

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio piloto de la prevalencia de infección por
Chlamydia trachomatis y *Neisseria gonorrhoeae* en una
población universitaria.**

Proyecto de Investigación

Liseth Estefanía Salazar Pérez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en procesos Biotecnológicos

Quito, 18 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Estudio piloto de la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y
Neisseria gonorrhoeae en una población universitaria.**

Liseth Estefanía Salazar Pérez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Firma del profesor

Quito, 18 de mayo de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Liseth Estefanía Salazar Pérez

Código: 00103968

Cédula de Identidad: 1717534042

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2017

DEDICATORIA

Desde niña he contado con el apoyo y el amor más grande, su guía, su ejemplo y su dedicación me han formado maravillosamente. Gracias a ustedes he logrado mucho y gracias a ustedes he logrado alcanzar uno de mis sueños. A mis padres, mis mejores amigos.

Tu ternura y tus enseñanzas son parte fundamental. Porque siempre quisiste verme crecer. A ti mi Anibital.

Por la suerte de compartir contigo una de mis pasiones, por tu aliento, tu apoyo y tus palabras. Por las largas mañanas de trabajo, las risas y los momentos. Porque me ayudaste a seguir, a confiar y me acompañaste en cada paso hasta lograrlo. A ti, David, Mi Gran Amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por el apoyo que recibí a lo largo de esta investigación.

A la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito por la colaboración en las campañas de recolección de muestras.

A la Doctora Marisol Bahamonde, por la colaboración con el Grant que financió este proyecto.

A mi directora Sonia Zapata por su constante apoyo y la oportunidad que me otorgó al ser parte de este trabajo.

Un agradecimiento especial a Saulo Erazo, Daniela Izurieta y David Perasso por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental.

A mi familia y amigos por haberme acompañado a lo largo de mi carrera.

RESUMEN

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) constituyen una de las principales causas de enfermedad aguda, infertilidad, incapacidad física, psicológica y muerte tanto en hombres como mujeres adolescentes y adultos, considerándose una preocupación para la salud pública tanto en los países industrializados, como en los países en vías de desarrollo. En Ecuador, la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (NG) aún se desconoce principalmente porque la mayoría de casos son asintomáticos. Se estandarizó la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, para amplificar la región 16S de ADNr de CT y NG y determinar su presencia en muestras de orina de estudiantes universitarios entre 18 y 25 años de edad que no presentan síntomas.

Los resultados obtenidos demuestran una prevalencia de 0.43% para NG y 0% para CT, cifras sumamente bajas. Pocos estudios preliminares señalan que con el paso del tiempo la prevalencia de estas infecciones en Ecuador, ha disminuido, concordando con este estudio. Además, la baja prevalencia puede ser el resultado del tipo de población estudiada, nivel socio-económico, tipo de estudio y técnica de diagnóstico.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, ETS, PCR tiempo real, Ecuador.

ABSTRACT

Sexually transmitted diseases (STDs) are known to be the principal cause of acute illness, infertility, physical, disability, psychological distress and death. In Ecuador, the prevalence of *Chlamydia trachomatis* (CT) and *Neisseria gonorrhoeae* (NG) is still unknown mainly because most cases are asymptomatic. We standardized Real-time Polymerase Chain Reaction to amplify the 16S rDNA region of CT and NG and used it to detect these bacteria in urine samples from asymptomatic college ages 18 to 25.

The results showed a prevalence of 0.43% for NG and 0% for CT, which is extremely low. The low prevalence may be the result of the type of population studied, socio-economic level, type of study and diagnostic technique.

Key Words: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, STD, real time PCR, students, Ecuador.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Enfermedades de Transmisión Sexual	13
1.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	14
1.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	14
1.4 Epidemiología	15
1.5 Situación de CT y NG en Ecuador	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. ÁREA DE ESTUDIO:.....	21
5. MATERIALES	23
5.1 Recolección y almacenamiento de muestras de orina	23
5.2 Extracción de ADN de las muestras de orina.....	23
5.3 Cuantificación de ADN.....	24
5.4 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN.....	24
5.5 Amplificación de la región del 16S ADNr de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> para análisis detección en muestras de orina de los pacientes.....	24
6. MÉTODOS	25
6.1 Recolección y almacenamiento de muestras de orina	25
6.2 Extracción de ADN	25
6.3 Cuantificación de ADN.....	26
6.4 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN.....	26
6.5 Amplificación de la región del 16S ADNr de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en las muestras.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Separación de muestras y Cuantificación de ADN	28
7.2 Amplificación de la región del 16S ADNr de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en las muestras.....	29
7.2.1 Controles.	29
7.2.2 Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en las muestras de los participantes.	30

7.2.3 Prevalencia de estas infecciones en la población universitaria estudiada.	30
8. DISCUSIÓN	30
8.1 Colección y separación de muestras.....	30
8.2 cuantificación y calidad del ADN	32
8.3 Amplificación de la región del 16S ADNr de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en las muestras.....	33
8.3.1. Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en las muestras de los pacientes.....	35
8.3.2 Prevalencia de estas infecciones en la población universitaria estudiada.	37
9. CONCLUSIONES	41
10. RECOMENDACIONES	43
11. BIBLIOGRAFÍA	44
12. TABLAS	49
13. FIGURAS	51
14. ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de primers utilizados para la amplificación del gen β -actina. (Control Interno).	49
Tabla 2: Secuencia de primers utilizados en el estudio con el tamaño del amplicón en PCR convencional y la temperatura de derretimiento para PCR tiempo real.	49
Tabla 3: Detalle de las muestras por criterio de inclusión (Activos sexualmente).	49
Tabla 4: Concentración y calidad de ADN de 15 muestras. Estos parámetros fueron calculados en NanoDrop 2000. Los códigos de las muestras se asignaron de acuerdo a la entrega de la muestra.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación del gen de B-actina. El tamaño de banda esperado es 300pb.	51
Figura 2: Curva positiva para para el control positivo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en PCR tiempo real.	51
Figura 3: Curva positiva para para el control positivo de <i>Chlamydia trachomatis</i> en PCR tiempo real.	52
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de los controles positivos para <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . El tamaño de banda esperado es 402 pb para CT y 260 pb para NG.	52
Figura 5: Curvas negativas para los controles negativos en PCR tiempo real, con 4 microorganismos comunes en infecciones de las vías urinarias (<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> y <i>Klebsiella</i>) para corroborar que la amplificación no esté dando valores falsos positivos o cruzados con estos microorganismos.	53
Figura 6: Resultados de la técnica HybriBio®, protocolo de detección de CT y NG utilizado en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la USFQ realizada con el objetivo de corroborar el estado de los controles positivos y comprobar los resultados que se obtendría en las muestras con la técnica de detección molecular.....	53
Figura 7: Resultados de PCR tiempo real para detección de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> de las primeras muestras. a. Curva de fusión b. Ciclos de elevación de las curvas para descartar muestras sospechosas. c. Repetición de las muestras sospechosas	55
Figura 8: Resultados de PCR tiempo real para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> de las primeras muestras. Todas las muestras son negativas. El pico más alto observado corresponde al control positivo.....	55
Figura 9: Ciclos de elevación de la curva de fusión para descartar muestras sospechosas para <i>Chlamydia trachomatis</i> . La muestra fue descartada como positiva dado que su curva se eleva en el ciclo 29.	56
Figura 10: Datos estadísticos para prevalencia de infección por gonorrea durante 20 años, presentados en el libro Enfermedades Infecciosas del Ecuador	56

ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado previo.	57
ANEXO 2: Encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sexuales para mujeres	61
ANEXO 3: Encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sexuales para hombres	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades de Transmisión Sexual

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son enfermedades que se transmiten de una persona a otra a través del contacto sexual (Workowski, 2015). Constituyen una de las principales causas de enfermedad aguda, infertilidad, incapacidad física, psicológica y muerte tanto en hombres como mujeres adolescentes y adultos. Dichas enfermedades pueden ser causadas por más de 30 patógenos bacterianos, virales y parasitarios que se pueden transmitir sexualmente siendo las principales *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* y virus de la hepatitis B (Papp et al, 2014). Las tres primeras responden exitosamente a un tratamiento antibiótico, sin embargo, a pesar de la existencia de un tratamiento eficaz, las ETS siguen considerándose una preocupación para la salud pública tanto en los países industrializados, como en los países en vías de desarrollo pues no se tienen datos exactos de su prevalencia (Rowley, et al, 2012). El mayor obstáculo para el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de las ETS es que la mayoría de estas infecciones son asintomáticas y los pocos síntomas que pueden aparecer son poco reconocibles. En estos casos, no es posible detectar la enfermedad por lo que no pueden ser reportados (World Health Organization, 2001). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, anualmente, cerca de más de 1 millón de personas adquieren una ETS cada día, y alrededor de 500 millones de personas se contagian de una de las ETS más prevalentes, especialmente clamidia y gonorrea (World Health Organization, 2013). Estas infecciones, requieren de adecuado tratamiento y diagnóstico preventivo, de manera que se disminuyan los riesgos en la salud de niños, adolescentes y adultos (World Health Organization, 2012).

1.2 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis (CT) es una bacteria aerobia, intracelular obligada que ataca a las células eucarióticas. Responde a la tinción Gram como Gram negativa y tiene forma de coco o bacilo. *C. trachomatis*, debido a su incapacidad de sintetizar su propio ATP, requiere de células en desarrollo para poder mantenerse viable (Manavi, 2006). Aproximadamente un 80% de las infecciones urogenitales en mujeres son asintomáticas, esto las convierte en un importante reservorio para la diseminación de CT. (WHO, 2001). La bacteria infecta principalmente las membranas mucosas, el cuello uterino, el recto, la uretra, la garganta y la conjuntiva, desencadenando en el 20% de los casos sintomáticos no tratados, serias complicaciones como enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico, infertilidad y dolor crónico en la pelvis (Gattlieb et al, 2010). En los hombres, el enfoque sindrómico funciona particularmente bien, con secreción uretral y úlceras genitales, pues, la enfermedad en el género masculino sí presenta sintomatología como la antes descrita. Existe un porcentaje reducido del 25% de casos de hombres infectados que no presentan síntomas (Murray et al., 2009). El CDC reportó en el año 2010, 1.3 millones de casos de infección por *Chlamydia trachomatis*, sin embargo, esta cifra podría estar subestimada pues la mayoría de los pacientes no reciben un tratamiento farmacológico o reciben un tratamiento en ausencia de un diagnóstico específico (Workowski, 2015).

1.3 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae (NG) es un coco Gram negativo, que, crece en parejas llamados diplococos, con los lados adyacentes aplanados. El organismo usualmente se encuentra intracelularmente en los leucocitos polimorfonucleares lo cual es una

característica para su identificación (Todar, 2011). Las infecciones de *Neisseria gonorrhoeae* suelen afectar a las membranas mucosas de la uretra en varones y al endocervix y uretra en mujeres. El mecanismo patogénico implica la unión de la bacteria a células epiteliales no ciliadas a través de pili y la producción de endotoxina (Todar, 2011). Las infecciones gonocócicas tienden a causar una respuesta inflamatoria más fuerte que la de *C. trachomatis*, pero son típicamente asintomáticas en las mujeres hasta que se desarrollan complicaciones como enfermedad inflamatoria pélvica. En los hombres, la mayoría de las infecciones uretrales causan uretritis con micción dolorosa y, menos comúnmente, epididimitis o infección gonocócica diseminada (Papp et al, 2014). Esta enfermedad también puede manifestarse como infección extragenital a manera de proctitis, faringitis, conjuntivitis. (Ghanem, 2015). Es esencial que existan métodos de detección de NG confiables de modo que el paciente pueda adquirir inmediatamente el tratamiento adecuado, sin embargo, el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* en etapas tempranas de la enfermedad es difícil dado que un gran porcentaje de las infecciones gonocócicas son asintomáticas (Weinstock, et al, 2004).

1.4 Epidemiología

La infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* ocurre frecuentemente en jóvenes de entre 18 y 25 años. Una nueva pareja sexual, múltiples parejas sexuales, el abuso de sustancias, historial de infecciones previas, un bajo nivel socioeconómico o falta de educación, son factores de riesgo que predisponen a una persona dentro de este rango de edad a contraer estas enfermedades (Price & Bash, 2015). Dadas las características asintomáticas de estas enfermedades y sus consecuencias al no ser tratadas a tiempo, han despertado la curiosidad alrededor del mundo para establecer estadísticas sobre

infecciones de clamidia y gonorrea de manera que se pueda ofrecer un diagnóstico preventivo y tratamiento eficiente (WHO, 2012). La falta de diagnóstico preventivo ha desencadenado campañas de tamizaje de estas infecciones en diferentes regiones de manera que se pueda conocer su desarrollo, control y prevención en las poblaciones mundiales. Por ejemplo, en Norteamérica se han establecido esquemas que permitan determinar factores de riesgo sobre los cuales los pacientes pueden basarse para realizarse un examen diagnóstico para cualquier tipo de ETS. De acuerdo a estos esquemas se recomienda que las mujeres menores de 24 años y aquellas mayores con alta posibilidad de infección (varias parejas sexuales), se realicen una prueba para la detección temprana de estas enfermedades (CDC, 2013). Esto se debe a que en las mujeres la presencia de estos microorganismos no produce síntomas hasta cuando la infección está avanzada (Kumamoto, et al, 2012). Por el contrario, en el caso de los hombres, la infección por CT y NG produce síntomas reconocibles que dan una alerta sobre lo que podría estar pasando, razón por la cual la investigación sobre la prevalencia en hombres es dejada de lado (Peeling, et al, 2006). Los tamizajes de estas infecciones en hombres podrían significar un avance en el estudio de la prevalencia en mujeres pues se realiza primero para proteger la salud de la población masculina y así prevenir el contagio a mujeres o determinar el porcentaje de la población femenina que podría estar infectada (CDC, 2013). Algunos estudios han demostrado que el tamizaje dual, es decir, evaluación de prevalencia de ETS en hombres y mujeres, resulta en una relación costo-beneficio más efectiva que solo dedicarse a la prevalencia en uno solo de los géneros. Un estudio publicado en el 2012 determinó que el tamizaje para *Chlamydia trachomatis* de 2,000 hombres en un futuro, resultaría en un ahorro de alrededor de \$52,000 anualmente y además reflejaría una disminución de los casos de enfermedad pélvica inflamatoria en sus parejas femeninas (Reagan, et al, 2012).

En el 2005 se reportaron 101.5 millones de casos de infección por *Chlamydia trachomatis* y 87.7 millones de casos de infección por *Neisseria gonorrhoeae* a nivel mundial, tres años después en el 2008 los números aumentaron a 105.7 millones para CT y 106.1 millones para NG todos estos casos distribuidos entre hombres y mujeres en proporciones iguales, es decir no se observó prevalencia mayor en uno u otro género (WHO, 2012). De acuerdo al CDC, la incidencia de estas enfermedades aumenta en 90 millones cada año (CDC, 2013). En Estados Unidos se ha determinado que CT y NG son las enfermedades de transmisión sexual más comunes. En el 2013 se realizó un tamizaje por estados en los cuales se reportaron un total de 820,000 nuevos casos de gonorrea de los cuales el 70% eran personas jóvenes de entre 15 a 24 años (CDC, 2013). En Colombia se realizó un estudio de prevalencia cuyos resultados determinaron una presencia de 9.7% de *Chlamydia trachomatis* y 1.4 % *Neisseria gonorrhoeae* en la población de estudio (Ángel, et al, 2012). En lugares como África la investigación sobre estas enfermedades es reducida y no hay acceso a información fehaciente probablemente por falta de métodos de diagnóstico efectivos y de alcance de toda la población (WHO, 2012).

Existen algunos métodos de diagnóstico para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, aún se considera uno de los principales, al método de cultivo sin embargo con el avance de la tecnología y la biotecnología, también se usan otros métodos basados en producción de anticuerpos como el test EIA (Enzima inmunoanálisis), el test DFA (Direct Fluorescent Antibody) y otras técnicas basadas en ADN como la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) y Test de hibridación (Kumamoto, et al, 2012). Por muchos años, la técnica de cultivo era la más ampliamente utilizada, sin embargo, se identificaron ciertos problemas con las condiciones bajo las cuales crecen los microorganismos además de

problemas de contaminación; lo que condujo a la búsqueda de nuevas formas de diagnóstico (Jalal, et al, 2012). Los métodos moleculares que utilizan ácidos nucleicos se han convertido en el diagnóstico más acertado, estos se basan en la amplificación de un segmento conocido de ADN de los microorganismos en cuestión que determinarán la presencia de los mismos. Estas técnicas son más sensibles y más directas y le proporcionan al paciente una mejor confiabilidad en los resultados (Gaydos, 2014).

1.5 Situación de CT y NG en Ecuador

En Ecuador, la prevalencia de estas infecciones de transmisión sexual en general y principalmente entre los jóvenes aún se desconoce a pesar de que el Ministerio de Salud Pública del Ecuador ha iniciado un programa nacional de prevención y control de VIH-SIDA e infecciones de transmisión sexual. En el 2011, el servicio público reporta 92,342 casos de gonorrea y clamidia, que corresponde al 25% de los casos de ETS (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, s.f.). En este caso, es importante notar que el diagnóstico de dichas enfermedades es únicamente sintomático y no se diferencia la etiología (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, s.f.). En el Ecuador al momento no se hace diagnóstico molecular por amplificación de material genético de los agentes, a pesar de que esta prueba es el estándar para el diagnóstico de las mismas (Mishori, 2012).

Por otro lado, en América Latina se calcula una incidencia 36 millones de casos anuales de sífilis, gonorrea e infecciones por clamidia, lo cual supone una gran carga económica para la región (Cáceres & Rubilar, 2010). Los datos reportados por la Dirección Nacional de Vigilancia epidemiológica describen un incremento de la tasa de Infecciones de transmisión sexual de 529.05 por 100, 000 habitantes en el 2006 a 1638.13 por 100,000 habitantes en 2013. La dirección en mención reporta datos específicos para la infección

causada por NG cuya tendencia es más bien contraria. Los datos mencionan una disminución sistemática de la tasa de infección de 7,139 por 100,000 habitantes en el 2000 que cae a 934 casos por 100,000 habitantes reportado en el 2013.

En Ecuador, no existen datos poblacionales para la infección específica causada por CT y NG en jóvenes y adolescentes. La mayoría de los estudios realizados tienen un enfoque en la detección de estas infecciones en mujeres gestantes dado el factor de riesgo que representan. En el 2009, un estudio de tamizaje de *Chlamydia trachomatis* en mujeres en edad fértil realizado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador determinó una prevalencia de 20.4% (Montalvo, 2010). En el 2013 la Universidad Central del Ecuador llevó a cabo un estudio de prevalencia de CT en mujeres de 19 a 45 años de edad cuyos resultados demostraron un 18.8 % de infección por clamidia (Vaca, 2014). Hacia el año 2016 la prevalencia cambió a de 1.5% (Rayo, 2016). No se buscó prevalencia de NG en ninguno de estos análisis. Es sumamente importante establecer nuevas técnicas de diagnóstico, pero, sobre todo buscar la incidencia de estas enfermedades en nuestra región de modo que se conozca la situación real y se pueda actuar al respecto.

En este estudio se estandarizó una técnica molecular de detección de CT y NG a partir de muestras de orina, con el objetivo de determinar la prevalencia de éstos patógenos en estudiantes universitarios. Dado que en Ecuador no existen estudios de tamizaje de estas infecciones, los resultados de este estudio serán un aporte para conocer la situación de CT y NG en jóvenes universitarios.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Establecer la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra representativa (n = 235) de una población universitaria entre 18 y 25 años.

2.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar el grupo de participación a partir de los criterios de inclusión y exclusión determinados para los participantes del estudio.
- Estandarizar la amplificación de un segmento del *16S* ADNr para la detección por PCR tiempo real, de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* a partir de las muestras recolectadas.
- Determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en el grupo de estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, las mujeres de 15 a 25 años de edad constituyen cerca de la mitad de la población femenina, considerando a este grupo como población en edad fértil y como tal una población de riesgo según describe la OMS en la publicación de Salud en las Américas-Ecuador; 2013. La población descrita enfrenta múltiples riesgos para la salud,

entre los que se destaca las infecciones de transmisión sexual (Loayza M et. al, 2005) en relación con un inicio cada vez más temprano de la actividad sexual evidenciado en la frecuencia de embarazos en mujeres entre 10 y 19 años correspondiente a 91 de cada 1000, lo que incrementa la tasa de mortalidad para este rango de edad a 70.9 por cada 100000 habitantes (WHO, 2012).

Dada la falta de información epidemiológica es necesario realizar el tamizaje de infecciones de transmisión sexual causadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en un grupo poblacional en edades de alto riesgo de contagio. Con ello, se pretende conocer el estado epidemiológico actual y realizar una detección temprana de la infección para disminuir la carga económica y psicosocial que implica el tratamiento tardío de dichas infecciones y sus respectivas complicaciones.

Actualmente, Ecuador no cuenta con un programa de detección temprana de CT y NG. La detección de estas infecciones en pacientes asintomáticos es útil primero, para evitar las complicaciones propias de estas enfermedades en el paciente, así como también prevenir y reducir la infección o reinfección de sus parejas sexuales (CDC, 2013). En segundo lugar, el tamizaje proporciona información sobre el estado epidemiológico actual de estas infecciones en el área de estudio. Este pretende determinar la prevalencia de clamidia y gonorrea en una población en riesgo de ETS en las que se desconoce la prevalencia de las mismas.

4. ÁREA DE ESTUDIO:

Previo al inicio de la recolección de muestras, se obtuvo la aprobación del comité de bioética y se trabajó con el consentimiento informado previo en el Anexo A y la encuesta

en los Anexos B y C. Luego, se realizaron campañas de prevención de enfermedades de transmisión sexual en la Universidad San Francisco de Quito. La recolección de muestras se llevó a cabo en dos de estas campañas, la primera en abril del 2015 en la cual se obtuvieron únicamente muestras de mujeres y la segunda en octubre del 2015 en la que se recolectaron muestras de hombres y mujeres. Estas campañas fueron lideradas por la doctora Marisol Bahamonde y los estudiantes de medicina de la USFQ.

Se colectó muestras de orina de estudiantes universitarios entre 18 y 25 años para determinar la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. La muestra de 235 estudiantes se calculó en base a un universo finito homogéneo, cuyo objeto de estudio es cualitativo; con un error de inferencia del 5%.

La Doctora Marisol Bahamonde, se entrevistó de forma personal y confidencial con cada participante. Se informó el objeto del estudio detenidamente y una vez firmado el consentimiento informado se completó una encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sexuales. Todos los documentos fueron codificados numéricamente para su pareamiento posterior, para garantizar la confidencialidad a los participantes. Ni las muestras, ni las encuestas llevaron las identificaciones de las participantes. Los consentimientos informados fueron archivados por separado bajo custodia del investigador principal. De igual forma la base de datos no incluyó identificaciones de las pacientes, respetando los criterios de ética para investigación observacional con sujetos humanos.

Los criterios de inclusión de las participantes del estudio fueron; 1) Participante con edad entre 18 y 25 años; 2) sexualmente activo y 3) que acepte participar voluntariamente en el estudio. Los criterios de exclusión serán quienes no cumplan los criterios de inclusión o no otorguen su consentimiento de participación. Todos los análisis moleculares fueron

llevados a cabo en los laboratorios del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

5. MATERIALES

5.1 Recolección y almacenamiento de muestras de orina

- Consentimiento informado previo y encuestas
- Frascos de Orina con tapa rosca
- Contenedor frío
- Congelador a - 20°C
- Tubos Falcon de 50 ml
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Centrífuga para tubos de 50 ml
- Baño María

5.2 Extracción de ADN de las muestras de orina

- Tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Pistilos de plástico
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio CTAB. (2% CTAB p/v, 1.4 mM NaCl, 20 mM EDTA 100 mM, HCl pH 8).
- Proteinasa K
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Buffer TE. (10 mM Tris-HCl, 0.1 Mm pH 8).

- Baño de arena
- Vórtex
- Microcentrífuga (Labnet)

5.3 Cuantificación de ADN

- Buffer AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0).
- Nanodrop 2000 (Thermo Fischer)
- Ultra-Pure Distilled Water (ThermoFischer)

5.4 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN

- 25 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 5X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 2 mM dNTPs (Invitrogen)
- 10 mM Primer F β -actina (Invitrogen)
- 10 mM Primer R β -actina (Invitrogen)
- 5 U Taq polimerasa (Invitrogen)
- 20 ng ADN muestras
- Termociclador T100™ (Biorad)
- Tubos Eppendorf 0.2 ml

5.5 Amplificación de la región del 16S ADNr de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* para análisis detección en muestras de orina de los pacientes.

- SsoFast™ EvaGreen® Supermix
- 0.5 μ M Primer NeiF
- 0.5 μ M Primer NeiR

- 0.5 μ M Primer ChlamyF
- 0.5 μ M Primer ChlamyR
- 20ng ADN de los pacientes
- CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
- Tubos para qPCR de 0.2ml en tira
- Tapas en tira para qPCR

6. MÉTODOS

6.1 Recolección y almacenamiento de muestras de orina

Durante la entrevista, los participantes fueron instruidas para la recolección de una muestra de orina uretral de la primera mañana. La recolección fue de la primera micción en un frasco estéril con un volumen máximo de 20mL. Una vez recolectada, las muestras fueron codificadas con el mismo identificador numérico asignado a la encuesta. Ningún dato de identificación adicional fue registrado en el frasco de la muestra. Las muestras fueron mantenidas y transportadas en una temperatura de 2-8 °C al laboratorio de análisis molecular del Instituto de Microbiología de la USFQ. Cada muestra fue homogenizada y dividida en dos tubos de polietileno estériles con un volumen de 10mL cada uno y serán almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

6.2 Extracción de ADN

Una alícuota de cada muestra fue descongelada en refrigeración toda la noche, antes de procesar se permitió que las muestras alcancen temperatura ambiente. En caso de observarse cristales precipitados, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 15 minutos,

o hasta observar la completa dilución de los cristales. Las muestras fueron homogenizadas en vórtex durante 10 segundos. Se utilizó el método de CTAB para extracción de ADN (Winnepenninckx et al, 2002). Para este, se añadió 700 μ l de solución CTAB y se disgregó con pistilos de plástico. Se colocó 20 μ l de proteinasa K y se incubó a 65°C durante dos horas con agitación cada 15 minutos. Cumplidas las 2 horas se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 700 μ l de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), a continuación, se agitaron los tubos vigorosamente hasta conseguir una emulsión. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm para obtener dos fases: precipitado y fase acuosa, de ésta última se tomó 500 μ l y se colocó en nuevo tubo eppendorf estéril. Se añadió 1000 μ l de etanol 100%, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 13200 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol 70% seguido de centrifugación de 10 minutos a 13200 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 50 μ l de buffer AE.

6.3 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000TM y se utilizó buffer AE como solución blanco.

6.4 Amplificación del gen de la β -actina como control de calidad del ADN

Se amplificó el gen de la β -actina del ADN genómico extraído de todas las muestras de orina, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El volumen final de la reacción fue 20 μ l y consistió en: 2 mM MgCl₂, Buffer de PCR 1X, 0.2 mM dNTPs, 1 uM Primer Forward, 1 uM Primer Reverse, 1 unidad de Taq polimerasa y 20 ng ADN. El programa de

PCR se realizó en un termociclador T-Personal (Biometra) con una desnaturalización inicial de 94°C por dos minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 92°C por 50 segundos, annealing a 45°C por 50 segundos, extensión a 72°C por 50 segundos y extensión final a 72°C por 2 minutos. Se utilizó como control positivo los controles disponibles en el Instituto de Microbiología de la USFQ. El producto de amplificación fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Se utilizaron 5ul del producto de amplificación y se realizó una corrida por 45 minutos a 80V.

6.5 Amplificación de la región del 16S ADNr de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras.

Se seleccionó el mejor set de primers para cada microorganismo mediante la revisión de literatura y gracias a la herramienta de NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Los primers para *Neisseria gonorrhoeae* se tomaron del estudio de Chui et al y los primers para *Chlamydia trachomatis* del estudio de Jalal, et al.

Posteriormente se amplificó la región 16S del ADNr con 5 controles positivos tanto para *Chlamydia trachomatis* como para *Neisseria gonorrhoeae* obtenidos a partir de extracción de ADN de muestras clínicas positivas para estas infecciones. Además, para la estandarización se utilizó controles negativos: agua y microorganismos comunes causante de infecciones a las vías urinarias: *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Klebsiella*, para evitar resultados inespecíficos, falsos positivos o cruzados. Para esta estandarización, el volumen final de la reacción fue de 10 µl. Se realizaron reacciones para CT y NG por separado. La mezcla de reacción consistió de: SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 0.5uM Primer F NEI, 0.5uM Primer R NEI en el caso de *Neisseria*

gonorrhoeae y 0.5uM Primer F Chlamy, 0.5uM Primer R Chlamy en el caso de *Chlamydia trachomatis* y 1 µl ADN. El programa de PCR se realizó en CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System con una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 5 minutos. El producto de amplificación fue evaluado mediante espectrofotometría gracias al sistema de PCR en tiempo real aceptando a una muestra positiva cuando la señal (pico de fusión) cumplía con los valores establecidos por el estudio de Chui et al, del año 2008 para NG y Jalal et al, del año 2007 para CT. El pico de derretimiento determinado para *Neisseria gonorrhoeae* fue de 87.80 °C y para *Chlamydia trachomatis* fue de 85.20 °C. Primero se analizaron las muestras para *Neisseria gonorrhoeae* y luego para *Chlamydia trachomatis*.

7. RESULTADOS

7.1 Separación de muestras y Cuantificación de ADN

En total se colectaron 235 muestras de orina, en dos campañas, de las cuales 170 correspondieron a mujeres y 65 a hombres. Las muestras fueron separadas en base a las encuestas de acuerdo a uno de los criterios de inclusión principales, la actividad sexual (Tabla 3). Aquellos participantes que declararon ser sexualmente activos, fueron asignados a un grupo al cual se llamó muestras con criterios, con prioridad de ser analizadas. Aquellas muestras que no cumplieron con el criterio de actividad sexual se las identificó como muestras sin criterios. Estas últimas no fueron rechazadas pues la encuesta es subjetiva y no se puede comprobar si los datos proporcionados por cada participante son reales, por lo tanto, son tomadas en cuenta. A partir de esta separación se obtuvieron las muestras de

ADN. Se estableció que, para mejores resultados en la extracción de ADN, sí era necesario que se disuelvan todos los cristales en la orina antes de empezar con el proceso de extracción.

La concentración de ADN obtenida en las muestras de orina fue adecuada, salvo 3 de ellas que presentaron una concentración baja (8-18.5ng/ul) (Tabla 4). La calidad del ADN se observa en las relaciones 260/280 y 260/230, en estos parámetros se obtuvieron valores fuera del rango aceptable (~1.8) (Tabla 4). Fueron pocas las muestras que presentaron valores cercanos a 1.8 lo que indica contaminación por compuestos fenólicos. A pesar de la baja concentración y calidad de ADN del 1005 de las muestras se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado para este gen (300pb), Figura 1.

7.2 Amplificación de la región del 16S ADNr de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras.

7.2.1 Controles.

Los primers escogidos amplificaron correctamente la región del 16S ADNr de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En 5 controles positivos en PCR por tiempo real, que se observa en las figuras 2 y 3, y para corroborar estos resultados se realizó una electroforesis en gel de agarosa de 1.5% de los amplicones generados. El fragmento amplificado tuvo el tamaño esperado en el gel, 402 pb para *Chlamydia trachomatis* y 260 pb para *Neisseria gonorrhoeae* (Figura 4). En relación a los controles negativos, se realizaron no se obtuvo en ninguno de los 4 microorganismos comunes en infecciones de las vías urinarias (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y

Klebsiella). Estos resultados corroboran que la amplificación genera falsos positivos o cruzados con estos microorganismos como se observa en la figura 5.

7.2.2 Detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras de los participantes.

Se confirmó la positividad y negatividad de los controles utilizados con el kit comercial de detección de CT y NG HYBRIBIO®. Se obtuvieron los resultados esperados tanto para los controles positivos como para los controles negativos (figura 6). La detección de *Neisseria gonorrhoeae* por PCR tiempo real identificó una muestra positiva de las 235 muestras. Por otro lado, el análisis para *Chlamydia trachomatis*, de 235 muestras, ninguna resultó positiva.

7.2.3 Prevalencia de estas infecciones en la población universitaria estudiada.

De la población total estudiada, se obtuvo un 0.43% de prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y un 0% de *Chlamydia trachomatis*. Dada la baja tasa de infección encontrada, estos resultados no permiten establecer relaciones entre infección-edad o infección-género.

8. DISCUSIÓN

8.1 Colección y separación de muestras.

Las muestras de orina han sido frecuentemente usadas para la detección de CT y NG. Varios proyectos de tamizaje de estas infecciones alrededor del mundo se han basado en el uso de muestras de orina. Shafer (2003) demostró en su análisis que tanto el uso de muestras de orina, como el hisopado vaginal son la mejor opción para la detección de estos patógenos, estadísticamente no hay diferencia significativa entre la prevalencia encontrada

en cada tipo de muestra por lo que concluye que cualquiera de ellas pueden ser utilizadas (Shafer, et al, 2003). Por otro lado, en el estudio de Chernesky (2005) buscó determinar la prevalencia de estas infecciones y, además, encontrar la manera más cómoda para el paciente de obtener una muestra representada en la facilidad de colección de las mismas. Los resultados indicaron que las pacientes preferían coleccionar su propia muestra vaginal y, o una muestra de orina que es más fácil y menos invasiva, además, se determinó que entre muestras vaginales y urinarias las prevalencias eran iguales (Chernesky, et al, 2005). Con esto en consideración, para nuestro estudio se definió utilizar muestras de orina que serían efectivas para la detección de CT y NG, representarían menor dificultad de colección, y además significarían comodidad para los pacientes.

En total se obtuvieron 235 muestras entre hombres y mujeres, y fueron separadas en dos grupos. Las muestras de pacientes sexualmente activos fueron asignadas un grupo con criterios, las muestras de pacientes que no reportaron actividad sexual se asignaron al grupo sin criterios; estas últimas también fueron incluidas en el estudio. De acuerdo a los datos reportados sobre infecciones de transmisión sexual en los pacientes que no declaran actividad sexual, la prevalencia de las mismas no es nula como se esperaría sino más bien es alta. En Ecuador, un estudio llevado a cabo por Loayza & Ramírez en el 2005, identificó positivos para muestras de pacientes que declaraban no tener actividad sexual (Loayza & Ramírez, 2005). Así mismo, en el artículo de Gottlieb, et al, (2010) se recomienda realizar un tamizaje periódico sobre infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en donde se coleccionen muestras de pacientes sintomáticos, asintomáticos, sexualmente activos y muestras de aquellos que no lo son, pues según este artículo, las personas tienden a ocultar ciertos aspectos personales como la actividad sexual y podrían

estar escapando de un diagnóstico preventivo y acertado (Gottlieb, et al, 2010). Por esta razón, para nuestro estudio se tomaron en cuenta las muestras colectadas de pacientes sin actividad sexual pues se esperaba encontrar posibles resultados positivos. Además, se tomó en cuenta la información proporcionada por los participantes en la encuesta (Anexos B y C) sobre prácticas sexuales y se les otorgó prioridad a las muestras de pacientes que tenían historial de mayor número de parejas sexuales y relaciones sexuales recientes sin protección por la probabilidad obtener muestras positivas para CT y NG en este grupo. Al juntar estos dos grupos de muestras se esperaba obtener una prevalencia media a alta.

8.2 Cuantificación y calidad del ADN

La concentración de ADN de las muestras fue buena (Tabla 4), ninguna de ellas presentó una concentración menor a 2 ng/μl que es el límite inferior de detección de ADN del NanoDrop 2000 (Termo Scientific, 2012). En cuanto a la pureza del ADN extraído se observa en las relaciones 260/280 y 260/230 con valores de 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente. Los valores obtenidos en este ensayo (Tabla 4) se encuentran fuera de los parámetros aceptables, esto indica la existencia de contaminación por otros componentes tales como: proteínas, compuestos fenólicos y otros residuos de los reactivos de extracción. Sin embargo, todas las muestras amplificaron para el gen de la β-actina (Figura 1). Esto indica que, a pesar de que en la cuantificación por NanoDrop 2000 se obtengan concentraciones bajas o malos rangos de calidad, sí existe una cantidad suficiente de ADN para realizar una PCR exitosa (Termo Scientific, 2012).

8.3 Amplificación de la región del 16S ADNr de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras.

Los primers escogidos amplificaron correctamente la región del 16S ADNr de los controles positivos para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (figuras 2 y 3). El mejor set de primers para cada microorganismo se escogió mediante la revisión de literatura y gracias a la herramienta de NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST es un algoritmo que permite comparar complementariedad de secuencias almacenadas en su base de datos genómica. Este algoritmo trabaja bajo el principio de complementariedad de bases, así, BLAST busca e identifica secuencias que se asemejan a la secuencia de consulta por encima de cierto umbral, buscando sólo los patrones más significativos en las secuencias, pero con sensibilidad comparativa que garantiza bajo un porcentaje de exactitud si se trata de lo que está buscando (NCBI, 2017). Los primers para cada caso fueron probados en el programa y de acuerdo al mismo, los primers amplificarán únicamente la región 16S ADNr CT y NG. El 16S ADNr, o ADN ribosomal 16S, es el ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S que es un componente de la subunidad pequeña 30S del ribosoma procariótico y es altamente conservada entre diferentes especies de bacterias y arqueas (Weisburg, et al, 1991). Las secuencias del gen ADNr 16S contienen regiones hipervariables que son secuencias de firma específicas de especies haciéndolas útiles para la identificación de bacterias. Por esta razón, la secuenciación 16S ADNr ha desempeñado un papel fundamental en la identificación precisa de bacterias aisladas y el descubrimiento de nuevas bacterias en los laboratorios de microbiología clínica. Para la identificación bacteriana, la secuenciación 16S ADNr es particularmente importante en el caso de bacterias con perfiles fenotípicos inusuales, bacterias raras, bacterias de

crecimiento lento, bacterias incultivables e infecciones de cultivo negativo (Woo, et al, 2008). Además, el amplio conocimiento que se ha desarrollado sobre esta región hace más fácil el diseño y elaboración de primers para PCR (Schloss, et al, 2011).

Se realizaron controles positivos para garantizar las buenas condiciones de los primers y la reacción en general, así como también, para acompañar al procesamiento de muestras y poder determinar cuándo una muestra es positiva.

Por otro lado, se realizaron controles negativos con el objetivo de descartar cualquier posible resultado falso positivo. Para esto, se utilizaron 4 microorganismos comunes en infecciones de las vías urinarias (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Klebsiella*). Al trabajar con orina, especialmente de aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, había la posibilidad de encontrar otro tipo de microorganismos distintos a los buscados. La orina es una sustancia de desecho de los riñones, que contiene menos bacterias que la saliva o las heces, la presencia de microorganismos en una cantidad superior a la justificable por mera contaminación de la uretra anterior, significa infección (Rizzo, 2015). La infección urinaria es producida por la contaminación del tracto urinario por microorganismos como: *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus saprophyticus*, y *Enterococcus* (Murray, et al, 2015). La infección urinaria es muy común sobre todo en mujeres por lo que la presencia de microorganismos en la orina es muy probable. Los resultados obtenidos fueron los esperados como se observa en la figura 5, demostrando la especificidad de la prueba molecular utilizada en el estudio.

8.3.1. Detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras de los pacientes.

La efectividad del protocolo de detección para CT y NG propuesto en este estudio fue evaluada por la técnica de hibridación de Hybribio®. Esta es una técnica cualitativa que utiliza la característica de hibridación por complementariedad de ADN. En esta, una sonda marcada específica para CT, NG O UU (Ureaplasma) se une por complementariedad a la muestra que contenga el patógeno. Los resultados se revelan gracias a una reacción colorimétrica entre el marcaje de la sonda unida a su complemento y la reacción con un conjugado. Esta es una prueba muy sensible y bastante eficaz para la detección de estos patógenos (Hybribio, 2017). Bajo ese principio, se utilizó esta técnica con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos de las primeras muestras, y así poder continuar con el procesamiento de las muestras restantes utilizando la técnica molecular. Se obtuvieron los resultados esperados, los controles positivos dieron positivo para la prueba Hybribio® y las muestras de los pacientes que ya habían sido procesadas por la técnica molecular con resultados negativos, también resultaron negativas con la prueba de hibridación (figura 6).

Se ha determinado que los métodos diagnósticos basados en ácidos nucleicos son los más precisos. Uno de los más utilizados dentro de esta tendencia es el PCR en Tiempo Real (q-PCR), su sensibilidad y especificidad ha sido evaluada por algunos ensayos y es el método diagnóstico para enfermedades de transmisión sexual más utilizado en la actualidad. Uno de estos estudios determinó que el q-PCR garantiza una sensibilidad de 93.93% a 100% y una especificidad de 93.33% a 98.85% para la detección de ETS (Fernández, et al, 2016). Otro punto a favor de esta técnica es la facilidad de detección en tiempo real. Para diagnóstico, una herramienta que permita la detección de un patógeno de la manera más

rápida es algo eficiente pues permite al médico proporcionar el tratamiento adecuado y a tiempo (Peuchant, et al, 2015). La PCR en Tiempo Real es una variante que utiliza los mismos reactivos que un PCR convencional y, además, se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo. El termociclador para este tipo de PCR posee sensores que miden la fluorescencia al excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, así, se puede medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Hindson, et al, 2013). A diferencia de una PCR convencional, en la cual se requiere una electroforesis en gel de agarosa para ver los resultados, la Q-PCR mide fluorescencia de fragmentos amplificados de ADN específicos a partir de la temperatura de fusión que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras analizadas. Dicha medición se realiza luego de cada ciclo de amplificación (Ramakers, et al, 2003). Permitiendo obtener resultados de forma inmediata, ideal para diagnóstico.

Esta técnica también nos permite determinar con mayor facilidad un falso positivo. Cuando el equipo lee fluorescencia en los últimos ciclos del programa de amplificación, estos positivos se descartan pues significa que, durante todos los ciclos anteriores no se detectó ninguna señal de amplificación y la señal en un ciclo tardío indica presencia de dímeros de cebadores y no una muestra positiva (Jonhson, et al, 2014). De esta manera es más conveniente establecer parámetros para determinar una muestra como positiva o descartarla como ocurrió en este estudio.

Se encontraron muestras sospechosas que requirieron criterios específicos para determinar su positividad. Basados en el fundamento de PCR Tiempo Real, y lo expuesto anteriormente, se comprobó el ciclo en el que las curvas de todas las muestras,

especialmente de las muestras sospechosas, empiezan a elevarse (Figura 7b). Así mismo, se realizó una nueva amplificación de las mismas muestras para ver su comportamiento (figura 7c). De acuerdo al análisis, las muestras sospechosas presentaron detección de fluorescencia en el ciclo número 36 de 40 lo que indica que es un momento tardío para aceptar una muestra como positiva y por lo tanto se descartan. Además, en base a estos resultados se pudo concluir que un ciclado de 40 es demasiado extenso para esta amplificación y, por lo tanto, se resolvió bajar los ciclos del programa a 30. Como sustento, se decidió realizar una nueva amplificación de las muestras sospechosas para comprobar si la teoría de los ciclos podía ser usada como criterio para descartar falsos positivos, esta vez usando el programa con 30 ciclos. De acuerdo a la Figura 7c, las muestras demostraron ser negativas.

A continuación, se realizó el análisis para *Chlamydia trachomatis*, ninguna de las 235 muestras resultó positiva como se muestra en la Figura 8. Al igual que el caso anterior, se observó una curva que podría ser considerada como positiva. Dadas las acciones tomadas en el caso de *Neisseria*, se tomaron los mismos parámetros y se determinó el ciclo en el cual se detectó fluorescencia. Los resultados demuestran una lectura en el ciclo 29 (figura 9) razón por la cual esta muestra también fue descartada como positiva.

8.3.2 Prevalencia de estas infecciones en la población universitaria estudiada.

Con los resultados del análisis molecular, se calculó el porcentaje de infección de la población total estudiada, éstas resultaron ser cifras bajas. Se obtuvo 0.43% de prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y 0% de *Chlamydia trachomatis* (Tabla 4). En Ecuador, así como en Latinoamérica, no existen proyectos de tamizaje de estas infecciones por lo que es difícil determinar resultados esperados o poderlos comparar. De acuerdo al reporte del libro de

enfermedades infecciosas del Ecuador, los datos indican un decrecimiento en la tasa de infección NG (figura 10) y una baja prevalencia de CT, 8.2 % (Berger, 2017) lo cual en cierta manera sustentaría que en nuestro estudio se encontrara una prevalencia tan baja, sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio siguen siendo sumamente bajos. En Cataluña-España se realizó un estudio muy similar al realizado en este proyecto. Según el análisis, se obtuvo una prevalencia de CT de 7.7% y de NG 5.8% en una población de edad menor a 25 años (Corbeto et al, 2011). En este estudio además se incluyó un grupo de gente extranjera en su mayoría migrantes latinoamericanos, quienes fueron los pacientes con la mayoría de casos positivos. Por esta razón, los resultados de esta evaluación son comparables con los nuestros. Los resultados obtenidos en el análisis realizado en este proyecto indican diferencias, de igual manera las prevalencias de ambas infecciones son bajas.

Se escogió una población de riesgo para contraer estas enfermedades: entre 18 y 25 años con vida sexual activa. Se conoce que, una nueva pareja sexual, múltiples parejas sexuales, falta de educación o bajo nivel socioeconómico, son factores de riesgo que predisponen a una persona dentro de este rango de edad a contraer estas enfermedades (Price & Bash, 2015). Por ello, se consideró a este grupo como objetivo para el estudio, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados pues el porcentaje de infección es nula. Una de las implicaciones por las cuales se obtuvieron estos resultados es el estatus socioeconómico de los participantes. Como se mencionó anteriormente, un nivel socioeconómico bajo puede significar un factor de riesgo puesto que estas personas no tienen fácil acceso a centros para el cuidado de la salud y mucho menos mantienen control preventivo general y de su salud sexual. Además, un nivel socioeconómico bajo puede

incluir falta de educación. El poco conocimiento sobre enfermedades de transmisión sexual, cuidados y prevención hace de este grupo muy vulnerable. Por el contrario, el lugar donde se desarrolló este estudio es un nivel socioeconómico medio-alto, los jóvenes tienen más conciencia, conocimiento, acceso y control de su salud sexual por lo que encontrar una alta prevalencia de estas infecciones es menos probable. Determinar el nivel socioeconómico del grupo de estudio como una causa para los resultados obtenidos es un tanto subjetivo. Un estudio encontró la relación entre contagio de enfermedades de transmisión sexual y otro tipo de infecciones, y el nivel socioeconómico en un grupo de universidades de Estados Unidos, los resultados determinaron una baja prevalencia de infecciones en general atribuidas al número que acudían a los servicios médicos y a la frecuencia con la que lo hacían. Las muestras fueron tomadas de estudiantes de universidades privadas y universidades públicas. Del total de participantes, el 60% acudió al médico, principalmente los estudiantes de universidad privada y mantenían un control preventivo periódico. Por el contrario, los estudiantes de universidad pública acudían con menor frecuencia al médico y los casos positivos se observaron en aquellos que no realizaban visitas al médico o no lo hacían frecuentemente determinando que la baja prevalencia, especialmente de CT 1.1 % y NG 9%, a causa de los cuidados a la salud que tenían los estudiantes (Turner & Keller, 2015). La población escogida para nuestro estudio entonces entraría dentro del grupo de universidad privada, y lo anteriormente mencionado podría ser un sustento para determinar el nivel socioeconómico como una posible causa de los resultados obtenidos.

Para contrastar nuestros resultados, se puede realizar una comparación con un estudio realizado por la Universidad Central del Ecuador en donde se determina la prevalencia de enfermedades de transmisión sexual en trabajadoras sexuales. Ellas forman

parte de la población de más alto riesgo de contagio de estas patologías dado sus actitudes y comportamientos sexuales, edad, nivel socio económico y educación, por lo tanto, se esperaba tener un alto porcentaje de infección. Los resultados de este estudio indican que el 100% de las pacientes se encuentran infectadas por alguna ETS, sin embargo, solo el 6% correspondía a infección por *Neisseria gonorrhoeae* (Arequipa, et al, 2012). Incluso en este estudio donde se esperaba tener una alta prevalencia de NG (o CT), la cifra es baja respaldando de cierta manera nuestros resultados.

Existen otras posibles razones para estos resultados que no tiene que ver con actitudes y prácticas sexuales sino, más bien, de la recolección de la muestra y también, aunque menos probable, la técnica molecular utilizada. Refiriéndose a la colección de muestras de orina, éstas fueron colectadas por los mismos pacientes. Según nuestros parámetros, para poder obtener lo deseado, la muestra debía ser muestra uretral de la primera micción la mañana con un volumen de alrededor de 20 mL y sin previo aseo del área genital, pues se requiere recoger todos los microorganismos presentes en la superficie con el objetivo de poder detectar la presencia de infecciones importantes como las buscadas. Además, la muestra debía ser entregada inmediatamente para mantenerla en refrigeración y garantizar la sobrevivencia de los microorganismos de existir alguno. Sin embargo, muchas de las muestras tenían muy poco volumen, no eran muestras uretrales, no fueron entregadas inmediatamente y no estaban bien selladas lo que ocasionó derrames y muchos otros aspectos que redujeron la calidad de la muestra y pudieron opacar el análisis.

En cuanto a la técnica molecular utilizadas, existen ciertas limitaciones que pueden influir en los resultados de este y cualquier otro análisis. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica sumamente eficaz y sensible a la identificación de

organismos, sin embargo, esa sensibilidad puede proyectar falsos positivos. Además, la técnica no puede diferenciar entre el ADN de un organismo vivo o muerto y puede o no emitir señal de la presencia del mismo dificultando determinar si el resultado es completamente correcto (Paiva-Cavalcanti, 2010). También, los resultados pueden verse afectados por otros parámetros ajenos al sistema de qPCR que no pueden ser detectados por el mismo como: extracción de ADN, calidad de ADN, estado de los reactivos y preparación de las reacciones, situaciones sujetas más bien a error humano. (Smith & Osborn, 2009)

Independientemente de los participantes, otra posibilidad para los resultados obtenidos es el número desigual de muestras de hombres vs mujeres que se obtuvieron, 170 mujeres y 65 de hombres, desigualdad que tampoco permitió realizar una comparación equitativa de resultados. Dada la baja tasa de infección encontrada, y desigual número de muestras, estos resultados no permiten establecer relaciones entre infección-edad o infección-género. Se puede atribuir la detección de infección en una muestra femenina, al número desigual de muestras colectadas de cada género. Dado que las muestras femeninas fueron más numerosas que las masculinas, estadísticamente, existe mayor probabilidad de encontrar una muestra positiva en un mayor número de muestras colectadas (Kirby, et al, 2015). En el caso de nuestro estudio, fue en mujeres donde se encontró este patrón.

9. CONCLUSIONES

A pesar de la baja calidad de las muestras de ADN se comprobó que había muestra suficiente para amplificar la región 16S ADNr para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. Los controles negativos demostraron que los primers utilizados identificaban únicamente a CT y NG y los controles positivos garantizaron que tanto la

reacción como el programa de ciclado para Q-PCR estaban correctamente establecidos, por lo tanto, se determina que la prueba molecular para la detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* fue estandarizada y puede ser utilizada para el diagnóstico de estas infecciones. Además, la técnica hibridación HybriBio® también contribuyó al respaldo de la veracidad de la técnica molecular utilizada. La prueba también permite una obtención de muestra menos invasivo para el paciente y con resultados rápidos.

Los resultados obtenidos demostraron una baja prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y una prevalencia nula de *Chlamydia trachomatis*. Estos resultados se deben a distintos factores: el nivel socioeconómico de los participantes pues, una población vulnerable es aquella que no tiene acceso a correcta educación, prevención y tratamiento sobre enfermedades de transmisión sexual, llamándose nivel socioeconómico bajo. Los participantes de este estudio pertenecían a un nivel socioeconómico medio-alto y sus condiciones les permitían mantener un mejor control sobre su vida sexual y acceso a controles médicos, disminuyendo así la posibilidad de encontrar pacientes infectadas tal y como se determinó en otro análisis. Además, la técnica de recolección de la muestra y las limitaciones propias de qPCR también pudieron influir en los resultados obtenidos. Los pocos estudios realizados en el Ecuador, también demuestran una baja prevalencia de estas infecciones lo que concuerda con nuestro estudio de cierta manera, pues a pesar de que los tamizajes realizados demuestran bajas prevalencias, no son del todo comparables con las nuestras pues éstas son extremadamente bajas. Finalmente, un número desigual de muestras entre hombres y mujeres dificultan la comparación incidencia de infección versus género y la baja prevalencia de ambas infecciones dificultan el establecimiento de relaciones infección/edad, infección/síntomas entre otros parámetros. El reducido número de muestras

colectadas en comparación con el total de estudiantes de la Universidad San Francisco de Quito, no nos permiten determinar que estos resultados reflejen efectivamente la situación actual en este grupo de estudio. Este fue un estudio piloto que permitió establecer parámetros y determinar cuáles son las condiciones y características requeridas para realizar un nuevo proyecto exitosamente.

10. RECOMENDACIONES

Para el objetivo de contribuir con datos estadísticos sobre prevalencia de infecciones de transmisión sexual en el país, se recomienda realizar expandir el número de muestras del estudio en una población de riesgo y expandir los criterios de inclusión para las muestras: jóvenes entre 18 y 30 años, sexualmente activa, un historial de varias parejas sexuales, además de una sintomatología propia de este tipo de infecciones. En esta población hay mayor posibilidad de encontrar alta incidencia de infección por CT y NG. También se debe instruir correctamente a los pacientes para que la toma de muestra se realice de la forma más efectiva posible. Pueden utilizarse muestras de orina como también secreciones vaginales o cervicales o secreciones uretrales que pueden ser tomadas por un médico experto y que garantizarían mayor facilidad de detección de los patógenos.

Buscar en lo posible la recolección de igual número de muestras entre hombres y mujeres en el caso que se desee hacer un estudio mixto y comparativo entre géneros para establecer mejores relaciones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ángel-Müller, E., Rodríguez, A., Núñez-Forero, L. M., Moyano, L. F., González, P., Osorio, E., ... & Gaitán-Duarte, H. (2012). Prevalencia y factores asociados a la infección por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *C. albicans*, sífilis, VIH y vaginosis bacteriana en mujeres con síntomas de infección vaginal en tres sitios de atención de Bogotá, Colombia, 2010. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 63(1), 14-24.
- Arequipa Caza, F. B., Hernández Quimuña, L. E., & Pacheco Mena, M. F. (2012). Incidencia de ITS en trabajadoras sexuales que acuden a la consulta externa en el Centro de Salud n° 1 de la Provincia de Cotopaxi período enero 2010–mayo 2012.
- Berger, S. (2017). *Infectious Diseases of Ecuador*. GIDEON Informatics Inc.
- Cáceres, K., & Rubilar, P. (2012). Infecciones de transmisión sexual: sífilis y gonorrea. *el vigía* 27, 19.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States*. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
- Chernesky, M. A., Hook III, E. W., Martin, D. H., Lane, J., Johnson, R., Jordan, J. A., ... & Schachter, J. (2005). Women find it easy and prefer to collect their own vaginal swabs to diagnose *Chlamydia trachomatis* or *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Sexually transmitted diseases*, 32(12), 729-733.
- Chui, L., Chiu, T., Kakulphimp, J., & Tyrrell, G. J. (2008). A comparison of three real-time PCR assays for the confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* following detection of *N. gonorrhoeae* using Roche COBAS AMPLICOR. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(5), 473-479.
- Fernández, G., Martró, E., González, V., Saludes, V., Bascuñana, E., Marcó, C., ... & Ausina, V. (2016). Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(8), 471-476.
- Gaydos, C. A. (2014). Review of use of a new rapid real-time PCR, the Cepheid GeneXpert®(Xpert) CT/NG assay, for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results for patients while in a clinical setting. *Expert review of molecular diagnostics*, 14(2), 135-137.
- Gottlieb, S. L., Brunham, R. C., Byrne, G. I., Martin, D. H., Xu, F., & Berman, S. M. (2010). Introduction: the natural history and immunobiology of *Chlamydia trachomatis* genital infection and implications for chlamydia control. *Journal of Infectious Diseases*, 201(Supplement 2), S85-S87.
- Gottlieb, S. L., Martin, D. H., Xu, F., Byrne, G. I., & Brunham, R. C. (2010). Summary: The natural history and immunobiology of *Chlamydia trachomatis* genital infection

- and implications for Chlamydia control. *Journal of Infectious Diseases*, 201(Supplement 2), S190-S204.
- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., ... & Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*, 10(10), 1003-1005.
- HybriBio. (2017). STD3 GenoArray Diagnostic Kit. Extraído desde: <http://hybriBio.com/content/portfolio-view/std3-genoarray-diagnostic-kit/>
- Jalal, H., Al-Suwaine, A., Stephen, H., Carne, C., & Sonnex, C. (2007). Comparative performance of the Roche COBAS Amplicor assay and an in-house real-time PCR assay for diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. *Journal of medical microbiology*, 56(3), 320-322.
- Johnson, G., Nour, A. A., Nolan, T., Huggett, J., & Bustin, S. (2014). Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols*, 5-17.
- Kirby, M., Tan, W. C., Hague, C., Leipsic, J., Bourbeau, J., Hogg, J. C., & Coxson, H. O. (2015). Sex Differences Evaluated Using Computed Tomography Derived Disease Probability Measure In The Population-Based Canceled Study. In B13. ANY TIME AT ALL: DISEASE PROGRESSION AND EMERGING PHENOTYPES IN COPD (pp. A2437-A2437). American Thoracic Society.
- Kumamoto, Y., Matsumoto, T., Fujisawa, M., & Arakawa, S. (2012). Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urogenital and oral specimens using the cobas® 4800, APTIMA Combo 2® TMA, and ProbeTec™ ET SDA assays. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2(2), 121-127.
- Loayza Villa M., Ramirez P. (2005). Prevalencia de infección por Chlamydia trachomatis en población joven asintomática de estudiantes universitarias de la ciudad de Quito. PUCE.
- Manavi, K. (2006). A review on infection with Chlamydia trachomatis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*, 20(6), 941-951.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (s.f). VIH/SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual en Ecuador. Recuperado de: <<http://instituciones.msp.gob.ec> >
- Mishori, R., McClaskey, E. L., & Winklerprins, V. J. (2012). Chlamydia Trachomatis Infections: Screening, Diagnosis, and Management, 1127–1132.
- Montalvo Calisto, A. C. (2010). Tamizaje de chlamydia trachomatis mediante técnicas moleculares y citológicas en mujeres en edad fértil del área urbana de la ciudad de Ibarra, año 2009 (Bachelor's thesis, QUITO/PUCE/2010).
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences.

- Murray. P., Rosenthal. K., Pfaller. M., (2009). Chlamydia y Chlamydophila. Microbiología Médica. Sexta edición. Elsevier –España.441 –449.
- NCIBI. (2017). An In-Depth Introduction to NCBI BLAST. Washington University. Extraído desde: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis-da-Silva, C. G., & Gomes, Y. M. (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection: a mini-review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(4), 537-542.
- Papp, J. R., Schachter, J., Gaydos, C. A., & Van Der Pol, B. (2014). Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae—2014. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports/Centers for Disease Control*, 63, 1.
- Peeling, R. W., Holmes, K. K., Mabey, D., & Ronald, A. (2006). Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. *Sexually transmitted infections*, 82(suppl 5), v1-v6.
- Peuchant, O., de Diego, S., Le Roy, C., Frantz-Blancpain, S., Hocké, C., Bébéar, C., & de Barbeyrac, B. (2015). Comparison of three real-time PCR assays for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in young pregnant women. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 83(4), 335-337.
- Price. G., Bash M., (2015), Epidemiology and pathogenesis of Neisseria gonorrhoeae infection. UpToDate Database.Recuperado de: <<http://www.uptodate.com>>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), 62-66.
- Rayo Ortiz, J. S. (2016). Frecuencia de chlamydia trachomatis en mujeres de edad fértil utilizando PCR en tiempo real en el Servicio de Laboratorio del Hospital Carlos Andrade Marín periodo diciembre 2014–agosto 2015.
- Reagan M., et al. (Noviembre, 2012). A randomized trial of home versus clinic--based STD Screening among men. *National Institutes of Health*. (39):11, 842 –847 doi:10.1097/OLQ.0b013E3182649165.
- Rizzo, D. C. (2015). Fundamentals of anatomy and physiology. Cengage Learning.
- Rowley, J., Toskin, I., & Ndowa, F. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008. In *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008* (pp. 20-20).
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one*, 6(12), e27310.

- Shafer, M. A., Moncada, J., Boyer, C. B., Betsinger, K., Flinn, S. D., & Schachter, J. (2003). Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4395-4399.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6-20.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., & Seed, B. (2010). PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1), D792-D799.
- Thermo Scientific (2012) Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123-Technical Bulletin. Extraído desde: <http://www.nanodrop.com/Library/T123-NanoDrop Lite Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- Todar, K. (2011). Pathogenic *Neisseriae*: gonorrhea, neonatal ophthalmia and meningococcal meningitis. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.
- Turner, J. C., & Keller, A. (2015). College Health Surveillance Network: Epidemiology and health care utilization of college students at US 4-year universities. *Journal of American College Health*, 63(8), 530-538.
- Vaca Acurio, N. J. (2014). Prevalencia de chlamydia trachomatis en mujeres que utilizan dispositivo intrauterino (DIU) en edad fértil de 15 a 49 años de edad. Centro de salud norte de la Policía Nacional de Quito, Mayo Agosto 2013 (Master's thesis, Quito: UCE).
- Weinstock, H., Berman, S., & Cates, W. (2004). Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspectives on sexual and reproductive health*, 36(1), 6-10.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T. R. D. W., & Dewachter, R. (2002). Extraction of high-molecular-weight DNA from mollusks.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S ADNr gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908-934.
- Workowski, K. A., & Bolan, G. A. (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines (2015). *Reproductive Endocrinology*, (24), 51-56.
- World Health Organization (WHO), (2013). Sexually transmitted infections (STIs).

Recuperado de: <<http://www.who.int>>

- World Health Organization. (2001). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates.
- World Health Organization. (2001). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates.
- World Health Organization. (2012). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria Gonorrhoeae*. Recuperado de: <<http://www.who.int>>

12. TABLAS

Tabla 1: Secuencias de primers utilizados para la amplificación del gen β -actina. (Control Interno).

Objetivo	Primers (5' - 3')	Tamaño amplicón
<i>β-actina</i>	F: GAGACCTTCAACACCCCAGC	300 pb
	R: ATGTCACGCACGATTCCC	

Obtenido de: Spandidos et al, 2010.

Tabla 2: Secuencia de primers utilizados en el estudio con el tamaño del amplicón en PCR convencional y la temperatura de derretimiento para PCR tiempo real.

Patógeno	Primers (5' - 3')	Tamaño amplicón	T° de Melting
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	F: TATCGGAACGTACCGGGTAGC	260 pb	87.80
	R: GTATTACCGCGGCTGCTGGCA		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	F: CGA GTC GGC ATC TAA TAC TAT	402 pb	85.20
	R: AAA ACG ACA TTT CTG CCG C		

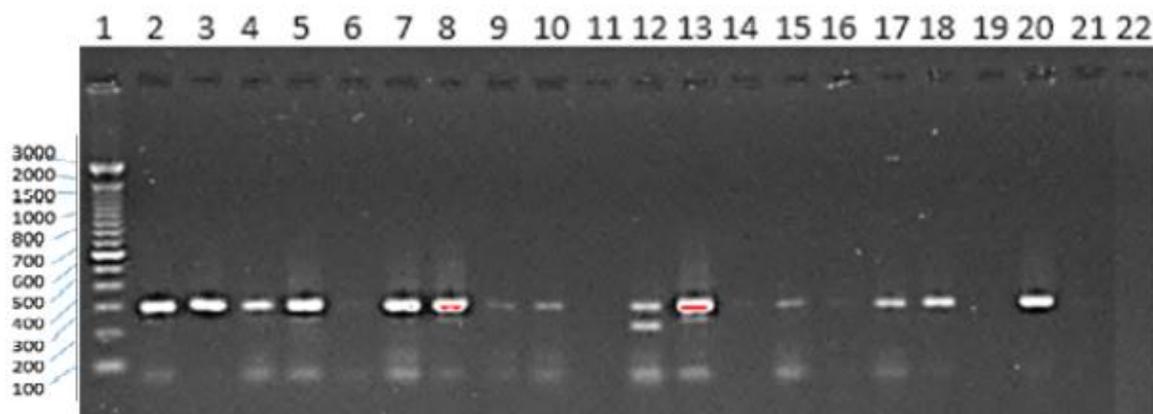
Tabla 3: Detalle de las muestras por criterio de inclusión (Activos sexualmente).

Criterio		Número de Muestras	
		Primera campaña de recolección de muestras (abril 2015)	Segunda campaña de recolección de muestras (octubre 2015)
MUJERES	Con Criterio	80	26
	Sin Criterio	31	33
HOMBRES	Con Criterio	0	65
	Sin Criterio	0	0
TOTAL		235	

Tabla 4: Concentración y calidad de ADN de 15 muestras. Estos parámetros fueron calculados en NanoDrop 2000. Los códigos de las muestras se asignaron de acuerdo a la entrega de la muestra.

No.	Muestra	Concentración de ADN ng/ul	260/280	260/230
1	1145	14	1.39	2.06
2	1211	8	1.18	1.38
3	1441	18.5	0.29	0.24
4	1111	1049	0.33	0.29
5	1134	1276	0.34	0.29
6	1151	811	0.32	0.27
7	1112	918	0.32	0.28
8	1115	767	0.29	0.24
9	2351	605.6	0.35	0.32
10	2425	72.5	0.33	0.22
11	2263	699.5	0.35	0.31
12	3112	42	1.56	1.04
13	3239	30	1.70	2.51
14	3315	502	0.26	0.22
15	3345	129	0.11	0.09

13. FIGURAS.



Orden de carga: 1: Ladder 100pb, 2: Muestra 1454, 3: Muestra 1614, 4: Muestra 1418, 5: Muestra 1444, 6: Muestra 2331, 7: Muestra 2414, 8: Muestra 2535, 9: Muestra 2523, 10: Muestra 1238, 11: Muestra 1152, 12: Muestra 2231, 13: Muestra 1134, 14: Muestra 1345, 15: Muestra 1112, 16: Muestra 11615, 17: Muestra 1237, 18: Muestra 1214, 19: Muestra 2441, 20: Muestra 1142, 21: Muestra 2534, 22: Control negativo

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación del gen de B-actina. El tamaño de banda esperado es 300pb.

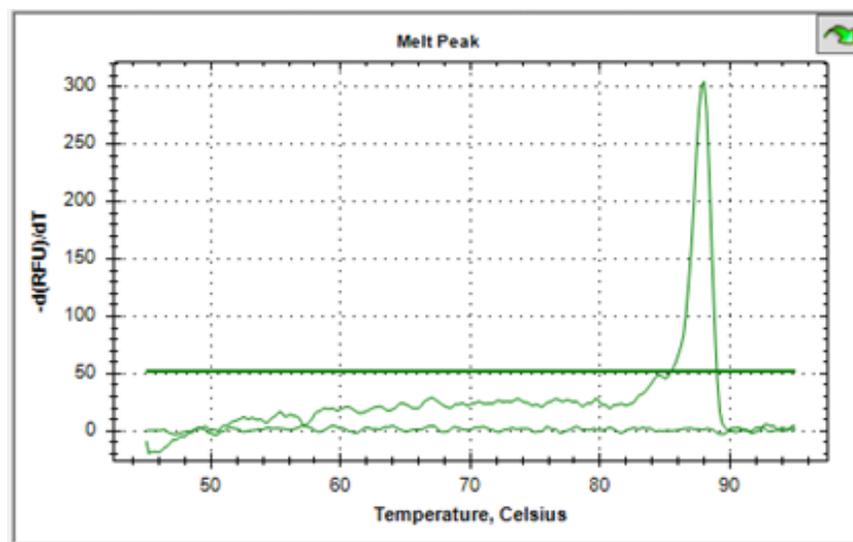


Figura 2: Curva positiva para para el control positivo de *Neisseria gonorrhoeae* en PCR tiempo real.

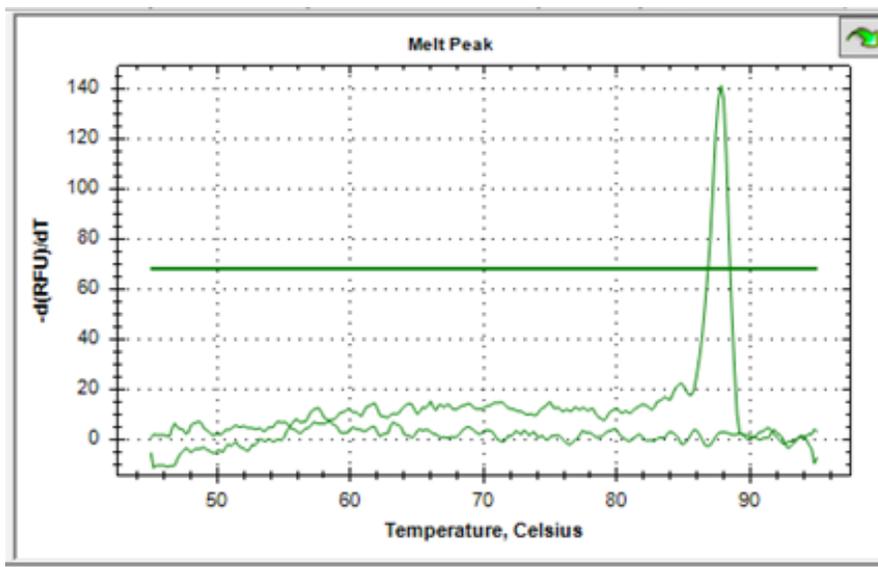
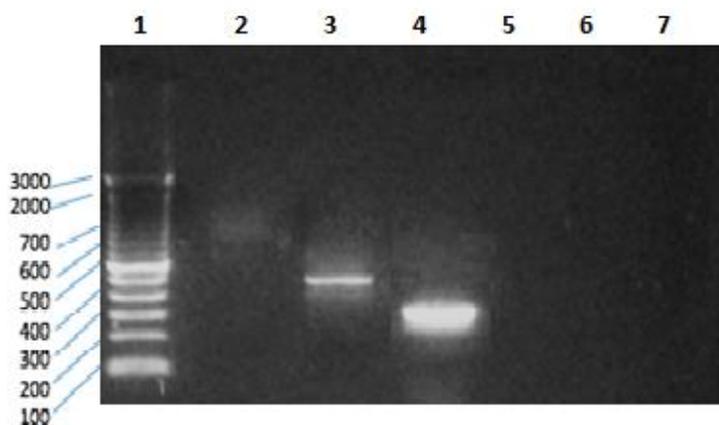


Figura 3: Curva positiva para para el control positivo de *Chlamydia trachomatis* en PCR tiempo real.



Orden de carga: Carril 1: Ladder 100 pb, Carril 2: CT par primers 1, Carril 3: CT par primers 2 (escogidos), Carril 4: NG, Carril 5: Control negativo primers 1 CT, Carril 6: Control negativo primers 2 CT, Carril 7: Control negativo NG.

Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de los controles positivos para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. El tamaño de banda esperado es 402 pb para CT y 260 pb para NG.

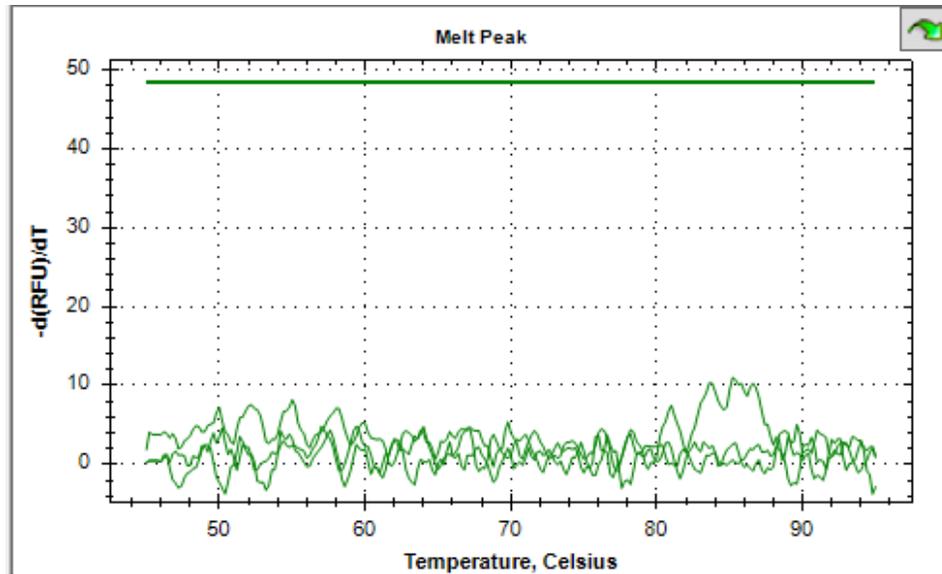
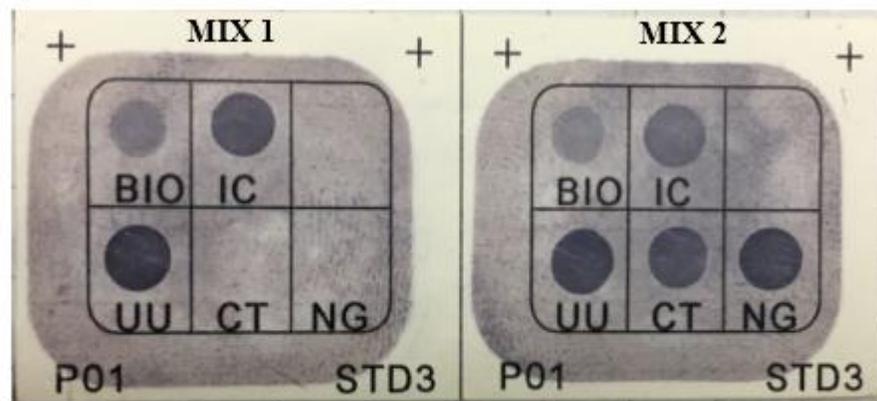


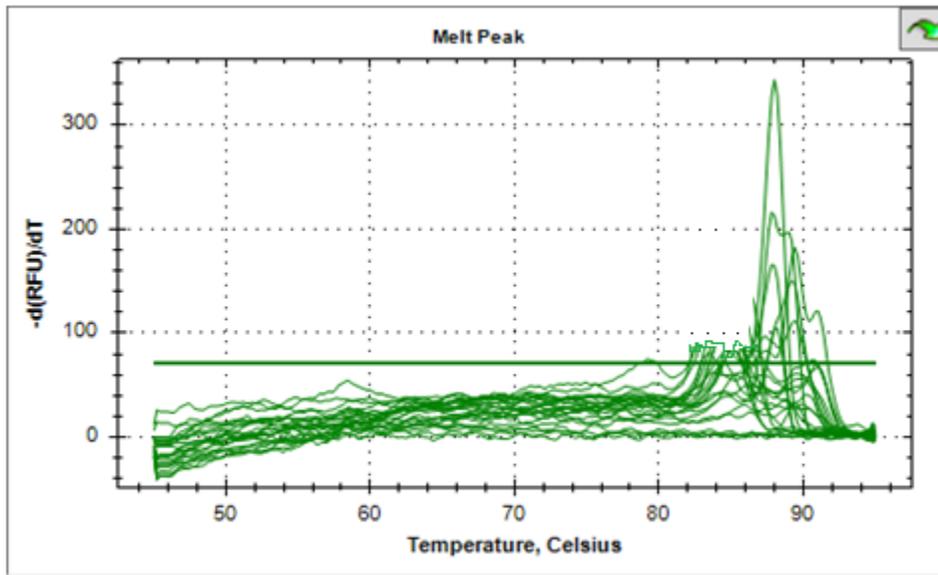
Figura 5: Curvas negativas para los controles negativos en PCR tiempo real, con 4 microorganismos comunes en infecciones de las vías urinarias (*Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Klebsiella*) para corroborar que la amplificación no esté dando valores falsos positivos o cruzados con estos microorganismos.



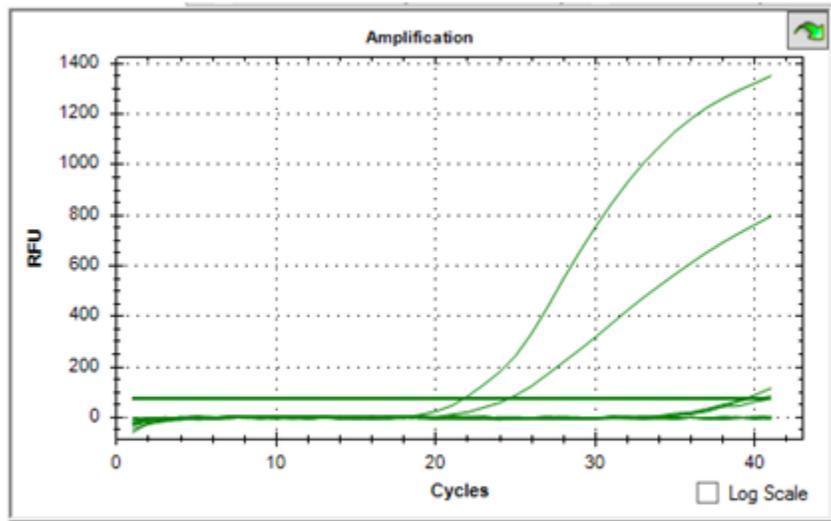
Mix 1: 1111, 2115, 1123, 1151, 1134

Mix 2: Controles Positivos

Figura 6: Resultados de la técnica HybriBio®, protocolo de detección de CT y NG utilizado en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la USFQ realizada con el objetivo de corroborar el estado de los controles positivos y comprobar los resultados que se obtendría en las muestras con la técnica de detección molecular.



7a



7b

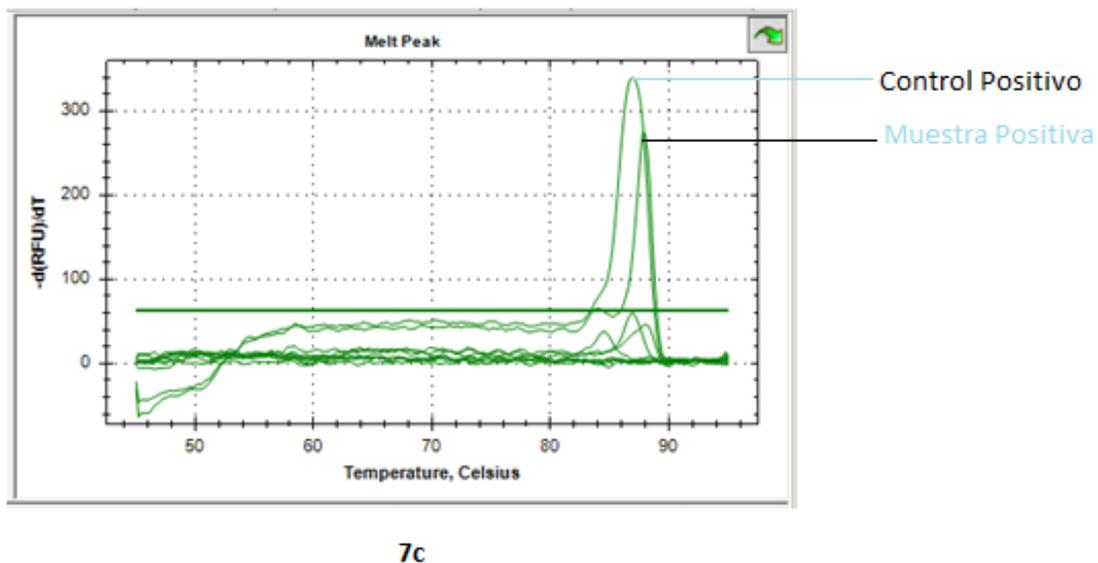


Figura 7: Resultados de PCR tiempo real para detección de *Neisseria gonorrhoeae* de las primeras muestras. a. Curva de fusión b. Ciclos de elevación de las curvas para descartar muestras sospechosas. c. Repetición de las muestras sospechosas

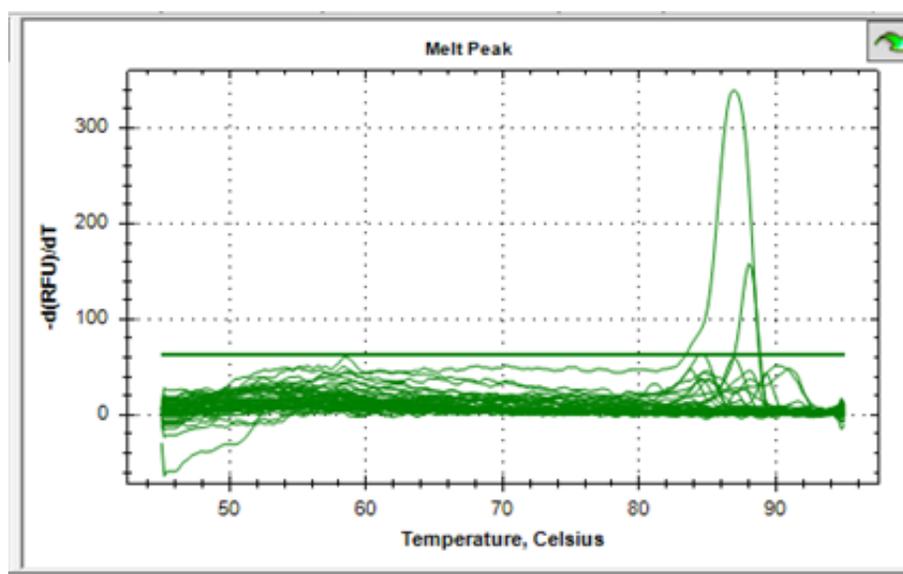


Figura 8: Resultados de PCR tiempo real para detección de *Chlamydia trachomatis* de las primeras muestras. Todas las muestras son negativas. El pico más alto observado corresponde al control positivo.

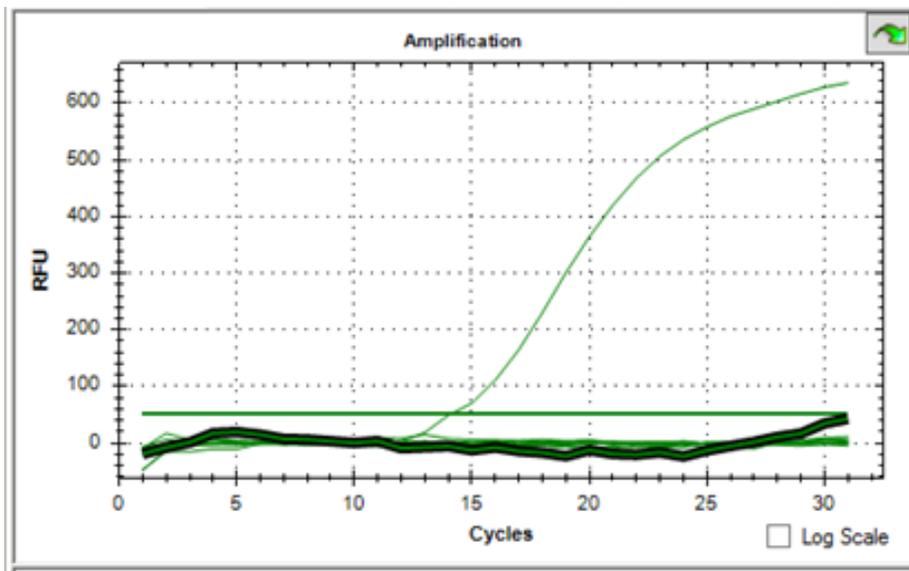
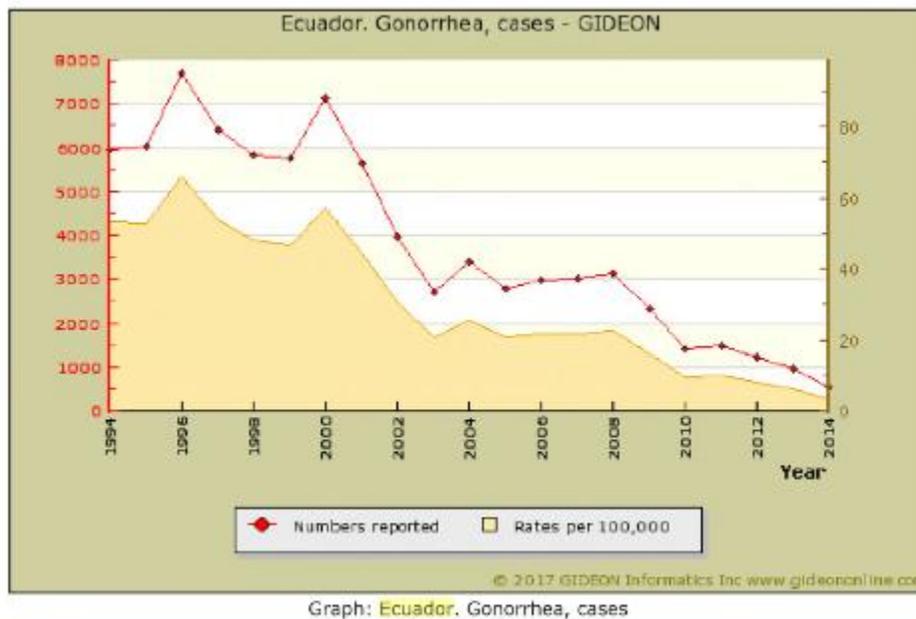


Figura 9: Ciclos de elevación de la curva de fusión para descartar muestras sospechosas para *Chlamydia trachomatis*. La muestra fue descartada como positiva dado que su curva se eleva en el ciclo 29.



Obtenido de: Berger, 2017.

Figura 10: Datos estadísticos para prevalencia de infección por gonorrea durante 20 años, presentados en el libro Enfermedades Infecciosas del Ecuador

14. ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado previo.



Comité de Bioética, Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Formulario Consentimiento Informado

Título de la investigación: Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres asintomáticas menores a 25 años. Estudio piloto

Organización del investigador

Universidad San Francisco de Quito

Nombre del investigador principal

Daniela Fernanda Izurieta Valencia

Datos de localización del investigador principal

Teléfono fijo: 022040138

Celular: 0997254680

dani.izu@hotmail.com

Co-investigadores

Liseth Estefanía Salazar Pérez

Marisol Bahamonde M.D.

Sonia Zapata PhD

Fernanda Loayza, Msc

Ma. Elena Peñaranda, PhD

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Introducción (Se incluye un ejemplo de texto. Debe tomarse en cuenta que el lenguaje que se utilice en este documento no puede ser subjetivo; debe ser lo más claro, conciso y sencillo posible; deben evitarse términos técnicos y en lo posible se los debe reemplazar con una explicación)

Este formulario incluye un resumen del propósito de este estudio. Usted puede hacer todas las preguntas que quiera para entender claramente su participación y despejar sus dudas. Para participar puede tomarse el tiempo que necesite para consultar con su familia y/o amigos si desea o no participar.

Usted ha sido invitado a participar en un investigación cuyos objetivos son determinar la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, en población joven asintomática de

estudiantes universitarias. Los criterios de inclusión de las participantes del estudio serán:

- 1) Mujer con edad entre 18 y 25 años
- 2) Sexualmente activa
- 3) Acepte participar voluntariamente en el estudio (consentimiento informado)
- 4) Registrada en universidad o que se encuentre cursando estudios de educación superior

Los criterios de exclusión serán quienes no cumplan los criterios de inclusión o no otorguen su consentimiento de participación.

Propósito del estudio (incluir una breve descripción del estudio, incluyendo el número de participantes, evitando términos técnicos e incluyendo solo información que el participante necesita conocer para decidirse a participar o no en el estudio)

Estudio epidemiológico para establecer la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra representativa de 400 mujeres universitarias entre 18 y 25 años de una institución de educación superior de la ciudad de Quito.

Descripción de los procedimientos (breve descripción de los pasos a seguir en cada etapa y el tiempo que tomará cada intervención en que participará el sujeto)

Para el estudio se requerirá una muestra de orina de la primera mañana, a la cual se le realizará un análisis molecular para detectar la presencia de los microorganismos *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Riesgos y beneficios (explicar los riesgos para los participantes en detalle, aunque sean mínimos, incluyendo riesgos físicos, emocionales y/o psicológicos a corto y/o largo plazo, detallando cómo el investigador minimizará estos riesgos; incluir además los beneficios tanto para los participantes como para la sociedad, siendo explícito en cuanto a cómo y cuándo recibirán estos beneficios)

Riesgos:

Se debe mencionar que los posibles riesgos son la posible incomodidad del paciente al realizar la recolección de la muestra o durante el llenado de la encuesta respectiva. Para minimizar los riesgos, la participante será debidamente entrenada durante la entrevista para la recolección de una muestra de orina de la primera mañana en un frasco estéril de 20mL. Además, durante la encuesta se realizarán preguntas que considerarán la sensibilidad del caso, para no ocasionar ningún tipo de daño emocional. Asimismo, se mantendrá absoluta confidencialidad de la identidad de los participantes, ya que todos los datos y muestras recolectadas serán codificados.

Beneficios:

Los resultados parciales y completos de relevancia clínica serán reportados a los participantes. De esta manera, de ser necesario, la paciente tomará por su cuenta medidas terapéuticas para evitar problemas relacionados con la infección en cuestión. Al realizar un diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, se previenen las complicaciones médicas de las mismas, así como su transmisión a nuevos sujetos.

Dentro de las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito se desarrollará y realizará una prueba de detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* a menor costo que las disponibles en el

mercado. Al ser este un estudio piloto, se espera que se aplique estudios similares en otros ambientes nacionales, lo cual beneficiará a la población en general al menor costo posible. En definitiva, se creará nueva tecnología para beneficio social. Es necesario resaltar la colaboración del Sustainable Science Institute (SSI) en el desarrollo de la tecnología y difusión de la misma.

Confidencialidad de los datos *(se incluyen algunos ejemplos de texto)*

Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:

- 1) La información que nos proporcione se identificará con un código que reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador tendrán acceso.
- 2) Si se toman muestras de su persona estas muestras serán utilizadas solo para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio.
- 3) Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones.
- 4) El Comité de Bioética de la USFQ podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuando a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio.

Derechos y opciones del participante *(se incluye un ejemplo de texto)*

Usted puede decidir no participar y si decide no participar solo debe decírselo al investigador principal o a la persona que le explica este documento. Además aunque decida participar puede retirarse del estudio cuando lo desee, sin que ello afecte los beneficios de los que goza en este momento.

Usted no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada por participar en este estudio.

Información de contacto

Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor llame al siguiente teléfono 0984631971 que pertenece a Marisol Bahamonde, o envíe un correo electrónico a mbahamonde@usfq.edu.ec

Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. William F. Waters, Presidente del Comité de Bioética de la USFQ, al siguiente correo electrónico: comitebioetica@usfq.edu.ec

Consentimiento informado	
Comprendo mi participación en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación.	
Firma del participante	Fecha
Firma del testigo (si aplica)	Fecha
Nombre del investigador que obtiene el consentimiento informado	
Firma del investigador	Fecha

ANEXO 2: Encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sexuales para mujeres

ENCUESTA DE CONOCIMIENTOS ACTITUDES Y PRÁCTICAS SEXUALES

Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres asintomáticas menores a 25 años. Estudio piloto

La información que se solicita a continuación es estrictamente confidencial y será empleada exclusivamente para establecer la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Solicitamos complete la información de manera verás, por cuanto esto permitirá obtener resultados confiables.

CÓDIGO .

1. Edad: años

2. Edad de la primera menstruación: años

3. Edad del inicio de actividad sexual años.

4. Durante el último mes ¿ha presentado flujo (secreción) vaginal anormal?

4.1 SI 4.2 NO .

5. Durante el último mes ¿ha presentado dolor en la región de la pelvis?

5.1 SI 5.2 NO .

6. Durante el último mes ¿ha presentado molestias al orina?

6.1 SI 6.2 NO .

ACTITUDES Y PRÁCTICAS SEXUALES

7. A qué edad tuvo su primera relación sexual: años

8. Cuantas parejas sexuales ha tenido hasta el momento actual: .

9. Durante su última relación sexual su pareja utilizó preservativo?

9.1 SI 9.2 NO .

10. Durante el último año, ¿ha mantenido relaciones sexuales no seguras (con desconocidos)?

10.1 SI 10.2 NO .

FECHA día/mes/año - - .

ANEXO 3: Encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas sexuales para hombres

ENCUESTA DE CONOCIMIENTOS ACTITUDES Y PRÁCTICAS SEXUALES-HOMBRES

Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en mujeres asintomáticas menores a 25 años. Estudio piloto

La información que se solicita a continuación es estrictamente confidencial y será empleada exclusivamente para establecer la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Solicitamos complete la información de manera verás, por cuanto esto permitirá obtener resultados confiables.

CÓDIGO .

1. Edad: años

2. Edad del inicio de actividad sexual años.

3. Durante el último mes ¿ha presentado flujo (secreción) en pene anormal?

3.1 SI 3.2 NO .

5. Durante el último mes ¿ha presentado molestias al orinar?

5.1 SI 5.2 NO .

ACTITUDES Y PRÁCTICAS SEXUALES

6. A qué edad tuvo su primera relación sexual: años

7. Cuantas parejas sexuales ha tenido hasta el momento actual: .

8. Durante su última relación sexual utilizó preservativo?

8.1 SI 8.2 NO .

9. Durante el último año, ¿ha mantenido relaciones sexuales no seguras (con desconocidos)?

9.1 SI 9.2 NO .

FECHA día/mes/año - - .