

Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Streptococcus agalactiae, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL
ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO SUPERIOR DE POSTGRADO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL ECUADOR**

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
MICROBIOLOGÍA MENCIÓN CLÍNICA**

**Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y
Streptococcus agalactiae, en pacientes gestantes del área urbana de la
ciudad de Ibarra, año 2008.**

**Dra. Lenis Ortiz Gómez
Dr. Vladimir Bazante Ramírez**

QUITO, 2010

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL
ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO SUPERIOR DE POSTGRADO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL ECUADOR**

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
MICROBIOLOGÍA MENCIÓN CLÍNICA**

**Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y
Streptococcus agalactiae, en pacientes gestantes del área urbana de la
ciudad de Ibarra, año 2008.**

**Autores: Dra. Lenis Ortiz Gómez
Dr. Vladimir Bazante Ramírez**

Director: Dr. Oswaldo Rodríguez Mora

QUITO, 2010

Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Streptococcus agalactiae, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

La información contenida en esta tesis puede ser utilizada citando las fuentes y autores. Todos los derechos reservados. Dra. Lenis Ortiz Gómez y Dr. Vladimir Bazante Ramírez. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Médicas - Instituto Superior de Postgrado & Pontificia Universidad Católica del Ecuador – Escuela de Bioanálisis; Quito 2010.

DEDICATORIA

A nuestros hijos: César Enrique, Pamela, Vladimir, Jhossua y Juan José; que son nuestro estímulo y motivación para superarnos académicamente. Por haber aceptado y perdonado con generosidad nuestras largas horas de ausencia durante el transcurso de la Maestría y la elaboración de este proyecto

AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y su Escuela de Bioanálisis, quienes nos acogieron durante innumerables días de trabajo permitiendo una formación científica, técnica y humanística dentro de un marco moral y ético.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Oswaldo Rodríguez, coordinador de la maestría y Director de nuestra Tesis, quien más allá de su excelente preparación académica supo guiarnos con dedicación, responsabilidad, paciencia y generosidad en todos los aspectos científicos para alcanzar el éxito de este trabajo científico.

A la Dra. Josefina Egas quien con su empeño y dedicación sacó adelante este proyecto de formación de características internacionales.

A la Dra. Bertha Estrella quien ha dedicado largas horas de su trabajo a encaminarnos, guiarnos y ayudarnos en el desarrollo y el análisis estadístico de esta tesis.

A todos nuestros docentes, quienes no escatimaron esfuerzos durante nuestra formación como Microbiólogos Clínicos.

Un especial reconocimiento a todas las madres del Subcentro de Salud No. 1 y del Hospital San Vicente de Paúl, quienes confiaron en este proyecto y permitieron ser la base de estudio del mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> (SGB).....	1
1.2 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT).....	2
1.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG).....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
3. MARCO TEORICO.....	5
3.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> o Estreptococo beta-hemolítico del grupo B (SGB)...	5
3.1.1. Prevalencias de SGB.....	6
3.1.2 Métodos de diagnóstico.....	7
3.2 <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG).....	8
3.2.1 Prevalencia de <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
3.2.2 Prevalencia de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10
3.2.3 Métodos de diagnóstico para <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. DEFINICIÓN DE VARIABLES.....	17
6.1 Embarazo en el tercer trimestre de gestación.....	17
6.2 Aborto.....	17
6.3 Parto prematuro.....	17
6.4 Ruptura Prematura de membranas.....	17
6.5 Antibióticoterapia sistémica.....	17
6.6 Número de parejas sexuales.....	17
6.7 Presencia de <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
6.8 Presencia de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	18
6.9 Presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
6. 10 Prueba de CAMP	19
6. 11 Prueba de aglutinación en látex	19
7. METODOLOGÍA.....	20
7.1 Sujetos, Materiales y Métodos.....	20
7.1.1 Diseño.....	20
7.1.2 Área de Estudio.....	20
7.2 Universo, Población y muestra.....	20
7.2.1 Población de estudio.....	20
7.2.2 Criterios de inclusión.....	21
7.2.3 Criterios de exclusión.....	21
7.3 Cálculo de la muestra.....	21
8. PROCEDIMIENTOS.....	22
8.1 Toma de muestras.....	22
8.1.1 Recolección, transporte y almacenamiento de muestras Vaginales y rectales para <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
8.1.2 Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	

cervicales para <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	22
8.2 Técnicas.....	23
8.2.1 Protocolo de Microbiología (Hospital San Vicente de Paúl)	23
8.2.1.1 Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	23
8.2.2 Protocolos Moleculares para el diagnóstico de <i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> por PCR en tiempo real (qPCR) de muestras cervicales (PUCE).....	24
8.2.2.1 Extracción de DNA.....	25
8.2.2.2 Cuantificación de DNA por espectrofotómetro.....	25
8.2.2.3 Control de extracción de DNA, Amplificación de DNA de β - Globina (PCR convencional).....	25
8.2.2.4 Amplificación de DNA de <i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> por PCR en tiempo real (qPCR)	25
9. ESTANDARIZACIÓN.....	27
9.1 Toma de muestras.....	27
9.2 Corrida de qPCR.....	27
	<u>10. ANÁLISIS</u>
ESTADÍSTICO.....	28
	<u>11. NORMAS</u>
ÉTICAS.....	28
	<u>12.</u>
RESULTADOS.....	30
12.1 Caracterización general de la población estudiada.....	30
12.2 Prevalencias de los microorganismos estudiados.....	33
12.3 Comparación de las características demográficas y clínicas de las pacientes con y sin <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
13. DISCUSIÓN.....	37
13.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> o Estreptococo beta hemolítico del grupo B (SGB)	37
13.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	40
13.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43
14. CONCLUSIONES.....	46
15. RECOMENDACIONES.....	47
16. BIBLIOGRAFÍA.....	49
17. ANEXOS DE LA INVESTIGACIÓN	57
Anexo No. 1 – Consentimiento informado.....	57
Anexo No. 2 – Enrolamiento de las pacientes.....	59
Anexo No. 3 – Factores de riesgo.....	60
Anexo No. 4 – Prueba de Camp.....	63
Anexo No. 5 - Prueba de aglutinación en látex para la identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	64
Anexo No. 6 – Técnica de extracción de DNA.....	66
Anexo No. 7 – Cuantificación de DNA por espectrofotometría.....	67
Anexo No. 8 – Control de extracción de DNA, Amplificación de DNA de β – globina (PCR convencional)	68
Anexo No. 9 - Técnica de amplificación de DNA <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	69
Anexo No. 10 – Técnica de amplificación de DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i>	71

<u>Anexo No. 11 - Control de temperatura de almacenamiento de reactivos.....</u>	<u>73</u>
<u>Anexo No. 12 - Registro para el control de temperatura de envío</u> <u>y recepción de muestras.....</u>	<u>74</u>
<u>Anexo No. 13 – Registro para el control de temperatura de</u> <u>almacenamiento de las muestras.....</u>	<u>75</u>
<u>Anexo No. 14 – Registro de resultados del cultivo y de la qPCR</u>	<u>76</u>
<u>Anexo No. 15 – Solicitud y aceptación del Comité de Bioética del</u> <u>Hospital “San Vicente de Paúl”</u>	<u>77</u>
<u>Anexo No. 16 – Resultado de laboratorio.....</u>	<u>79</u>
<u>18. ANEXOS QUE RESPALDAN LA INVESTIGACIÓN.....</u>	<u>80</u>
<u>Anexo No. 17 – Operacionalización de las variables.....</u>	<u>80</u>
<u>Anexo No. 18 – Cronograma de trabajo.....</u>	<u>81</u>
<u>Anexo No. 19 - Recursos de la investigación.....</u>	<u>82</u>
<u>Anexo No. 20 - Flujograma de trabajo.....</u>	<u>85</u>
<u>Anexo No. 21 - Resultados de la cuantificación de DNA.....</u>	<u>86</u>
<u>Anexo No. 22 - Lista de figuras.....</u>	<u>89</u>

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla No. 1.- Datos demográficos de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>30</u>
<u>Tabla No.2 .- Historia Gineco-obstétrica de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>31</u>
<u>Tabla No. 3.- Manifestaciones clínicas de infección génito-urinaria en las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>32</u>
<u>Tabla No. 4.- Signos físicos encontrados durante la toma de muestras en las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>32</u>
<u>Tabla No. 5.- Datos clínicos de la pareja sexual de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>33</u>
<u>Tabla No. 6.- Prevalencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> (SGB) y <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) por grupos de edad en las mujeres embarazadas de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>34</u>
<u>Tabla No. 7.- Características generales de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, con y sin <i>Chlamydia trachomatis</i>.....</u>	<u>35</u>
<u>Tabla No. 8.- Signos y síntomas de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, con y sin <i>Chlamydia trachomatis</i>.....</u>	<u>36</u>

LISTA DE ANEXOS:**ANEXOS DE LA INVESTIGACIÓN:**

<u>Anexo No. 1 Consentimiento informado.....</u>	<u>57</u>
<u>Anexo No. 2 Formulario de enrollamiento de las pacientes.....</u>	<u>59</u>
<u>Anexo No. 3 Formulario de factores de riesgo de las pacientes.....</u>	<u>60</u>
<u>Anexo No. 4 Prueba de Camp.....</u>	<u>63</u>
<u>Anexo No. 5 Prueba de aglutinación en látex para identificación de</u> <u><i>Streptococcus agalactiae</i></u>	<u>64</u>
<u>Anexo No. 6 Técnica de Extracción de DNA.....</u>	<u>66</u>
<u>Anexo No. 7 Cuantificación de DNA por espectrofotometría.....</u>	<u>67</u>
<u>Anexo No. 8 Control de extracción de DNA, amplificación de DNA de β-globina.....</u>	<u>68</u>
<u>Anexo No. 9 Técnica de amplificación de DNA de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</u>	<u>69</u>
<u>Anexo No. 10 Técnica de amplificación de DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i>.....</u>	<u>71</u>
<u>Anexo No. 11 Registro de control de temperatura de</u> <u>almacenamiento de reactivos</u>	<u>73</u>
<u>Anexo No. 12 Registro de control de temperatura de envío y</u> <u>recepción de muestras.....</u>	<u>74</u>
<u>Anexo No. 13 Registro de control de temperatura de almacenamiento de muestras....</u>	<u>75</u>
<u>Anexo No. 14 Registro de resultados del cultivo y de la qPCR.....</u>	<u>76</u>
<u>Anexo No. 15 Carta de aceptación del Comité de Ética del Hospital</u> <u>San Vicente de Paúl de la ciudad de Ibarra.....</u>	<u>77</u>
<u>Anexo No. 16 Formato de resultado de laboratorio.....</u>	<u>79</u>

ANEXOS QUE RESPALDAN LA INVESTIGACIÓN:

<u>Anexo No. 17 Operacionalización de variables.....</u>	<u>80</u>
<u>Anexo No. 18 Cronograma de trabajo.....</u>	<u>81</u>
<u>Anexo No. 19 Recursos.....</u>	<u>82</u>

<u>Anexo No. 20 Flujograma de trabajo.....</u>	<u>85</u>
<u>Anexo No. 21 Resultados de la cuantificación del DNA.....</u>	<u>86</u>
<u>Anexo No. 22 Lista de figuras.....</u>	<u>89</u>

RESUMEN

Las infecciones bacterianas adquiridas durante el parto son una causa importante de morbi-mortalidad neonatal. Entre los gérmenes encontrados con más frecuencia están el *Streptococcus agalactiae* (SGB), y agentes causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS) como *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (NG). Las prevalencias a nivel mundial y de Latinoamérica son diversas. En nuestro país pocos datos se conocen con respecto a la prevalencia de estas enfermedades. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra en el año 2008 y determinar factores de riesgo asociados a estas enfermedades.

Se realizó un estudio transversal, observacional, en una muestra de 152 mujeres embarazadas. En este grupo de pacientes se identificó la presencia de SGB mediante cultivo microbiológico convencional y la presencia de CT y NG mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). Se calcularon las prevalencias de cada microorganismo globalmente y por grupos de edad y son expresadas en porcentajes con un intervalo de confianza del 90%.

La prevalencia de SGB fue de 13,15%, con el más alto porcentaje en el grupo de mujeres ≥ 40 años. La mayoría de casos positivos provinieron de cultivos vaginales (7%) y tan solo el 2% de los 2 sitios anatómicos (Vagina y recto/ano). *Chlamydia trachomatis* presentó una prevalencia de 23,02%, observándose el mayor porcentaje en

los grupos etarios más jóvenes: 15 a 19 y 20 a 24 años. No se encontró ningún caso de *Neisseria gonorrhoeae*.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Streptococcus agalactiae* (SGB), prevalencia.

SUMMARY

The bacterial infections acquired during delivery are a major cause of neonatal morbidity and mortality. Among the most common germs found are *Streptococcus agalactiae*, and agents of sexually transmitted infections like *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. The prevalence worldwide and in Latin America are diverse. In our country, few data are known about the prevalence of these diseases. The aim of this study was determine the prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus agalactiae*, in urban pregnant area of the city of Ibarra in 2008 and identify risk factors associated with these diseases.

We performed a cross-sectional study, observational, in a sample of 152 pregnant women. In this group of patients was identified the presence of *Streptococcus agalactiae* was identified by conventional microbiological culture, and the presence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Real-time Chain Reaction Polymerase (qPCR). We calculated the prevalence of each organism globally and by age groups, and they are expressed in percentages with a 90% confidence interval.

The prevalence of GBS was 13.15%, with the highest percentage in the group aged ≥ 40 years. Most positive cases were from vaginal cultures (7%) and only 2% of the 2 anatomic sites (vagina and rectum / anus). *Chlamydia trachomatis* presented a prevalence of 23,02%, with the highest percentage in the younger age groups: 15 to 19 and 20 to 24. No cases of *Neisseria gonorrhoeae* were found.

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, prevalence.

1. INTRODUCCION

Gran parte de la morbi-mortalidad neonatal es debida a infecciones bacterianas adquiridas durante el parto normal. Los niños prematuros y los niños de bajo peso presentan más prevalencia de estas infecciones. Entre los gérmenes más frecuentes que causan las infecciones neonatales destacan el *Streptococcus agalactiae* (SGB), y los agentes causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS), como *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (NG) (Peña, 2006; Blanco et al, 2002; SEGO, 2003; Allaire et al, 1998).

1.1 *Streptococcus agalactiae* (SGB)

El SGB es el principal agente etiológico de la sepsis neonatal precoz y meningitis bacteriana (Valdés et al, 2004; Díaz et al, 2002). La incidencia reportada en EEUU es de 1 a 4/1000 nacidos vivos, con alta mortalidad (Valdés E, et al – 2004). Los neonatos con infección por SGB requieren un período de hospitalización más prolongado y el rango de mortalidad es alto entre el 10 y 20%. Aquellos niños que sobrevivieron presentaron secuelas neurológicas graves (Artz et al, 2003). La colonización materna es el factor más importante para que los recién nacidos puedan llegar a desarrollar enfermedad neonatal. También se ha descrito su correlación con el nivel de anticuerpos maternos anticapsulares para SGB (Peña, 2006). Las tasas de colonización en mujeres embarazadas varían del 10 al 40%, dependiendo de las poblaciones de estudio, medios y técnicas de cultivo utilizados (Bartolomeo et al, 2005; Valdés et al, 2004; Díaz y Nieves, 2008; Valdés et al, 2003).

El 5% de los nacidos a término tienen signos y síntomas de sepsis al momento del parto. Tomando en cuenta esta consideración, en 1997 se realizó un estudio de análisis computarizado de costos, utilizando estimados publicados durante el mismo año. Este estimado se basó en una estrategia obstétrica “sobre el cultivo microbiológico”. El costo encaminado a la prevención de infección por SGB osciló entre \$28,800 - \$34,800 para ese año en EEUU. Esto contrasta con el costo de atención para un recién nacido con sepsis por SGB, en una unidad de cuidados intensivos neonatales, en el mismo país, que en el año 1997 alcanzó cifras de \$33,000 a \$67,279 (Fargason et al, 1997).

Por todo lo que representa una infección neonatal por SGB, el CDC de Atlanta en 1996 sugirió que "*cada centro de salud analice, de acuerdo a su realidad local, cuál es la más apropiada*" y planteó dos estrategias posibles de manejo. La primera está basada en los "factores de riesgo" que la gestante pueda presentar, tales como: embarazo < 37 semanas, ruptura prematura de membranas >18 horas, ó temperatura >38.0°C, para adoptar la administración de antimicrobianos intraparto. La segunda es el "tamizaje basado en el protocolo" para realizar la búsqueda del SGB en las mujeres embarazadas de 35-37 semanas de gestación sin factores de riesgo (CDC, 2002).

1.2 Chlamydia trachomatis (CT)

La CT es uno de los principales microorganismos causante de infección de transmisión sexual, considerándose en los países europeos un problema de salud pública. Se estima que existen 50 millones de nuevos casos por año a nivel mundial y 4 millones de nuevas infecciones por año en los Estados Unidos (Low N y Egger M, 2002), con un costo de 2,4 billones de dólares (Washington et al, 1987). Es la enfermedad más cara después del HIV debido al costo en el tratamiento de las secuelas como enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico e infertilidad, que esta enfermedad produce (Scholes et al, 1996).

La CT en la mujer embarazada se asocia con parto pretérmino, muerte fetal y retardo del crecimiento intrauterino. Además, es una de las causas más comunes de complicaciones infecciosas del neonato, como la conjuntivitis y la neumonía que son de mayor prevalencia (Romoren et al, 2007; Andrews et al, 1995; Salcedo, 2003; Watson et al, 2002). Se ha estimado un riesgo de 50 a 70% de transmisión vertical de las gestantes portadoras de *Chlamydia trachomatis* especialmente durante el parto vaginal y/o durante el parto por operación cesárea, en embarazos complicados por rotura prematura de membranas (Schachter et al, 1986; Arya et al, 1981; Smith y Taylor, 1993; Valdés et al, 2002).

1.3 Neisseria gonorrhoeae (NG)

La NG es considerada como una bacteria de transmisión sexual que produce un gran impacto en la salud, sobre todo de mujeres y niños (Over y Piot, 1993). La infección cervical puede causar graves complicaciones como infertilidad, cáncer cervical, aborto espontáneo, infección ascendente, parto prematuro o nacimiento de recién nacido de bajo peso (Mullick et al, 2005). Además, estudios epidemiológicos proveen evidencia de que la infección gonocócica facilita la transmisión de HIV (CDC, 2006). Por su asociación con la morbi-mortalidad materno-infantil, los países desarrollados han creado programas de diagnóstico encaminados a prevenir este tipo de enfermedades y sus complicaciones, mientras que en los países en desarrollo el diagnóstico de infección cervical está limitado al manejo sindrómico. Ante esta situación la OMS desarrolló guías de tratamiento en los casos de ITS sintomáticos para los países que no cuentan con el soporte de diagnóstico adecuado (Romoren et al, 2007; WHO, 2003).

Gracias a los programas de Salud Pública implementados a nivel mundial, la prevalencia de gonococo ha disminuido notablemente. En Estados Unidos la incidencia bajó de 500 casos en 100000 habitantes en 1975, hasta 123 en 1997; mientras que en Canadá la incidencia bajó de 217 casos en 1980 a 19 casos por 100000 habitantes en 1995 (Chin, 2000).

La mayoría de mujeres con una infección cervical por CT y/o NG son asintomáticas, razón por la cual su infección no puede ser detectada con los protocolos sindrómicos (Mullick et al, 2005). El tamizaje de este tipo de infecciones entonces, está basado en los factores de riesgo socio demográficos que puedan presentar las pacientes, asociados a algún síntoma o signo evidente en la exploración.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Streptococcus agalactiae, *Chlamydia trachomatis*, y *Neisseria gonorrhoeae* son microorganismos que han alcanzado proporciones epidémicas en sociedades occidentales e inclusive en países en desarrollo, provocando un significativo impacto deletéreo en el campo de la perinatología. Estas bacterias son consideradas los principales agentes causantes de infecciones en los neonatos, que se contagian durante el nacimiento a través del canal del parto. El SGB es el mayor causante de sepsis neonatal. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* pueden producir graves complicaciones en el campo de la fertilidad. Así, una mujer portadora de estos agentes presenta mayor riesgo de sufrir procesos inflamatorios pelvianos, uretritis, salpingitis, embarazos ectópicos e infertilidad. En el ámbito perinatal están asociados a parto pretérmino, muerte fetal y restricción del crecimiento intrauterino, además son causa emergente de complicaciones infecciosas del neonato, como la conjuntivitis que observa la mayor prevalencia.

No existen datos nacionales de las prevalencias de los microorganismos investigados. Sin embargo, en Quito se conoce que la prevalencia del SGB en mujeres embarazadas de la semana 34 a 38 de gestación es del 10% (Cárdenas y Benítez, 2002) y la prevalencia de CT en adolescentes embarazadas es del 6,5% (Dean, 2008: Comunicación personal). No existen datos de prevalencia de NG para nuestro país.

Con estos antecedentes realizamos este estudio para determinar la frecuencia de SGB, CT y NG en mujeres embarazadas de la ciudad de Ibarra y conocer si los factores de riesgo que han sido referidos internacionalmente asociados a estas infecciones están presentes en nuestra población.

3. MARCO TEÓRICO

A partir del canal del parto se pueden transmitir infecciones al neonato tanto por virus, como por bacterias. El reservorio de algunas bacterias como el *Streptococcus agalactiae* es el recto, a partir del cual alcanzan las mucosas del tracto genital. Mientras que bacterias de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*) pueden estar presentes en la vagina sin causar sintomatología alguna e igualmente infectar al neonato en el momento del parto (Salcedo, 2003). Sin embargo no solo pueden transmitirse verticalmente, sino que también son capaces de provocar complicaciones infecciosas en la madre y complicaciones evolutivas durante el embarazo (Peña, 2006; Salcedo, 2003; Watson et al, 2002).

3.1 *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo beta-hemolítico del grupo B (SGB)

Es un coco grampositivo que causa infecciones en recién nacidos y embarazadas (SEGO, 2003). El SGB continúa siendo la causa principal de infección neonatal con peligro para la vida a nivel mundial. Está involucrado en complicaciones infecciosas del embarazo, parto, puerperio, parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, corioamnionitis, endometritis postparto e infección de heridas postparto. El tratamiento intraparto de las madres afectadas puede prevenir los efectos nocivos al neonato (Valdés et al, 2004; Díaz et al, 2002).

La colonización asintomática vaginal y/o rectal en la mujer embarazada, constituye uno de los principales factores de riesgo capaz de producir enfermedad perinatal (Díaz et al, 2002). Hasta el 60% de mujeres colonizadas portan el microorganismo en forma intermitente. En realidad la colonización vaginal puede reflejar la contaminación del recto y tubo digestivo que son los principales reservorios de este microorganismo. La colonización vaginal suele ser asintomática, aunque se reporta casos de vaginitis. La transmisión sexual de este microorganismo es controversial, sin embargo tasas muy altas de colonización se reportan en pacientes con ITS (Koneman, 2008).

El CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) recomienda realizar el cultivo de muestras de hisopados vaginales y rectales durante las semanas 35-37 de gestación (Koneman, 2008; CDC, 2006) y a cualquier edad gestacional cuando exista sospecha de corioamnionitis. La única medida de eficacia probada para prevenir la sepsis neonatal precoz por SGB es la aplicación de profilaxis antibiótica antes del parto a las madres portadoras. Se debe realizar la profilaxis antibiótica en las siguientes circunstancias:

- A toda gestante con colonización positiva.
- Si durante la gestación se detectó bacteriuria (sintomática o asintomática), por SGB.
- Si existe el antecedente de un hijo previo con sepsis por SGB, independientemente del estado de colonización.
- Parto prematuro con edad gestacional menor de 37 semanas si no se conoce el estado de portadora de SGB.
- Si están presentes uno de los factores de riesgo: fiebre intraparto (mayor a 38 °C) y/o ruptura de membranas superior a 18 horas (Blanco et al, 2002).

El tamizaje para SGB ha sido implementado en varios países de Latinoamérica como Chile y Argentina desde aproximadamente el año 2003 (Bartolomeo et al, 2005; Valdés et al, 2004). En nuestro país, poco se conoce sobre la prevalencia de SGB, razón por la cual no se ha implementado una normativa de salud que indique realizar un tamizaje en las mujeres embarazadas. También se desconoce la prevalencia de infecciones neonatales como sepsis o meningitis producidas por este microorganismo. Esta carencia de información puede deberse al hecho de que no se realiza hemocultivo rutinariamente a los recién nacidos infectados en las primeras 24 horas, y por tanto no hay estadísticas que nos demuestren realmente las cifras de infecciones neonatales graves.

3.1.1 Prevalencias de SGB

En América Latina se ha reportado un amplio rango de prevalencias de colonización por SGB entre 9 y 40%, en mujeres embarazadas. Esta prevalencia variable depende de la población estudiada y el medio de cultivo utilizado, como se puede apreciar en la siguiente tabla. De estudios realizados en nuestro país, se conoce una prevalencia del 10% en mujeres embarazadas entre 34 y 37 semanas de gestación (Cárdenas y Benítez, 2002); mientras que un estudio realizado en inmigrantes ecuatorianas en España reportó una prevalencia del 20,33% (Blanco et al, 2004).

-PREVALENCIA DE *Streptococcus agalactiae* EN PAÍSES DE AMÉRICA LATINA

POBLACIÓN	PREVALENCIA	PAÍS
2192 embarazadas (35 – 37 sem*)	19,8% (Medio selectivo)	Chile ^(Abarzúa, 2002)
	12,7% (Med. no selectivo)	
185 embarazadas (35 – 37 sem.)	14%	Chile ^(Valdés et al, 2004)
238 embarazadas (> 26 sem.)	10,9%	Lima ^(Tamariz et al, 2004)
1203 embarazadas (35 – 37 sem.)	9,39%	Argentina ^(Bartolomeo et al, 2005)
60 embarazadas con complicaciones obstétricas (26 – 32 sem.)	36,7%	Venezuela ^(Díaz y Nieves, 2008)

*sem = semanas

3.1.2 Métodos de diagnóstico

El método de diagnóstico para la identificación del SGB recomendado por el CDC es el cultivo microbiológico, que es la prueba de referencia y permite determinar la sensibilidad del SGB a los antibióticos sobre todo en pacientes alérgicos a la penicilina. La única prueba que reúne los criterios recomendados por el CDC, comparable con el cultivo es un PCR en tiempo real para la identificación del SGB, sin embargo esta metodología no permite valorar la sensibilidad a los antimicrobianos (Koneman, 2008).

La identificación óptima de colonización por SGB depende de la técnica. El estado de portadora se reduce notablemente cuando el screening no incorpora los 2 sitios anatómicos para el cultivo (recto e introito vaginal) y cuando no se utilizan medios selectivos. El CDC recomienda el uso de caldos de cultivo selectivos como Todd-Hewitt suplementado con colistin (10 g/mL) o gentamicina (8 g/mL) y ácido nalidíxico (15 g/mL) para inhibir el crecimiento de gramnegativos y posteriormente realizar la siembra en medios sólidos como agar sangre de cordero al 5% (CDC, 1996).

3.2 *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (NG)

Entre las infecciones de transmisión sexual, CT y NG son las más prevalentes a nivel mundial y es reconocido que estas infecciones pueden facilitar la transmisión de HIV (CDC, 2006).

Aún en países desarrollados un alto porcentaje de mujeres con infección cervical no tiene el diagnóstico etiológico por el limitado acceso a los test diagnósticos (Andrews et al, 1995). En países en desarrollo como el nuestro, los nuevos casos de infecciones de transmisión sexual en áreas sin acceso a laboratorios son determinados mediante el uso de factores de riesgo y/o manejo de algoritmos sindrómicos sin una prueba que confirme el diagnóstico.

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligatoria, inmóvil, incapaz de desarrollar su metabolismo con producción de energía por lo que depende de la célula como huésped intermediario y de su ATP. El sitio más común de infección en la mujer es el endocervix, y en el hombre las células epiteliales de la uretra (Buimer, 1996). Sin embargo, el gran número de pacientes asintomáticos los convierte en un reservorio natural de la enfermedad (Valkengoed, 2001).

La presencia de *Chlamydia trachomatis* en la mujer embarazada se asocia frecuentemente con complicaciones perinatales como ruptura prematura de membranas, recién nacido pretérmino, bajo peso al nacer, retardo del crecimiento intrauterino, e

incluso endometritis postparto o postaborto. Cuando el niño atraviesa el canal del parto puede considerarse en riesgo de contraer CT o de adquirir neumonitis en el 3%-18%, conjuntivitis 18%-50%, e infección nasofaríngea en el 15%-20% (Allaire et al, 1998; Gregor y French, 1991). El tratamiento de la infección por CT durante el embarazo disminuye las complicaciones tanto perinatales como maternas, por lo cual se vuelve importante el diagnóstico de dicha enfermedad en cualquier período del embarazo.

Según el CDC, el tamizaje temprano de CT en embarazadas provee un diagnóstico oportuno para prevenir los partos prematuros, así como el nacimiento de neonatos de bajo peso. El tamizaje y tratamiento en el tercer trimestre podrían resultar más efectivos para prevenir la transmisión de CT durante el parto y disminuir los riesgos de infecciones neonatales (CDC, 2006).

3.2.1 Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*

La prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en América es muy diversa, depende de la población estudiada y del método de diagnóstico. Países como México (Métodos enzimáticos) reportaron prevalencias que bordean el 10% (Canto et al, 2003; Díaz et al, 1997), en unos casos y prevalencias mayores, de hasta el 20% con técnicas moleculares (Sánchez, 2009). Perú, en cambio, reporta prevalencias que alcanzan el 34,8%, mediante el uso de técnicas inmunológicas (Portilla, 1999). Algunas cifras de las prevalencias encontradas en nuestro continente se muestran en la tabla que continúa.

PREVALENCIA DE *Chlamydia Trachomatis* EN PAÍSES DE AMÉRICA

<i>POBLACIÓN</i>	<i>PREVALENCIA</i>	<i>MÉTODO</i>	<i>PAÍS</i>
80 embarazadas (20-39 sem ¹)	10%	IFI ²	México ^(Díaz, 1997)
482 mujeres (Muestras endocervicales)	6%	Cobas Amplicor Roche	EEUU ^(Martínez, 2001)

410 embarazadas (> entre los 33 a 37 años)	34,8%	ELISA de captura de antígeno. IFI ² y Cultivo celular	Lima (Portilla et al, 1999)
100 mujeres (15 y 45 años de edad)	6.7 %	Inmunoenzimático Wellcozyme.	México (Canto, 2003)
98 mujeres	20.4%	PCR ³	México (Sánchez, 2009)
273 embarazadas	20 %	Nested PCR ³ in house	Trinidad y Tobago (Rampersad et al, 2007)

¹sem = semanas

²IFI = Inmunofluorescencia directa

³PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

Nuestra realidad es similar a las prevalencias reportadas en diferentes estudios, así en un estudio piloto en adolescentes embarazadas del Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora, la prevalencia encontrada fue 6,5%, y otro en mujeres trabajadoras sexuales del Centro de Salud No. 1 fue 20%, ambos estudios realizados en la ciudad de Quito en el año 2006, mediante el uso de técnicas moleculares como la PCR convencional (Dean, 2008 - comunicación personal). En otro estudio realizado en 158 gestantes de la ciudad de Quito y Guayaquil (Con la misma técnica) en el año 2008 reportó una prevalencia de 8,2% (Medina, 2008).

Neisseria gonorrhoeae es un diplococo gramnegativo intra y extracelular y de transmisión sexual. Produce uretritis, cervicitis, salpingitis, enfermedad inflamatoria pélvica, artritis y complicaciones graves como infección ascendente, esterilidad, cáncer cervical, aborto espontáneo, parto prematuro y recién nacidos de bajo peso (Romoren, 2007). Además, puede contagiar al recién nacido a su paso por el canal del parto y promover el desarrollo de conjuntivitis neonatal y oftalmía neonatorum (Zurita, 2004).

3.2.2 Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae*

De las prevalencias de NG reportadas en diferentes estudios, se conoce una prevalencia del 2,9% en Viena (Schabereiter, 2008), del 2,5% en mujeres atendidas en cuidados prenatales en Mozambique (Luján, 2008). En África (Sub-Sahara) la prevalencia en mujeres embarazadas para el año 2006 alcanzó el 3% (Romoren, 2007), mientras que en Haití entre 1999 y 2002 fue de 1,7% (Andrews, 1995). Los datos de prevalencia en

Latinoamérica son muy escasos e incluso se desconocen en países como el nuestro, algunos datos de prevalencias se reportan en la siguiente tabla.

PREVALENCIA DE *Neisseria gonorrhoeae* EN PAÍSES DE AMÉRICA

POBLACIÓN	PREVALENCIA	MÉTODO	PAÍS
110 embarazadas	2,73%	Cultivo en agar Thayer Martin	Guatemala ^(Arjona, 1982)
260 embarazadas	1,21%	Cultivo en agar Thayer Martin	Guatemala ^(Cano, 1998)
410 embarazadas	0,0%	Cultivo en agar Thayer Martin modificado	Lima ^(Portilla, 1999)
273 embarazadas	2 %	Nested PCR in house	Trinidad y Tobago ^(Rampersad, 2007)
200 mujeres (100 sintomáticas y 100 asintomáticas)	0,0%	Cultivo en agar Thayer Martin	México ^(Iglesias, 2007)
2630 pacientes (40% Hombres y 60% mujeres)	3,4%	Cultivo en agar Thayer Martin	Argentina ^(Pájaro, 2001)

198	embarazadas	0,0%	Cultivo en agar Thayer Martin modificado	Argentina ^(Bartolomeo, 2001)
	sintomáticas			

3.2.3 Métodos de diagnóstico para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*

Los cultivos tanto para CT como para NG han sido por mucho tiempo el estándar de referencia contra los cuales se han comparado las demás pruebas diagnósticas. Sin embargo, para CT se han requerido desarrollar otros test diagnósticos menos complicados y menos costosos (CDC, 2006).

La identificación y confirmación de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* con métodos tradicionales es difícil (a pesar del bajo costo de los mismos en comparación con otras pruebas diagnósticas), debido a que es una bacteria de crecimiento difícil por lo complicado de sus requerimientos. La sensibilidad del cultivo se encuentra entre el 85 al 95% en infección aguda y cae bruscamente al 50% en infección crónica. Esto debido probablemente a la escasa cantidad de muestra recolectada y/o a la demora en el transporte y/o a la mala conservación de la misma (CDC, 2006).

Una identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* debe ser confirmada con una coloración de gram y el test de la oxidasa, sin embargo muchas otras especies pueden ser confundidas con NG, dependiendo del sitio de la muestra. Un test presuntivo es suficiente para iniciar el tratamiento, sin embargo debe confirmarse el cultivo con pruebas bioquímicas para emitir el resultado. Una de las ventajas del cultivo es la capacidad de poder conservar las cepas para pruebas adicionales como la determinación de la sensibilidad antimicrobiana, y la subtipificación. La desventaja principal del cultivo para *N. gonorrhoeae* es que los especímenes deben ser transportados en condiciones adecuadas para mantener la viabilidad de los microorganismos, otra desventaja es que se requiere de un mínimo de 24-72 horas de la colección de la muestra para emitir el informe con el resultado del cultivo (CDC, 2002).

En el caso del cultivo celular de *C. trachomatis* es fundamental la toma y el transporte de la muestra. Después de 48 a 72 horas de realizado el cultivo, las células infectadas muestran el desarrollo de inclusiones intracitoplasmáticas con cuerpos reticulares de

CT, los cuales van a ser detectados con anticuerpos monoclonales fluorescentes contra la proteína mayor de la membrana externa de CT conocida como MOMP. La alta especificidad del cultivo le permite ser usado como evidencia en investigaciones legales, además el aislamiento clínico puede ser usado para la realización de test de sensibilidad antimicrobiana. Sin embargo la baja sensibilidad, el tiempo largo en la identificación de CT, la dificultad en la estandarización de la técnica, la complejidad de la misma y el alto costo, son las principales desventajas de los cultivos celulares para *C. trachomatis* (CDC, 2002).

En vista de esto, un gran número de pruebas basadas en test inmunoenzimáticos (EIA) ha sido probada para determinar la infección por *C. trachomatis*, pero en cambio el funcionamiento y el costo de este tipo de pruebas para identificar *N. gonorrhoeae* no las ha hecho competitivas frente al cultivo (Jephcott, 1997).

Los test enzimáticos para CT utilizan anticuerpos monoclonales contra el lipopolisacárido bacteriano (LPS), este tipo de pruebas puede dar resultados falsos positivos, producto de una reacción cruzada con LPS de otros microorganismos, incluyendo otras especies de *Chlamydia* (Barnes, 1989; CDC, 1991).

También existen pruebas de fluorescencia dirigidas contra la MOMP o el LPS de CT, los test fluorescentes con anticuerpos monoclonales anti-MOMP para CT son considerados altamente específicos, cuando son realizados por un buen microscopista, mientras que los kits comerciales desarrollados contra el LPS, que contienen Anti-LPS pueden resultar en reacciones cruzadas con *chlamydias* de otras especies como *C. pneumoniae* y *C. psittaci* (Jephcott, 1997). La serología tiene un valor limitado en el diagnóstico de *C. trachomatis* genital no complicada, y no debería ser usada ya que los anticuerpos existentes no discriminan entre una infección pasada de una infección reciente por este microorganismo. Un tamizaje serológico para *N. gonorrhoeae* no está disponible en el mercado (CDC, 2002).

Tanto para *C. trachomatis*, como para *N. gonorrhoeae* los estudios basados en test de ácidos nucleicos (NAATs) amplifican las secuencias específicas del microorganismo (CDC, 2002). Lo detectan mediante sondas de oligonucleótidos específicos, que hibridan directamente al ácido nucleico con una sensibilidad y especificidad mayor que

la obtenida por los cultivos (Geraats, 2005). Entre las ventajas de las pruebas de diagnóstico molecular con respecto al cultivo convencional, se encuentra la mayor sensibilidad, debido a la capacidad de encontrar un resultado positivo a partir de una simple copia de ADN blanco (CDC, 2006), inclusive en aquellas pacientes asintomáticas, lo cual es crítico en el control de la infección. Segundo, las muestras no requieren organismos viables para su identificación, por lo que no son necesarias condiciones especiales de transporte, y finalmente, pueden usarse muestras no invasivas como la orina en el caso de CT (Geraats, 2005).

Estas técnicas también presentan algunas limitaciones en su uso como alto costo, arrastre (carryover), muestras con inhibidores de la amplificación que provocan falsos negativos y además no proveen de datos de resistencia a los antibióticos (CDC, 2006).

En el caso de la *Neisseria gonorrhoeae* pueden presentarse falsos positivos y falsos negativos, debido a que las secuencias blanco pueden estar presentes en algunos comensales de *Neisseria* y pueden estar ausentes en algunos subtipos de *N. gonorrhoeae* respectivamente (Geraats, 2005). Para cuantificar la cantidad de ADN se utilizan curvas estándares construidas de diluciones conocidas de la bacteria. La sensibilidad del qPCR alcanza el 95,7% y la especificidad el 100% comparadas con otras técnicas moleculares (Jaton, 2006). Entre las ventajas de esta técnica se encuentran el menor riesgo de contaminación horizontal y vertical (Sistema cerrado); menor tiempo en la obtención de resultados (1 hora), posibilidad de proveer resultados cuantitativos, alta sensibilidad y excelente especificidad (Jaton, 2006). Lo mencionado anteriormente explica las grandes diferencias en las prevalencias encontradas en los diferentes países de América, en lo referente el método utilizado para el diagnóstico, lo cual se hace más evidente en el caso de *Chlamydia trachomatis*.

4. JUSTIFICACION

Las infecciones perinatales producidas por el SGB, y agentes causantes de infecciones de transmisión sexual (CT-NG) constituyen un problema importante de salud pública por su prevalencia, su tendencia al incremento y por las serias complicaciones para la salud de hombres, mujeres y niños. Es necesario realizar su identificación de forma oportuna, con métodos de diagnóstico altamente sensibles, de tal forma que se pueda instaurar el tratamiento adecuado para prevenir las secuelas y complicaciones que estos gérmenes pueden ocasionar en la población.

En la práctica médica, la atención de las ITS con frecuencia consiste en la realización de una historia clínica rápida, diagnóstico sindrómico y una receta para su tratamiento. Frente a esta situación el Estado ecuatoriano, a través del Ministerio de Salud Pública, ha considerado prioritario mejorar e integrar en los servicios del sector salud el manejo integral de las ITS. Sin embargo, debido a la falta de técnicas accesibles por su

complejidad y costos, el diagnóstico se ha limitado a valorar las manifestaciones clínicas encasilladas en síndromes.

En nuestro país se conocen muy pocos datos sobre la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Streptococcus agalactiae* (SGB), que son los principales agentes causantes de enfermedades neonatales. Por la alta tasa de natalidad de la ciudad de Ibarra, (Hospital San Vicente de Paúl 3800 a 4000 partos/año – 2007, Departamento de Estadística) propusimos realizar un estudio inicial de prevalencia de estos microorganismos, en mujeres embarazadas que se encuentren entre la 34 y 39 semanas de gestación, y relacionar su presencia con ciertos factores de riesgo en la mujer portadora de los estos microorganismos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* y los factores de riesgo asociados, en mujeres que cursan el tercer trimestre de gestación que acuden al control prenatal en el Hospital San Vicente de Paúl y en el Subcentro de Salud No. 1 de la ciudad de Ibarra.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, en muestras cervicales por la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).
- 2.- Determinar la presencia de *Streptococcus agalactiae* en las muestras vaginales y rectales mediante crecimiento bacteriano en cultivo microbiológico convencional.
- 3.- Determinar las prevalencias de cada uno de los microorganismos a investigar (CT – NG – SGB).
- 4.- Establecer los factores de riesgo para estas infecciones de transmisión sexual en el tercer trimestre de embarazo.

6. DEFINICIÓN DE VARIABLES:

6.1 Embarazo en el tercer trimestre de gestación.-

Período de gestación comprendido entre la semana 25 hasta el parto, determinado por la fecha de última menstruación (FUM) y/o por ecografía, mediante el diámetro biparietal (Gabbe et al, 2000). Trabajamos con gestantes de 34 semanas hasta 38,6 semanas como lo recomienda el CDC.

6.2 Aborto.-

Es la terminación del embarazo con la muerte y expulsión del feto antes de las 20 semanas de gestación o cuando el producto pesa menos de 500 gramos (Cunningham et al, 2006).

6.3 Parto prematuro.-

Se denomina al parto que se produce entre las semanas 28 y antes de las 37 semanas de gestación. Al borramiento del cérvix mayor al 80%, o dilatación mayor de 2 cm, en gestación de menos de 37 semanas (Lambrou et al, 2001).

6.4 Ruptura prematura de membranas.-

Es la ruptura de las membranas amnióticas por lo menos una hora antes de iniciado el trabajo de parto, con la consiguiente salida del líquido amniótico (Lambrou et al, 2001).

6.5 Antibióticoterapia sistémica.-

Uso de antibióticos por vía oral o parenteral que actúan a cualquier nivel en el organismo para eliminar el foco de la infección (Macfadyen et al, 2008).

6.6 Número de parejas sexuales.-

Número de hombres con quienes haya tenido relaciones sexuales (Cunningham et al, 2006).

6.7 Presencia de *Chlamydia trachomatis*.-

La CT es una bacteria intracelular obligatoria, capaz de producir enfermedad de transmisión sexual e infecciones neonatales. Su presencia se determina mediante diagnóstico de laboratorio con técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual amplifica el DNA de la bacteria. Un resultado se considera positivo cuando en el canal 640 se detecta una parte del genoma que indica la presencia del DNA de la bacteria, mediante un fragmento de 136 pares de bases (pb) que es amplificado con primers específicos (Roche- LightMix, 2007).

6.8 Presencia de *Neisseria gonorrhoeae*.-

La NG es un diplococo gramnegativo, capaz de producir enfermedad de transmisión sexual e infecciones neonatales. Su presencia se determina mediante pruebas de laboratorio como cultivo microbiológico convencional y técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual amplifica el DNA de la bacteria. Un resultado se considera positivo cuando en el canal (640) se detecta una parte del genoma que indica la presencia del DNA de la bacteria, mediante un fragmento de 166 pares de bases (pb) que es amplificado con primers específicos (Roche- LightMix, 2007).

6.9 Presencia de *Streptococcus agalactiae* (SGB).-

El SGB es un coco grampositivo que se presenta al microscopio en cadenas. Esta bacteria puede encontrarse como habitante normal de la flora vaginal y anal en las mujeres, pero es capaz de producir infección grave en el recién nacido, cuando el neonato atraviesa por el canal del parto al momento del nacimiento. Su presencia se determina por examen de laboratorio, mediante desarrollo positivo en cultivo microbiológico y confirmación del mismo con la prueba de CAMP y la prueba de aglutinación en látex (Koneman, 2008).

6.10 Prueba de CAMP

Se considera positiva cuando la zona de aumento de hemólisis se observa en el punto donde se intersecan la B-hemolisina secretada por el estafilococo y el factor de CAMP secretado por el estreptococo del grupo B (Koneman, 2008).

6.11 Prueba de aglutinación en látex

Se considera positiva cuando aparece la aglutinación en el grupo B o cuando la reacción de aglutinación es más fuerte en este que en los otros cinco grupos; la prueba se considera negativa cuando no aparece aglutinación (Forbes et al, 2002).

7. METODOLOGÍA

7.1 SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1 Diseño

Se realizó un estudio de tipo transversal, observacional para determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en una muestra de 152 mujeres embarazadas que cursaron el tercer trimestre de gestación, y que acudieron al control prenatal en el Hospital San Vicente de Paúl y en el Subcentro de Salud No. 1 de la ciudad de Ibarra.

7.1.2 Área de Estudio

EL Hospital “San Vicente de Paúl - HSVP” y el Subcentro de Salud No. 1 son unidades del Sistema Nacional de Servicios de Salud del Ministerio de Salud Pública, ubicados en la ciudad de Ibarra, capital de la provincia de Imbabura, la cual ha alcanzado un notable desarrollo demográfico con una población que bordea la cifra de los 180000 habitantes, con una cifra de 3750 nacidos vivos por año.

7.2 UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

7.2.1 Población de estudio

La población de estudio comprendió a las mujeres embarazadas, de tercer trimestre de gestación, que acudieron al control prenatal en el Hospital San Vicente de Paúl y en el Subcentro de Salud No. 1 de la ciudad de Ibarra, durante los meses de agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2008, de acuerdo con los siguientes criterios:

7.2.2 Criterios de inclusión:

1. Mujer embarazada que cursó el tercer trimestre de gestación, desde la semana 34 hasta las 38,6 semanas de gestación determinado por fecha de última menstruación, y que no haya entrado en labor de parto.
2. Aceptación de participar en el estudio – Consentimiento informado (Anexo No. 1)

7.2.3 Criterios de exclusión:

1. Uso de tratamiento local con óvulos o cremas vaginales, durante los últimos 15 días.
2. Tratamiento sistémico con antimicrobianos durante los últimos 15 días.
3. Pacientes que al momento de la toma presenten ruptura de membranas.

4. Pacientes con sangrado genital al momento de la toma de la muestra, por cualquier causa. (Anexo No.2 - Enrolamiento de las pacientes)

7.3 CÁLCULO DE LA MUESTRA

Se estimó una prevalencia (P) de SGB de 10%, equivalente a la más alta encontrada en la literatura de los 3 microorganismos (Cárdenas y Benítez, 2002); NG=3% (Romoren et al, 2007); CT = 6,5% (Dean, 2008 - comunicación personal), con un valor α de 1,64, un nivel de confianza del 90% ($Z\alpha$); y un ancho de intervalo (W2) del 8% ($\pm 4\%$), se necesitaron no menos de 152 muestras vaginales. El cálculo se hizo con la siguiente fórmula (Browner, 1988):

$$N = 4Z\alpha^2 P (1-P) \div W^2$$

$$N = 4 \times (1,64)^2 \times 0,10 \times (1 - 0,10) \div (0,08)^2$$
$$N = 152$$

8. PROCEDIMIENTOS:

8.1 TOMA DE MUESTRAS:

A cada mujer que ingresó en el estudio se le realizó un cuestionario estandarizado y validado relacionado con ciertos factores de riesgo para enfermedades de transmisión sexual (Anexo No.3 – Formulario de factores de riesgo), luego de lo cual se le tomó una muestra vaginal y una rectal para determinación de SGB y una muestra cervical para la investigación de CT y NG, con las siguientes técnicas:

8.1.1 Recolección, transporte y almacenamiento de muestras vaginales y rectales para Streptococcus agalactiae:

- Se colocó a la paciente en posición ginecológica
- Con un hisopo estéril se tomó una muestra de la parte externa de la vagina y con otro hisopo se tomó una muestra rectal a través del esfínter anal.
- Los 2 hisopos fueron colocados en medio de transporte (Stuart), previamente rotulados y mantenidos a temperatura ambiente, hasta su transporte (Koneman, 2008).
- Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología del Hospital San Vicente de Paúl donde se procesaron diariamente.

8.1.2 Recolección, transporte y almacenamiento de muestras cervicales para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*:

- Con la paciente en posición ginecológica y luego de la toma para *Streptococcus agalactiae* se procedió a colocar un espéculo vaginal.
- Para la muestra endocervical, con una gasa estéril se limpió el moco del exocervix, gasa que posteriormente fue descartada.
- El hisopo de nylon se insertó en el endocervix hasta que la punta no fuera visible.
- El hisopo fue rotado en este sitio por 3 a 5 segundos y retirado sin tocar las paredes de la vagina.
- Este hisopo fue colocado en el medio de transporte M4 – CTM (Micro Test, Inc)
- Se cerraron los recipientes con la muestra y se rotularon con los datos de la paciente.
- Las muestras fueron transportadas en cooler con hielo hasta el Laboratorio Clínico del HSVP, donde se conservaron a -20°C hasta su transporte al Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador – Quito
- Una vez en la PUCE las muestras fueron almacenadas a - 80°C hasta su procesamiento.

8.2 TÉCNICAS:

8.2.1 Protocolo de Microbiología (Hospital San Vicente de Paúl):

8.2.1.1 Identificación de *Streptococcus agalactiae*:

- Se utilizó la metodología propuesta por el CDC, modificada. Esta metodología recomienda colocar los hisopos con la muestra vagino-ano-rectal en el medio de transporte Stuart o Amies y luego inocularla en el caldo Todd-Hewitt selectivo, SBM o Lim. Incubar durante 18 a 24 horas y sub-cultivar a placas de agar sangre.
- En el presente estudio se colocaron los hisopos en medio de transporte Stuart y se realizó la siembra directa de la muestra vagino-ano-rectal en agar CNA (Columbia agar + Acido nalidíxico + Colistin) selectivo para bacterias Gram positivas. Estas placas fueron incubadas a 35 °C durante 18 a 24 horas.
- Una vez identificadas las colonias sugerentes (Por su morfología) de *Streptococcus sp*: colonias traslúcidas o transparentes, de bordes enteros y convexas, a estas colonias se les realizó una tinción de Gram y la prueba de la catalasa.
- Las colonias que resultaron Gram positivas y catalasa negativas fueron sub-cultivadas en Agar Sangre de cordero con atmósfera microaerofílica, por 18 a 24 horas a 35 °C (Incubadora Marca G -Modelo 780 – Thermoestatic – Italia). Fueron consideradas como Estreptococo beta – hemolítico del grupo B cuando en el tiempo mencionado pudo observarse colonias con un halo de hemólisis beta débil en comparación con otros estreptococos beta-hemolíticos, e incluso algunas colonias no presentaron hemólisis.
- Las cajas en las cuales no se obtuvo desarrollo fueron descartadas después de 72 horas de incubación y consideradas como negativas.
- A las colonias obtenidas del agar sangre de cordero se las identificó presuntivas de *S. agalactiae* cuando la prueba de CAMP fue positiva (Anexo No 4) - Figura No. 1.
- Todas las cepas identificadas presuntivamente como *S. agalactiae* por las pruebas antes mencionadas fueron confirmadas mediante la detección del

antígeno específico de grupo, con pruebas de aglutinación de látex siguiendo las instrucciones del fabricante (Slidex Strep B- BioMérieux) (Anexo No.5) - Figura No. 2.

8.2.2 Protocolos Moleculares para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* por PCR en tiempo real (qPCR) de muestras cervicales (Pontificia Universidad Católica de Quito):

El PCR en tiempo real (qPCR) se basa en Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET). Solo el amplicón específico causa fluorescencia. A la sonda donante se etiqueta con fluoresceína en el extremo 3' y la aceptor con Rojo LC en el 5'. No hay hibridación durante la desnaturalización; la distancia entre los tintes es muy grande para que ocurra FRET.

Durante el anillamiento, las sondas hibridan al amplicón en un arreglo cercano. Se excita la fluoresceína y transfiere la energía al aceptor, que emite la luz roja. Esta fluorescencia se mide al final de cada anillamiento, cuando la fluorescencia es la más alta. Se eleva la temperatura y se desplaza la sonda HybProbe durante el alargamiento. Al final el amplicón está de doble cadena y las sondas desplazadas están otra vez demasiado lejano para permitir FRET. La qPCR_{ORM1}, permite la amplificación de un segmento de 166 pares de bases (pb) para NG y 136 bp para CT, con primers específicos mediante el equipo LightCycler® de la empresa Roche (Roche, 2007).

8.2.2.1 Extracción de DNA:

Como primer paso se procedió a la extracción de DNA, mediante el uso del Kit High Pure PCR Template – Preparation Kit (Roche, 2008); el procedimiento de extracción se detalla en el Anexo No. 6. Se usó una Cámara de bioseguridad (BSL-II – Marca Labconco, Serie: 02122260511) y una microcentrífuga (Marca Eppendorf No. 5415).

8.2.2.2 Cuantificación de DNA por espectrofotómetro:

Para asegurar los resultados se cuantificó el DNA mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm de absorbancia (Surzycky S, 2000). Para esto se utilizó un espectrofotómetro de UV marca Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV/VIS. Se consideró un DNA de buena calidad cuando la relación de A260/A280 tuvo un valor igual o mayor a 1,5 (Anexo 7).

El promedio de calidad del DNA obtenido fue de $1,4 \pm 0,31$ con un máximo de 2,76 y un mínimo de 1,03. El promedio de la cuantificación de DNA fue de $284,48 \pm 164$ con un mínimo de 44,5 y un valor máximo de 1007,2 ug/mL. El DNA de las muestras se conserva a -80°C en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de DISerLAB – PUCE.

8.2.2.3 Control de extracción de DNA, Amplificación de DNA de β - Globina (PCR convencional)

Procedimiento detallado se muestra en Anexo No.8 - Figura No. 3

8.2.2.4 Amplificación de DNA de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* por PCR en tiempo real (qPCR)

Para la detección cuantitativa de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* se usaron los siguientes kits:

- LightMix® para detección de *Neisseria gonorrhoeae*. Corrida en Termociclador para tiempo real: Lightcycler® 1.5 - Instrument – Roche. (Procedimiento detallado se muestra en el Anexo No.9) - Figura No. 4.
- LightMix® para detección de *Chlamydia trachomatis*. Corrida en Termociclador para tiempo real: Lightcycler® 1.5 - Instrument – Roche. (Procedimiento detallado se muestra en Anexo No.10) - Figura No. 5.

9. ESTANDARIZACIÓN

Los investigadores realizaron un ensayo de repetitividad de:

9.1 Toma de muestras.- Para asegurar la precisión en la toma de muestras, los investigadores y colaboradores realizaron un ensayo de repetitividad en 20 tomas de muestras cervicales y se evaluó la precisión.

9.2 Corrida de qPCR.- Para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos en la PCR, se efectuó una prueba piloto con 10 muestras, en la que se incluyeron controles positivos, negativos y controles internos.

Paralelamente y con la finalidad de asegurar la calidad de los reactivos a ser usados, se monitoreó la temperatura de almacenamiento de los mismos, y se graficó diariamente en una hoja de control de temperatura (Anexo No. 11). De igual manera se monitoreó la temperatura de envío y recepción de las muestras (Anexo No. 12) y de almacenamiento de las mismas a -20°C. (Anexo No.13).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron registrados en formularios en hoja de Excel (Anexo No.14) e ingresados en una base de datos del mismo programa versión 2007 para su análisis en el programa SPSS versión 11.5.

Se calcularon las prevalencias de cada microorganismo en forma global y por edad de la paciente y edad gestacional. Se observó si existe una prevalencia múltiple de más de

uno de los microorganismos investigados. Las prevalencias son expresadas en porcentajes con un intervalo de confianza de 90%.

Se determinó el Riesgo Relativo para comparar la frecuencia de enfermedades de transmisión sexual entre las que tienen factores de riesgo y las que no lo tienen. Se utilizó la Razón de momios para valorar si quienes presentan mayores factores de riesgo tienen mayor probabilidad de presentar enfermedad de transmisión sexual (Positividad CT y/o NG).

11. NORMAS ÉTICAS

El estudio respetó las normas éticas de la declaración de Helsinki en lo que se refiere a la investigación biomédica en seres humanos. Si bien trabajamos con un grupo sobreprotegido y vulnerable de la población, para realizar la investigación se obtuvo con anterioridad el permiso ante el comité de Bioética del Hospital San Vicente de Paúl de la ciudad de Ibarra. (Anexo No 15)

Las pacientes fueron informadas sobre los objetivos, alcances, riesgos y beneficios de la investigación, mismos que ellas obtendrían al participar en dicho estudio, previo a la aceptación de su participación (Consentimiento informado) y sólo si la paciente lo autorizaba se procedía a la realización de la entrevista privada asegurando a la paciente la confidencialidad.

Para la toma de muestra se brindó a la paciente privacidad al igual que para la entrevista. El procedimiento para la toma de muestra fue totalmente inocuo, con equipo estéril y realizado por personal entrenado.

Una vez tomadas las muestras se introdujeron en los tubos con medios de transporte adecuados, los mismos que fueron rotulados con un código asignado previamente para no manejar los datos de identificación de cada paciente.

Una vez obtenidos los resultados del laboratorio se dio a conocer a cada paciente sus resultados y el médico tratante de Ginecología le ofreció una alternativa de tratamiento y consejería. (Anexo 16)

12. RESULTADOS

12.1 Caracterización general de la población estudiada

Se estudiaron un total de 152 mujeres embarazadas entre 34 y 39 semanas de gestación, determinadas por la fecha de la última menstruación (FUM) o por ecografía. La edad promedio fue de 25 años, con un mínimo de 15 y un máximo de 41 años.

En la tabla No. 1 se describen los principales datos demográficos, es notorio que la mayoría de las pacientes son de raza mestiza, han tenido instrucción secundaria y se dedican a tareas domésticas.

Tabla No.1 Datos demográficos de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.

DATOS	PORCENTAJES
RAZA	
Mestiza	91,4
Negra	7,9
Indígena	0,7
INSTRUCCIÓN	
Superior	19,7
Secundaria	51,3
Primaria	26,3
Ninguna	2,7
OCUPACIÓN	
QQDD	76,3
Trabajo ocasional	21,0
Trabajo permanente	2,7

La historia gineco-obstétrica de este grupo de mujeres se presenta en la Tabla número 2. El inicio de la vida sexual es a los 11 años y es amplio el rango del número de embarazos, abortos y parejas sexuales.

Tabla No. 2 Historia Gineco-obstétrica de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.

HISTORIA GINECO-OBSTÉTRICA	MEDIA ± DE	MÍNIMO	MÁXIMO
Edad de inicio de su vida sexual (Años)	18,17 ± 3,41	11	35
Número de parejas sexuales	2 ± 1,41	1	12
Número de embarazos	2,3 ± 1,77	1	14
Número de partos	0,86 ± 1,28	0	7
Número de abortos	0,31 ± 0,97	0	10
Número de cesáreas	0,13 ± 0,39	0	2

La mayoría de las mujeres se realizó al menos 5 controles prenatales durante este embarazo (23,7%), sin embargo el rango de los mismos va desde 1 (2,6%) hasta 8 (5,3%). El 93,4% de las pacientes se realizaron el examen serológico de HIV y el 94,1% el examen de VDRL, no se encontró resultados positivos para los exámenes mencionados.

En la entrevista realizada antes de la toma de las muestras ginecológicas se encontró que la mayoría presentaba síntoma/s relacionados con algún tipo de infección genito-urinaria. En la tabla número 3 se sintetizan las manifestaciones clínicas mencionadas por las gestantes. Un alto porcentaje refirió tener secreción vaginal y dolor abdominal bajo.

Tabla No 3. Manifestaciones clínicas de infección genito-urinaria en las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS	PORCENTAJES (%)
Secreción vaginal	85
Picazón	29
Secreción de mal olor	40

Ardor	24,30
Disuria	19,70
Dolor abdominal bajo	58

El examen físico durante la toma de muestras reveló que la mayoría (93,4%) presentó secreción vaginal, sea blanquecina o purulenta. Aproximadamente en el 18% de las gestantes se observó laceraciones en la mucosa vaginal. Estos datos se presentan en la tabla 4.

Tabla No. 4 Signos físicos encontrados durante la toma de muestras en las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.

SIGNOS FÍSICOS	PORCENTAJES (%)
Temperatura mayor a 37,5°C	0
Tatuajes	19,7
CERVICALES	
Laceraciones	17,80
Quistes de Naboth	13,80
Tumoraciones	0
VAGINALES	
Secreción purulenta	19,70
Secreción blanquecina	73,70
Mal olor	40
Condilomas	0,70

Con respecto a la pareja sexual de las gestantes estudiadas el 86% de mujeres refirió conocer que su pareja tiene otra pareja sexual. Cuando se consultó algunos signos y síntomas que podía presentar la pareja sexual se encontró que entre el 10% y 17% de las parejas refirieron la presencia de úlceras genitales y disuria, respectivamente. (Tabla 5)

Tabla No. 5 Datos clínicos de la pareja sexual de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra.

DATOS CLÍNICOS	PORCENTAJES (%)
Secreción uretral	7,20
Disuria	17,80

Ulceras en los genitales	9,20
La pareja ha tenido alguna vez Infección de transmisión sexual (ITS)	2
Recibió tratamiento para ITS	100 (2)

12.2 Prevalencias de microorganismos estudiados

Encontramos una prevalencia de *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo beta hemolítico Grupo B – SGB) de 13,15%, 23,02% de *Chlamydia trachomatis* (CT) y 0% de *Neisseria gonorrhoeae* (NG). La presencia combinada de *Streptococcus agalactiae* y *Chlamydia trachomatis* fue 1,32%, es decir 2 pacientes resultaron positivas para los gérmenes buscados.

Cuando observamos la prevalencia de SGB por grupos de edad encontramos que la presencia de SGB fue más frecuente en pacientes del grupo de edad de 40 años o más, seguido por el grupo de edad de 20 a 24 años. Con respecto a la frecuencia de *Chlamydiasis* por grupos de edad se encontró que es mayor en los grupos de mujeres más jóvenes: de 15 a 24 años de edad. (Tabla 6)

La prevalencia total de SGB fue obtenida de cultivos tanto vaginales como ano-rectales. La mayor frecuencia de este germen se determinó en los cultivos de vagina (7%), seguido de los cultivos rectales (4%) y solo en el 2% de las pacientes se encontró SGB en los dos sitios anatómicos.

Tabla No. 6 Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* (SGB) y *Chlamydia trachomatis* (CT) por grupos de edad en las mujeres embarazadas de la ciudad de Ibarra.

Grupos de edad	Porcentaje de SGB (Casos)	Porcentaje de CT (Casos)
15 – 19 años	9,1 (3/33)	24,24 (8/33)
20 – 24 años	19,6 (10/51)	27,5 (14/51)
25 – 29 años	14,71 (5/34)	14,7 (5/34)
30 – 34 años	2,2 (1/14)	13,3 (6/14)
35 – 39 años	0 (0/15)	13,3 (2/15)
=/> 40 años	20 (1/5)	0 (0/5)

~~embarazadas de la ciudad de Ibarra.~~

12.3 Comparación de las características demográficas y clínicas de las pacientes con y sin *Chlamydia trachomatis*

Cuando se analizó las características demográficas de la población se encontró que el inicio de la vida sexual y el número de parejas sexuales fueron similares tanto en el grupo de mujeres con resultados positivos como en el grupo con resultados negativos para *Chlamydia trachomatis*. Al analizar los antecedentes de número de embarazos y partos no hubo diferencias estadísticamente significativas. Llama la atención el mayor porcentaje de abortos encontrado en el grupo de mujeres con resultado positivo para CT, por lo que al compararlo con el grupo negativo para CT hay diferencia estadística. (Tabla No. 7)

Tabla No. 7 Características generales de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, con y sin *Chlamydia trachomatis*

CARACTERISTICAS	NEGATIVAS	POSITIVAS	P
	117	35	
Edad (X ± DE)	25,5 ± 6,8	24,6 ± 6,2	NS
Inicio de vida sexual (X ± DE)	18,28 ± 3,7	17,84 ± 2,3	NS
Más de una pareja sexual (%)	52,6 <u>48,7</u> (57 <u>4</u> / 117 <u>4</u>)	53,3 <u>51,4</u> (21 <u>18</u> / 35 <u>8</u>)	NS
Número de embarazos (X ± DE)	2,32 ± 1,9	2,26 ± 1,3	NS
Número de partos (X ± DE)	0,9 ± 1,3	0,74 ± 0,9	NS
Abortos (%)	16,7 <u>2</u> (19 <u>1</u> / 117 <u>1</u>)	26,3 <u>28,7</u> (10 <u>3</u> / 35 <u>5</u>)	0,054

Encontramos una alta prevalencia de infecciones sintomáticas, ya que el 97,1% de gestantes que presentaron CT, se quejaron de antecedentes de algún tipo de secreción vaginal, síntoma considerado el más común en cualquier tipo de infección.

Las mujeres con CT vaginal presentan una frecuencia significativa más alta (P = 0,013) que la encontrada en las gestantes negativas para CT (80,7%). Las frecuencias del síntoma: secreción se relacionaron altamente con las frecuencias signo: secreción (de cualquier tipo) en las gestantes con y sin CT. Sin embargo, sólo en el 24% de las gestantes positivas para CT se evidenció secreción purulenta, y este porcentaje no difirió del encontrado en las gestantes sin CT (Tabla No. 8).

Los porcentajes de las gestantes que refirieron dolor abdominal bajo, signo de infección, fue similar tanto en el grupo positivo como en el negativo para CT. Tampoco se encontró diferencia entre los 2 grupos de gestantes con respecto a cambios en el cérvix, como laceraciones o quistes de Naboth. Estos hallazgos nos indican que el antecedente

de secreción vaginal es un síntoma importante en la infección por *Chlamydia trachomatis*.

Tabla No.8 Signos y síntomas de las pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, con y sin *Chlamydia trachomatis*

<i>Síntomas/Signos físicos</i>	<i>NEGATIVAS</i>	<i>POSITIVAS</i>	<i>P</i>
<i>Cervicales</i>	<i>117</i>	<i>35</i>	
Antecedentes de secreción vaginal (%)	81,19 (95/117)	97,1 (34/35)	0,013
Antecedentes de prurito (%)	29,05 (34/117)	25,7 (9/35)	NS
Antecedentes de disuria (%)	18,80 (22/117)	22,8(8/35)	NS
Antecedentes de dolor abdominal bajo (%)	64,95 (76/117)	60 (21/35)	NS
Presencia de laceraciones (%)	18,80 (22/117)	14,28 (5/35)	NS
Presencia de quistes de Naboth (%)	17,09 (20/117)	2,85 (1/35)	NS
Presencia de secreción purulenta (%)	18,80 (22/117)	22,85 (8/35)	NS
Presencia de secreción blanquecina (%)	90,59 (106/117)	100 (35/35)	NS
Presencia de condilomas (%)	0,85 (1/117)	0 (0/35)	NS

13. DISCUSIÓN

13.1 *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo beta hemolítico del grupo B (SGB)

Nuestro trabajo evidenció porcentajes altos (13,15%) de colonización por *S. agalactiae* en muestras vagino-ano-rectales de mujeres embarazadas, porcentaje que es mayor al encontrado (10%) en otro estudio de mujeres embarazadas de 38 semanas de gestación de la Ciudad de Quito en el año 2002 (Cárdenas, Benítez, 2002), y similar a los reportados en Chile (14%) en el año 2004 (Valdés, 2004), en México (20%) en el mismo año (González, 2004) y en Argentina (9,35%) en el año 2005 (Bartolomeo, 2005).

La variación de la prevalencia de SGB en países latinos puede ser atribuida a diferentes características de la población de estudio. Las prevalencias varían entre 5 y 40% (Valdés, 2004; Díaz, 2008; Valdés, 2003), dependiendo de la población estudiada, la ubicación geográfica, la región anatómica de obtención de la muestra (vaginal y/o anal o rectal) y el medio de cultivo utilizado (selectivo Vs. no selectivo) (Bartolomeo, 2005).

La técnica de cultivo que utilizamos para determinar la colonización por *S. agalactiae* en mujeres embarazadas, fue la propuesta por el CDC (Centro para el control y la Prevención de Enfermedades), con una modificación: se utilizó medio de Stuart para el transporte y posteriormente se sembró directamente la muestra vagino-ano-rectal en agar CNA (Columbia agar + Acido nalidíxico + Colistin) selectivo para bacterias Gram Positivas, el CDC por su parte recomienda la subsiembra de las muestras en caldo Todd-Hewitt selectivo. Por último se subcultivaron los microorganismos en agar sangre de cordero con atmósfera microaerofílica por 18 a 24 horas a 35 °C. A pesar de utilizar

los medios de cultivo recomendados por el CDC, se pudo observar el sobre-crecimiento de bacterias Gram positivas, tales como: *Enterococcus sp.* y *Staphylococcus sp.*, debido a que el medio de cultivo CNA (Columbia con Colistin y ácido nalidíxico) es un medio no selectivo para bacterias Gram positivas lo cual dificultó un poco el aislamiento de *S. agalactiae*.

Se conoce que la colonización de la vagina por *S. agalactiae* a partir del recto es muy frecuente, debido a que la bacteria puede migrar por vía ascendente hasta el cérvix donde produce infección, o puede alterar el moco cervical e inducir partos prematuros (Díaz, 2008; Regan, 1981), asociación importante entre la colonización materna y la ruptura prematura de membranas, ya que este microorganismo es capaz de producir fosfolipasas y proteasas, e inducir respuesta inmune con la producción de prostaglandinas, que debilitan las membranas fetales (Parry, 1998).

La prevalencia de colonización por SGB según el tipo de muestra analizada varía de acuerdo con el sitio anatómico. Así, nosotros encontramos un mayor porcentaje (7,2%) en muestras vaginales, que en muestras rectales (4,0%) y sólo el 2,0% en ambas localizaciones. Generalmente la identificación de este germen se hace en muestras vaginales, por lo tanto, para aumentar la recuperación de identificación de este microorganismo es necesario, que además de usar medios selectivos, se realice el tamizaje de los dos sitios anatómicos: vagina y ano/recto. La evidencia indica que la identificación aumenta cuando se busca al SGB en región vaginal asociada a la perianal, ya que desde allí va a ir a colonizar intermitentemente el tracto genital inferior y nuestros hallazgos confirman esta hipótesis (Abarzúa et al, 2002).

La colonización de los recién nacidos se produce por vía ascendente hacia el útero y durante el nacimiento sea a partir del tracto genital materno colonizado o desde el útero. La tasa de colonización del recién nacido reportada por algunos estudios alcanzó hasta el 50% (CDC, 2006; Díaz y Nieves, 2008; Sayahtheri y Dryja, 1994). A pesar de las altas prevalencias de colonización por SGB encontradas en las embarazadas de nuestro país, no se conoce la incidencia de infección neonatal por *S. agalactiae*, ni la relación existente sobre la morbi-mortalidad neonatal. Si inferimos esta tasa de colonización del 50% a nuestro estudio, se espera que el 6% de los niños estén colonizados, ya que 13% de las madres lo están, por lo tanto la infección neonatal por este germen podría ser alta,

sin embargo esta tasa de infección no la conocemos porque no fue realizada en este estudio. La alta prevalencia de SGB nos hace pensar que la tasa de transmisión y enfermedad en los recién nacidos por este microorganismo también debe ser importante. Desafortunadamente no se cuenta con estadísticas de infección neonatal por SGB, ni estudios que respalden tal afirmación, debido a que no existen programas de vigilancia nacional de estas infecciones en neonatos.

Streptococcus agalactiae es actualmente el agente causal más importante de sepsis neonatal precoz de origen bacteriano, descrito así internacionalmente (Huger et al, 2000). En 1992, la Asociación Americana de Pediatría (AAP) recomendó realizar *screening* universal entre las 26 y 28 semanas de gestación y tratar con antimicrobianos intraparto a las pacientes con factores de riesgo y a aquellas que tuviesen cultivo positivo para SGB. Ese mismo año, el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (ACOG) recomendó tratar a las pacientes basándose exclusivamente en los factores de riesgo, sin realizar *screening* (CDC, 1997). En 1996, el Comité del ACOG (The American Congress of Obstetricians and Gynecologists) comentó que las normas pediátricas y obstétricas de 1992 generaban controversias y confusión entre los clínicos. Por ello, el CDC de Atlanta en 1996 planteó dos estrategias posibles y sugirió que "*cada centro de salud analice, de acuerdo a su realidad local, cuál es el más apropiado*". La primera se basa en la administración de antimicrobianos intraparto sólo a las pacientes que presentan alguno de los siguientes factores de riesgo: embarazo < 37 semanas, ruptura prematura de membranas de >18 horas, ó temperatura >38.0°C. ("risk factors-based protocol"). La segunda agrega a lo anterior, el *screening* del SGB entre las mujeres embarazadas de 35-37 semanas de gestación sin tomar en cuenta los factores de riesgo ("screening-based protocol") (CDC, 1997). Debido al alto impacto en la morbimortalidad neonatal por SGB, el tamizaje universal y profilaxis han sido propuestos por el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, 1997), justificando su implementación desde el punto de vista médico como económico (Colbourn et al, 2007). Sin embargo, el desconocimiento de las tasas de colonización por SGB en gestantes y el impacto de enfermedad neonatal en nuestro país, no han permitido implementar una norma de tamizaje para prevenir este tipo de enfermedades, a pesar de que internacionalmente han sido propuestas.

La prevalencia encontrada de SGB en los diferentes grupos de edad no es estadísticamente significativa, aunque el porcentaje mayor de SGB se halló en el grupo de ≥ 40 años de edad, el tamaño pequeño de la muestra no nos permite generalizar los resultados encontrados hacia la población. Es necesario recalcar que las referencias indican que la edad joven de la madre, la raza negra y ser hispanas aumentan el riesgo de enfermedad neonatal en el recién nacido (CDC, 1997). Si consideramos que en nuestro estudio casi el 22% de las pacientes tienen menos de 20 años y salvo el 1%, la mayoría son de raza mestiza y negra, con una tasa de colonización de SGB del 13%, estamos frente a una población con altos factores de riesgo de presentar infección en los recién nacidos. En este estudio no se encontró asociación significativa entre la colonización y antecedentes de aborto espontáneo, o síntomas manifestados por las pacientes.

Los resultados de nuestro estudio en mujeres embarazadas sugieren una elevada tasa de colonización de SGB, lo que podría conducir a un incremento de niños colonizados con riesgo de sufrir infección neonatal por este microorganismo.

13.2 *Chlamydia trachomatis*

Nuestro estudio reveló una prevalencia de *Chlamydia trachomatis* de 23,02%, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR), valor muy superior al encontrado (6,5%) en una prueba piloto de 100 adolescentes embarazadas de la ciudad de Quito en el año 2006, e inclusive mayor al encontrado en un grupo de 100 mujeres trabajadoras sexuales de Quito en el mismo año (20%), utilizando el mismo método. Los 2 estudios fueron realizados por Dean Deborah del Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI), utilizando PCR convencional (Amplicor). Supera también al encontrado en un estudio de 158 gestantes en riesgo de parto pretérmino y amenaza de parto pretérmino de las maternidades de Quito y Guayaquil, mediante PCR convencional (Medina et al, 2008). Estas diferencias en la prevalencia de CT pueden ser debidas, probablemente a las diferentes técnicas moleculares utilizadas y a la diferente población investigada. La PCR Amplicor fue la primera técnica comercial autorizada por la FDA en 1993, está dirigida al plásmido

críptico específico que está presente en más del 99% de las cepas de CT. Su sensibilidad y especificidad son del 99% y del 98%, respectivamente. Sin embargo, la PCR en tiempo real parece tener una sensibilidad y especificidad mayores al Sistema PCR Amplicor (Vásquez et al, 2008).

En estudios de prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en gestantes realizados por técnicas inmunológicas (ELISA por captura de antígeno) se reportaron prevalencias inferiores a las encontradas en nuestro estudio. Así, en 216 mujeres embarazadas en Uruguay se encontró una prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* de 5,6% (Acevedo et al, 1997), otro estudio en 198 mujeres colombianas en el último trimestre de gestación reportó 3,5% de infección (Heredia, Vargas, 1989), en Kinshasa –Zaire (Vuylsteke et al, 1993) en 1160 gestantes la infección clamydial alcanzó el 5,2%.

Sin embargo en estudios de prevalencia realizados en diferentes países en los cuales utilizaron técnicas moleculares, las frecuencias reportadas fueron similares a las encontradas en nuestro estudio. Así en México en el 2009 con el uso de PCR convencional se encontró una prevalencia del 20,4% (Sánchez et al, 2009). en Trinidad y Tobago el 20%, mediante la técnica de Nested-PCR in house, en el 2007 (Rampersad et al, 2007), en Venezuela el 10,4% (PCR convencional) en el año 2007 (Arráiz et al, 2007) y en Argentina el 12,9% (Nested-PCR) en el año 2005 (Deluca et al, 2005). Las prevalencias reportadas varían ampliamente dependiendo de las técnicas de diagnóstico utilizadas. Sin embargo, las frecuencias obtenidas mediante test moleculares son más altas que las encontradas con test serológicos, por tal razón las pruebas moleculares son consideradas altamente sensibles. La prevalencia encontrada en nuestro estudio (23,02%) transforma a la población estudiada como de “alta prevalencia”.

La presencia de *C trachomatis* y sus secuelas han sido bien documentadas a través de diversos estudios y mediante diferentes técnicas de diagnóstico, por esta razón el CDC recomienda el “screening de rutina en mujeres sexualmente activas menores de 25 años, aunque la mayoría de informes indican que la prevalencia más alta está en el grupo entre 20 - 25 años, en edades mayores debe considerarse algún otro factor de riesgo.” Para las mujeres embarazadas el screening es incierto, sin embargo una búsqueda en período temprano en el embarazo puede evitar nacimientos con bajo peso o partos prematuros, pero el screening en el tercer trimestre podría proveer de un

diagnóstico y tratamiento efectivos para evitar la transmisión de la enfermedad al feto (CDC, 2006). A pesar de las recomendaciones internacionales, poco se conoce de la prevalencia de CT en nuestro país y nada se hace al respecto.

En nuestro estudio el mayor número de casos detectados de infección por *C. trachomatis* se ubicó en los grupos etarios más jóvenes, alcanzando cifras del 24,24% y del 27,5% en los grupos más jóvenes (15 a 19 y 20 a 24 años, respectivamente) y declinó hasta 0% en pacientes sobre los 40 años de edad, estos datos se relacionan con los reportados por estudios internacionales. En un estudio de mujeres militares menores de 17 años se encontró una prevalencia del 15% (Gaydos et al, 1998). En mujeres menores de 25 años, asintomáticas, la cifra alcanzó el 20% y fue disminuyendo conforme avanzaban en edad (Lan et al, 1995; Cates et al, 1991).

La disminución de casos de infección por *C. trachomatis* en la población de pacientes sobre 30 años de edad ha sido atribuida a las diferencias anatómicas encontradas en esta población etaria, tal es el caso de una menor exposición del epitelio escamocolumnar de la región endocervical. También se han señalado otros factores como: el número de parejas sexuales, número de partos, raza negra y la baja condición socioeconómica (Cates et al, 1991; Black, 1997; Morré et al, 1998). Por esta razón la edad temprana de las mujeres constituye uno de los principales factores de riesgo de *Chlamydia*. Otro factor de riesgo importante es el número de parejas sexuales. En nuestra población de estudio, el 53,3% de las embarazadas han tenido más de un compañero sexual, estudios comparativos de poblaciones en las cuales las mujeres han tenido un solo compañero sexual en el último año reportan prevalencias mucho más bajas (3,5%) versus poblaciones con varios compañeros sexuales (40%) (Chen et al, 2009). La edad, el número de compañeros sexuales y posiblemente la presencia de síntomas, parecen ser los factores más importantes para la detección de *C. trachomatis* en la población evaluada.

Contrariamente a lo que se ha publicado (Guerra, 2003; Servaas et al, 2002; Sánchez et al, 2009; Gaydos et al, 1998) no encontramos relación entre el inicio temprano de la vida sexual y el número de parejas sexuales con la infección, ya que ambas características fueron similares tanto en el grupo de mujeres con resultados positivos

para CT como en el grupo con resultados negativos para CT. Al analizar los antecedentes de número de embarazos, partos y abortos no hubo diferencias significativas en la mayoría de las características de la historia gineco-obstétrica de las mujeres embarazadas que fueron positivas en comparación con el grupo de mujeres negativas para CT. Sin embargo, hay que recalcar que el grupo de mujeres con CT que presentaron secreción vaginal fue significativamente mayor que el grupo de mujeres negativas para CT.

El cultivo celular para *C. trachomatis* ha sido la norma de referencia contra el cual todas las demás pruebas de diagnóstico se han comparado, aunque limitado por su baja sensibilidad de 50 a 80% y su moderada especificidad de hasta el 89% (Frontera et al, 20002). Mientras que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos alcanzan una sensibilidad de hasta el 100 % y una especificidad del 94% (Técnica de PCR-plásmido) (Martínez, 2001; Marrazzo et al, 2005; Frontela et al, 2002). Por ello se ha requerido de la implementación de otras pruebas de diagnóstico, debido a que los cultivos microbiológicos celulares para identificar *C. trachomatis* son difíciles de estandarizar, son técnicamente exigentes, y muy costosos. Por lo anteriormente mencionado se han desarrollado nuevas técnicas que no requieren de organismos viables, los primeros en desarrollarse fueron los test enzimáticos de inmunoensayo (EIA) que detectan antígenos y anticuerpos fluorescentes directos de *Chlamydia* basados en el uso de anticuerpos monoclonales. Estas pruebas de detección de antígeno fueron seguidas por pruebas de hibridación de ácidos nucleicos, que detectan secuencias específicas de los ácidos nucleicos de *C. trachomatis* (CDC, 2006). En este estudio se emplearon técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real - qPCR), recomendadas internacionalmente para el diagnóstico de *C. trachomatis* por su alta sensibilidad, para detectar secuencias de ADN de *C. trachomatis* en muestras clínicas y cuantificar la presencia de este patógeno (CDC, 2006; Lan et al, 1995), por lo tanto la alta prevalencia de CT encontrada en nuestra población es muy confiable y refleja la sensibilidad de este tipo de pruebas diagnósticas.

13.3 *Neisseria gonorrhoeae*

En nuestro estudio no hemos encontrado ningún caso positivo para *Neisseria gonorrhoeae*, la prevalencia del 0% encontrada es similar a la reportada en otros estudios realizados en países como Lima (Portilla et al, 1999) y México (Iglesias et al, 2007). Sin embargo, es necesario indicar que este resultado posiblemente es debido al uso de antibióticos en el manejo sintromico de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), como norma de atención en nuestro país, basado en las Guías para el tratamiento de las ITS dictado por la OPS (OPS, 2005), lo que de cierta forma ha controlado la gonorrea.

En el año 2007 en EEUU se reportaron 355,991 casos de gonorrea con una tasa de 118.9/ 100,000 habitantes, ligeramente más alta en las mujeres (123.5/100,000), que en los hombres (113.7 casos por 100,000 habitantes), y siendo más frecuente en adolescentes entre 15 a 19 y 20 a 24 años (CDC, 2007). De las prevalencias reportadas en diferentes estudios se encuentran datos que van desde el 0 al 3% (Portilla et al, 1999; Rampersad et al, 2007; Arjona et al, 1982; Cano et al, 1998; Iglesias et al, 2007), cabe indicar que estas frecuencias han sido determinadas por distintos métodos de diagnóstico y en diferentes grupos poblacionales. De las frecuencias más altas reportadas en gestantes, está una prevalencia del 2% encontrada en un grupo de embarazadas de Trinidad y Tobago en el año 2007 (Rampersad et al, 2007).

La *Neisseria gonorrhoeae* es una bacteria de difícil crecimiento, que necesita múltiples requerimientos para crecer en un medio de cultivo. El cultivo en medios selectivos es considerado como el “Estándar de oro”, sin embargo con las condiciones más adecuadas de toma, conservación y sobre todo de transporte de la muestra se puede alcanzar una sensibilidad del 80 al 90%. La limitación más grande es que se necesita de muestras colectadas invasivamente de endocervix o de la uretra para el diagnóstico microbiológico (Martín et al, 2000).

El diagnóstico específico de infección por *N. gonorrhoeae* puede ser realizado por cultivo, pruebas de hibridación de ácidos nucleicos, y los NAATs (Test de amplificación de ácido nucleicos). Estas pruebas están disponibles para la detección de

infección genitourinaria de *N. gonorrhoeae* en muestras endocervicales, vaginales, uretrales, o de orina tanto para hombres como mujeres. Tanto el cultivo como las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos requieren de muestras invasivas (CDC, 2006). El cultivo microbiológico es la prueba estándar para el diagnóstico de NG, sin embargo los test de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) son generalmente más sensibles. Por esto se ha propuesto que los laboratorios pueden ofrecer estas pruebas para el diagnóstico de gonorrea, después de una validación de este método por cada laboratorio (CDC, 2009).

En base a estas consideraciones decidimos realizar el tamizaje para buscar NG en las gestantes de la ciudad de Ibarra, mediante test de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Sin embargo estamos conscientes de que este tipo de pruebas diagnósticas son limitantes en nuestro medio, por los costos y fundamentalmente porque no proveen la sensibilidad requerida para el tratamiento en caso de resultar test positivos.

Hay que considerar que los pacientes infectados con *N. gonorrhoeae* generalmente están coinfectados con *C. trachomatis* (CDC, 2006), pero la prevalencia encontrada de 0% en el estudio, no nos permite valorar estados de coinfección por estas bacterias consideradas de transmisión sexual, capaces de provocar grandes secuelas en el recién nacido y complicaciones en la madre.

Los resultados que presentamos dejan prever la necesidad de nuevos trabajos de investigación encaminados a consolidar estos hallazgos y a determinar la frecuencia de infecciones neonatales causadas por estos microorganismos no solo en la provincia de Imbabura sino también en el país, de forma que se puedan implementar sistemas de tamizaje que permitan identificarlas tempranamente y evitar este tipo de infecciones en nuestros recién nacidos.

14. CONCLUSIONES

Podemos concluir que la colonización materna por *Streptococo beta hemolítico del grupo B* (SGB) ó *Streptococcus agalactiae* en muestras vaginales y/o anales, diagnosticada mediante cultivo microbiológico en la población estudiada es del 13%, causa importante de infección neonatal. Esta prevalencia en los diferentes grupos de edad no es estadísticamente significativa.

La prevalencia encontrada de *Chlamydia trachomatis* (CT) en muestras de cérvix de embarazadas de la ciudad de Ibarra fue del 23,02%, mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), la prevalencia más alta se ubicó en el

grupo de mujeres menores de 25 años. Considerando que el RN que nace de una madre que tenga una infección cervical con CT tiene un riesgo de hasta 50% de adquirir infección clamydial sobre todo conjuntivitis y neumonía. La presencia de secreción vaginal y el número de abortos fueron estadísticamente significativos entre el grupo de mujeres con diagnóstico positivo vs negativo para *Chlamydia*. Es concluyente que no existe *Neisseria gonorrhoeae*, diagnóstico realizado mediante qPCR en las mujeres embarazadas de la ciudad de Ibarra.

15. RECOMENDACIONES

Se debería implementar de forma rutinaria el cultivo microbiológico para diagnóstico de SGB a partir de la 34^a semana de gestación, pues esta bacteria se debe considerar como el microorganismo más importante cuando se analiza la sepsis neonatal precoz de origen bacteriano, por lo que sería conveniente realizar estudios que determinen la tasa de infección neonatal producida por este microorganismo. Las elevadas tasas de colonización nos indican que sería conveniente realizar este tipo de estudios a nivel del país a fin de conocer la real magnitud del problema, en base al cual las autoridades del Ministerio de Salud podrían implementar las medidas preventivas y de control necesarias, de acuerdo a los resultados que se puedan obtener.

Se estima que la aplicación de estrategias de prevención basadas en cultivo permite prevenir más de 90% de los casos de infección neonatal por *S. agalactiae*, mientras que las basadas únicamente en factores de riesgo previenen 50 a 60% de los casos. En este sentido, es importante que los laboratorios realicen una revisión cuidadosa de los protocolos de detección de *S. agalactiae*, de tal manera que se pueda implementar la técnica de diagnóstico más sensible y que se puedan desarrollar en todos los laboratorios microbiológicos, sin inconvenientes y con mínimos costos. En este sentido, sería conveniente efectuar estudios de relación costo-beneficio en nuestro medio, para definir si la estrategia de prevención de la infección neonatal ocasionada por SGB es aplicable a la realidad del país.

Es importante realizar estudios similares en otros Hospitales y Centros de Salud de atención a gestantes, con la finalidad de determinar la prevalencia y la magnitud de la infección clamydial y gonocócica.

Se recomienda fomentar en los médicos el tamizaje de *Chlamydia* en mujeres embarazadas durante el tercer trimestre, para evitar la infección *Chlamydial* en el recién nacido, ya que si se realizaría en los primeros controles prenatales puede ocurrir el riesgo de reinfección. Debido a la alta prevalencia encontrada en nuestra población se sugiere realizar el tamizaje en gestantes menores de 25 años y en todas aquellas que presenten algún factor de riesgo, así evitar complicaciones futuras de la madre y el recién nacido.

Sería conveniente extender el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* por métodos altamente sensibles en poblaciones con alto riesgo de contraerla, puesto que en los últimos años se ha subestimado la prevalencia de NG por falta de reporte y control epidemiológico.

Creemos conveniente fomentar este tipo de estudios en poblaciones con características diferentes a la nuestra, para determinar una prevalencia real de este tipo de infecciones en las mujeres embarazadas del país y poder establecer estrategias de diagnóstico para estas enfermedades e implementar su uso en los controles prenatales.

16. BIBLIOGRAFIA:

Abarzúa F, Guzmán A, Belmar C, Becker J, García P, Riosec A, Oyarzún E. Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) en el tercer trimestre del embarazo. Evaluación del cultivo selectivo, experiencia en 2192 pacientes. Revista Chilena Obstet. Ginecol. 2002; 67(2): 89 – 93.

Acevedo A, Marquez C, Zarantonelli L, Borthagaray G. Prevalencia de Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres en Uruguay. Libro de Resúmenes del XI Congreso Latinoamericano de Enfermedades de Transmisión Sexual. V Congreso Panamericano de SIDA. Lima-Perú. 1997: 113.

Allaire A, Huddleston J, William L, Graves, Lawrence N. Initial and repeat screening for *Chlamydia trachomatis* during pregnancy. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 1998; 6:116-122.

Andrews W, Goldenberg R, Hauth J. Preterm labor: Emerging role of genital tract infections. Infection Agents Diseases. 1995;4:196-211.

Arjona H. Incidencia de *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres embarazadas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. 1982; 5(1):171.

Arráiz N, Ginestre M, Perozo A, Castellano M, Urdaneta B, García M. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela. Rev Chil Infect. 2007; 24 (1): 48-52.

Artz L, Kempf V, Autenrieth I. Rapid Screening for *Streptococcus agalactiae* in vaginal specimens of pregnant women by fluorescent in situ hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41: 2170 – 2173.

Arya OP, Mallinson H, Goddard AD. Epidemiological and clinical correlates of *Chlamydia* infection of the cervix. Br J Vener Dis. 1981; 57: 118-24.

Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin. Microbiol Rev. 1989; 2:119–36.

Bartolomeo S, Gentile M, Priore G. *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. Revista Argentina de Microbiología, 2005; 37: Disponible en: <http://www.scielo.org.ar>

Bartolomeo S, Rodríguez M, Sauka D, De Torres R. Perfil microbiológico en secreciones genitales de embarazadas sintomáticas, en el Gran Buenos Aires, Argentina. Rev. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2001; 19: 99 – 102.

BioMérieux. Slidex strepto plus, Rapid and reliable identification of streptococci; 2008.

Black C M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 160-84.

Blanco A, De la Rosa M, Andreu A, Cacho J, López J. Microbiología de la Infección perinatal. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2002. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap13.htm>

Blanco M, Pazos C, Agreda M, Rodríguez J, Salazar F. Porcentaje de Gestantes portadoras de *Estreptococo del grupo B* según nacionalidad de origen (576). Enfermedades Infecciosas – Microbiología Clínica. 2004; 22: 198 – 206.

Browner WS, Blick D, Newman T, Hulley SB Estimating simple size and power. In: Hulley SB, Cumming SR. Eds. Designing clinical research. Baltimore MD, Williams and Wilkins; 1988.

Buimer M, Van Doornum G, Ching S, Peerbooms P, Plier P, Ram D, and Lee H. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by ligase chain reaction-based assays with clinical specimens from various sites: implications for diagnostic testing and screening. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 2395–2400.

Cano M, Amado E. Estado de portador de *Neisseria Gonorrhoeae* en mujeres embarazadas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. 1998; 1(5):154.

Canto T, Polanco L, Fernández V, Ruiz S. Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. Revista de Salud Pública de México. 2003; 45: 5.

Cárdenas S. Benítez M. Prevalencia de *Streptococo agalactiae* en mujeres de 38 semanas de gestación de la ciudad de Quito.[Disertación]. Quito: PUCE; 2002.

Cates W Jr, Wasserheit J N. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. Am J Obstet Gynecol. 1991; 164: 1771-81.

CDC. Clinic-Based Testing for Rectal and Pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infections by Community-Based Organizations --- Five Cities, United States, 2009. 58(26);716-719.

CDC. Decreasing incidence of perinatal *group B streptococcal* disease-United States, 1993-1995. MMWR. 1997; 46 (21): 473 -477.

CDC. False-positive results with the use of chlamydial tests in the evaluation of suspected sexual abuse—Ohio 1990 [Epidemiologic notes and reports]. MMWR. 1991; 39: 932–5.

CDC. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: A Public Health Perspective. Recommendations and Reports. MMWR. 2002.

CDC. Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections — 2002. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51 / No. RR-15.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted diseases (Gonorrhea) Data and Statistics Surveillance Reports, 2007.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment guidelines. Vol. 55; no. RR – 11, August 4, 2006.

Chen M, Fairley C, Guingand D, Hocking J, Tabrizi S, Wallace E, et al. Screening pregnant women for Chlamydia: what are the predictors of infection? Sex Transm Inf. 2009; 85:31-35.

Chin J. El control de las infecciones transmisibles. OPS. Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública. 17 edición. Publicación Científica y Técnica No. 581. 2000.

Colbourn TE, Assenburg C, Bojke L, et al: Preventive strategies for group B streptococcal and other bacterial infections in early infancy: cost effectiveness and value of information analyses. BMJ 2007 Sep 29; 335 (7621): 622-3.

Cunningham G, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Gilstrap L, Wenstrom K. Obstetricia de Williams. Edición No. 22. Editorial Mc Graw Hill. México. 2006.

Deluca G, Alonso J, Marín H, Schelover E, Vicente L. Epidemiología molecular de *Chlamydia trachomatis* en las provincias de Chaco y Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas. 2005.

Díaz G, Díaz E, Ramírez J. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en el cérvix de pacientes embarazadas en control prenatal. Revista de Ginecología y Obstetricia. México. 1997;65(2):48-51.

Díaz R, Nieves B, Vegas L. Colonización vaginoanorrectal por *Streptococcus del grupo B* en mujeres embarazadas con complicaciones Gineco-obstétricas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2002; 22: 23 – 26.

Díaz T, Nieves B. Comparación de medios de cultivos y procedimientos para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. Rev Chil Infect. 2008; 25 (2): 108-113.

Fargason C, Peralta M, Rouse D, Cutter G, Goldenberg R. El costo pediátrico de las estrategias para minimizar el riesgo de enfermedad por Estreptococo del grupo B de inicio temprano. University of Alabama. Obstetrics & Gynecology 1997; 90:347-352.

Fernandez J, Sanchez J, Fersi J, Gomez E, Serulle Y, Demorizi J. et al. Prevalencia de *Estreptococo grupo B* (EGB) en embarazadas dominicanas. Revista Panamericana de Infectología. 2006; 8: 1.

Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico. Undécima edición. Ed. Panamericana. Argentina. 2002.

Frontela M, Amores I, Yepe S, Kourí V, Ferreira R, Mallea L. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudado endocervical por la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cubana Endocrinol. 2002; 13(2):135-43.

Gabbe S, Niebyl J, Simpson J. Obstetricia normalidad y complicaciones en el embarazo. Ed. 1ª. Editorial Marbán. España. 2000.

Gallagher R, Fuller C. J Am Acad Nurse Pract 1994 Aug;6(8):357-61.

García P, Benavente F, Melo A, Roa I, Roa J. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. Revista Española de Patología. 2006; 39(3): 175-179.

Gaydos Ch, Howell R, Pare B, Clark K, Ellis D, Hendrix R, Gaydos J, McKee K, Quinn T. *Chlamydia. Trachomatis*, Infections in female military recruits. N Engl J Med. 1998; 339: 739-744.

Geraats-Peters G, Brouwers M, Schneeberger P, Van der Zanden A, Bruisten S, Weers-Pothoff G, et al. Specific and sensitive detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 5653–5659.

González Pedraza A, Ortiz Zaragoza M, Madrigal de León H, Corzo Coello M, Flores Huitrón P. Colonización por *Streptococcus grupo B* en mujeres embarazadas de un

centro de atención primaria de la Ciudad de México, Archivos de Medicina Familiar. 2004; 6 (2): 44-47.

Greer C, Wheeler C, Manos M. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Genomes Research. 1994; 3: S113-S122.

Gregor Mc, French JI. Chlamydia trachomatis infection during pregnancy. American Journal of Obstet - Gynecol. 1991;164: 1782-1789.

Guerra F. Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociados a la infección por Chlamydia trachomatis en mujeres infértiles. Salud Pública Mex 2003;45 supl 5:S672-S680.

Heredia R, Vargas CI. Infección por *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* y *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres embarazadas. Rev. Biomed INS. 1989; 9 (1 y 2): 25-28. Disponible en:
http://prematuros.cl/webfebrero06/guiasserena/infecciones_bacterianas.htm

Huger W, Schuchat A, Gibbs R, Sweet R, Larsen W. Prevention of perinatal *group B streptococcal* infection: Current controversies. Obstet Gynecol. 2000; 96 (1): 141-145.

Iglesias Benavides J, Saldívar Rodríguez D, Tijerina Menchaca R. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*: prevalencia y relación con los datos clínicos de vaginitis. Medicina Universitaria. 2007; 9(35): 53-57.

Jaton K, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. Journal of Medical Microbiology. 2006; 55: 1667-1674.

Jephcott AE. Microbiological diagnosis of gonorrhoea. Genitourinary Medicine. 1997; 73:245-52.

Koneman Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Sexta edición. Buenos Aires. Edt Panamericana; 2008.

Lambrou N, Morse A, Wallach E. Johns H. Ginecología y Obstetricia. Edición 1a. Ed. Marbán. España. 2001.

Lan J, Melgers I, Meijer C, Walboomers J, Roosendaal R, Burger C, Bleker O, Van Den Brule D. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia Trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33: 3194-3197.

Low N, Egger M. What should we do about screening for genital *Chlamydia*? (editorial). Int. J. Epidemiol. 2002; 31: 891-893.

Luján J, de Oñate WA, Delva W, Claeys P, Sambola F, et al. Prevalence of sexually transmitted infections in women attending antenatal care in Tete province, Mozambique. South African Medical Journal. 2008; 98: 49 - 51.

Macfadyen CA, Acuin JM, Gamble C. Tratamiento con antibióticos sistémicos versus tópicos para la secreción ótica crónica con perforación timpánica subyacente. *La Biblioteca Cochrane Plus*. 2008; 2.

Marrazzo J M, Johnson R, Green T A, Stamm W E, Schachter J, Bolan G, et al. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification test and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 577-84.

Martin D, Cammarata C, Van Der Pol B, Jones R, Quinn T, Gaydos Ch, et al. Multicenter evaluation of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG, Tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(10): 3544 – 3549.

Martínez A. Diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis*: Estado actual de un problema. *Revista chilena de Infectología*. 2001; 18: 4.

Medina M, Hidalgo L, Moya W, Calle A, Terán E, Chedraui P. Identificación molecular de infección endocervical por *Chlamydia Trachomatis* en gestantes en riesgo de parto pretérmino. *Revista Médica. Junta de Beneficencia de Guayaquil*. 2008; 13: 4.

Mirshahabi H, Meshkat Z, Soleimanzahi H, Mohamad Z, Meshkat M. Different DNA Extraction Methods for Paraffin-Embedded Pathological Samples. *Iranian Journal of Pathology*. 2007; 2(4): 159-164.

Morré S A, Ossewaarde J M, Lan J, Van Doornum J M, Walboomers J M, Maclaren D M, et al. Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveals variants and serovars Ba, G y J as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 345-51.

Mullick S, Watson-Jones D, Beksinska M, Mabey D: Sexually transmitted infections in pregnancy: prevalence, impact on pregnancy outcomes, and approach to treatment in developing countries. *Sex Transm Infect* 2005, 81:294-302.

OPS. Guías para el tratamiento de las Infecciones de Transmisión sexual. Washington, D.C. EUA. OPS. 2004.

Ortiz T, Obregón M, Jara J, Díaz J, Cortez L, Guerra A. Colonización vaginal y anorrectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. *Revista Médica Herediana*. 2004; 15 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe>

Ovalle A, Gómez R, Martínez A, Aspillaga C, Dolz S. Infección vaginal y tratamiento del *Streptococcus* Grupo B en embarazadas con factores universales de riesgo de infección. Resultados Neonatales y factores de riesgo de Infección neonatal. *Revista Chilena Obstet Ginecol*. 2002; 67(6): 467-475.

Over M, Piot P: HIV infection and sexually transmitted diseases. In *Disease control priorities in developing countries* Edited by: Jamison DT, Mosley WH, Measham AR, Bobadilla JS. Oxford University Press; 1993:455-527.

Pájaro M, Barberis I, Godino S, Pascual L, Agüero M. Epidemiology of sexually transmitted diseases in Río Cuarto, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2001; 43: 157 – 160.

Parry S, Strauss J. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med*. 1998; 338: 663.

Peña A. Infecciones bacterianas en el recién nacido. Guías de diagnóstico y tratamiento en Neonatología. 2006. Disponible en:
http://prematuros.cl/webfebrero06/guiasserena/infecciones_bacterianas.htm

Portilla J, Valverde A, Romero S, Suárez M, Aliaga R, Alfaro P, et al. Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en gestantes atendidas en el instituto materno perinatal de Lima – Perú, 1997-1998. *Rev Med Exp*. 1999; 15: 25-27.

Rampersad J, Wang X, Gayadeen H, Ramsewak S, Ammons D. In-house polymerase chain reaction for affordable and sustainable *Chlamydia trachomatis* detection in Trinidad and Tobago. *Rev Pan Am Journal Public Health*. 2007; 22(5): 317 – 322.

Regan J, Chao S, James L. Premature rupture membranes, preterm delivery, and *group B streptococcal* colonization of mother. *Am Journal of Obstet Gynecol*. 1981; 141: 184-186.

Roche. High pure PCR Template preparation kit – Isolation of nucleic acids from bacteria or yeast. 2008.

Roche. LightMix for the detection of *Chlamydia trachomatis*. 2007.

Roche. LightMix for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. 2008.

Romoren M, Sundby J, Velauthapillai M, Rahman M, Klouman E, Hjortdahl P. *Chlamydia and gonorrhoea* in pregnant Batswana women: Time to discard the syndromic approach?. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 27: 1471.

Salcedo S. Recién nacido y riesgo obstétrico de infección. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. 2003. Disponible en:
www.aeped.es/protocolos/neonatologia/riesgos

Sánchez Monroy V, Torres Mata A, Villalba Magdaleno J. Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Revista de Ginecología y Obstetricia*. México. 2009;77(1):13-18.

Sayahtaheri S, Dryja D. Detection of *group B Streptococcus*: Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994; 18: 141-4.

Schabereiter-Gurtne C, Hufnagl P, Sonvilla G, Selitsch B, Rotter M, Makristathis A, and Hirschl A. Evaluation of a novel internally controlled real-time PCR assay

targeting the 16S rRNA gene for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14: 1 – 7.

Schachter J, Grossman M, Sweet RL, Jane Holt: Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis*. *JAMA* 1986; 255: 33374-77.

Scholes D, Stergachis A, Heidrich E, Andrilla H, Holmes K, Stamm W E. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection. *New Engl J Med*. 1996; 334: 1362-1366.

SEGO, SEN, SEIMC, SEQ, SEMFYC. Prevención de la infección perinatal por *Streptococo del grupo B*. Recomendaciones españolas revisadas. *Enfermedades Infecciosas – Microbiología Clínica*. 2003; 21(8):417-423.

Servaas A, Munk M, Persson K, Krüger-Kjaer S, Van Dijk K, Meijer C, Van Den Brule. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 584–587.

Smith JR, Taylor-Robinson D: Infection due to *Chlamydia trachomatis* in pregnancy and the newborn. *Baillier Clin Obstet Gynecol*. 1993; 7: 237-555.

Stamm E. Chlamydia trachomatis infections: Progress and problems. *J Infect Dis*. 1999; 179 (Suppl 2): S380-3.

Tamariz Ortiz J, Obregón Calero M, Jara Aguirre J, Díaz Herrera J, Jefferson Cortez L, Guerra Allison H. Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. *Rev Med Hered*. 2004; 15 (3): 145.

Valdés E, Juárez G, Almendra H, Caballero R. *Chlamydia Trachomatis*: Transmisión vertical con membranas íntegras. Caso clínico. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*. 2002; 67: 1.

Valdés E, Pastene C, Garau M, Catalán J, Candia P, Juárez G, et al. Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* (grupo B) en el tercer trimestre de embarazo. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2003; 68: 305-308.

Valdés E, Pastene C, Morales A, Gutiérrez B, Canales A, Martínez P, et al. Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) durante el embarazo pesquisado en medio de cultivo selectivo. *Revista Chilena Obstétrica – Ginecológica*. 2004; 69 (2): 132 – 135.

Valkengoed V, Postma I, Morre S, Van Den Brule A, Meijer C, Bouter L, Boeke A. Cost effectiveness analysis of a population based screening programme for asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections in women by means of home obtained urine specimens. *Sex. Transm. Infect*. 2001; 77: 276–282.

Vázquez F, Aznar J, Blanco M, Lepe J, Otero L. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2007.

Vuylsteke B, Laga M, Alary M. Clinical algorithms for the screening of women for gonococcal and chlamydial infection: evaluation of pregnant women and prostitutes in Zaire. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 82-8.

Washington A, Johnson R, Sanders L. *Chlamydia trachomatis* infections in the United States. What are they costing us? *JAMA* 1987; 257: 2070-2072.

Watson E, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, et al. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 1021–1031.

Whiley D, Tapsall J, Sloots T. Review: Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae* an Ongoing Challenge. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2006; 8: 2353 – 2360.

WHO: Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva. 2003 [http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546263.pdf] Disponible en: www.aeped.es/protocolos/neonatologia/riesgos.

Zurita J. Recolección y transporte de muestras en Microbiología Clínica. Ecuador: Organización Panamericana de la Salud; 2004.

17. ANEXOS DE LA INVESTIGACIÓN:

ANEXO No. 1 – CONSENTIMIENTO INFORMADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA EN MENCIÓN CLÍNICA
Hospital “San Vicente de Paúl” – Ibarra**

Proyecto “Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008”

Dr. Oswaldo Rodríguez Mora (Pontificia Universidad Católica del Ecuador)

Dra. Bertha Estrella (Corporación Ecuatoriana de Biotecnología)

Dra. Lenis Ortiz G. y Dr. Vladimir Bazante (Hospital San Vicente de Paúl)

El investigador:

Señora: Muchas mujeres pueden tener enfermedades en su cuello uterino y/o vagina y no haber presentado molestia alguna, sin embargo la falta de tratamiento puede causar problemas en usted y ocasionar graves infecciones en su hijo al momento del nacimiento. Para poder saber si tuvo o tiene estas enfermedades se requieren de pruebas especiales, para lo cual es necesario que el médico tome muestras de sangre y de la secreción del cuello uterino, de la vagina y ano. Estas muestras serán estudiadas después con procedimientos especiales de laboratorio. En caso de que alguna de sus muestras resulte **positiva** para alguno de los microbios buscados, el resultado será entregado a su médico tratante para que usted reciba el tratamiento oportuno y específico.

Invitación:

Es posible que usted tenga una infección por alguno de los microbios y que no haya presentado síntomas o que hayan pasado por desapercibido; pero que hoy pueden causar daños en usted o en su hijo. Para conocer si es así le invitamos a participar en un proyecto de investigación para determinar la presencia de estas bacterias que pueden causarle daño a usted y a su hijo.

Que se le solicita que usted haga:

Si es que usted voluntariamente decide participar, usted deberá autorizarnos tomar una muestra de sangre en cantidad de una cuchara y varias muestras cervicales/ vaginales y anales, para que sean sometidas a un proceso de diagnóstico especial que permita identificar el microbio que puede estar infectando a su cuello uterino y/o vagina. Su participación en la investigación no implica gastar su tiempo más que el necesario para el examen diagnóstico habitual.

Riesgos:

- El examen de su cuello uterino no es doloroso pero algunas veces puede haber un pequeño sangrado; sin embargo no existe riesgo durante este procedimiento para usted y para su hijo.
- El pinchazo para la toma de la muestra de sangre podría causar un poco de dolor y/o un pequeño hematoma.

Beneficios:

- Es posible que esta investigación determine la presencia de uno o varios microbios causantes de problemas en su organismo y potenciales complicaciones para su hijo.
- Su participación en este estudio, podría ofrecerle mejores posibilidades de tener un diagnóstico rápido y oportuno y así evitar problemas para usted y su hijo al momento del nacimiento.
- Si estas bacterias están presentes, los médicos le indicarán un tratamiento para combatirla y evitar graves secuelas para usted y su hijo.
- Esta investigación podría ayudarnos a tener un mejor conocimiento de la frecuencia de microbios que causan daños en los neonatos de las madres gestantes infectadas de la provincia de Imbabura.

Costos:

Todos los exámenes especiales que se le van a realizar, para ver si usted está infectada con algún microbio, NO tienen costo alguno para usted.

Confidencialidad:

Su nombre será manejado confidencialmente. Un número de código será usado a partir de este momento para proteger su identidad. Los datos obtenidos de esta investigación serán mantenidos bajo llave, en la oficina del investigador.

Voluntario:

Su participación es absolutamente voluntaria.

Paciente:

Yo _____ he leído (escuchado) con atención los exámenes que se realizarán en mi sangre, cuerpo (vagina/ano), para conocer si estoy infectada o no por microbios capaces de causarme daño a mi o a mi hijo. Durante el examen se tomarán unas pequeñas muestras en las cuales se realizarán pruebas especiales para determinar la presencia de estos microbios. Si estas bacterias están presentes los investigadores comunicaran a mi medico tratante los resultados y se me indicará un tratamiento para combatirla y que no afecte a mi hijo.

Yo autorizo libremente que se realicen los procedimientos indicados. También me siento libre de seguir o no las indicaciones o tratamientos que se establezcan. Mi firma (huella) abajo indica que he leído y entendido toda la información arriba explicada.

Firma del paciente CC:	Fecha
Firma del testigo CC:	Fecha
Teléfono del paciente	Dirección del paciente

En caso de dudas comunicarse con los investigadores, Dr. Bazante telf # 062608262 o Dra. Ortiz teléfonos: 062907526 ó Cel: 096002239, o Dr. Rodríguez 08-497-1491.

H.CI:	Médico:
CODIGO DE LA PACIENTE:	

ANEXO No. 2 - FORMULARIO DE ENROLAMIENTO DE LAS PACIENTES

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA EN MENCIÓN CLÍNICA
Hospital "San Vicente de Paúl" - Ibarra**

Proyecto "Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008"

FORMULARIO DE ENROLAMIENTO

CUMPLIMIENTO

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Edad gestacional de 34 a 38,6 semanas
- 2.- Aceptación de participar en el estudio (consentimiento informado)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Tratamiento local o sistémico con antibióticos
- 2.- Labor de parto y/o Ruptura prematura de membranas
- 3.- Sangrado genital

SI	NO
SI	NO

Paciente enrolado
 NÚMERO DE
 IDENTIFICACIÓN

SI	NO

ANEXO No. 3 - FORMULARIO DE FACTORES DE RIESGO DE LAS PACIENTES

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
 MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA EN MENCIÓN CLÍNICA
 Hospital “San Vicente de Paúl” - Ibarra**

Proyecto: “Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008”

Ciudad y fecha de nacimiento:
 Edad.....

Código

--	--	--	--

Información Demográfica:

A que raza pertenece?

1. Mestizo	
2. Indígena	
3. Negro	
4. Otro:	

Cuál es el lugar de origen de:

Padre	Madre
Abuelo paterno	Abuelo materno
Abuela paterno	Abuela materna

Instrucción:

Ultimo Grado completado:

Primaria	
----------	--

Secundaria	
------------	--

Superior	
----------	--

Con quién vive:

Padre	Madre	Esposo	Hijos	P. adoptivos	Sin hogar	Solo

Usted trabaja:

SI		NO	
----	--	----	--

Permanente	
Ocasional	
Quehaceres domésticos	

Antecedentes personales:

Cual fue la última fecha de su menstruación (día/mes/año):

--	--	--

Cuántas semanas de gestación tiene?	Semanas	Días
Por ecografía		
Por fecha de la última menstruación		

Número de controles que ha tenido en el embarazo	
--	--

#embarazos		Partos		Abortos		Cesáreas	
------------	--	--------	--	---------	--	----------	--

Fecha de su último Pap-Test	
Resultado	
Tratamiento	

Edad de inicio de la primera relación sexual	
Número de parejas sexuales	

Información de su pareja sexual:

Su pareja tuvo o tiene otras parejas sexuales

SI		NO		Confundido		No sabe	
----	--	----	--	------------	--	---------	--

Su pareja ha tenido alguno de estos síntomas:	SI	NO
Secreción uretral		
Problemas urinarios – Disuria		
Ha visto alguna úlcera o llaga en el área de los genitales		
Otro		

Su pareja ha tenido alguna enfermedad de transmisión sexual: SI..... NO.....

Recibió tratamiento		
Hace cuanto tiempo		
Sabe que enfermedad tuvo		

Manifestación clínica:

Usted en este momento tiene: SI NO

1. Secreción vaginal		
Picazón		
Mal olor		
Ardor		
2. Ardor al orinar		
3. Dolor abdominal bajo leve		

Se ha realizado exámenes de control prenatal:

Examen	SI	NO
VIH		
VDRL		
Se confirmó el VDRL (En caso que haya resultado positivo)		
Secreción vaginal		

Al momento de la toma de la muestra la paciente presenta:

SIGNOS FISICOS:	SI	NO
Temperatura bucal > 37,5°C		
Tatuajes #		
Cambios cervicales:		
Laceraciones		
Quistes de Naboth		
Tumoraciones		
Cambios vaginales:		

Secreción purulenta		
Secreción blanquecina		
Mal olor		
Condilomas		

ANEXO No. 4 - PRUEBA DE CAMP

(Koneman, 2008)

Materiales:

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC
- Caja de agar sangre de cordero
- Control de calidad:
- Control positivo: estreptococo del grupo B.
- Control negativo: estreptococo del grupo A.

Procedimiento:

- En el centro de la caja de petri con agar sangre de cordero hacer una sola estría recta con *S. aureus* productora de β -hemolisina.
- Hacer una estría con los estreptococos β -hemolíticos por identificar sin tocar la estría del estafilococo con una longitud de 3-4 cm.
- En la misma placa deben sembrarse de igual manera cepas conocidas de estreptococos del grupo A y del grupo B como controles negativo y positivo respectivamente.
- Incubar la caja a 35oC en aerobiosis durante 18-24 horas

Interpretación:

La zona de aumento de hemólisis se observa en el punto donde se intersecan la β -hemolisina secretada por el estafilococo y el factor de CAMP secretado por el estreptococo del grupo B. (Koneman 2008)

**ANEXO No. 5 - PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN LÁTEX
PARA IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae***

(BioMérieux, 2008)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras a identificar, deben sembrarse en agar sangre e incubarse a 37°C, 18 – 24 horas. Observar la hemólisis de las colonias sospechosas.

Es recomendable realizar una tinción de Gram y una prueba de catalasa para confirmar la presencia de cocos Gram- positivos, catalasa – negativos. Para más detalles, acudir a los libros de consulta.

Para cada muestra que se vaya a estudiar:

1. Reconstituir la enzima de extracción con 10 ml de agua destilada estéril.
2. Transferir 0,4 ml de enzima de extracción en un tubo de ensayo.
3. Del medio sólido escoger 3 a 5 colonias características de acuerdo al tamaño y emulsionarlos en 0,4 ml de la enzima de extracción.
4. Homogeneizar en un mezclador tipo vórtex e incubar en la estufa durante 10 minutos a 37 °C. El extracto de antígeno está listo para el ensayo.

Identificación:

1. Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente al menos 10 minutos antes de su uso.
2. Resuspender los reactivos de látex. Eliminar las burbujas retenidas en el cuentagotas.
3. Registrar la referencia de la cepa sobre una tarjeta (fuera de los pocillos de reacción)
4. Agitar bien las suspensiones de látex
5. Depositar 1 gota de cada reactivo de látex en los pocillos de reacción de la tarjeta. Cuidar que los frascos cuentagotas estén en posición vertical durante la distribución de las gotas.
6. Distribuir 15 ul de extracto al lado de cada gota de látex.
7. Mediante un bastoncillo, mezclar las 2 gotas y extenderlas sobre toda la superficie del pocillo.
8. Realizar cuidadosamente un ligero movimiento de rotación con la tarjeta durante 2 minutos como máximo y leer la reacción bajo iluminación normal sin emplear una lupa.

Lectura e Interpretación de los resultados.

Un resultado positivo se manifiesta por la aparición de una aglutinación visible con un reactivo de látex en menos de 2 minutos.

Un resultado negativo viene indicado por la ausencia de aglutinación: suspensión homogénea o granulación muy fina en 2 minutos.

La reacción es ininterpretable cuando se observa la aglutinación en varias de las suspensiones de látex. Esto puede corresponder a una cepa poliaglutinante o a una mezcla de las cepas. En este caso, realizar de nuevo el aislamiento y la prueba, o llevar la identificación mediante pruebas bioquímicas.

Un resultado es no-identificable si no se observa ninguna aglutinación en ninguno de los reactivos de látex.

ANEXO No. 6 – TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA

High pure PCR Template preparation kit – Isolation of nucleic acids from bacteria or yeast (Roche, 2008).

Antes de empezar la reacción de purificación colocar el buffer de elución a 70°C:

1. En un tubo eppendorf estéril de 1.5ml:
 - Colocar 200µl de la muestra.
 - Colocar 200µl del buffer binding (vinculante).
 - Colocar 40µl de Proteinasa K (reconstituido).
 - Mezclar inmediatamente e incubar a 70°C por 10 min.
2. Colocar 100µl de Isopropanol y mezclar bien.
3. Insertar un tubo con filtro en un tubo de colección.

- Pipetear el material dentro del tubo con filtro
 - Colocar los tubos ensamblados en la centrifuga.
 - Centrifugar 1min a 8.000x g.
4. Proceder al lavado y elución.
 5. Después de centrifugar:
 - Descartar el tubo de colección del tubo con filtro y descartar el tubo de colección con el sobrenadante.
 - Colocar el tubo con filtro en un tubo de colección nuevo.
 - Colocar 500µl de Inhibidor Removal Buffer en el tubo con filtro.
 - Centrifugar 1 min a 8.000 x g.
 6. Retirar el tubo con filtro y descartar el tubo de colección con el sobrenadante.
 - Coloque el tubo con filtro en un tubo de colección nuevo.
 - Colocar 500µl de wash buffer en el tubo con filtro.
 - Centrifugar por 1 min a 8.000 x g.
 7. Repetir el paso 6.
 8. Después de desechar el sobrenadante :
 - Centrifugar los tubos ensamblados por 10seg a toda velocidad.
La centrifugación extra remueve los residuos del buffer de lavado.
 9. Para eluir el DNA:
 - Insertar el tubo con filtro en un tubo eppendorf estéril de 1.5ml.
 - Colocar 200µl del buffer precalentado de Elution Buffer en el tubo con filtro.
 - Centrifugar por 1 min a 8.000 x g.
 10. El tubo eppendorf contiene el DNA eludido.
 11. Se puede utilizar el DNA directamente o almacenarlo a 2-8°C o -15 a -25°C para un posterior análisis

ANEXO No. 7 - CUANTIFICACIÓN DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

(Surzycky, 2000).

1. Preparar 2 tubos con 3 ml de agua grado biología molecular y adicionar al primero 5µl de agua y el segundo adicionar 5 µl de la muestra de ADN.
2. Colocar en el espectrofotómetro y leer a 260 y 280nm. Una unidad a A260 es igual a 50ng de DNA por ml de muestra.
3. Con los valores observados de las absorvancias realizar una relación entre el valor obtenido a 260 y 280nm.
4. Para saber la calidad de DNA se debe dividir el valor obtenido a 260nm para el valor obtenido a 280nm, el valor que resulta de esta división denota la calidad del ADN.
5. Un valor de 1.5 es considerado de muy buena calidad.
6. Para saber la concentración de DNA que tiene la muestra estudiada se utilizó la siguiente fórmula:

$$N(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = 70A_{260} - 40A_{280} \text{ (Surzycky, 2000)}$$

ANEXO No. 8 - CONTROL DE EXTRACCIÓN DE DNA, AMPLIFICACIÓN DE DNA DE β - GLOBINA (PCR convencional)

(Greer et al, 1994; Mirshahabi et al, 2007; García et al, 2006)

En un tubo eppendorf de 1.5ml se adicionó:

Reactivo	Concentración inicial	Vol. 1X (μl)	Concentración final	Vol. X
GoTaq® Green Master Mix	Taq, 3mM MgCl ₂ , 400 μM dNTPs c/u	12.5	1U Taq, 1.5Mm MgCl ₂ , 200 μM dNTPs c/u	
Primer 1	10 μM	1		
Primer 2	10 μM	1		
Agua BM		5.5		
ADN		5		

		Vol. final 25µl		
--	--	----------------------------	--	--

1. Si se va a realizar más de una reacción hay que preparar una mix primero sin colocar el ADN. Después reparta la mix en cada tubo de 0.2ml. Adicione el ADN a cada tubo de 0.2ml.
2. Cargue las muestras en el termociclador y corra el programa.

Una vez terminado el programa en el termociclador se guardaron las muestras a -20°C hasta su posterior análisis.

ANEXO No. 9 – TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN DE DNA DE *Neisseria gonorrhoeae*

LightMix® para detección de *Neisseria gonorrhoeae* (Roche, 2008)

El kit de qPCR ROCHE contiene:

1. 6 viales de Premix, primers liofilizados, y pruebas de hibridación para 16 reacciones.
2. Viales con control interno positivo
3. Viales con 6 estándares de diferente concentración (10^1 a 10^6)

- **PREPARACION DE LOS REACTIVOS:**

1.- **PREPARACION DEL REACTIVO MIX (PARAMETER-SPECIFIC 16 Reacciones)**

- Reactivo a) 1 vial de reactivo (color azul) contiene los primers y pruebas para 16 corridas del LightCycler®.
- Reactivo b) El vial (color rojo) contiene el blanco para el control interno.
- Para reconstituir el control interno positivo añadimos 80 µl de agua grado biología molecular al reactivo b y mezclamos por inversión.

- De esta última solución transferimos 66 ul al reactivo a y mezclamos por inversión.

Nota: Esta solución es estable por tres días a 4 oC.

2.- PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

El kit contiene 6 concentraciones diferentes de estándares, que deben ser reconstituidos con 40 uL de agua pura calidad biología molecular. Estos deben usarse comenzando por la concentración más baja.

Nota: Esta solución no es estable por mucho tiempo y puede perder su sensibilidad. Usar solamente soluciones recién preparadas.

3.- PREPARACIÓN DEL MASTERMIX LIGHTCYCLER®

En un tubo colectar la reacción mix, para calcular se multiplica el volumen/reacción/número de reacciones/ciclos + una reacción adicional.

La reacción Mix contiene:

15 uL mix { 7,0 uL de agua (pura)
4,0 uL del reactivo mix
4,0 uL de FastStart mix

Transferir 15 uL de mastermix por capilaridad al LightCycler®

Añadir 5 uL de muestra o estándar, para obtener un volumen final de 20 uL

Iniciar la corrida.

- PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

- Denaturación de la muestra y activación enzimática
- Amplificación del DNA
- Curva para identificación de Neisseria gonorrhoeae derivada del producto de la PCR
- Instrumento en cooling

Programación:

Programa	Denaturación	Ciclos			Identificación			Cooling
Parámetro								
Modo de análisis	Ninguno	Cuantificación			Curvas de medida			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
Segmento	1	1	2	3	1	2	3	1
Temperatura (°C)	95	95	62 - 58	72	95	40	85	40
Tiempo (hh:mm:ss)	0:10:00	0:00:05	0:00:10	0:00:15	0:00:20	0:00:20	0:00:00	0:00:30
Proporción °C/sg	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Modo	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Continuo	Ninguno

Nota.- Para el segmento 2 del ciclo 2 se necesita: una temperatura inicial de alineamiento de 62°C durante 10 segundos, con una parada de 20°C por sg. La temperatura de alineamiento final 58°C, con una disminución de 4°C.

- ANALISIS DE DATOS.-
 1. Los datos son analizados con un Software, que permite la graficación de curvas, en relación con los estándares utilizados y con los controles tanto positivo como negativo.
 2. El número de ciclos para el punto de corte de cada muestra se calcula automáticamente.
 3. El canal para NG es 640 y forma una curva en los productos positivos de amplificación.
 4. El control negativo no da señal
 5. Cuando se usa controles internos positivos, los datos se observan en el canal 640.
 6. La cuantificación de los controles internos se hace a través del canal 705
 7. Los controles negativos y las bajas concentraciones de NG en las muestras (10 a 1000 copias) son amplificadas en las curvas del control interno positivo en aproximadamente 30 ciclos.

ANEXO No. 10 – TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Chlamydia trachomatis*

LightMix® para detección de *Chlamydia trachomatis* (Roche, 2007)

El kit de qPCR ROCHE contiene:

1. 6 viales de Premix, primers liofilizados, y pruebas de hibridación para 16 reacciones.
2. Viales con control interno positivo
3. Viales con 6 estándares de diferente concentración (10^1 a 10^6)

- PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

1.- PREPARACION DEL REACTIVO MIX (PARAMETER-SPECIFIC 16 Reacciones):

- Reactivo a) 1 vial de reactivo (color verde) contiene los primers y pruebas para 16 corridas del LightCycler®.
- Reactivo b) 1 vial de reactivo (color blanco) contiene los primers, pruebas y DNA para 16 corridas del control interno del LightCycler® (IPC)
- Para reconstituir los viales añadir 66 uL de agua grado biología molecular, en cada uno y mezclar por inversión.

Nota: Esta solución es estable por tres días a 4°C.

2.- PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

El kit contiene 6 concentraciones diferentes de estándares, que deben ser reconstituidos con 40 uL de agua pura calidad biología molecular. Estos deben usarse comenzando por la concentración más baja.

Nota: Esta solución no es estable por mucho tiempo y puede perder su sensibilidad. Usar solamente soluciones recién preparadas.

3.- PREPARACIÓN DEL MASTERMIX LIGHTCYCLER®

En un tubo colectar la reacción mix, para calcular se multiplica el volumen/reacción/número de reacciones/ciclos + una reacción adicional.

La reacción Mix contiene:

15 uL mix	{	3,0 uL de agua (pura)
		4,0 uL del reactivo mix
		4,0 uL de IPC mix
		4,0 uL de FastStart mix

Transferir 15 uL de mastermix por capilaridad al LightCycler®

Añadir 5 uL de muestra o estándar, para obtener un volumen final de 20 uL

Iniciar la corrida.

4. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

- v. Denaturación de la muestra y activación enzimática
- vi. Amplificación del DNA
- vii. Curva para identificación de *Chlamydia trachomatis* derivada del producto de la PCR
- viii. Instrumento en cooling

Programación:

Programa	Denaturación	Ciclos			Identificación			Cooling
Parámetro								
Modo de análisis	Ninguno	Cuantificación			Curvas de medida			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
Segmento	1	1	2	3	1	2	3	1
Temperatura (°C)	95	95	62 – 58	72	95	40	85	40
Tiempo (hh:mm:ss)	0:10:00	0:00:05	0:00:10	0:00:15	0:00:20	0:00:20	0:00:00	0:00:30
Proporción °C/sg	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Modo	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Continuo	Ninguno

Nota.- Para el segmento 2 del ciclo 2 se necesita: una temperatura inicial de alineamiento de 62°C durante 10 segundos, con una parada de 20°C por sg. La temperatura de alineamiento final 58°C, con una disminución de 4°C.

5. ANALISIS DE DATOS.-

- Los datos son analizados con un Software, que permite la graficación de curvas, en relación con los estándares utilizados y con los controles tanto positivo como negativo.
 - El número de ciclos para el punto de corte de cada muestra se calcula automáticamente.
 - El canal para CT es 640 y forma una curva en los productos positivos de amplificación.
 - El control negativo no da señal
 - Cuando se usa controles internos positivos, los datos cuantifican en el canal 705
8. Los controles negativos y las bajas concentraciones de CT en las muestras (10 a 1000 copias) son amplificadas en las curvas del control interno positivo en aproximadamente 30 ciclos.

ANEXO No. 11 - CONTROL DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

LABORATORIO				
CONTROL DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS				
MES	JULIO	2008		
DIA	HORA	TEMPERATURA	CONTROLADA POR	MEDIDA CORRECTIVA
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				

14				
15				
16				
17				
18				
19				

ANEXO No. 12 - REGISTRO PARA EL CONTROL DE TEMPERATURA DE ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS

LABORATORIO					
CONTROL DE TEMPERATURA PARA ENVIO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS					
MES	JULIO	2008			
DIA	HORA DE ENVÍO	TEMPERATURA °C	HORA DE RECEPCIÓN	TEMPERATURA °C	CONTROLADA POR
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					

14					
15					

ANEXO No. 13 - REGISTRO PARA EL CONTROL DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

LABORATORIO				
CONTROL DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS				
MES	JULIO	2008		
DIA	HORA	TEMPERATURA	CONTROLADA POR	MEDIDA CORRECTIVA
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				

ANEXO No. 14 - REGISTRO DE RESULTADOS DEL CULTIVO Y DE LA qPCR

FECHA	COD.	CULTIVO				Estrepto latex B		qPCR	qPCR
		Catalasa	Hemólisis	Gram	Camp	Vaginal	Rectal	Chlamydia	Neisseria
13/08/2008	C001	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
13/08/2008	C002	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
13/08/2008	C003	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
13/08/2008	C004	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
14/08/2008	C005	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
14/08/2008	C006	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
14/08/2008	C007	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
15/08/2008	C008	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
18/08/2008	C009	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	POSITIVO	negativo
21/08/2008	C010	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	POSITIVO	negativo
21/08/2008	C011	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
21/08/2008	C012	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
21/08/2008	C013	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
25/08/2008	C014	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
25/08/2008	C015	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
26/08/2008	C016	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	POSITIVO	negativo
26/08/2008	C017	negativa	beta	cocos +	positiva	positivo	negativa	negativo	negativo
26/08/2008	C018	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C019	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C020	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C021	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C022	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C023	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
27/08/2008	C024	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
28/08/2008	C025	negativa	beta	cocos +	positiva	positivo	negativa	negativo	negativo
28/08/2008	C026	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo

28/08/2008	C027	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	POSITIVO	negativo
28/08/2008	C028	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
28/08/2008	C029	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
01/09/2008	C030	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
03/09/2008	C031	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
04/09/2008	C032	negativa	beta	cocos +	positiva	positivo	positiva	negativo	negativo
04/09/2008	C033	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
04/09/2008	C034	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
04/09/2008	C035	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	POSITIVO	negativo
04/09/2008	C036	negativa	beta	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
09/09/2008	C037	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo
09/09/2008	C038	negativa	alfa	cocos +	negativa	negativa	negativa	negativo	negativo

ANEXO No. 15 - ACEPTACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL HOSPITAL “SAN VICENTE DE PAUL”

DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DE IMBABURA “HOSPITAL SAN VICENTE DE PAUL”

Teléfonos: 2950533 / 2957272 Fax: 2957276 Ap. 150
E-mail: hsvp@andinanet.net Ibarra-Ecuador



Ibarra, 10 de junio del 2008

SEÑOR DOCTOR:

JOSE ALBUJA CHAVEZ

SUBDIRECTOR MEDICO Del Hospital san Vicente de Paúl de la ciudad de Ibarra

Presente.-

Por medio del presente nos dirigimos a usted para solicitarle muy comedidamente se digne autorizar a través de la aprobación y consentimiento del Comité de Bioética del Hospital, el desarrollo del Proyecto:

“Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008” a cargo de los doctores Lenis Ortiz G. y Vladimir Bazante. Para los fines consiguientes adjuntamos una copia del mismo.

Por la atención prestada le anticipamos nuestros agradecimientos:

Atentamente:

Dr. Vladimir Bazante
Líder de Laboratorio Clínico

Dra. Lenis Ortiz
Patóloga Clínica



ANEXO No. 16 – RESULTADO DE LABORATORIO

Pontificia Universidad Católica del Ecuador



Av. 12 de Octubre y Roca
Telf: 2991727
Fax: 2991726
e-mail: diserlab@puce.edu.ec

Quito, 09 de septiembre de 2008

Paciente: XXXXXXXXXXXX
Fecha de toma de las muestras: 01/09/2008
Fecha de Entrega: 09/09/2008
Nº de Muestra: C038

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: INVESTIGACIÓN DE ESTREPTOCOCO GRUPO B

TEST	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Cultivo microbiológico para identificación de Estreptococo grupo B (<i>Strep. agalactiae</i>)	NEGATIVO	NEGATIVO

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO-MOLECULAR: INVESTIGACIÓN DE *Chlamydia trachomatis*

TEST	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Identificación de <i>Chlamydia trachomatis</i> por qPCR (Reacción en	NEGATIVO	NEGATIVO

Cadena de la polimerasa en tiempo real)		
---	--	--

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO-MOLECULAR: INVESTIGACIÓN DE *Neisseria gonorrhoeae*

TEST	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> por qPCR (Reacción en Cadena de la polimerasa en tiempo real)	NEGATIVO	NEGATIVO

Dra. Lenis Ortiz G. CMP: 9070
Directora Técnica DISerLAB-PUCE

18. ANEXOS QUE RESPALDAN LA INVESTIGACIÓN:

ANEXO No. 17 - OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE:	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INSTRUMENTO	INDICADOR
DE CONTROL				
Mujeres embarazadas	Embarazo es el periodo comprendido entre la fecundación del óvulo hasta el momento del parto	Cualitativa - dicotómicas	Por fecha de última menstruación (FUM) Por ecografía	Semanas de gestación Latido fetal, crecimiento uterino
INDEPENDIENTE				
Embarazo - tercer trimestre de gestación	Período de gestación comprendido entre la semana 25 hasta el parto	Cualitativa - categórica	Por fecha de última menstruación (FUM) Por ecografía	De 25 hasta 40 semanas. Cálculo de la edad gestacional (diámetro biparietal)
DEPENDIENTES				
<i>Chlamydiasis</i>	Enfermedad de transmisión sexual producida por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	Cualitativa - dicotómicas	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)	Presencia de curva en el canal 640
Gonorrea	Enfermedad de transmisión sexual producida por <i>Neisseria</i>	Cualitativa - dicotómicas	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en	Presencia de curva en el canal 640

	<i>gonorrhoeae</i> .		tiempo real (qPCR)	
Colonización por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Enfermedad infecciosa producida por <i>Streptococcus agalactiae</i> o SGB	Cualitativa - dicotómicas	- Por cultivo microbiológico - Pruebas serológicas	- Prueba de CAMP positiva. - Aglutinación en látex positiva

ANEXO No. 18 - CRONOGRAMA DE TRABAJO

N	Actividad	Responsable	Tiempo	CRONOGRAMA 2009											
				Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agost	Sept.	Octub	Nov			
1	Estandarización	Investigadores y colaboradores (HSVP)	Marzo a mayo												
2	Enrolamiento, consentimiento informado y recolección de muestras	Investigadores y colaboradores (HSVP)	Junio a septiembre												
3	Identificación del SGB	Investigadores	Junio a septiembre												
4	Procesamiento de qPCR para CT y NG	Investigadores y colaboradores (PUCE)	Junio a Septiembre												
5	Interpretación de la qPCR	Investigadores	Junio a Septiembre												
6	Ingreso de datos a la base	Investigadores	Junio a Septiembre												
7	Análisis de datos	Investigadores	Octubre												
8	Resultados y conclusiones	Investigadores	Octubre												
9	Presentación de Tesis	Investigadores	Noviembre												

ANEXO 19: RECURSOS DE LA INVESTIGACIÓN

19.1 RECURSOS HUMANOS:

- Toma de muestras: Dra. Lenis Ortiz y Dr. Vladimir Bazante; médicos investigadores, con la colaboración del personal de enfermería del hospital San Vicente de Paúl. Susana Terán, Auxiliar de enfermería del Subcentro de Salud No 1 de la ciudad de Ibarra.
- Procesamiento de muestras vaginales y anales para la determinación de SGB mediante cultivo microbiológico: Dr. Vladimir Bazante.
- Procesamiento de muestras endocervicales para la determinación de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real: Personal técnico de DISerLAB-PUCE: Dra. Lenis Ortiz, Ing. Cecilia Cruz y Pamela Chiriboga.
- Análisis estadístico: Dra. Bertha Estrella (Docente de la cátedra de Investigación de la Maestría de Microbiología de la PUCE)
- Dirección de tesis: Dr. Oswaldo Rodríguez (Tutor de tesis de grado)

19.2 RECURSOS FINANCIEROS:

Materiales de papelería e insumos de oficina:

RECURSOS	CANTIDAD	COSTOS EN DÓLARES
----------	----------	-------------------

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
Hojas de papel Bon	1000	3.75 x 500	7.50
Copias Xerox (Consentimiento informado)	300	0.05	15
Esferos	12	0.25	3
Lápices	12	0.20	2.40
Cuadernos	4	1.50	6
Mandiles	2	15	30
Guantes (Cajas)	4	4	16
Costo por transporte de muestras	10	3	30

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae*

RECURSOS	CANTIDAD	COSTOS EN DÓLARES	
		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
EQUIPOS			
Incubadora	1	Disponible	
Termómetro	1	Disponible	
MATERIALES:			
Hisopos estériles	300	3 x 100	9
Medios de transporte (Stuart)	300	0.80	240
Cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>	1	Disponible	
Agar sangre de cordero	300	1.25	375
Placas	300	3 x 50	18
Colorantes para tinción de GRAM	1	Disponible	
Peróxido de hidrógeno	1(litro)	10	10
Pruebas de aglutinación en látex para SGB	4 sets (50 pruebas c/u)	450	1800

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Chlamydia trachomatis* Y *Neisseria gonorrhoeae* POR qPCR ROCHE (Toma y transporte de muestras)

RECURSOS	CANTIDAD	COSTOS EN DÓLARES	
		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
MATERIALES:			
Espéculos vaginales	300	0.41	123
Hisopos de Nylon	300	0.25	75
Vial y medio de transporte – M4	300	Disponible	
Gasa estéril	3 paquetes (100 c/u)	0.05	15
Cooler (Transporte de muestras)	2	35	70

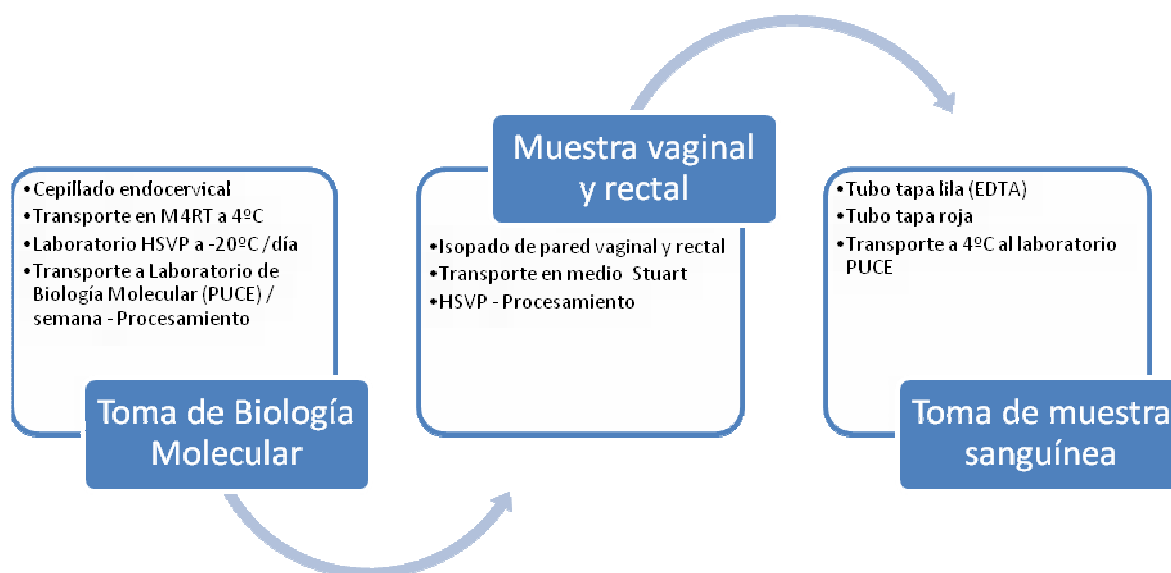
RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Chlamydia trachomatis* Y *Neisseria gonorrhoeae* POR qPCR ROCHE (Extracción de DNA)

RECURSOS	CANTIDAD	COSTOS EN DÓLARES	
		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
REACTIVOS		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
Muestras a -20 °C (En M4).		Disponible	
Desnaturalizante		Disponible	
MATERIALES:		Disponible	
Puntas de 100-1000 uL	2 fundas	30	60
Porta tubos		Disponible	
Papel toalla	10	1.25	12,50
EQUIPOS:			
Cámara de flujo laminar	1	Disponible	
Vórtex	1	Disponible	
Cronómetro	2	Disponibles	
Micropipetas	6	Disponibles	

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS PARA LA DETECCIÓN DE *Chlamydia trachomatis* Y *Neisseria gonorrhoeae* POR qPCR ROCHE

RECURSOS	CANTIDAD	COSTOS EN DÓLARES	
		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
REACTIVOS:		VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
Muestras almacenadas a – 20°C)			
2 Kits para detección de NG		Disponible	
2 Kits para detección de CT		Disponible	
MATERIALES:			
Puntas de 100 - 1000 uL	2 fundas	30	60
Puntas de 20 – 200 uL	2 fundas	30	60
Etiquetas y marcadores		1	10
Porta tubos		Disponible	
EQUIPOS			
Cronómetro	2	Disponibles	
Refrigeradora	1	Disponible	
Congeladora	1	Disponible	
Termociclador (LightCycler)	1	Disponible	
Sistema automatizado de análisis de datos	1	Disponible	

ANEXO 20: FLUJOGRAMA DE TRABAJO



ANEXO 21: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE DNA

No.	CÓDIGO	A 260	A280	A260/A280	Concentración
1	C001	0,0071	0,0032	2,21875	221,8
2	C002	0,0048	0,0031	1,548387097	127,4
3	C003	0,0023	0,0018	1,277777778	53,5
4	C004	0,0067	0,005	1,34	161,7
5	C005	0,0024	0,0017	1,411764706	60,1
6	C006	0,0246	0,0214	1,14953271	520,6
7	C007	0,0147	0,0121	1,214876033	327,5
8	C008	0,0056	0,0043	1,302325581	132,2
9	C009	0,0022	0,002	1,1	44,5
10	C010	0,0103	0,0071	1,450704225	262,6
11	C011	0,0131	0,0116	1,129310345	272,2
12	C012	0,0062	0,0059	1,050847458	119
13	C013	0,0077	0,0073	1,054794521	148,5
14	C014	0,0107	0,0087	1,229885057	241
15	C015	0,0025	0,0012	2,083333333	76,3
16	C016	0,0166	0,0137	1,211678832	369
17	C017	0,0037	0,0019	1,947368421	109,9
18	C018	0,0186	0,0143	1,300699301	438,7
19	C019	0,0152	0,0129	1,178294574	329,3
20	C020	0,0256	0,0215	1,190697674	560,1
21	C021	0,015	0,0136	1,102941176	304,1
22	C022	0,0134	0,0124	1,080645161	265,6
23	C023	0,0118	0,0105	1,123809524	244
24	C024	0,0134	0,0119	1,12605042	277,6
25	C025	0,0126	0,0102	1,235294118	284,8
26	C026	0,0137	0,0114	1,201754386	302,3
27	C027	0,0148	0,0131	1,129770992	307,7
28	C030	0,0176	0,0131	1,34351145	425,5
29	C031	0,0041	0,0016	2,5625	134
30	C032	0,0238	0,0201	1,184079602	518
31	C033	0,0458	0,0393	1,165394402	982
32	C034	0,0098	0,0066	1,484848485	253,6
33	C035	0,0154	0,0102	1,509803922	402,6
34	C036	0,0095	0,0051	1,862745098	277
35	C037	0,0142	0,0132	1,075757576	280,06
36	C038	0,0083	0,0079	1,050632911	159,26

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

37	C039	0,0089	0,0049	1,816326531	256,6
38	C040	0,0536	0,0519	1,032755299	1007,2
39	C041	0,0112	0,007	1,6	302,9
40	C042	0,0055	0,0039	1,41025641	137,6
41	C043	0,0038	0,0032	1,1875	82,9
42	C044	0,0042	0,0029	1,448275862	106,9
43	C045	0,0036	0,002	1,8	103,3
44	C046	0,0085	0,0061	1,393442623	210,9
45	C047	0,0153	0,0101	1,514851485	400,8
46	C048	0,0102	0,0062	1,64516129	280
47	C049	0,0113	0,0092	1,22826087	254,2
48	C050	0,0067	0,0043	1,558139535	178,4
49	C051	0,0226	0,0159	1,421383648	568,5
50	C052	0,0084	0,0044	1,909090909	247,6
51	C053	0,0128	0,0064	2	384,6
52	C054	0,0088	0,0059	1,491525424	228,3

No.	CÓDIGO	A 260	A280	A260/A280	Concentración
53	C055	0,0064	0,0032	2	192,3
54	C056	0,0051	0,0039	1,307692308	120,8
55	C057	0,0094	0,0048	1,958333333	280
56	C058	0,0101	0,0071	1,422535211	254,2
57	C059	0,0092	0,0069	1,333333333	221,1
58	C060	0,0116	0,0095	1,221052632	259,6
59	C061	0,0118	0,0094	1,255319149	270,4
60	C062	0,0121	0,0099	1,222222222	271
61	C063	0,0098	0,0049	2	294,4
62	C064	0,0091	0,0069	1,31884058	216,9
63	C065	0,0125	0,0105	1,19047619	273,4
64	C066	0,0108	0,0091	1,186813187	235,5
65	C067	0,0086	0,005	1,72	241,6
66	C068	0,0076	0,0066	1,151515152	161
67	C069	0,0092	0,0078	1,179487179	199,5
68	C070	0,0083	0,0072	1,152777778	176
69	C071	0,0194	0,0149	1,302013423	457,9
70	C072	0,0186	0,0148	1,256756757	426,7
71	C073	0,0164	0,0136	1,205882353	363
72	C074	0,0145	0,0109	1,330275229	347,9
73	C075	0,0154	0,0117	1,316239316	366,6
74	C076	0,0125	0,0096	1,302083333	295
75	C077	0,0301	0,0248	1,213709677	670,1
76	C078	0,0141	0,0105	1,342857143	340,7
77	C079	0,0216	0,0163	1,325153374	516,8
78	C080	0,0111	0,0091	1,21978022	248,2
79	C081	0,0197	0,0105	1,876190476	576,3
80	C082	0,0137	0,0103	1,330097087	328,7
81	C083	0,0143	0,0102	1,401960784	356,3
82	C084	0,0057	0,0045	1,266666667	131,6
83	C085	0,0078	0,0062	1,258064516	179
84	C086	0,0102	0,0077	1,324675325	244
85	C087	0,0073	0,0058	1,25862069	167,6
86	C088	0,0051	0,0044	1,159090909	108,7
87	C089	0,0061	0,0049	1,244897959	138,8

88	C090	0,0074	0,0063	1,174603175	159,8
89	C091	0,0074	0,0061	1,213114754	164,6
90	C092	0,0033	0,0027	1,222222222	73,9
91	C093	0,0037	0,0031	1,193548387	81,1
92	C094	0,0187	0,0077	2,428571429	601,6
93	C095	0,0163	0,014	1,164285714	349,1
94	C096	0,0181	0,0149	1,214765101	403,2
95	C097	0,0401	0,0329	1,218844985	896
96	C098	0,0085	0,0071	1,197183099	186,9
97	C099	0,0071	0,0059	1,203389831	156,8
98	C100	0,0141	0,0121	1,165289256	302,3
99	C101	0,0098	0,0058	1,689655172	272,8
100	C102	0,0161	0,0138	1,166666667	345,5
101	C103	0,0099	0,0071	1,394366197	245,8
102	C104	0,0151	0,0131	1,152671756	320,3
103	C105	0,0097	0,0052	1,865384615	283

No.	CÓDIGO	A 260	A280	A260/A280	Concentración
104	C106	0,0115	0,0091	1,263736264	265
105	C107	0,0123	0,0109	1,128440367	255,4
106	C108	0,0126	0,0104	1,211538462	280,06
107	C109	0,0395	0,0285	1,385964912	976,6
108	C110	0,0219	0,0201	1,089552239	438,12
109	C111	0,0152	0,0141	1,078014184	300,5
110	C112	0,0214	0,0188	1,138297872	448,3
111	C113	0,0142	0,0129	1,100775194	287,2
112	C114	0,0089	0,0076	1,171052632	191,7
113	C115	0,0116	0,0098	1,183673469	252,4
114	C116	0,0126	0,0098	1,285714286	294,4
115	C117	0,0138	0,0121	1,140495868	289,6
116	C118	0,0057	0,0041	1,390243902	141,2
117	C119	0,0081	0,0064	1,265625	186,9
118	C120	0,0089	0,0072	1,236111111	201,3
119	C121	0,0097	0,0071	1,366197183	237,4
120	C122	0,0189	0,017	1,111764706	386,4
121	C123	0,0099	0,0068	1,455882353	253
122	C124	0,0149	0,0135	1,103703704	302,3
123	C125	0,0177	0,0064	2,765625	590,8
124	C126	0,0088	0,0067	1,313432836	209,1
125	C127	0,0068	0,0051	1,333333333	163,4
126	C128	0,0098	0,0079	1,240506329	222,3
127	C129	0,0116	0,0087	1,333333333	278,8
128	C130	0,0095	0,0074	1,283783784	221,7
129	C131	0,0108	0,0091	1,186813187	235,5
130	C132	0,0109	0,0084	1,297619048	256,6
131	C133	0,0135	0,012	1,125	279,4
132	C134	0,0065	0,0041	1,585365854	174,8
133	C135	0,0115	0,0095	1,210526316	255,4
134	C136	0,0089	0,0071	1,253521127	203,7
135	C137	0,0171	0,0146	1,171232877	368,4
136	C138	0,0114	0,0099	1,151515152	241,6
137	C139	0,0095	0,0081	1,172839506	204,9
138	C140	0,0094	0,0046	2,043478261	284,8
139	C141	0,0157	0,0071	2,211267606	489,8
140	C142	0,0045	0,0029	1,551724138	119,5

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

141	C143	0,0035	0,0022	1,590909091	94,35
142	C144	0,0102	0,0081	1,259259259	234,3
143	C145	0,0074	0,0051	1,450980392	188,7
144	C146	0,0121	0,0098	1,234693878	273,4
145	C147	0,0105	0,0089	1,179775281	227,7
146	C148	0,0077	0,0059	1,305084746	182,1
147	C149	0,0142	0,0121	1,173553719	306,5
148	H001	0,0157	0,0071	2,211267606	489,8
149	H002	0,0092	0,0079	1,164556962	197,1
150	H003	0,0149	0,0115	1,295652174	350
151	H004	0,0056	0,0042	1,333333333	134,62
152	H005	0,0113	0,0091	1,241758242	256,6
			Promedio	1,368987097	284,4899342
			Des. estándar	0,314070578	164,0841032
			Mínimo	1,032755299	44,5
			Máximo	2,765625	1007,2

ANEXO 22: LISTA DE FIGURAS

FIGURA No. 1 – Subcultivo de *Streptococcus agalactiae* en agar sangre de cordero.



FIGURA No. 2 – Prueba de aglutinación en látex para confirmación de *Streptococcus agalactiae*.

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

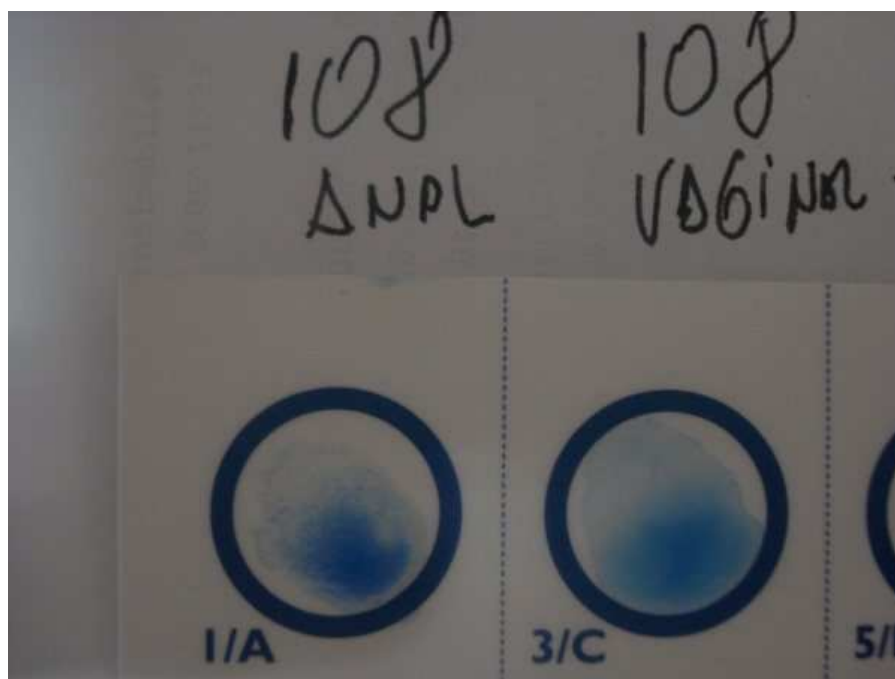


FIGURA No. 3 – Electroforesis de la amplificación de DNA de β - Globina (PCR convencional)

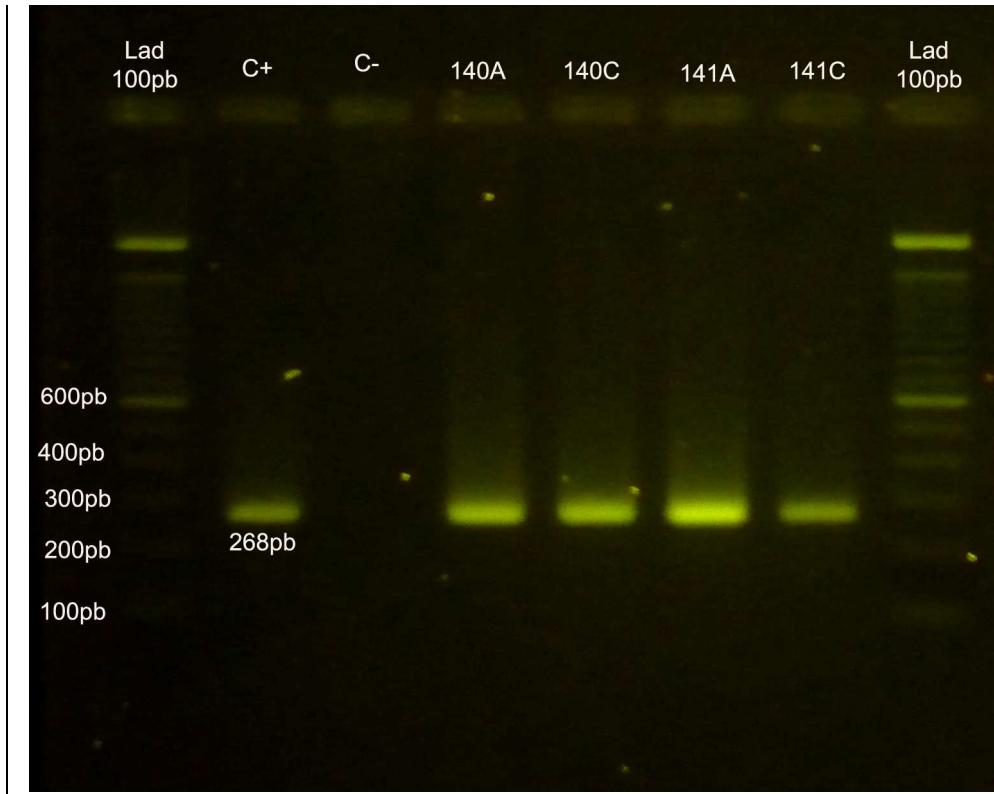


FIGURA No. 4 – Curva de amplificación de DNA de *Neisseria gonorrhoeae* (PCR en tiempo real)

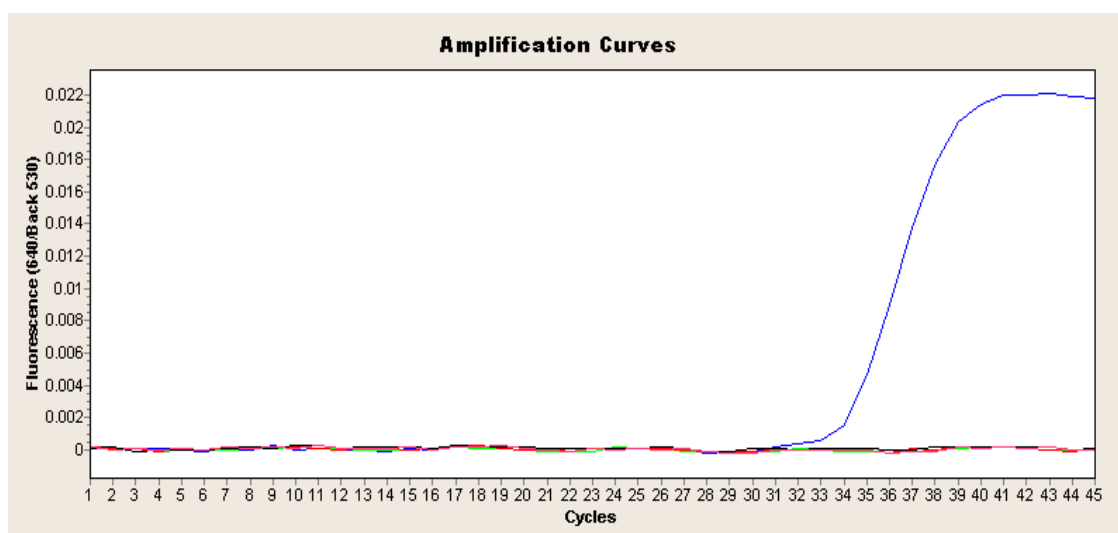




FIGURA No. 5 – Curva de amplificación de DNA de *Chlamydia trachomatis* (PCR en tiempo real)

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*, en pacientes gestantes del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2008.

