuación, se realizó la curva de disociación que se muestra en la figura 14 para la obtención de la melting temperatura del producto y los CT's específicos para la amplificación *C. trachomatis*.

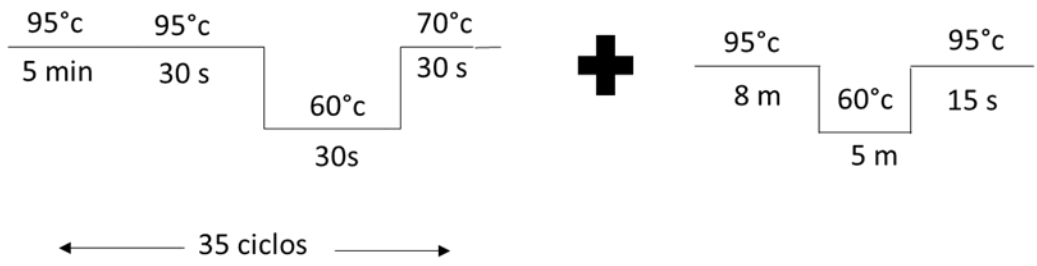


Figura 14. Condiciones de corrida para la estandarización, se realizó la curva de disociación de *C. trachomatis*.

Tabla 9. Mezcla de reacción para la estandarización, se realizó la curva *C. trachomatis*.

Mix de reacción	Concentración Final	Volumen final (1 reacción de 25 µl)
Maxima SYBR Green Rox qPCR Master Mix (2x)	1x	12.5µl
Oligo Forward-Omp A- (10pmol/µL) =(100µM)	.125 µM	.3µl
Oligo Reverse-Omp A- (10pmol/µL) =(100µM)	.125 µM	.3µl
Agua	-----	10.9 µl
ADN molde (1-100ng)	-----	1 µl

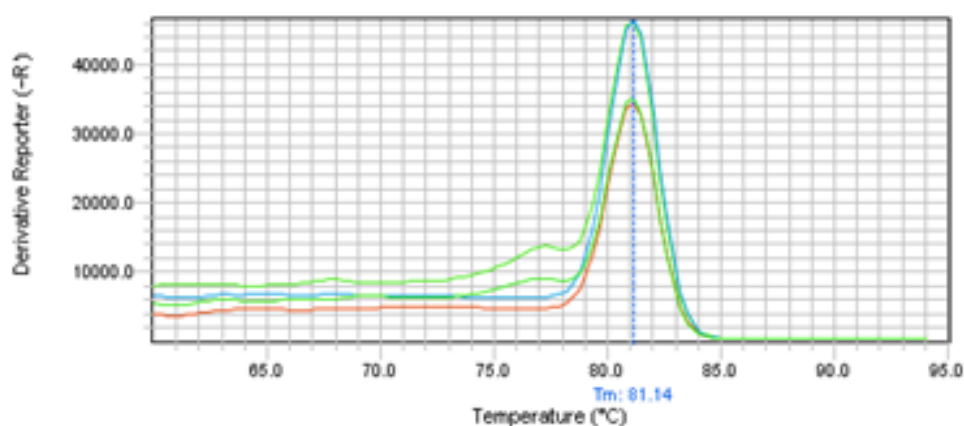


Figura 15. Curva de disociación.

Para la curva de estándar se realizaron ocho diluciones por triplicado en base 1:2, con ADN extraído del cultivo de células McCoy, las cuales están infectadas con un serotipo L2 del biovar LGV de *C. trachomatis*. El ADN se obtuvo siguiendo el protocolo ya descrito en la metodología.

Se obtuvo un límite de detección en la dilución de concentración de 1 a 32 con un 1ng de ADN de *C. trachomatis*. El promedio de la Tm del producto fue de 81.17 ± 0.5 y una CT máxima de 30 ciclos.

Las muestras con un Ct máximo a 30 y TM del producto 81.17 ± 0.5 , se consideran positivas a *C. trachomatis*.

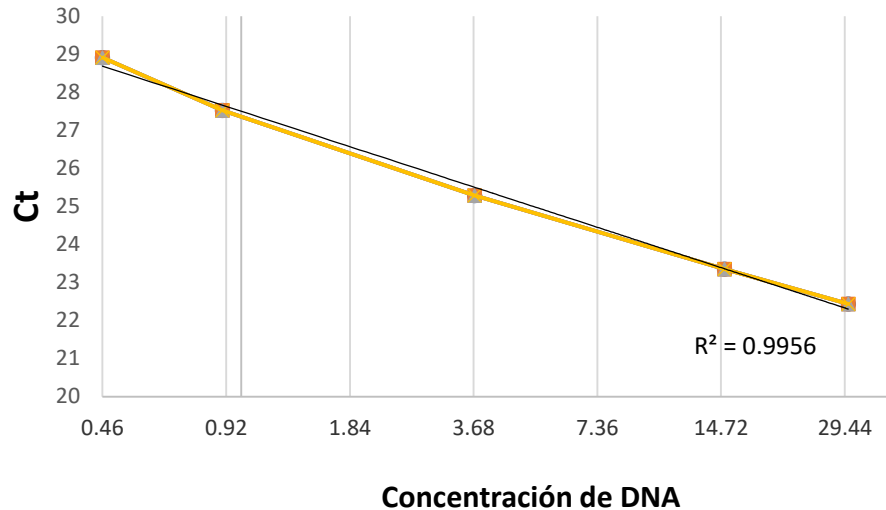


Figura 16. Curva estándar para *C. trachomatis*.

8.10. Resultados de amplificación de muestras por PCR para β -globina

De las 229 muestras procesadas para *C. trachomatis*, únicamente se procesaron 153 muestras para β -globina, de las cuales 88 muestras fueron positivas para β -globina y negativas para *C. trachomatis*, 28 fueron positivas y 28 negativas para ambos, 10 muestras fueron negativas para β -globina pero positivas para *C. trachomatis*.

8.11. Análisis de los resultados

Se procesaron 229 muestras por PCR tiempo real de las cuales 50 muestras fueron positivas para *C. trachomatis*, dando una prevalencia cruda de 21.8 %. Sin embargo, considerando los resultados de β -globina, el control interno del procesamiento, la prevalencia se calculó de la siguiente manera: de las 154 muestras con resultado de β -globina y *C. trachomatis*, 28 fueron negativas para ambos genes, por lo que se consideraron inválidas, de modo que el cálculo de prevalencia se basa en 126 muestras, de los cuales 37 fueron positivas para *C. trachomatis*, por lo que la prevalencia es 29.3%.

En la tabla 12 se muestran las proporciones de las diferentes variables con sus respectivas categorías de la población de estudio en comparación a las muestras positivas.

Tabla 10. Proporciones de las diferentes variables de la población de estudio.

Variab les	Categorías	N	N (Positivas)	Prevalencia (%)	p (χ^2)
Edad	10-19	73	20	25.3	0.8605
	20-24	53	18	33.9	
Centro de salud	Cuernavaca	47	17	36.1	0.5979
	Yautepec	79	21	26.5	
Trimestre de embarazo	Primero	27	8	29.6	0.1317
	Segundo	49	16	32.6	0.8461
	Tercero	50	14	28	0.2642

No se encontró ninguna diferencia significativa en la prevalencia de *C. trachomatis* por grupo de edad, por los centros de salud de Yautepec y Cuernavaca o por trimestre de embarazo,.

9. DISCUSIÓN

En todo el mundo se ha informado de un aumento en la prevalencia de infección por *C. trachomatis*. La OMS ha documentado que la prevalencia mundial de *C. trachomatis* en el año 2012 fue de 4.2%, sin embargo, esta prevalencia puede variar según las diferentes regiones entre 1.8 y 7.6%, así como por el grupo de edad (OMS, 2012).

En México, la prevalencia de infección genital por Clamidia en mujeres embarazadas se desconoce, debido a un subregistro de la prevalencia, ya que solo son notificados los casos por LGV, mientras que la infección por *C. trachomatis* no es de notificación obligatoria y mucho menos el diagnóstico es rutinario en cada visita ginecológica. En otros países se ha informado que la prevalencia es entre 3.2 y 12.3%, mientras que en adolescentes embarazadas se registra 14% (López-Hurtado et al., 2018). Es importante enfatizar que la detección oportuna de la infección por este patógeno puede prevenir las complicaciones que podría tener el recién nacido como la conjuntivitis, la neumonía o la sepsis.

En el presente estudio se encontró que el 29.3% de las adolescentes y jóvenes embarazadas incluidas en el estudio presentaban una infección por *T. vaginales*, siendo la prevalencia de 23.5% entre las adolescentes (15 a 19 años) y 33.9% en adultas jóvenes (20 a 24 años), sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Cabe resaltar que estos valores son mayores a los encontrados en otros estudios. Por ejemplo, en un estudio realizado en mujeres por López Hurtado y colaboradores (2018) en el Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México, se observó que las adolescentes de 15 a 19 años de edad presentaron una prevalencia de 10.9% en adultas jóvenes de 20 a 24 se encontró prevalencia de 5.6%. Sin embargo entre las embarazadas adolescentes como jóvenes la prevalencia de la bacteria fue aún menor (4.7% y de 2.0% respectivamente). Cabe recalcar que nuestras prevalencias obtenidas son mayores.

Además, en el estudio se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa de las prevalencias obtenidas dependiendo del método de detección ($p= 0,0001$), por el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) se obtuvo una prevalencia del 0.66%, mientras que por PCR en tiempo real fue de 29.3%, evidenciando la diferencia de sensibilidad entre ambos métodos. En base a la literatura se sabe que el ELISA es mucho menos sensible (Ostos y Melida, 2003; Cervantes, 2009) que el PCR en tiempo real (Costa, 2004), debido a ello se están detectando más casos por el método molecular que el serológico. Otra razón por las diferencias en los resultados puede ser que al momento en el que se obtuvo la muestra sea una infección muy reciente de modo que no puede ser detectada por no tener una suficiente concentración de IgMs o no se hayan generado anticuerpos debido a que la característica de *C. trachomatis* es su proliferación intracelular, esto genera que la respuesta inmune tarde más en surgir, además de que la respuesta inmune de mucosas se puede quedar solo a nivel local y no generar una respuesta inmune sistémica.

Por otra parte, en cuanto a la detección por PCR en tiempo real, de las nueve muestras que fueron positivas para *C. trachomatis*, pero negativas para el control interno, se consideraron como positivas debido a que fue posible amplificar ADN bacteriano, pero no celular, indicando que la muestra carecía de ADN celular. De cualquier manera, es necesario procesarlas nuevamente por PCR tiempo real para β -globina o incluso desde la extracción del ADN para la confirmación de la viabilidad del ADN, debido que el ADN puede estar demasiado fragmentado o degradado para que no haya tenido una correcta amplificación para el fragmento de para β -globina, pero si para el fragmento de *C. trachomatis*.

Así mismo, es importante mencionar que las 28 muestras negativas para ambos genes, se excluyeron del análisis final, dado que no es posible determinar si son negativas por la ausencia de ADN de clamidia o por la calidad de la muestra, por lo que es necesario procesar nuevamente desde la extracción de ADN para verificar el resultado.

Es relevante mencionar que la prevalencia obtenida hasta el momento entre la población de estudio, puede cambiar una vez que se haya procesado total de muestras de la población de estudio. Pero a pesar de esta limitación este es un dato importante para el estado, debido a que es el primero y no hay un estudio sobre prevalencias en estos grupos de edades y mucho menos en embarazadas.

10. CONCLUSIONES

- Nuestra hipótesis en el proyecto fue falsa, debido a que nuestro subconjunto de población no fue lo suficientemente grande para mostrar una diferencia estadísticamente significativa de las prevalencias obtenidas en los grupos de edad.
- La seroprevalencia de *C. trachomatis* en adolescentes y mujeres jóvenes embarazadas de tres centros de salud del estado de Morelos fue de 0.66; mientras que por PCR en tiempo real, fue de 29.6%. Estos resultados indican que el PCR es mucho más sensible para la detección, siendo así más recomendable esta práctica en las mujeres embarazadas para evitar complicaciones en el embarazo.
- No se encontró una diferencia significativa en la prevalencia de *C. trachomatis* por grupo de edad, esto derivado de que nuestro subconjunto de población es reducido.
- No hubo diferencia en la prevalencia de *C. trachomatis*, en los centros de salud de Yautepec y Cuernavaca, sugiriendo que son poblaciones con características similares.

11. PERSPECTIVAS

Como perspectivas del presente proyecto se plantean las siguientes:

Seguimiento del procesamiento de las muestras para la obtención de una prevalencia real, lo que nos podría llevar a tener una diferencia significativa en las diferentes variables y categorías. Lo anterior permitiría hacer un análisis más completo de la población de estudio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, R., Galán, J. C., Fernández, J. G., Rodríguez-Domínguez, M., Salinas, J., & Gámez, S. S. (2012). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recuperado el, 9.
- Black, C. M. (1997). Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical microbiology reviews*, 10(1), 160-184.
- Byrne, G. I. (2010). *Chlamydia trachomatis* strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. *The Journal of infectious diseases*, 201(Supplement_2), S126-S133.
- Canto-de Cetina, T., Polanco-Reyes, L., Fernández-González, V., & Ruiz-García, S. (2003). Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. *Salud pública de México*, 45, S657-S661.
- Cervantes, E. (2009). Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(1), 18-22.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(5), 299-305.
- Dean, D., & Millman, K. (1997). Molecular and mutation trends analyses of *omp1* alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Implications for the immunopathogenesis of disease. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 475-483.
- Dutilh, B., Bebear, C., Rodriguez, P., Vekris, A., Bonnet, J., & Garret, M. (1989). Specific amplification of a DNA sequence common to all *Chlamydia trachomatis* serovars using the polymerase chain reaction. *Research in Microbiology*, 140(1), 7-16.
- Frontela Noda, M., Rodríguez Marín, Y., Verdejas Varela, O. L., & Valdés Martínez, F. J. (2006). Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres cubanas en edad reproductiva. *Revista Cubana de Endocrinología*, 17(2), 0-0.
- Infante Tavío, N. I., Mendo Alcolea, N., Hernández Lin, T., Cala Calviño, L., & Samón Rodríguez, E. (2012). Factores de riesgo asociados a la infección vaginal por *Chlamydia trachomatis*. *Medisan*, 16(5), 686-693.
- López-Hurtado, M., García-Romero, S., Escobedo-Guerra, M. R., Bustos-López, D., & Guerra-Infante, F. M. (2018). Prevalencia de la infección genital por *Chlamydia*

- trachomatis en mujeres que asisten al Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México. *Revista chilena de infectología*, 35(4), 371-376
- Martínez, M. A. (2001). Diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis*: Estado actual de un problema. *Revista chilena de infectología*, 18(4), 275-284.
- Martínez, M. A., Diomedi, A., Kogan, R., & Borie, C. (2001). Taxonomía e importancia clínica de las nuevas familias del orden Chlamydiales. *Revista chilena de infectología*, 18(3), 203-211.
- Matta, S., Arango, Á. I., & Visbal, J. (2001). *Chlamydia trachomatis*: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista MVZ Córdoba*, 6(2).
- Occhionero, M., Paniccia, L., Pedersen, D., Rossi, G., Mazzucchini, H., Entrocassi, A., & Fermepin, M. R. (2015). Prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y factores de riesgo de infecciones transmisibles sexualmente en estudiantes universitarios. *Revista argentina de microbiología*, 47(1), 9-16.
- Ostos, O. L., & Sánchez, R. M (2003). *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *Nova*, 1(1), 81-93.
- Roca, B. (2007). Infecciones por clamidias. In *Anales de medicina interna* (Vol. 24, No. 6, pp. 292-299). Arán Ediciones, SL.
- Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, F., & Peeling, R. (2014). Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Organización Panamericana de la Salud.
- Urbina, M. T., Medina, R., Muñoz, G., Sánchez, V., Benjamín, I., & Lerner, J. (2010). Infección por *Chlamydia trachomatis*. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 70(2), 90-96.
- Vergara-Ortega, D. N., Sevilla-Reyes, E. E., Herrera-Ortiz, A., Torres-Ibarra, L., Salmerón, J., Lazcano-Ponce, E., & Sánchez-Alemán, M. A. (2018). Real time PCR to evaluate HSV-2 shedding from anal and genital samples among men who have sex with men, living with HIV. *Journal of medical virology*, 90(4), 745-752.
- Zamboni, M., Ralph, C., García, P., & Cuello, M. (2016). La prevalencia actual de infección genital por *Chlamydia trachomatis* en adolescentes y mujeres jóvenes chilenas asintomáticas justifica la vigilancia periódica. *Revista chilena de infectología*, 33(6), 619-627.

ANEXOS

ANEXO 1. Cartas de consentimiento informado



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EMBARAZADA MAYOR DE 18 o EMANCIPADA



Folio: _____

Fecha: _____

Título de proyecto: Participación de la microbiota vaginal para el riesgo de las infecciones de transmisión sexual durante el embarazo adolescente.

Estimada:

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en colaboración con el Hospital de la Mujer de Morelos está realizando el proyecto de investigación arriba mencionado. El objetivo del estudio es conocer la asociación entre la flora vaginal y la adquisición de infecciones de transmisión sexual (ITS) en las adolescentes embarazadas. El estudio se está realizando en el Hospital de la Mujer de Morelos.

Si Usted acepta que su hija participe en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

1. Le haremos algunas preguntas generales, como edad y lugar de residencia, además se le preguntará acerca de su sexualidad. La encuesta tendrá una duración máxima de 20 min y se realizará en el Hospital durante su consulta ginecológica.
2. Se le solicitará que done una muestra de sangre (6 ml), la cual utilizaremos para buscar evidencia de algunas infecciones como sífilis.
3. También se le solicitará una muestra de exudado vaginal. Lo cual nos permitirá hacer las pruebas apropiadas para diagnosticar otras ITS (herpes, clamidiasis y tricomoniasis), así como presencia de vaginosis.
4. La muestra de sangre y exudado vaginal se le solicitará en cada trimestre del embarazo (3 veces), durante las consultas de seguimiento del embarazo.
5. Con las muestras otorgadas, se generará un banco de muestras, que servirán para este y futuros proyectos relacionados con otras ITS que no están contempladas en el presente estudio. Cabe mencionar que todas las muestras serán transportadas al Instituto Nacional de Salud Pública para su almacenamiento y procesamiento. Las muestras se almacenarán por 10 años.

Le aclaramos que tanto la encuesta como la toma de muestras serán realizadas por personal capacitado. También le aclaramos que estas pruebas no implican un riesgo para usted ni para el bebé, ya que suelen practicarse de manera rutinaria en el seguimiento del embarazo.

Beneficios: En caso de encontrar alguna ITS durante el diagnóstico, se avisará al médico tratante a más tardar en dos semanas, para que tome las medidas pertinentes. Además, su participación colaborará con la investigación realizada por el INSP en la generación de conocimiento que más adelante ayude en la salud de las adolescentes embarazadas.

Confidencialidad: Toda la información que usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificada con un número (Folio) y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificada.

Riesgos Potenciales/Compensación: Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hiciera sentir un poco incomoda, tiene el derecho de no responderla. Es posible que la toma de muestra de sangre pueda causar un riesgo mínimo (un pequeño moretón o dolor al momento) así mismo, durante el exudado vaginal es posible que pueda haber cierta molestia, sin que sea un riesgo para el embarazo o para el bebé. Es importante aclarar que el material que se utilizará es nuevo y desechable. En el remoto caso de que ocurriera alguna molestia más allá del mínimo, resultado de estas dos acciones, favor de contactarnos para canalizarla de inmediato a su médico tratante. Su hija no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para ella.

Participación Voluntaria/Retiro: La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le tratan en el Hospital de la Mujer, ya que el estudio es completamente independiente de la consulta a la que usted tiene derecho.

Números a Contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto: Dra. Antonia Herrera Ortiz al siguiente número de teléfono (777)3293000 ext: 2402 en un horario de 8:00 a 16:00 h.

Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación, puede comunicarse con la presidenta del Comité de Ética del INSP, Dra. Angélica Ángeles Llerenas, al teléfono (777) 329-3000 ext. 7424 de 8:00 am a 16:00 hrs. o si lo prefiere puede escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico etica@insp.mx

Si usted acepta que su hija participe en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Actividades en las cuales usted acepta participar (marque con una X)

- Encuesta
- Toma de muestra de sangre venosa
- Exudado vaginal
- Almacenamiento y utilización de las muestras para futuros estudios relacionados a ITS

Nombre y firma de la participante: _____

Nombre y Firma Testigo 1: _____

Nombre y Firma Testigo 2: _____

Nombre y Firma aplicante: _____

ANEXO 2. Cuestionario para adolescentes y jóvenes embarazadas

Fecha: _____

Título de proyecto: Participación de la microbiota vaginal para el riesgo de las infecciones de transmisión sexual durante el embarazo adolescente.

I. DATOS GENERALES

1. ¿Qué edad tienes? _____
2. ¿En qué localidad vives, municipio?

3. ¿Cuál es tu estado civil?
 - a. Soltera d. Divorciada
 - b. Casada e. Separada
 - c. Unión libre f. Viuda
4. ¿Cuál es tu ocupación?
 - a. Estudio c. Desempleado
 - b. Trabajo d. Ama de casa
5. ¿Cuál es tu grado máximo de estudios?
 - a. Ninguno d. Preparatoria o bachillerato
 - b. Primaria e. Técnico
 - c. Secundaria f. Licenciatura

II. VIVIENDA

6. La casa donde vives es
 - a. Propia b. Rentada c. De un familiar
7. ¿Cuántas personas viven en la casa? _____
8. ¿Cuántos cuartos usan como dormitorios? _____
9. ¿Cuáles de los siguientes aparatos o servicios tienen en su casa?
 - a. Automóvil propio d. Televisión de paga
 - b. Computadora portátil e. Teléfono celular
 - c. Internet f. Agua dentro de la casa
10. ¿La casa cuenta con drenaje?
 - a. Si b. No

III. HÁBITOS

11. En toda tu vida, ¿has fumado 100 cigarros o más?
 - a. Sí c. No
 - b. Antes fumaba, ahora ya no
12. En el último año ¿en cuántas ocasiones tomaste 5 copas o más?
 - a. Nunca he tomado e. Cada 15 días
 - b. No en los últimos 12 meses, pero antes sí. f. Cada Semana
 - c. Ocasionalmente (2 o 3 veces al año) g. Diario
 - d. Cada mes
13. ¿Qué tipo de droga ilegal has consumido? (Puedes marcar más de una)
 - a. Nunca he probado d. Marihuana, mota, hashish
 - b. Chochos, tachas, éxtasis e. Cocaína, perico, nieve, crack, grapa
 - c. Hongos, peyote, LSD, PCP f. Otros

IV. DATOS CLÍNICOS

14. ¿Has tenido alguna vez flujo o escurrimiento vaginal?

- a. Sí b. No (pase a la pregunta 16)
15. ¿De qué características era el flujo o escurrimiento vaginal? (Puedes marcar más de una)
- a. Transparente c. Blanco
b. Amarillo d. Verde
c. Café e. Olía mal
d. Comezón o ardor f. Dolor en el vientre
16. ¿Has tenido alguna vez ampollas o úlceras en tu vagina por dentro, por fuera o alrededor, inclusive en las ingles?
- a. Sí b. No
17. ¿Has tenido alguna vez verrugas, granos o ronchas en tu vagina por dentro, por fuera o alrededor, inclusive en las ingles?
- a. Sí b. No
18. ¿Tus relaciones sexuales son dolorosas (dispareunia)?
- a. Sí b. No
19. ¿Has tenido diagnóstico de endometriosis?
- a. Sí b. No c. No sé
20. ¿Has sufrido de enfermedad pélvica inflamatoria o infección por Clamidia ó Gonorrea?
- a. Sí b. No c. No sé
21. ¿Alguna vez has tenido alguna otra enfermedad de transmisión sexual?
- a. Sí ¿Cuál? _____
b. No c. No estoy segura
22. ¿Padeces alguna enfermedad crónica?
- a. No d. Hipertensión
b. Diabetes e. Otra
c. Obesidad f. No estoy segura
23. Antes del embarazo, ¿variaba tu regla en el número de días?
Sí b. No
24. Antes del embarazo, ¿tenías síntomas del síndrome pre-menstrual antes de la regla (distensión, sensibilidad en los senos, carácter irritable o depresivo)?
- a. Sí b. No
24. Antes del embarazo ¿Tenías reglas dolorosas (dismenorrea)?
- a. Sí b. No
25. ¿Cuántos embarazos has tenido, incluyendo el actual? _____
26. De estos embarazos ¿cuántos han sido...
- a. nacidos vivos que no han fallecido? _____
b. nacidos vivos que fallecieron antes de cumplir un año de edad? _____
c. nacidos muertos? _____
d. abortos? _____

V. EMBARAZO ACTUAL

28. ¿Cuál es tu peso? _____
29. ¿Cuánto mides? _____
30. ¿Cuántos kilos has subido con respecto a antes de tu embarazo? _____
31. ¿Cuántos meses de embarazo tienes actualmente? _____
32. ¿Cuántas veces te han revisado? _____
33. ¿Quién te revisó la mayoría de las veces?
- | | |
|--|---------------------------|
| a. Médico | d. Otro personal de salud |
| b. Enfermera (o) | e. No recuerda |
| c. Promotor, auxiliar o asistente de salud | f. No me han revisado |
| d. Partera profesional técnica | |
34. ¿En qué lugar te revisaron la mayoría de las veces?
- | | |
|---|--|
| a. Seguro Social (IMSS) | d. Consultorio dependientes de Farmacia |
| b. ISSSTE | e. Consultorio, clínica u hospital privado |
| c. Centro de Salud u Hospital de la SSA | f. Otro (especifique) _____ |
35. ¿Te han realizado alguna de las siguientes pruebas? (Puede marcar más de una)
- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| a. Examen general de orina | d. Prueba de detección de sífilis |
| b. Examen de sangre | e. Prueba de detección de VIH |
| c. Presión sanguínea | |
36. Te han diagnosticado o te dijeron que tenías: (Puede marcar más de una)
- | | |
|-----------------------|------------------------------------|
| a. Sangrado vaginal | d. Infección de transmisión sexual |
| b. Amenaza de aborto | e. Infección por VIH o SIDA |
| c. Infección urinaria | f. Otra enfermedad o padecimiento |

VI. VIDA SEXUAL

37. ¿A qué edad tuviste tu primera relación sexual? _____
38. ¿Qué tipo de método anticonceptivo utilizaron tú o tu pareja durante su primera relación sexual? Puedes poner más de una opción
- | | |
|--|------------|
| a. Pastillas o píldoras | f. Ritmo |
| b. Emergencia (píldora del día después) | g. DIU |
| c. Parches | h. Condón |
| d. Inyección | i. Ninguna |
| e. Retirarse antes de venirse o terminar | |
39. ¿Para qué usaron condón?
- | |
|--|
| a. No usamos condón |
| b. Para prevenir infección por VIH |
| c. Para prevenir una infección de transmisión sexual diferente a VIH |
| d. Para prevenir embarazo no deseado |
| e. Porque su pareja se lo pidió, aunque desconoce el motivo. |
40. En los últimos 12 meses ¿Con cuántas personas has tenido relaciones sexuales?

- a. Cuántos hombres _____ b. Cuántas mujeres _____
41. En los últimos 12 meses ¿Con qué frecuencia has tenido relaciones sexuales?
- a. 1-2 veces al año f. 3 veces al mes
 b. 3-6 veces al año g. 1 vez a la semana
 c. 7-11 veces al año h. 2-3 veces por semana
 d. 1 vez al mes i. 4-5 veces por semana
 e. 2 veces al mes j. diario
42. Durante tu vida ¿Con cuántas personas has tenido relaciones sexuales?
- a. Cuántos hombres _____ b. Cuántas mujeres _____
43. ¿Con qué frecuencia utilizas el condón al tener relaciones sexuales?
- a. Siempre d. Casi Nunca
 b. La mayoría de las veces c. Nunca
44. ¿Has pagado alguna vez por tener relaciones sexuales?
- a. Sí b. No
45. ¿Has recibido dinero, regalos o favores, por tener relaciones sexuales?
- a. Sí b. No
46. ¿Has tenido alguna relación sexual con personas de tu mismo sexo?
- a. Sí b. No
47. ¿Has tenido relaciones sexuales con parejas ocasionales? (con personas que es la primera o segunda ocasión que ve)
- a. Sí b. No
48. ¿Usas condón al tener relaciones sexuales con parejas ocasionales?
- a. Sí c. No
 b. A veces d. No he tenido parejas ocasionales
49. En el último mes ¿has tenido relaciones sexuales con más de una persona?
- a. Sí ¿Con cuántas personas? _____
 b. No
50. ¿Con quién acostumbras tener relaciones sexuales?
- a. Únicamente con hombres
 b. Con hombres la mayoría de las veces y ocasionalmente con mujeres
 c. Con hombres y mujeres por igual
 d. Con mujeres la mayoría de las veces y ocasionalmente con hombres
 e. Únicamente con mujeres
51. ¿Crees posible que puedas contagiarte de alguna infección de transmisión sexual?
- a. No es posible c. Muy posible
 b. Poco posible d. No se
52. ¿Has tenido relaciones sexuales orales?
- a. Sí (he recibido sexo oral) c. Sí (he recibido y he dado sexo oral)

b. Sí (he dado sexo oral)

d. No

53. ¿Has tenido relaciones sexuales anales?

a. Sí

b. No

54. ¿Usas duchas vaginales?

a. Sí b. No

55. En el último mes ¿has usado óvulos con antibióticos?

Sí b. No

56. En el último mes, ¿has tomado o te han inyectado algún antibiótico?

a. Si b. No

Nombre y firma del encuestador

ANEXO 3. Extracción de ADN

Hoja de trabajo para documentar el proceso de extracción y purificación de DNA ZYMO RESEARCH Quick-DNA™

Lote: _____ Fecha de caducidad: _____ Usuario: _____ Fecha de procesamiento: _____

Antes de empezar temperar y homogeneizar las muestras a procesar.

Muestras a procesar:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____
11. _____
12. _____

La digestión se hará en tubos de 1.5 ml etiquetados de acuerdo al número de la lista anterior que le corresponde a la muestra que se procesaran en ese tubo.

1. Transferir 200 μ l _____ de muestra _____ (especifique tipo de muestra, exudado vaginal, cultivo etc.) al tubo de 1.5 ml. El resto de la muestra regresarlo inmediatamente a su ubicación original.
2. Adicionar 200 μ l _____ buffer de biofluido y 20 μ l _____ de proteinasa K, una vez agregados se homogenizan, vortex (10-15 segundos) _____, Centrifugar (spin) _____
3. Incubar a 55°C por 10 minutos: Hora de inicio _____ Hora de finalización _____
4. Adicionar un volumen de buffer de unión genómica (420 μ l) _____ al tubo con la digestión, homogeneizar la mezcla, Vortex (10-15 s) _____, centrifuga (Spin) _____. Transferir el contenido a una columna de ZYMO (etiquetada adecuadamente) en un tubo colector (etiquetado adecuadamente). Centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, desechar el líquido y el tubo colector, este último se cambia por uno nuevo (etiquetado adecuadamente).
5. Añadir 400 μ l _____ de buffer de pre-lavado de DNA a la columna. Centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.
6. Se agrega 700 μ l _____ de buffer de lavado de DNA a la columna posteriormente centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.
7. Se agrega 200 μ l _____ de buffer de lavado de DNA a la columna posteriormente centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.
8. Transferir la columna al tubo de centrifuga, previamente etiquetado con la correspondiente muestra, una vez hecho esto, añadir 40 μ l _____ de buffer de Elusión (Previamente calentado a 70°C _____).

9. Incubar por 7 min a temperatura ambiente (T=_____°):

Hora de inicio _____

Hora de finalización _____

10. Centrifugar a máximo nivel _____ por 1 minuto _____

11. Cuantificar en nanodrop cada una de las muestras y registrar la concentración en ng/ul

Muestra	[] ng/μl	A260/280	A260/230	A260	A280
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					

ANEXO 4. Purificación de ADN a de geles de agarosa

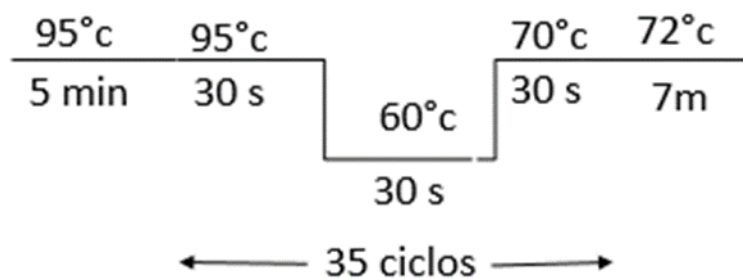
Purificación de producto de PCR de electroforesis en gel de agarosa por medio del kit de extracción de DNA pure extreme de fermentas.

1. Correr el gel de agarosa con el producto de PCR en cuestión (10µl de muestra + 2 µl de buffer de carga).
2. Cortar la banda donde se encuentre el producto (evitar la exposición a la luz).
3. Determinar el volumen aproximado de la banda de gel (conversión 1g= 1ml) y peso, colocar la banda en un tubo.
4. Pesar el tubo por sí solo, posteriormente pesarlo con la banda de gel.
5. Una vez teniendo el conocimiento del volumen de la banda, añadir 3 volúmenes de binding solution a 1 volumen de gel.
6. Incubar 5 minutos a 55°C
7. Si el gel se hizo y corrió con TBE, añadir ½ de volumen de TBE conversión buffer y 4 a 5 volúmenes de binding solution a 1volumen dado de agarosa.
8. Añadir la suspensión de silica de .1 a 2.5 mg de ADN, añadir 6µl de silica.
9. Incubar 5 min a 55°C.
10. Mezclar vigorosamente cada 2 minutos para mantener la silica en suspensión.
11. Centrifugar (spin) a 1300 rpm la silica- AND por 5 a 10 segundos para formar un pellet, posteriormente removiendo el sobrenadante.
12. Añadir 500µl de buffer de lavado frío (-20°C), mezclar vigorosamente y centrifugar (spin) de 5 a 10 segundos; descartar el sobrenadante
13. •Repetir 3 lavados
14. Dar un último spin y remover el liquido con pipeta, si en necesario dejar secar el pellet de 10 a 15 minutos.
15. Eluir el ADN en agua o solución de TE. Resuspender el pellet con agua ionizada (10µl) e incubar por 5 minutos a 55°C.
16. Centrifugar (spin) al tubo por 30 segundos, remover el sobrenadante a un tubo nuevo.
17. •Se puede aumentar la eficiencia repitiendo la elución de 2 a 3 veces (cada vez con 10 µl).

ANEXO 5. PCR B-Globina.

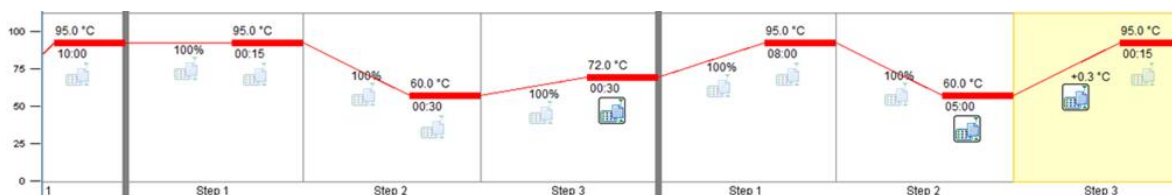
Condiciones de reacción y corrida para el PCR punto final β Globina 140 Pb.

Mezcla de reacción	Volumen final (reacción de 25 μ l)	Concentración final
Buffer KCl (10x)	2.5 μ l	1x
MgCl ₂ (25mM)	2.5 μ l	2Mm
dNTP's (10mM)	0.8 μ l	0.2Mm
Taq polimerasa (5u/ μ L)	0.5 μ l	1 U/ μ l
Oligonucleótido F2q beta (10pmol/ μ L) = (100 μ M)	2.5 μ l	0.15Mm
Oligonucleótido R2q beta (10pmol/ μ L) = (100 μ M)	2.5 μ l	0.15Mm
Agua	8.7 μ l	-
ADN molde (1-100ng)	5 μ l	-



ANEXO 6. Condiciones de reacción y corrida para el PCR tiempo real β Globina 161 Pb.

Reactivo	1 reacción	Concentración final
SYBR [2x]	6	[1x]
GH20 (2.5mM)	0.36	0.075 mM
R2qbeta (2.5mM)	0.36	0.075mM
Agua	4.28	cbp
ADN	1	-



ANEXO 7. Condiciones PCR OmpA *C. trachomatis*

Condiciones de reacción y corrida para el PCR punto final para *C. trachomatis* 129 pb.

Tabla 10. Mezcla de reacción para la estandarización del PCR punto final.

Mezcla de reacción	Volumen final (reacción de 25 μ l)	Concentración final
Buffer KCl (10x)	2.5 μ l	1x
MgCl ₂ (25mM)	2.5 μ l	2Mm
dNTP's (10mM)	0.8 μ l	0.2Mm
Taq polimerasa (5u/ μ L)	0.5 μ l	1 U/ μ l
Oligo Forward-Omp A- (10pmol/ μ L) =(100 μ M)	2.5 μ l	0.15Mm
Oligo Reverse-Omp A- (10pmol/ μ L) =(100 μ M)	2.5 μ l	0.15Mm
Agua	8.7 μ l	-
ADN molde (1-100ng)	5 μ l	-

ANEXO 8. Condiciones de reacción y corrida para la estandarización del PCR tiempo real *C. trachomatis* 129 Pb.

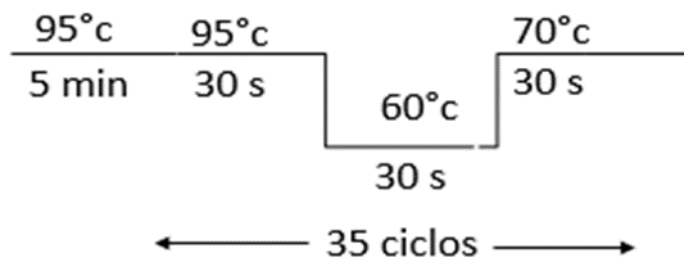


Tabla 17. Mezcla de reacción para la estandarización PCR en tiempo real para *C. trachomatis*.

Mix de reacción	Concentración Final	Volumen final (1 reacción de 25 µl)
Maxima SYBR Green Rox qPCR Master Mix (2x)	1x	12.5µl
Oligo Forward-Omp A- (10pmol/µL) =(100µM)	.125 µM	.3µl
Oligo Reverse-Omp A- (10pmol/µL) =(100µM)	.125 µM	.3µl
Agua	-----	10.9 µl
ADN molde (1-100ng)	-----	1 µl

Figura 13. Condiciones de la corrida para la estandarización del PCR tiempo real para *C. trachomatis*.

