



FACULTAD DE MEDICINA

Trabajo de titulación previo a la obtención de título de Médico

Título:

Tamizaje de Infecciones de Transmisión Sexual por Hibridación Genómica en mujeres que acuden para citología de Control a la Fundación Pablo Jaramillo de la Ciudad de Cuenca, en el año 2020.

Autores:

Sebastián Efraín Abad Larrea

Elizavet Neira Naidiuk

Director:

Dra. Vivian Alejandra Neira Molina

Asesora Metodológica:

Dra. Vivian Alejandra Neira Molina

Cuenca, noviembre 2020

RESUMEN

Antecedentes:

Las ITS son un problema de salud pública que afectan diariamente a más de un millón de personas mundialmente. Los agentes etiológicos más comunes son: *C.trachomatis*, *N.gonorrhoea*, *T.pallidum* y *T.vaginallis*. Además, existen microorganismos prevalentes como *U.urealyticum* que colonizan el tracto urogenital. En nuestro medio no existen estudios sobre la prevalencia de ITS en mujeres asintomáticas, específicamente para *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *U. Urealyticum*, que pueden coexistir.

Objetivo:

Identificar la presencia de *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *U.urealyticum* mediante HG en mujeres asintomáticas que acuden para citología cervical preventiva a la Fundación Pablo Jaramillo de la Ciudad de Cuenca.

Métodos:

Estudio descriptivo, transversal en el que se reclutaron 100 participantes que cumplieron los criterios y aceptaron participar. Se recolectaron datos sociodemográficos y de riesgo mediante un formulario. Un médico procedió a tomar la muestra de cepillado cervical. Un total de 76 muestras fueron procesadas utilizando el Kit STD₃ (Hybridio) que permitió detectar simultáneamente la presencia del genoma de los agentes de interés. Utilizamos métodos de amplificación del genoma bacteriano por PCR seguido de GH.

Resultados:

La prevalencia para *U.Urealyticum*, *C.trachomatis*, y *N.gonorrhoeae* en asintomáticas fue 56.58%, 3.95% y 0%, respectivamente. La coinfección por *C.trachomatis* y *U.urealyticum* fue 2.63%. La prevalencia total de ITS fue del 57.89%. La residencia en zona rural se mostró como factor protector para ITS ($p=0.045$); OR=0.28 (95% CI 0.08-0.97). El nivel socio económico bajo representó un factor de riesgo para ITS ($p=0.035$) OR=4.46 (95% CI 1.11-17.91).

Conclusiones:

La prevalencia de ITS en asintomáticas fue del 57.89%.

Palabras clave: Infecciones de transmisión sexual (ITS), hibridación genómica, (HG), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*), *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae*).

ABSTRACT

Background:

STIs are a major public health problem that affect more than 1 million people worldwide every day. The most common etiological agents are: *C.trachomatis*, *N.gonorrhoea*, *T.pallidum*, and *T.vaginallis*. In addition, there are highly prevalent microorganisms such as *U.urealyticum* that colonize the urogenital tract. In our region, there are no studies that show the prevalence of STIs in asymptomatic women, specifically for *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* and *U.urelyticum*, which can coexist.

Objective:

To identify the presence of *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* and *U.urealiticum* by GH in asymptomatic women who attend to The Pablo Jaramillo Foundation from the City of Cuenca for preventive cervical cytology.

Methods:

Descriptive, cross-sectional study in which a 100 participants who met the inclusion criteria and agreed to participate were included. Sociodemographic data and risk factors were collected using a questionnaire. A physician proceeded to take the cervical brushing sample. A total of 76 samples were processed using the STD₃ Kit (HybriBio), which allowed to simultaneously detect the presence of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *U. Urelyticum* genome. We used PCR to amplify the bacterial genome followed by GH.

Results:

The prevalence of *U.Urelyticum*, *C. trachomatis*, and *N.gonorrhoeae* in asymptomatic women was 56.58%, 3.95%, and 0%, respectively. We found coinfection of *C.trachomatis* and *U.Urelyticum* in 2 of 76 (2.63%). We also found *C. trachomatis* or *U.Urelyticum* in a 57.89%. Residence in rural areas was a protective factor for STIs ($p=0.045$); OR = 0.28 (95% CI 0.08-0.97). The low socio-economic level was a risk factor ($p=0.035$) OR = 4.46 (95% CI 1.11-17.91).

Conclusions:

The prevalence of STIs in asymptomatic women was 57.89%.

Key words: Sexually transmitted infections (STIs), genomic hybridization (GH), *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyicum*), *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae*)



Translated by



Sebastián Abad

INTRODUCCIÓN:

Conocemos a las infecciones de transmisión sexual (ITS) como aquellas enfermedades transmitidas predominantemente por contacto sexual, ya sea oral, vaginal o anal; aunque, algunas también pueden ser transmitidas por otras vías como hematógenas o de manera vertical (de madre a hijo durante el parto) (1). Las ITS son un importante problema de salud pública, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo.

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que diariamente más de 1 millón de personas contraen una ITS a nivel mundial (2). Anualmente, unos 357 millones de personas contraen alguna de las cuatro ITS siguientes: clamidiasis (131 millones), gonorrea (78 millones), sífilis (5,6 millones) o tricomoniasis (143 millones) (3). Además, aproximadamente el 70% de mujeres y hombres sexualmente activos presentan infección por *Ureaplasma urealyticum* causando infección no gonorreica del tracto urinario (4).

Microbiología:

C.trachomatis es una bacteria gramnegativa. El ciclo vital está compuesto por una forma infecciosa inactiva metabólicamente (cuerpos elementales) y otra forma no infecciosa activa metabólicamente (cuerpos reticulados). Las células sensibles incluyen las del epitelio cilíndrico no ciliado, cuboidal y de transición encontradas en las membranas mucosas de la uretra, endocérvix, endometrio, trompas de Falopio, ano y recto, el aparato respiratorio y la conjuntiva (5).

N.gonorrhoeae es un coco gramnegativo aerobio e inmóvil con tendencia a agruparse en parejas (diplococos). La infección por *N.gonorrhoeae* abarca cuatro etapas específicas: apego local (posee fimbrias que le permiten adherirse a las células epiteliales), invasión, diseminación y evasión de la inmunidad del huésped. Puede crecer y multiplicarse en las mucosas incluyendo cérvix, útero, y trompas de Falopio en las mujeres y en la uretra masculina (5).

U.urealyticum está considerado dentro de los organismos con vida libre más pequeños, no es posible visualizarlo mediante tinción de Gram (6). Permanece adherido a las células epiteliales del tracto respiratorio o urogenital y puede

diseminarse a otros sitios para causar infección en lugares con interrupción de la mucosa (7).

Epidemiología:

Hasta el 80% de infecciones del aparato genital femenino son asintomáticas o presentan sintomatología leve (5). Esto impide un diagnóstico oportuno y genera un reservorio de infecciones, en gran parte silenciosas, que ocasionan la transmisión sostenida dentro de la comunidad y el desarrollo de futuras complicaciones (infecciones del tracto urinario superior, infertilidad, enfermedad inflamatoria pélvica, complicaciones del embarazo, sobreinfecciones, entre otras) (8).

En nuestro medio no existen estudios que evidencien la prevalencia de ITS en mujeres asintomáticas, específicamente para *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *U. urealyticum*, las cuales generalmente coexisten. Esto es debido a que la mayoría de pruebas diagnósticas utilizadas en nuestro medio tienen un costo demasiado elevado y solo se reservan para aquellas mujeres con una clínica altamente sugerente.

Diagnóstico:

En la actualidad en nuestro medio se utilizan diferentes pruebas para el diagnóstico de las ITS previamente mencionadas, dentro de las principales están los medios de cultivo específicos, microscopía con tinción de Gram (*N.gonorrhoeae*), serología, pruebas rápidas, detección de antígeno, métodos de sondeo genético (hibridación) y pruebas moleculares de ácidos nucleicos (NAAT).

Gracias a las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos ha mejorado el diagnóstico debido a la alta sensibilidad y especificidad que ofrecen estas pruebas. Consisten en la identificación del genoma bacteriano mediante amplificación de secuencias ADN o ARN del patógeno, utilizando: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA) o amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) (7).

La técnica de PCR tiene una sensibilidad y especificidad aproximada de 86 y 99.6%, respectivamente, en muestras cervicales para *C.trachomatis* (9). Esta consiste en la amplificación de genes diana del microorganismo concreto utilizando una polimerasa y reacciones termosensibles en múltiples ciclos (10).

Por otro lado, la hibridación genómica consiste en la unión de una sonda (fragmentos de ADN marcados para identificación del gen diana) con la secuencia complementaria del genoma de interés (10). Es así que la tecnología de hibridación genómica (HybriBio STD₃), que fue utilizada en nuestro estudio, permitió detectar simultáneamente 3 tipos de bacterias (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma urealyticum*) en un solo ensayo, utilizando métodos de amplificación del genoma bacteriano seguido de hibridación en una membrana de nitrocelulosa (que contiene el ADN genómico que nos interesa identificar). Esta es una prueba rápida, efectiva, económica que además permite el diagnóstico de coinfecciones.

El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres asintomáticas que acudieron para citología de control, mediante un proyecto piloto de tamizaje que utilizó una técnica molecular altamente sensible, específica y menos costosa que las pruebas disponibles en nuestro medio. La importancia de este estudio radicó en la posibilidad de identificar a las mujeres con infecciones asintomáticas antes de que desarrollen complicaciones graves que podrían afectar su vida reproductiva. De este modo, este proyecto permitió realizar un diagnóstico, tratamiento y asesoramiento sobre el tratamiento a las parejas sexuales de las mujeres que dieron positividad en las pruebas con la intención de prevenir la transmisión y reinfecciones.

MATERIALES Y METODOS:

Reclutamiento de las pacientes:

Se realizó un estudio descriptivo, observacional transversal de asociación que incluyó el uso de muestras biológicas. La muestra incluyó mujeres asintomáticas que acudieron a La Fundación Pablo Jaramillo para realizarse una citología de control. Al tratarse de un proyecto piloto de tamizaje, utilizamos una muestra a conveniencia que incluyó 100 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron su participación mediante la firma de un consentimiento informado. El proyecto contó con la aprobación del comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (código de aprobación: P2019-175E) y la aprobación de la Dirección de Inteligencia en Salud del Ministerio de Salud Pública (MSP) (código de aprobación: MSPCURI000352-1) Se incluyeron mujeres en edad fértil de 18 a 45 años, sexualmente activas, asintomáticas para ITS (Chlamydia, Gonorrea y Ureaplasma), que no utilizaran un método anticonceptivo de forma regular. No se incluyeron los casos de mujeres con diagnóstico establecido de las ITS mencionadas, mujeres embarazadas, en tratamiento actual para infecciones vaginales y/o antibióticos o con alguna contraindicación para la realización de citología cervical (Anexo 1).

Las participantes llenaron un formulario de recolección de datos con el fin de definir sus características sociodemográficas e identificar posibles factores de riesgo asociados con las ITS (Anexo 2).

Las variables independientes estudiadas fueron:

- 1) Datos Sociodemográficos: edad en años (fecha de nacimiento), estado civil, autopercepción étnica y socio económica, procedencia (urbana o rural) y profesión /ocupación.
- 2) Factores de riesgo: edad de inicio de relaciones sexuales, dificultad para conseguir un embarazo, historial de aborto, número de parejas sexuales, escolaridad, tratamiento previo para infecciones vaginales y uso de DIU (dispositivo intrauterino).

Recolección de las muestras:

Las muestras cervicales fueron tomadas por un especialista en ginecología utilizando un cepillo cervical diseñado para este fin (Anexo 1). Las muestras fueron preservadas en un medio de conservación a 8°C para asegurar su calidad. Cada muestra fue identificada con un código numérico para garantizar la confidencialidad de las participantes.

Procesamiento de las muestras:

En términos generales, la técnica consistió en la purificación de material genético (ADN) de las muestras, seguido de una amplificación utilizando una PCR multiplex. Posterior a la amplificación se realizó una hibridación genómica en una membrana de nitrocelulosa (GenoArray) que contenía sondas del genoma bacteriano de los agentes patógenos de interés. La interpretación de los resultados se efectuó por observación directa (Anexo 3). Cada muestra tuvo un control interno de hibridación que aseguró la fiabilidad de los resultados. Una vez validados los resultados se eliminaron las muestras siguiendo los protocolos de eliminación de muestras biológicas establecidos por el MSP del Ecuador.

Análisis de los datos:

Los datos recolectados se ingresaron en una base de datos de Microsoft-Excel, donde se calcularon las frecuencias y porcentajes de los datos de las diferentes variables del estudio. Una vez obtenidos los resultados, se utilizó estadística descriptiva con el fin de definir y describir a la población de estudio y obtener datos de frecuencias y medidas de tendencia central para las variables cuantitativas.

Los datos fueron analizados en el software informático STATA® (Versión 14). Los datos de las variables continuas permitieron los cálculos de la media \pm desviación estándar, mientras que para los datos categóricos se calcularon porcentajes. Además, se analizaron las variables continuas utilizando la prueba t de Student y prueba no paramétrica de Wilcoxon rank-sum, mientras que las variables categóricas fueron analizadas mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher según fue apropiado. El análisis multivariado fue realizado mediante un modelo de regresión logística para modelos bivariados y ajustados según fue pertinente para estimar los factores de riesgo asociados con las ITS en estudio. Además, se

calcularon la razón de probabilidades (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC). En todas las pruebas un valor de $p < 0,05$ indicó significación estadística.

RESULTADOS:

Se reclutaron 100 pacientes asintomáticas que acudieron para citología preventiva a La Fundación Pablo Jaramillo Crespo en el año 2020 que cumplieron con los criterios de inclusión. En todos los casos se obtuvo una cantidad satisfactoria de ADN. Todas las muestras fueron amplificadas por PCR multiplex. Sin embargo, la fase de hibridación resultó satisfactoria para 76 muestras, por lo que el análisis corresponde a una $n=76$.

Con este número de muestras ($n=76$) se evidenció que más de la mitad de las pacientes presentó por lo menos un microorganismo de transmisión sexual; siendo la más prevalente la infección única por *U.urealyticum* (56.58%). En la **Tabla 1** mostramos la prevalencia de las ITS en estudio.

Tabla 1. Prevalencia de Infecciones de Trasmisión Sexual (<i>C.trachomatis</i> , <i>N.gonorrhoeae</i> y <i>U.urealyticum</i>) en la Fundación Pablo Jaramillo Crespo en la Ciudad de Cuenca, Ecuador. 2020 (N=76)			
ITS [†]		N [‡]	PORCENTAJE (%)
<i>N. gonorrhoeae</i>	Positivo	0	0
	Negativo	76	100
<i>C.trachomatis</i>	Positivo	3	3.95
	Negativo	73	96.05
<i>U.urealyticum</i>	Positivo	43	56.58
	Negativo	33	43.42
<i>Chlamydia</i> y <i>U. urealyticum</i>	Positivo	2	2.63
	Negativo	74	97.36
<i>Chlamydia</i> o <i>U. urealyticum</i>	Positivo	44	57.89
	Negativo	32	42.10

†Infección de trasmisión sexual. ‡Tamaño de la muestra

Fuente: Base de datos. Elaborado: Los autores

La media para la edad de las mujeres estudiadas fue de 31.87 ± 6.25 años. No encontramos asociación estadísticamente significativa entre edad y presencia o ausencia de las ITS estudiadas ($p=0.434$).

Los factores sociodemográficos y de riesgo fueron asociados con la prevalencia de ITS, en las **Tablas 2 y 3**, respectivamente.

Tabla 2. Asociación de variables sociodemográficas con resultados positivos o negativos para cualquier ITS: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *U. urealyticum*

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE		TOTAL		POSITIVO		NEGATIVO		VALOR P
			N [‡]	MEDIA±DE [‡]	N	MEDIA±DE	N	MEDIA±DE	
SOCIODEMOGRAFICAS	Edad (años)		76	31.87±6.25	44	31.39±6.13	32	32.53±6.45	0.434*
	VARIABLE		N	PORCENTAJE	N	PORCENTAJE	N	PORCENTAJE	VALOR P
	Residencia	Urbano	53	69.74	34	77.27	19	59.38	0.094 [†]
		Rural	23	30.26	10	22.73	13	40.63	
	Nivel socioeconómico	Medio	54	71.05	29	65.91	25	78.13	0.246 [†]
		Bajo	22	28.95	15	34.09	7	21.88	
	Educación	Primaria	16	21.05	7	15.91	9	28.13	0.393 [‡]
		Secundaria	27	35.53	16	36.36	11	34.38	
		Superior	30	39.47	20	45.45	10	31.25	
		Cuarto nivel	3	3.95	1	2.27	2	6.25	
		Unión libre	7	9.21	4	9.09	3	9.38	
	Estado conyugal	Casada	37	48.68	18	40.91	19	59.38	0.102 [†]
		Divorciada	8	10.53	4	9.09	4	12.50	
		Con pareja	32	42.11	22	50	10	31.25	
	Etnia	Sin pareja	44	57.89	22	50	22	68.75	0.619 [†]
Mestiza		73	96.05	42	95.45	31	96.88		
	Blanca	3	3.95	2	4.55	1	3.13		

‡ Tamaño de la muestra

‡ Desviación estándar

* Valor p: calculado a partir de prueba paramétrica T de student.

† Valor p: Calculado a partir de prueba no paramétrica Chi-cuadrado de Pearson.

‡ Valor p: Calculado a partir de prueba no paramétrica Exacta de Fisher.

Fuente: Base de datos. Elaborado: Los autores.

La prevalencia de ITS en las pacientes estudiadas fue del 57.89%. Hubo una tendencia a que esta prevalencia sea mayor en las pacientes pertenecientes a la zona urbana en comparación con la zona rural (77.27% vs. 22.73%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.094$). Por otro lado, el nivel de instrucción, el hecho de tener pareja y la autoidentificación étnica no tuvieron

diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los casos positivos comparados con los negativos (**Tabla 2**).

Tabla 3. Asociación de variables de riesgo con resultados positivos o negativos para cualquier ITS: <i>C.trachomatis</i> , <i>N.gonorrhoeae</i> y <i>U.urealyticum</i>									
FACTORES DE RIESGO	VARIABLES	TOTAL		POSITIVO		NEGATIVO		VALOR P	
		N [*]	MEDIA±DE ³	N	MEDIA±DE	N	MEDIA±DE		
	Compañeros sexuales	76	2.47±2.06	44	2.75±2.39	32	2.09±1.44	0.143 [*]	
	Inicio de vida sexual	76	17.95±3.35	44	17.84±3.08	32	18.09±3.73	0.541 [*]	
FACTORES DE RIESGO	Dificultad para embarazarse	No ha tenido dificultad	59	77.63	34	77.27	25	78.13	0.955 [‡]
		No ha buscado embarazarse	8	10.53	5	11.36	3	9.38	
		Si	9	11.84	5	11.36	4	12.50	
		No	59	78.67	31	72.09	28	87.50	
	Historial de abortos	Si	17	22.37	13	70.45	4	12.50	0.099 [‡]
		No	59	77.63	31	29.55	28	87.52	
Tratada por infección vaginal	Si	58	76.32	34	77.27	24	75	0.818 [†]	
	No	18	23.68	10	22.73	8	25		
T de cobre o DIU	Si	18	23.68	12	27.27	6	18.75	0.388 [†]	
	No	58	76.32	32	72.73	26	81.25		

∗ Tamaño de la muestra

³ Desviación estándar

^{*} Valor p: Calculado a partir de prueba no paramétrica Wilcoxon Rank-sum

³ Desviación estándar

[‡] Valor p: Calculado a partir de prueba no paramétrica Exacta de Fisher.

[†] Valor p: Calculado a partir de prueba no paramétrica Chi-cuadrado de Pearson

Fuente: Base de datos. Elaborado: Los autores.

Aunque la asociación no mostró significancia estadística, las participantes con historial de aborto tuvieron una mayor prevalencia para ITS en comparación con las participantes sin historial de aborto (70.45% vs. 29.55%), aunque el valor de p es cercano a 0.05. Las demás variables de riesgo no demostraron asociaciones significativas (**Tabla 3**).

Finalmente, la regresión logística multivariante con modelos bivariados mostró asociación estadísticamente significativa entre la variable dependiente y la variable independiente: estado civil casada (**Tabla 4**).

Tabla 4. Análisis de regresión logística multivariante: Modelos bivariados y ajustados de características sociodemográficas y de riesgo con presencia de Infección de Trasmisión Sexual en la Fundación Pablo Jaramillo, 2020. Variable directa: al menos 1 (N=76)

Variables	Modelos Bivariados					Modelos ajustados					
	OR	SE [†]	Intervalo de confianza		Valor p	OR	SE [†]	Intervalo de confianza		Valor p	
			Límite inferior	Límite superior				Límite inferior	Límite superior		
Edad	0.97	0.04	0.90	1.05	0.429	0.97	0.05	0.88	10.07	0.546	
Compañeros sexuales	1.22	0.18	0.91	1.64	0.186	1.11	0.21	0.76	1.60	0.597	
Inicio de vida sexual	0.98	0.07	0.85	1.12	0.744	0.99	0.08	0.85	1.16	0.890	
Historial de abortos	2.94	1.84	0.86	10.06	0.087	3.05	2.20	0.74	12.55	0.122	
Residencia	Rural	0.42	0.22	0.16	1.17	0.097	0.28	0.18	0.08	0.97	0.045
Nivel socioeconómico	Bajo	1.85	0.98	0.65	5.25	0.249	4.46	3.16	1.11	17.91	0.035
Educación	Secundaria	1.87	1.19	0.54	6.53	0.327	-	-	-	-	-
	Superior	2.57	1.63	0.74	8.94	0.137	-	-	-	-	-
	Cuarto nivel	0.64	0.85	0.05	8.62	0.739	-	-	-	-	-
Estado civil	Unión libre	0.44	0.40	0.08	2.58	0.366	1.11	1.17	0.14	8.71	0.921
	Casada	0.32	0.18	0.10	0.97	0.045	0.53	0.40	0.12	2.36	0.404
	Divorciada	0.33	0.28	0.06	1.76	0.196	0.35	0.36	0.05	2.57	0.302
Etnia	Blanco	1.48	1.84	0.13	17.02	0.755	-	-	-	-	-
Dificultad para embarazarse	No ha buscado	1.23	0.95	0.27	5.61	0.793	-	-	-	-	-
	Si	0.92	0.66	0.22	3.77	0.907	-	-	-	-	-
Infección vaginal	Si	1.13	0.62	0.39	3.29	0.818	-	-	-	-	-
T de cobre/Diu	Si	1.63	0.92	0.54	4.92	0.391	-	-	-	-	-

†SE: Error estándar.

*OR: Odds-ratio.

Fuente: Base de datos. Elaborado: Los autores.

La regresión logística multivariable ajustada por edad de las participantes, edad de inicio de vida sexual, número de compañeros sexuales, historial de abortos, residencia, nivel socioeconómico y estado civil mostró que la residencia en zonal rural es un factor protector para ITS mientras que el nivel socio económico bajo resultó ser un factor de riesgo.

Como se mencionó anteriormente, en el modelo bivariado la variable “casados” fue estadísticamente significativa. Sin embargo, en el modelo ajustado no se obtuvo una asociación significativa ($p=0.404$).

DISCUSIÓN:

En la actualidad existen diversos métodos diagnósticos para ITS. A pesar de esto, en nuestro medio la mayoría de los métodos son costosos y no están disponibles en todos los servicios de salud, por lo que las pacientes no reciben un diagnóstico oportuno y no es posible establecer una prevalencia real. Además, diversos estudios reportan prevalencias variables de infección por *C.trachomatis*, *N.Gonorrhoeae* y *U.urealyticum* debido a la falta de estandarización de los métodos de diagnóstico de estas enfermedades. Por esta razón, uno de los objetivos de nuestro estudio fue la implementación de una técnica de PCR multiplex seguida de hibridación genómica altamente sensible y específica. Con este método encontramos una prevalencia para cualquier ITS incluida en el Kit STD₃ de Hybrirbio del 57.89% en pacientes asintomáticas que acudieron para citología de control a la Fundación Pablo Jaramillo en el año 2020. Esto demuestra que más de la mitad de las participantes presentaron infección asintomática de al menos un microorganismo. El agente más prevalente fue *U.urealyticum* (56.58%), seguido de *C.trachomatis* (3.95%) y no se identificó caso alguno de infección por *N.gonorrhoeae*. Cabe recalcar que solo el 2.63% de las participantes presentaron coinfección por *C.trachomatis* y *U. urealyticum*. Nuestros datos concuerdan con estudios que muestran una elevada prevalencia de hasta el 70% de *U.urealyticum* para infección no gonorreica del tracto genitourinario (4).

La carencia de identificación de *N.gonorrhoeae* concuerda con los resultados de un estudio chileno que determina la prevalencia de ITS por *C.trachomatis*, sin encontrar ningún caso de *N.gonorrhoeae* (11). Según la organización panamericana de la salud (OPS) existe coinfección entre *C.trachomatis* y *N.gonorrhoeae* en un 10-40% de la población mundial (12). La falta de coinfecciones por *N.gonorrhoeae* y *C.trachomatis* en nuestro estudio puede relacionarse con el limitado tamaño de la muestra.

Otro estudio realizado a mujeres que acudieron a una clínica de ITS en Estonia mostró que es más frecuente la coinfección de *C.trachomatis* con *U.urealyticum*. Los autores concluyeron que si una paciente tiene *C.trachomatis* tiene 2.6 veces mayor riesgo de presentar coinfección para *U.urealyticum* (OR=2.6; $p=0.02$). Esta asociación es relacionable con nuestro estudio ya que de las 3 mujeres asintomáticas positivas

para *C.trachomatis*, 2 presentaron coinfección (13). Sin embargo, el estudio en cuestión incluyó en su mayoría a mujeres sintomáticas, lo que representa una diferencia importante con el enfoque del presente estudio.

Las asociaciones estadísticamente significativas entre la variable dependiente (presencia de cualquier ITS) e independientes en nuestro estudio fueron procedencia rural y nivel socioeconómico bajo. No obstante, existieron otras variables independientes con tendencia a la significancia estadística tales como historial de abortos y estado civil que serán discutidas en este apartado.

Respecto a la asociación entre la variable presencia de infección de transmisión sexual y variable procedencia rural, encontramos asociación significativa en el análisis multivariado. La procedencia rural está asociada con menor prevalencia de cualquier infección de transmisión sexual valorada en esta investigación (*C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae* y *U.urealyticum*). En contraste, las pacientes urbanas tienen mayor prevalencia de *C.trachomatis*, y/o *U.urealyticum*. Esta asociación es también reconocida por un comité de expertos de la OMS quienes sugieren que dicha correlación podría deberse a la organización de las sociedades urbanas industrializadas lo que conlleva a un estilo de vida que contribuye a una elevada prevalencia de infecciones de transmisión sexual. Aquello podría ser producto de las largas horas de trabajo y la movilidad geográfica y social que fomentan las relaciones sexuales casuales; al igual que, otros factores sociales, culturales, económicos y educativos (14,15).

En nuestro medio no existen estudios que muestren la prevalencia de ITS en el área urbana vs. el área rural. Sin embargo, dentro de nuestra región la idiosincrasia de mujeres en áreas urbanas podría llevarlas a tener mayores factores de riesgo (p.ej. mayor número de parejas sexuales) para contraer más ITS que sus contrapartes del área rural, lo que fundamentaría nuestros hallazgos.

En estudios realizados en Florida y Uganda los resultados contrastan con los nuestros en donde los autores observaron una mayor prevalencia de ITS en mujeres rurales que en urbanas. Aunque las diferencias en estos estudios no fueron estadísticamente significativas, los autores argumentan que la mayor prevalencia es

debida a que en las campesinas existe mayor tendencia a prácticas de sexo no seguro y a las condiciones socioculturales propias de cada país. (16,17).

Al realizar el análisis sobre los aspectos sociodemográficos mediante el análisis bivariado, no se encontró asociación significativa entre el nivel socioeconómico y la presencia de ITS. Sin embargo, en el análisis multivariado ajustado para la edad de las participantes, edad de inicio de vida sexual, número de compañeros sexuales, historial de abortos, residencia, nivel socioeconómico y estado civil (**Tabla 4**), encontramos una asociación estadísticamente significativa ($p=0.035$), lo que sugiere que el nivel socioeconómico bajo es un factor de riesgo importante para contraer una ITS. Esto podría explicarse por pobre acceso a centros de salud y métodos anticonceptivos de barrera. Los hallazgos difieren con un estudio realizado en 940 mujeres pertenecientes a la Universidad autónoma de México donde obtuvieron resultados que apuntan que aquellas con un menor nivel socioeconómico tuvieron un comportamiento sexual de menor riesgo (18). No obstante, otro estudio realizado por el comité de expertos de la OMS en enfermedades venéreas y treponematosis afirma que la prevalencia de ITS es mayor en poblaciones de nivel socioeconómico bajo. Lo cual es explicado por el hecho de una limitación de acceso a servicios de salud, pruebas diagnósticas, medicamentos e información sobre ITS (14).

Por otro lado, es importante mencionar que muchas de las ITS suelen cursar asintomáticas hasta que presentan complicaciones, entre ellas el aborto. Dentro de las infecciones bacterianas del tracto urogenital, *C.trachomatis*, *U.urealyticum* y *Mycoplasma hominis* (no incluido en este estudio) han sido asociados específicamente con abortos a repetición (19). En nuestro estudio piloto evidenciamos que la variable historial de aborto presentó una tendencia a la significancia estadística asociada a la presencia de ITS ($p=0.087$); OR=2.94 (95% CI 0.86-10.06). Al igual que con el resto de las variables que en nuestro estudio presentan tendencia a la significancia estadística, sugerimos que al ampliar el tamaño de la muestra los resultados podrían volverse significativos.

Aunque es controversial la asociación entre infección por *U.urealyticum* y aborto espontáneo, existen artículos que encontraron asociación significativa entre

estos. En un estudio de casos y controles iraní encontraron que la presencia de infección por *U.urealyticum* está asociada con abortos espontáneos ($p<0.05$) (20).

Conocemos que las infecciones por *C.trachomatis* suelen cursar asintomáticas hasta en el 75% de mujeres (21). Existen varias investigaciones que describen la asociación entre infección por *C.trachomatis* e historial de abortos. Un estudio realizado en Aguascalientes, México que buscó establecer una asociación entre aborto temprano e infección por *C.trachomatis* encontró que el 34.2% de mujeres con diagnóstico de aborto temprano tenía *C.trachomatis*, confiriendo un riesgo de aborto del 10.42% (22). Por lo que sugieren la necesidad de tamizaje de este patógeno en mujeres embarazadas e, incluso en aquellas que ya han tenido un aborto. Otros estudios también establecen una asociación significativa entre este microorganismo e historial de abortos (23, 24). Sugerimos que, al ser una infección asintomática, en general no es diagnosticada de manera oportuna, desencadenando así una inflamación crónica que podría ser la causa de las pérdidas gestacionales. Sin embargo, es necesario contar con un mayor número de estudios para esclarecer este aspecto.

Tras asociar la variable presencia de ITS y la variable “casada”, encontramos relación significativa solo en el análisis bivariado y no en el multivariado, por lo que no fue considerado como estadísticamente significativo. Hallazgo compatible con el estudio de Kost y Derroch quienes tampoco encontraron ninguna asociación significativa entre el estado civil y el comportamiento sexual de riesgo (25). Sin embargo, existe bibliografía que indica que la prevalencia es menor en individuos casados que en personas solteras debido a que en los últimos años un mayor número de adultos de los países industrializados ha optado por la soltería (14).

No encontramos asociación estadísticamente significativa en relación con la media de la edad en las mujeres con diagnóstico positivo (31.39 ± 6.13) y negativo (32.53 ± 6.45) para ITS. Por el contrario, varios estudios establecen que existe mayor riesgo de presentar ITS en el rango de 21-24 años (26).

Finalmente, de forma opuesta a lo que se ha publicado en El Canadian Journal of Infectious Diseases (27), este estudio no pudo establecer una relación directa entre el número de parejas sexuales y la edad de inicio de vida sexual. Ambas

características fueron similares en las mujeres con resultados positivos y negativos en este estudio.

CONCLUSIONES:

La prevalencia de ITS (*C.trachomatis*, *N.Gonorrhoeae* y *U.urealyticum*) en mujeres que acudieron para citología de control a la Fundación Pablo Jaramillo de la ciudad de Cuenca, en el año 2020 fue del 57.89%. En más de la mitad de las participantes existió por lo menos un microorganismo de interés. Esta prevalencia está en concordancia con el rango publicado por la literatura mundial.

En este estudio no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en la mayoría de las variables independientes al relacionarlas con la presencia o ausencia de ITS. Encontramos asociación significativa entre nivel socioeconómico bajo y positividad para ITS al igual que residencia en la zona rural como factor protector para ITS. Además, observamos una tendencia a la significancia estadística en historial de abortos y su asociación con presencia de ITS.

Al tratarse de un estudio piloto utilizamos una muestra pequeña de participantes. Sin embargo, esta investigación abre las puertas a estudios futuros con mayor número de participantes que seguramente tendrán mayor significancia estadística.

Se implementó una técnica molecular altamente sensible y específica, que resulta menos costosa que las pruebas disponibles en nuestro medio. Esto nos permitió identificar a mujeres de alto riesgo infectadas e iniciar un tratamiento para prevenir la transmisión sostenida dentro de la comunidad y evitar futuras complicaciones.

LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES:

Dentro de las limitaciones de nuestra investigación podemos mencionar su naturaleza observacional y el pequeño número de pacientes estudiadas. Sin lugar a duda el tamaño de la muestra jugó un papel importante en la falta de significancia estadística de la mayoría de las variables por lo que recomendamos realizar estudios futuros con un mayor número de participantes.

AGRADECIMIENTOS:

Un agradecimiento especial para el personal médico del departamento de Ginecología y Obstetricia de la Fundación Pablo Jaramillo Crespo, por la ayuda y apoyo para la recolección de muestras necesarias para este estudio y la dirección del Hospital por permitirnos llevar a cabo esta investigación. Esta investigación fue financiada por el Vicerrectorado de Investigaciones de la Universidad del Azuay (código del proyecto:2019-0208).

CONFLICTOS DE INTERÉS:

Los investigadores no presentaron conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Normas de manejo y tratamiento de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS): Primera parte. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2009 Abr [citado 2019 Ago 01] ; 26(2): 174-190. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000200012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000200012>.
2. Taylor M, Wi T. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [citado 1 Agosto 2019]. 10 p. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277258/9789241565691-eng.pdf?ua=1>
3. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Who.int: Notas descriptivas; 2019. Infecciones de transmisión sexual; 2019 Jun 19 [citado 17 Julio 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
4. Borrel Martínez J, Díaz Franco A, Herrera Puente Á, Sánchez Brsón L, Sanmartín Sánchez E. Guía De Buena Práctica Clínica En Infecciones De Transmisión Sexual [Internet]. Madrid: Organización Médica Colegial de España; 2011 [cited 18 September 2020]. Disponible en: https://www.cgcom.es/sites/default/files/gbpc_infecciones_transmision_sexual.pdf
5. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. 237-241,348-354,235-24p.
6. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev 2005; 18:757
7. Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, et al. Congenital and opportunistic infections: Urea plasma species and Mycoplasma hominis. Semin Fetal Neonatal Med 2009; 14:190.
8. Kohl K, Markowitz L, Koumans E. Developments in the screening for Chlamydia trachomatis. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2003;30(4):637-658.

9. Cook R, Hutchison S, Østergaard L, Braithwaite R, Ness R. Systematic Review: Noninvasive Testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Annals of Internal Medicine*. 2005;142(11):914.
10. Becker W. *The world of the cell*. 9th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2009. 531-532,562-563,519-520 p 500, 466.
11. Gaete M, Prado V, Altamirano P, Martinez J, Urrejola P, Pinto J. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Chilean asymptomatic adolescent males determined by urine sample. *Sexually Transmitted Infections* [Internet]. 1999 [cited 8 November 2020];75(1):67-68. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1758182/>
12. Sanchez J. OPS/OMS | Gonorrea [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2020 [cited 8 November 2020]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14872:sti-gonorrhoea&Itemid=3670&lang=es#:~:text=Se%20detecta%20una%20coinfec%20i%C3%B3n%20con,m%C3%A1s%20resistente%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos
13. Denks K, Spaeth E, Jõers K, Randoja R, Talpsep T, Ustav M et al. Coinfection of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2007 [cited 8 November 2020];39(8):714-718. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17654349/>
14. Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Enfermedades Venéreas y Treponematosi [Internet]. Ginebra: Catterall; 1986 p. 35-36. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39332/WHO_TRS_736_spa.pdf?sequence=1
15. WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBAL PREVALENCE AND INCIDENCE OF SELECTED CURABLE SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS [Internet]. Ginebra; 2001 p. 3 Available from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66818/WHO_HIV_AIDS_2001_02.pdf

16. Darj E, Mirembe F, Råssjö E. STI-prevalence and differences in social background and sexual behavior among urban and rural young women in Uganda. *Sexual & Reproductive Healthcare* [Internet]. 2010 [cited 8 November 2020];1(3):111-115. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21122607/>
17. Thompson E, Mahony H, Noble C, Wang W, Ziemba R, Malmi M et al. Rural and Urban Differences in Sexual Behaviors Among Adolescents in Florida. *Journal of Community Health* [Internet]. 2017 [cited 8 November 2020];43(2):268-272. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10900-017-0416-6#citeas>
18. García Reza, Cleotilde, Factores sociales y su asociación con el comportamiento sexual de riesgo para adquirir enfermedades de transmisión sexual . *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva* [Internet]. 2001;8(2): Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10402106>
19. Darj E, Mirembe F, Råssjö E. STI-prevalence and differences in social background and sexual behavior among urban and rural young women in Uganda. *Sexual & Reproductive Healthcare* [Internet]. 2010 [cited 8 November 2020];1(3):111-115. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21122607/>
20. Ahmadi A, Khodabandehloo M, Ramazanzadeh R. Association between *Ureaplasma urealyticum* endocervical infection and spontaneous abortion. *Iranian Journal of Microbiology* [Internet]. 2014 [cited 8 November 2020];:1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411424/>
21. Conde-Ferrández L, Martínez JR, Ayora-Talavera G, Losa Md. Human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* infection in gynecologic outpatients from a Mexican hospital. *Indian J Med Microbiol* [serial online] 2017 [cited 2020 Nov 8];35:74-9. Disponible en: <https://www.ijmm.org/text.asp?2017/35/1/74/202324>
22. Gutiérrez-Campos R, Gutiérrez-Santillán EA, Bravo-Aguirre DE, et al. Asociación entre aborto temprano e infección por *Chlamydia trachomatis* en Aguascalientes, México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2020;58(1):21-27.
23. Baud D, Regan L, Greub G. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Current Opinion in Infectious*

- Diseases [Internet]. 2008 [cited 8 November 2020];21(1):70-76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18192789/>
24. Canto-de Cetina Thelma, Polanco-Reyes Lucila, Fernández-González Víctor, Ruiz-García Sandra. Infección por Chlamydia trachomatis en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. Salud pública Méx [revista en la Internet]. 2003 Ene [citado 2020 Nov 07] ; 45(Suppl 5): S657-S661. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342003001100011&lng=es.
25. Kost K, Forrest J. American Women's Sexual Behavior and Exposure to Risk of Sexually Transmitted Diseases. Family Planning Perspectives. 1992;24(6):244.
26. Gómez Walter, Damaso Bernardo, Cortegana Carlos, Lahura Pedro, Motta Juan. Comportamientos sociales y sexuales asociados a las infecciones de transmisión sexual en jóvenes del Alto Huallaga. An. Fac. med. [Internet]. 2008 Mar [citado 2020 Nov 07] ; 69(1): 17-21. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000100004&lng=es.
27. Navarro C, Jolly A, Nair R, Chen Y. Risk Factors for Genital Chlamydial Infection: A Review. Canadian Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2002 [cited 8 November 2020];13(3):195-207. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094865/#:~:text=Women%20who%20reported%20having%20five,%25%20CI%201.8%20to%2012.7>

ANEXOS:**Anexo 1:****TÉCNICA DE LA TOMA DE MUESTRA PARA CITOLOGÍA CÉRVICO VAGINAL:**

El siguiente protocolo contiene las normas establecidas por el Ministerio de Salud Pública de la república del Ecuador para la adecuada toma de muestra de ADN para citología cérvico vaginal. Cabe recalcar que en el proyecto de investigación no se utilizará ningún nombre para identificar la muestra ya que se utilizará solo códigos para garantizar la confidencialidad de las participantes.

1. CONDICIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

Se debe cumplir una serie de condiciones para garantizar la calidad de la muestra:

- NO realizar la toma de muestra durante la menstruación o en presencia de cualquier sangrado.
- No haber tenido relaciones sexuales tres días antes de la realización de la prueba.
- NO realizar la toma de muestra durante los 3 primeros meses del postparto, excepto en situaciones que lo ameriten.
- NO realizar la toma de muestra si la paciente tiene evidencia clínica de infección vaginal o de que esté usando medicación intravaginal.

2. INSUMOS NECESARIOS PARA EL PROCEDIMIENTO

- Espéculo vaginal desechable.
- Mesa de exploración – Mesa de Mayo.
- Guantes desechables estériles.
- Lámpara de cuello de ganso.
- Hisopo, torundas de gasas.
- Pinzas de aro.
- Espátulas de madera o plástico para toma exocervical (Espátula de Ayre).
- Cepillo ó hisopo para toma endocervical.
- Lámina porta objetos.
- Lápiz bicolor ó lápiz de grafito para rotular lámina porta objetos.
- Laca fijadora especial para citología ó alcohol etílico al 96%.
- Formulario de solicitud de estudio citológico específica del sistema Bethesda (M.S.P .H.C.U.Form.041/89).

3. PREPARACIÓN

- Identificación del tubo de transporte de la muestra con el código asignado.
- Informar a la paciente del procedimiento que se le va a realizar, así como también explicarle que puede ser necesario repetir esta prueba si la muestra no es adecuada.
- Situar a la paciente en posición ginecológica, siempre respetando el pudor de la mujer y garantizando la privacidad necesaria durante la realización del examen.
- Colocar sábana cobertura.
- Ubicar la lámpara cuello de ganso.
- Colocarse guantes desechables estériles en ambas manos, y mantenerlos hasta retirar el espéculo, evitando el exceso de talco.
- Proceder a la separación de los labios mayores con el dedo pulgar y el índice, con el objetivo de visualizar el introito vaginal.
- **NO** usar gel, líquidos antisépticos en el espéculo vaginal, pues puede alterar los resultados de la citología.

- En mujeres mayores de 50 años ó en mujeres que refieren dolor a la introducción del espéculo se recomienda lubricar el mismo con solución fisiológica.
- Tomar en la palma de la mano contraria el espéculo con las valvas cerradas.
- Seleccionar el tamaño del espéculo vaginal, de acuerdo a la complejión de la mujer.
- Introducir el espéculo hasta el fondo de la vagina en posición oblicua (ángulo de 45°) hacia el sacro de la mujer. En este momento se le dice a la usuaria que "puje".
- Girar el espéculo presionando la palanca que abre la valva superior, evitar que se rasgue el cuello y pueda sangrar (se debe visualizar el cérvix completamente). Fijar el espéculo.
- De no poder visualizar el cérvix referir al médico especialista en ginecobstetricia.

4. REALIZACIÓN DE LA CITOLOGÍA: TOMA DE MUESTRA ENDOCERVICAL

- Se utiliza el cepillo aislado para la toma de muestra endocervical.
- El hisopo se utiliza para tomar muestras en mujeres adolescentes, histerectomizadas, climatéricas, premenopaúsicas y postmenopaúsicas.
- Se puede utilizar el extremo bifurcado de la espátula de Ayre.
- Introducir el cepillo o hisopo en el canal endocervical.
- Girar a la izquierda (a contra de las manecillas del reloj) 360°.
- Retirar el cepillo y colocar en el tubo de transporte que contiene la solución preservante.

5. CONCLUSIÓN DEL PROCESO DE TOMA DE MUESTRA

- Aflojar el tornillo del espéculo que fijó las valvas, para esto se le pide a la usuaria que puje.
- Ir retirando el espéculo lentamente.
- Retirar los guantes de ambas manos.
- Informar a la paciente de la entrega de sus resultados.

Anexo 2:

**FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA PARTICIPAR EN EL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN
SEXUAL (ITS) EN LA FUNDACIÓN PABLO JARAMILLO**

El siguiente formulario debe ser completado por el investigador solamente después de que la paciente acepte participar en la investigación y firme el consentimiento informado. Los datos recolectados aquí serán utilizados para correlacionarlos con los resultados del test. El llenado de este formulario NO autoriza la publicación de nombres ni interfiere con la privacidad de la participante. Solamente los investigadores tendrán acceso a este formulario.

Código*:

DIA	MES	AÑO			SERIAL				

*El código de identificación único que se compone de: dd/mm/aaaa del nacimiento de la paciente seguido de un serial de 3 números que inicia en 001 hasta el 100, esté código debe ser el mismo que se consignará en la muestra.

Instrucciones:

Marque con una X el cuadrado que corresponde a cada respuesta y complete el espacio en blanco (en caso de ser necesario) con la información que más se asemeje a su realidad. Todas las preguntas tienen una sola respuesta. En caso de tener preguntas, no dude en consultar con el médico tratante.

1. Edad (años cumplidos):

- _____

2. Procedencia:

- Urbano
- Rural

3. Etnia (autoadscripción):

- Mestizo
- Afroamericano
- Blanco
- Asiático
- Indígena
- Otros:

➤➤ especifique _____

4. ¿Dentro de que nivel socioeconómico usted se considera? (su respuesta a esta pregunta no interviene con la valoración de trabajo social realizada por la Fundación Pablo Jaramillo)

- Alto
- Medio
- Bajo

5. Estado civil actual:

- Soltera
- Unión libre
- Casada
- Divorciada
- Viuda

6. Nivel de estudios:

- Primaria
- Secundaria
- Superior
- Cuarto nivel

7. ¿Cuántos compañeros sexuales ha tenido a lo largo de su vida?

- _____

8. ¿A qué edad inició su vida sexual?:

- _____

9. ¿Ha tenido dificultad para embarazarse con una misma pareja (tras un año de mantener relaciones sexuales sin utilizar ningún método anticonceptivo)?

- NO he tenido dificultad
- NO he buscado embarazarme
- SI,

➤➤ ¿Por cuánto tiempo
aproximadamente hasta
lograr embarazarse?

10. ¿Alguna vez ha tenido un diagnóstico de aborto?

- NO
- Si,

➤➤ ¿Cuántos?

11. ¿Alguna vez ha sido tratada para algún tipo de infección vaginal?

- NO
- SI

12. ¿Utiliza o ha utilizado una t de cobre o un dispositivo intrauterino?

- NO
- SI

Anexo 3

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN, PCR E HIBRIDACIÓN POR FLUJO DIRECTO UTILIZANDO EL KIT STD3 HYBRIBIO CATÁLOGO HBGA-STD3P

1. EXTRACCIÓN DE ADN

El siguiente protocolo se utiliza para la extracción de material genético de las muestras de citología cervical utilizando: **HYBRIBIO CELL LYSIS KIT**

Objetivo: Extraer el material genético ADN de muestras de cepillado cervical a partir de solventes orgánicos.

Almacenamiento y estabilidad: El kit debe almacenarse a temperatura ambiente lejos de la luz solar. En estas condiciones los reactivos se mantienen estables por 12 meses.

Requerimientos:

a) Materiales

- Tubos eppendorf 1.5mL con tapón de rosca
- Puntas de pipeta automática de 1000µl
- Puntas de pipeta automática de 10µl
- Guantes de nitrilo

b) Reactivos

- Hybriobio Cell Lysis Kit

c) Equipos

- Microcentrífuga que alcance las 14000rpm
- Vórtex
- Baño maría
- Pipetas automáticas de 10µl y 100µl

Procedimiento:

- 1) Pipetear 1 ml de muestra cervical en un tubo de micro-centrífuga de 1.5 ml o en un tubo de tapón de rosca.
- 2) Centrifugar a 14.000m rpm durante 5 minutos (para aquellos que usan tubos con tapón de rosca, coloque una marca en el tapón del tubo y la marca debe quedar hacia afuera durante la centrifugación).
- 3) Desechar el sobrenadante.
- 4) Re-suspender el sedimento en 400 ul de la **Solución 1**, agitar en vórtex con intensidad, luego hervir en un baño de agua caliente (95 ° C o más) durante 15 minutos, dejar enfriar el tubo durante 2 minutos.
- 5) Agregar 400 ul de la **Solución 2**, mezclar suavemente, esperar 2 minutos a temperatura ambiente.

- 6) Centrifugar el tubo a 14.000 rpm durante 5 min. (la marca debe quedar hacia afuera para el tubo con tapón de rosca), luego desechar el sobrenadante.
- 7) Centrifugue el tubo nuevamente a 14.000 por un minuto, luego use una punta de micro-pipeta para pipetear el resto del solvente en el tubo.
- 8) Dejar reposar el tubo durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Añadir 30 μ l de la **Solución 3** al tubo, agitar en vórtex durante 10 segundos, centrifugar por 10 segundos, luego pipetear 1 μ l de la solución tomando una muestra de la mitad superior del volumen para la amplificación por PCR. (Nota: No pipetear la base del tubo).

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El siguiente protocolo se utiliza para la amplificación del material genético purificado con el procedimiento previo utilizando: **STD3 Diagnostic Kit Hybribio “3-in-1” CT/NG/UU Infection diagnosis. No. Catálogo HBGA-STD3P.**

Objetivo: Amplificar el material genético mediante PCR utilizando cebadores específicos para: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Almacenamiento y estabilidad: El kit debe almacenarse en una zona pre-PCR, nunca debe almacenarse en una zona post-PCR. Los reactivos deben almacenarse en una temperatura de 2-8°C evitando ciclos de congelación – descongelación.

Requerimientos:

a) Materiales

- Guantes de nitrilo
- Tubos eppendorf 1.5mL
- Tubos para PCR de 0.2mL tapa plana
- Puntas de pipeta automática de 1000 μ l
- Puntas de pipeta automática de 100 μ l
- Puntas de pipeta automática de 10 μ l

b) Reactivos

- Etanol al 70%
- Agua destilada libre de DNAsa.
- STD3 Diagnostic Kit Hybribio “3-in-1” CT/NG/UU Infection diagnosis. No. Catálogo HBGA-STD3P

c) Equipos

- Termociclador
- Minicentrífuga para tubos de 0.2 a 1.5mL

Antes de empezar, limpiar toda la zona de trabajo con etanol al 70% incluyendo las pipetas.

El volumen total de reacción de PCR es de 50µl con la siguiente composición:

Componentes	Volumen de reacción
Mezcla de PCR (tapa azul)	47.4 µl
UNG (tapa roja)	0.2 µl
DNA Taq Polimerasa	0.4 µl
Molde de DNA	2 µl

Procedimiento:

- 1) Descongelar la mezcla de PCR y el agua libre de DNAsa a temperatura ambiente.
- 2) Agitar y centrifugar los reactivos a 8000rpm por 1 minuto antes de usar.
- 3) Centrifugar la DNA Taq polimerasa y el reactivo UNG a 8000rpm por 30 segundos.
- 4) Descongelar el DNA y centrifugar a 8000rpm por 5 minutos.
- 5) Preparar la mezcla utilizando los volúmenes de la tabla anterior, agitar y centrifugar la mezcla.

NOTA: La DNA Taq polimerasa debe ser sacada del congelador justo antes de su uso y debe guardarse inmediatamente.

- 6) Distribuir alícuotas de 48µl de la mezcla en cada tubo de PCR de 0.2mL.
- 7) Añadir 2 µl de la muestra de DNA a cada tubo de reacción.
- 8) Centrifugar las muestras suavemente.
- 9) Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa de amplificación con los siguientes parámetros:

	Temperatura	Tiempo
Inicio	37°C	5 minutos
Desnaturalización	95°C	11 minutos
40 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Hibridación	58°C	30 segundos
Elongación	72°C	50 segundos
Extensión final	72°C	5 minutos
Incubación	4°C	∞

3. HIBRIDACIÓN POR FLUJO DIRECTO

El siguiente protocolo se utiliza para la hibridación por flujo directo a partir de los productos de la PCR, utilizando una membrana de nitrocelulosa contenida en el **STD3 Diagnostic Kit Hybribio "3-in-1" CT/NG/UU Infection diagnosis. No. Catálogo HBGA-STD3P.**

Objetivo: Evidenciar si se produjo o no una amplificación del genoma de uno o más de uno de los patógenos a continuación: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Almacenamiento y estabilidad: Las soluciones de hibridación deben almacenarse a temperatura de 4-8°C, en estas condiciones son estables por 12 meses. La solución NBT/BCIP es sensible a la luz por lo que es necesario protegerla en un envase marrón. Después de utilizarse, la solución debe guardarse a 4°C.

Requerimientos:

a) Materiales

- Puntas de pipeta automática de 1000µl
- Puntas de pipeta automática de 100µl
- Guantes de nitrilo
- Hielo
- Pinzas

b) Reactivos

- Kit de hibridación Hybriobio No. Catálogo HBGA-STD3H

c) Equipos

- Termobloque
- HybriMax
- Baño maría
- Pipeta automática de 100µl
- Pipeta automática de 1000µl

Preparación antes del experimento:

- 1) Precalear la **Solución de Hibridación (HYB SOLN)** en baño de agua a 45°C antes de usar. Todo el resto de soluciones deben estar a temperatura ambiente.
- 2) Si en la **Solución B (SOLN B)** se forma un precipitado, disolver incubando en baño de agua a 45°C y dejando que llegue posteriormente a temperatura ambiente.
- 3) Utilizar el frasco marrón para preparar la solución de trabajando a partir de disolver el comprimido **NBT/BCIP** en 10mL de **Solución C**.
- 4) Desnaturalizar los productos de PCR calentándolos a 95°C por 5 minutos y luego producir un choque térmico colocándolos en hielo por 2 minutos.

Procedimiento:

- 1) Instalar todos los componentes del **HybriMax** en el dispositivo **HybriMax**.
- 2) Ajustar la temperatura del **HybriMax** a 45°C.
- 3) Cuando la temperatura alcance los 45°C, añadir 0.8mL de **Solución de Hibridación** (precautada a 45°C) en los pocillos donde se encuentran las membranas "**HybriMem**" durante 3 minutos.
- 4) Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
- 5) Añadir 0.5mL de **Solución de Hibridación** (precautada a 45°C) en los pocillos donde se encuentran las membranas "**HybriMem**".
- 6) Agregar en los pocillos, las muestras amplificadas de DNA desnaturalizados (una por

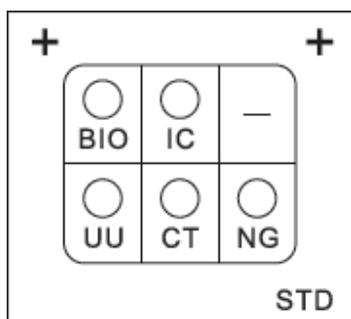
- pocillo), pipetear 2 a 3 veces cada una para mezclar la solución cuidadosamente.
- 7) Cerrar la tapa del **HybriMax**.
 - 8) Incubar durante 20 minutos.
 - 9) Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
 - 10) Agregar 0.8mL de **Solución de Hibridación** (precalentada a 45°C).
 - 11) Repetir los pasos 9 y 10 dos veces más.
 - 12) Apagar la bomba de succión.
 - 13) Fijar la temperatura del **HybriMax** a 25°C.
 - 14) Cuando la temperatura alcance los 30°C, agregar 0,5mL de **Solución de Bloqueo** en cada pocillo (la temperatura está descendiendo hasta alcanzar los 25°C).
 - 15) Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
 - 16) Nuevamente, agregar 0,5mL de **Solución de Bloqueo** en cada pocillo e incubar por 5 minutos. Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
 - 17) Cuando la temperatura del HybriMax alcance los 25°C, agregar 0,5mL de **Conjugado Enzimático**, e incubar por 3.5 minutos.
 - 18) Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
 - 19) Añadir 0,8mL de **Solución A** (lavado).
 - 20) Repetir los pasos 18 y 19 tres veces más.
 - 21) Apagar la bomba.
 - 22) Fijar la temperatura del **HybriMax** a 36°C.
 - 23) Cuando la temperatura alcance lo 36°C, agregar 0,5mL de **Solución NBT/BCIP** e incubar por 5 minutos. La tapa del **HybriMax** debe estar cerrada.
 - 24) Extraer todo el solvente con succión de la bomba.
 - 25) Mantener la bomba encendida.
 - 26) Añadir 0.8mL de **Solución B** (lavado).
 - 27) Repetir el paso 26 dos veces más.
 - 28) Añadir 1mL de **agua destilada** (enguaje).
 - 29) Apagar la bomba.
 - 30) Retirar la tapa de fijación y todos los accesorio. Utilizar pinzas para sacar las membranas y secar en papel absorbente.

31) Interpretar los resultados por visualización.

NOTA: no tocar las membranas con las manos/dedos sin guantes. Usar siempre guantes y pinzas.

Limpiar el área de trabajo antes y después de la prueba con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 10%.

Interpretación de los resultados:



Claves:

BIO: Control de biotina

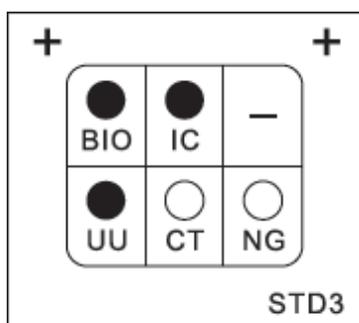
IC: Control interno

UU: *Ureaplasma urealyticum*

CT: *Chlamydia trachomatis*

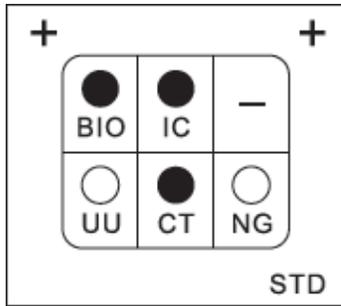
NG: *Neisseria gonorrhoeae*

Figura No. 1 Diagrama esquemático de la membrana diagnóstica del STD3 GenoArray.



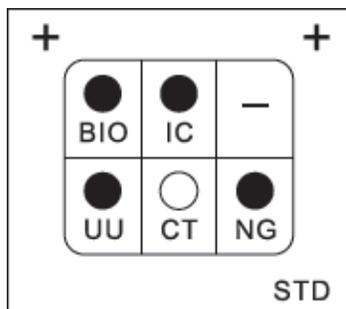
UU Positive

Figura No. 2 Ejemplo de una infección positiva para *Ureaplasma urealyticum*.



CT Positive

Figura No. 3 Ejemplo de una infección positiva para *Chlamydia trachomatis*.



Multiple infections

Figura No. 4 Ejemplo de una infección múltiple con *Ureaplasma urealyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*.