

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DETECCIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA (PCR) Y MICROELISA DE
CHLAMYDIA TRACHOMATIS Y/O *NEISSERIA
GONORRHOEAE*, EN MUESTRAS
ENDOCERVICALES DE MUJERES EMBARAZADAS
CON RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS
Y/O PARTO PREMATURO EN LA CIUDAD DE
QUITO.**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.**

ELABORADO POR:

María José Roldán Posso.

SANGOLQUI, 05 de diciembre del 2006

CERTIFICACION

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srita. MARÍA JOSÉ ROLDÁN POSSO como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

Quito, 05 de Diciembre del 2006.

Dr. Edmundo Estévez

Profesor Director

Dr Marcelo Grijalva

Profesor Co-Director

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

María José Roldán Posso

DECANO DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

MsC. Mónica Jadán

SECRETARIA ACADEMICA

Ab. Laura López

Sangolquí, 05 de diciembre del 2006.

DEDICATORIA

A mi madre Sra. Rosa Posso, cuya fuerza, tenacidad y constancia me han enseñando a tener la fortaleza de continuar hacia delante no importa las circunstancias que la vida me presente.

Por enseñarme que no existen límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mi.

Por tu amor, cariño y sobre todo el apoyo incondicional que me ha entregado a lo largo de la carrera mi triunfo es el tuyo madre te quiero mucho

Lo importante en la vida no es el triunfo sino la lucha. Lo esencial no es haber vencido, sino haber luchado bien.
(Barón Pierre de Coubertin).

María José Roldán Posso

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Edmundo Estévez, por brindarme su valioso tiempo.

A mi codirector Dr. Marcelo Grijalva por la colaboración y ayuda prestada.

Al Dr. Enrique Terán Coordinador del Centro de Biomedicina de la Universidad Central de Ecuador, por permitirme ser parte de esta investigación, por su dirección, paciencia, entrega y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de las tesis, pero sobre todo por haber creído en mi y haberse lanzado a la ventura sin conocerme, por ser un gran apoyo y guía.

A mi novio Andrés Prado que ha vivido paso a paso la culminación de esta etapa de mi carrera.

Al Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, que me abrió las puertas incondicionalmente para realizar este gran proyecto, a los miembros que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis principalmente a la Lcda. Marcia Racines, Lcda. Sandra Vivero, cuyas enseñanzas me han servido en la elaboración de este estudio.

Al Biólogo Saúl Escobar puesto que mediante sus experiencias logré enriquecerme con conocimientos necesarios para la culminación de la tesis.

María José Roldán Posso

INDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
CERTIFICACIÓN.....	II
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
LISTADO DE TABLAS.....	IX
LISTADO FIGURAS	X
LISTADO DE CUADROS.....	XI
LISTADO DE ANEXOS.....	XI
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
I MARCO TEÓRICO.....	4
I.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
I.1.1 Microbiología.....	4
I.1.1.1 Fisiología y estructura.....	4
I.1.1.2 Ciclo de Vida.....	8
I.1.2 Antígenos.....	9
I.1.3 Genoma de <i>Chlamydia trachomatis</i>	10
I.1.4 Interacción Huésped-Parásito.....	11
I.1.4.1 Factores de Virulencia.....	11
I.1.5 Epidemiología.....	11

I.1.6 Patogenia e Inmunidad.....	12
I.1.7 Prevalencia	13
I.1.8 Factores de Riesgo para la Infección.....	15
I.1.8.1 Aumento en la transmisión de VIH.....	16
I.1.9 Manifestaciones clínicas en las mujeres.....	16
I.1.9.1 La relación entre la Infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> y las complicaciones obstétricas asociadas a prematuridad.....	16
I.1.9.2 Diagnóstico por infección de <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
I.2 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20
I.3 Diagnóstico Molecular	22
I.3.1 Características Principales.....	22
I.3.1.1 Hibridación por sondas.....	23
I.3.1.2 Indicaciones para el uso de sondas en el laboratorio.....	24
I.3.2 Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR).....	25
I.3.2.1 Características Principales.....	25
I.3.2.2 Elementos de la PCR y optimización.....	25
I.3.2.2.1 Iniciadores.....	26
I.3.2.2.2 ADN polimerasa.....	27
I.3.2.2.3 Substrato (dNTP's).....	27
I.3.2.2.4 MgCl ₂	28
I.3.2.2.5 Buffer y sal.....	28
I.3.2.3 Etapas Principales.....	29
I.3.2.3.1 Desnaturalización.....	29
I.3.2.3.2 Alineación - Unión del Primer al Objetivo.....	29
I.3.2.3.3 Extensión.....	30

I.3.2.4 Aplicación.....	30
I. 3.3 MicroElisa.....	31
I.3.3.1 Principios Básicos.....	31
I.3.3.2 Etapas Principales.....	32
I.3.3.3 Elisa Directo.....	35
I.3.3.4 Tipos de Técnica ELISA.....	36
I.3.3.5 Optimización	36
II: MÉTODOS Y TÉCNICAS	37
II.1 Obtención de la muestra	41
II.2 Extracción de ADN	42
II.2.1 Amplificación del ADN (PCR)	45
II.3 Micro Elisa	46
II.4 Determinación de la densidad óptica.....	48
III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
III.1 Resultados	48
III.2 Discusión	61
Conclusiones.....	66
Recomendaciones.....	70
Bibliografía	72
Anexo 1.....	77

Listado de Tablas

Tabla I.1: Situaciones en las que se recomienda presentar un examen para el diagnóstico de <i>C.trachomatis</i>	15
Tabla I.2: Aplicaciones de la medicina molecular en el estudio y manejo de las enfermedades	22
Tabla III. 1: Hoja de resultados Primer ensayo	51
Tabla III. 2: Hoja de resultados correspondiente al segundo ensayo realizado, AMPLICOR CT/NG, 09/04/2006, 08/11/2006.....	53
Tabla III. 3: Hoja de resultados correspondientes a las 30 primeras muestras, AMPLICOR CT/NG, 09/26/2006.....	55,56
Tabla III. 4: Hoja de resultados correspondientes a las 30 muestras finales, AMPLICOR CT/NG, 10/26/2006.....	59,60

Listado de Figuras

	Páginas
Figura I.1: Cuerpo elemental de <i>Chlamydia trachomatis</i>	5
Figura I.2: Cuerpo reticular de <i>Chlamydia trachomatis</i>	6
Figura I.3: Ciclo de Crecimiento de <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
Figura I.4: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20
Figura I.5: Colonia de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20
Figura I .6: Conjugación del anticuerpo o del antígeno marcado con un Enzima.....	32
Figura I. 7: La unión de anticuerpos o antígenos.....	33
Figura I.8. Formación de complejos.....	34
Figura I.9: Formación del producto coloreado.....	35
Figura II. 1 Colocación del espejo vaginal para la toma de muestra endocervical.....	41
Figura II. 2: Introducción del hisopo en el canal endocervical.....	42
Figura II. 3: Medio M4RT.....	43
Figura II. 4: Retirar los tubos de PCR del termociclador.....	46
Figura III.1: Fotografía correspondiente al primer ensayo realizado.....	50
Figura III.2: Fotografía correspondiente al segundo ensayo realizado.....	52
Figura III.3: Fotografía correspondiente a las 30 primeras muestras.....	55
Figura III.4: Fotografía correspondiente a las 30 muestras finales.....	58
Figura III.5: Colocación del ADN amplificado en los pocillos del gel.....	69
Figura III.6: Detección de ADN amplificado en el gel de azarosa visualizado en la cámara de U.V.....	69

Listado de Cuadros:

Páginas

Cuadro III.1.- Resultado de detección de CT en mujeres embarazadas con APP y/o RPM.....	63
Cuadro III.2.- Resultado de las mujeres embarazadas con APP y/o RPM.....	64
Cuadro III.3.- Muestras positivas para CT relacionadas con la edad.....	65

Listado de Anexo:

Anexo II.1: Hoja de recolección de datos	77
--	-----------

Nomenclatura Utilizada:

ATP: Adenosín tri fostato

ADN: Acido desoxirribonucleico

RNA: Acido ribonucleico.

CE: Cuerpos elementales.

CR: Cuerpos reticulares.

MOMP: Proteína mayor de membrana externa.

LPS: La superficie de lipopolisacáridos

HSP: Proteínas termolábiles.

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.

RPM: Ruptura prematura de membranas.

RPMPt: Ruptura prematura de membranas pretérmino.

APP: Amenaza de parto prematuro.

VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirido.

dNTP´S: Desoxinucleósidos Trifosfato

CT/NG LYS: Solución de lisis.

CT/NG DIL: Solución diluyente.

CT/NG HYB: Solución de hibridación.

AV-HRP: Conjugado.

DN: Solución de desnaturalización.

CT: *Chlamydia trachomatis*.

NG: *Neisseria gonorrhoeae*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ELISA: Procedimiento de ensayo inmunoenzimático.

CBM: Centro de Biomedicina.

OBJETIVOS

Objetivo General del Proyecto:

- Detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae* en muestras de mujeres embarazadas con RPM y/o PP

Objetivos Específicos:

- Utilizar la reacción de cadena de la polimerasa y microELISA de manera simultánea para el diagnóstico in vitro de *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae* en muestras de mujeres embarazadas con RPM y/o APP.
- Fortalecer el laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador

I. MARCO TEÓRICO

1.- *Chlamydia trachomatis*

1.1.- Microbiología.

La *Chlamydia trachomatis* es una bacteria Gram negativa, no móvil y de vida parasitaria intracelular obligada, porque carece de habilidad para sintetizar ATP, son parásitos energéticos, no tienen vida libre y colonizan el citoplasma de las células susceptibles (1).

Existen cuatro especies de Chlamydias; *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* son preferentemente patógenas para el ser humano, mientras *C. psittaci* y *C. pecorum* afectan sobre todo a animales (32). Aunque la *Chlamydia trachomatis* es un microorganismo que se clasifica como bacteria, contiene tanto ADN como RNA, se divide por fisión binaria y sólo crece dentro de las células, como lo hacen los virus (2). Además presentan una morfología esférica u ovalada y se observan como cocos Gram negativos o Gram variables, poseen una membrana interna y otra externa, la cual se asemeja a la pared celular de las Gram negativas (3).

Al parecer su pared carece del ácido N-acetilmurámico, pero contienen ribosomas procariotas. Se desarrolla en la conjuntiva del ojo, en el epitelio de la uretra y cérvix (2).

1.1.1.- Fisiología y estructura:

La *Chlamydia trachomatis* posee dos formas morfológicas distintas: el cuerpo elemental (300-400 nm) y el cuerpo reticular (800-1000 nm).

Los cuerpos elementales (CE) son estructuras redondeadas diminutas infecciosas, rígidas, resistentes a la ruptura como consecuencia de los puentes disulfuro de las proteínas de la capa externa de la membrana (Figura I.1), se liberan cuando se lisa la célula hospedera infectada, con coloración de Giemsa se tiñen de púrpura y de rojo con la tinción de Macchiavello, en contraste con la coloración que toma el citoplasma de la célula huésped (4).

CE son resistentes a los factores ambientales más duros, incluso aunque estas bacterias carecen de capa de peptidoglicanos que se encuentran en la mayoría de las otras bacterias (5), las proteínas de las membranas forman enlaces disulfuros entre los residuos de cisteína.

Las bacterias no se replican en la forma de los CE, pero son infecciosas de dicha forma; es decir se pueden unir a los receptores de las células huéspedes y estimular la captación por las células infectadas (5).

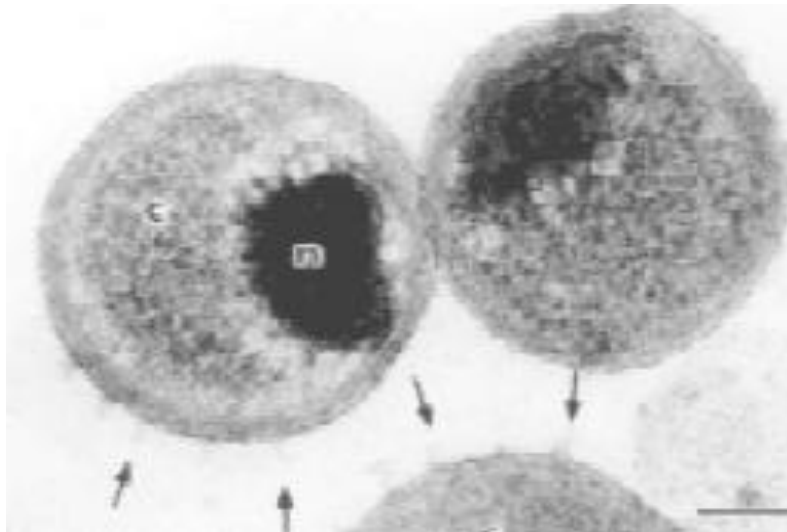


Figura I.1. Cuerpo elemental de *C. trachomatis* (Ostos. O., Mérida. R., 2003, *Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas*, Bogotá D.C., Colombia, 81-93).

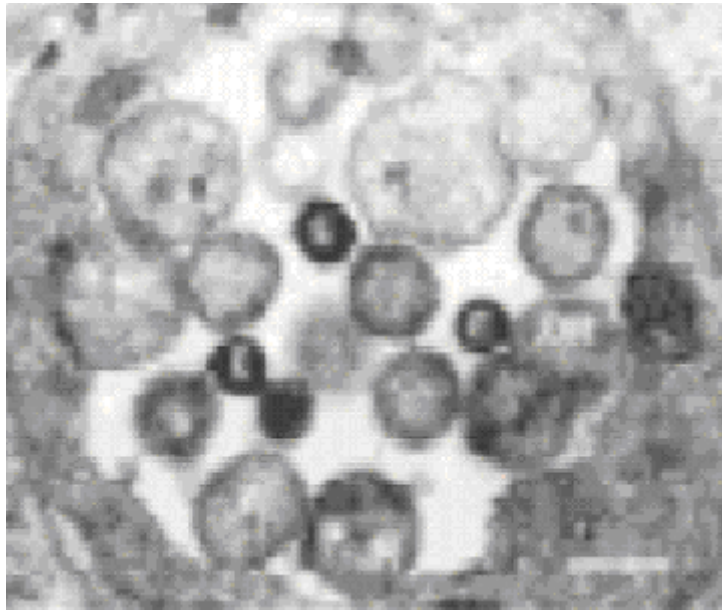


Figura I.2. Cuerpos Reticulares de *C. trachomatis* (Paavonen J. 1998, *Chlamydia trachomatis* infection -from diagnosis to treatment and prevention. Kempers RD et al. Fertility and Reproductive Medicine. Elsevier Science BV; 497509)

En los cuerpos elementales se encuentra ADN y RNA. La mayor parte de ADN se distribuye en el nucleoide central electro denso y la mayor parte del RNA está en los ribosomas.

Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos, que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar y son infectivos (4).

Los cuerpos reticulados (CR) son metabólicamente activos siendo la forma de chlamydia que se replica (8) y son el resultado de la diferenciación de los cuerpos elementales al ser fagocitados, tienen una morfología bacilar, están desprovistos del nucleoide denso y no son infecciosos (Figura I.2). Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse, tienen actividad metabólica y el ADN está disperso (4). Los CR están ausentes de puentes proteicos, esta forma es osmótica frágil; sin embargo, los CR están protegidos por su localización intracelular (5).

La membrana presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los cuerpos elementales para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Los cuerpos reticulares son frágiles en comparación con los cuerpos elementales (6).

En estudios realizados se ha demostrado que en el tratamiento con penicilina en células infectadas muestran inhibición de la división celular pero no del crecimiento de los CR con la aparición de formas Chlamidiales morfológicamente anormales y agrandadas (2).

Las proteínas de la envoltura Chlamidial ricas en cisteína incluyen:

1. MOMP (Proteína mayor de membrana externa), expresada en la envoltura del cuerpo elemental, pesa 40 kDa, constituye casi el 60% del total de las proteínas de la membrana externa y está codificada por el gen omp 1; muestra una función de porina, se glicosila post-traducción; actualmente, se ha visto que juega un rol en la adherencia electrostática y contiene epitopes antigénicos de superficie (8).
2. Proteína de 60 kDa: esta proteína está codificada por el gen omp2. Se encuentra en el espacio periplásmico, dando a las Chlamidias una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Los cuerpos reticulares no contienen la proteína de 60 kDa (7).
3. Proteína de 12-15 kDa: codificada por el gen omp 3, es una lipoproteína hidrofílica. Los cuerpos reticulares no contienen esta proteína.

1.1.2.- Ciclo de Vida

Las *Chlamydias* tienen un ciclo de crecimiento común que consiste en 2 fases principales: la forma Infecciosa de la *Chlamydia* denominado cuerpo elemental; tiene 0.3 micras en diámetro se une al epitelio columnar, probablemente mediante un proceso dependiente de receptor, e ingeridas por las células mediante pinocitosis (4-8). Luego de la ingestión, ocurre la replicación la cual generalmente ocurre entre 48 a 72 horas. A medida que progresa la replicación, las *Chlamydias* se localizan dentro de una estructura llamada cuerpo reticular (CR) un complejo vacuolar dentro del citoplasma celular epitelial. El cuerpo reticular se desarrolla después de 8 a 12 horas de la ingestión del cuerpo elemental. Una célula epitelial puede contener muchos cuerpos reticulares, los cuales pueden ocupar casi todo el espacio citoplasmático (8). Eventualmente, estos procesos inducen ruptura celular con la dispersión de los cuerpos elementales contenidos dentro del cuerpo reticular. La liberación de los cuerpos elementales inicia el proceso de replicación, ya que esta es la forma como se puede infectar nuevas células endoteliales (Figura I.3). El ciclo largo de crecimiento puede explicar por que se requieren prolongados cursos de tratamiento (4).

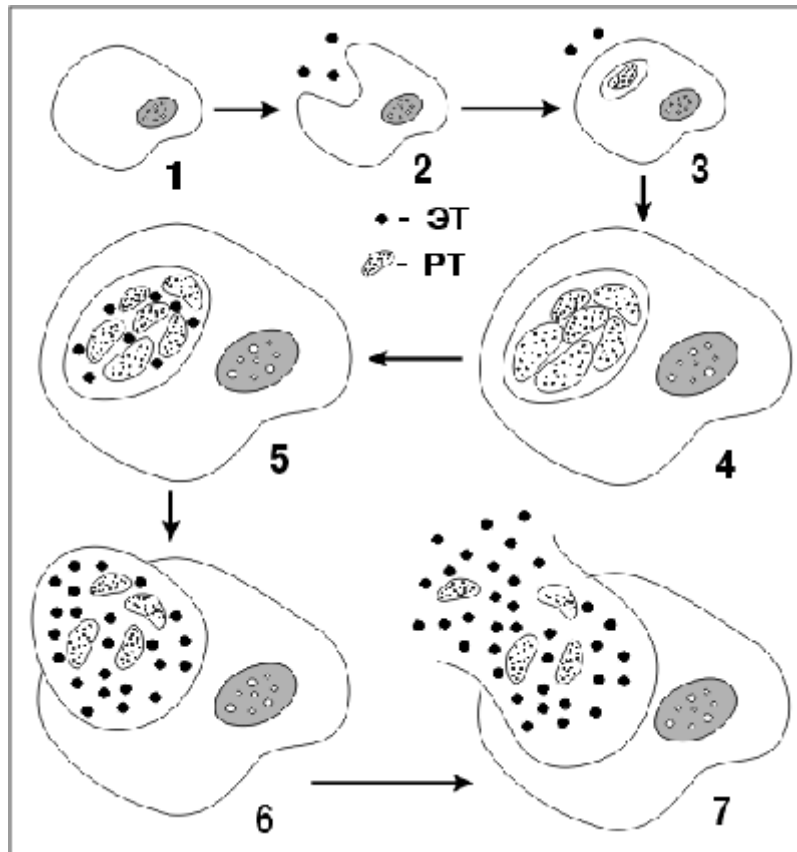


Figura I.3. Ciclo de Crecimiento de *Chlamydia trachomatis*: 1.-Célula Susceptible; 2.-Adhesión de CE, Ingestión; 3.- Reorganización en el CR dentro del fagosoma; 4.- Crecimiento por fisión binaria; 5. Reorganización del CE, inclusión contiene CE y CR; 6.- Liberación de CE de la Chlamydia: continúa la reorganización; 7.- Eliminación de la masa de CE por endocitosis inversa. (Adaptado de Batteiger B, Nones R. *Chlamydial Infections. Infect Dis Clin North Am* 1987; 1: 55-81.)

1.2.-Antígenos

Las *Chlamydias* poseen antígenos específicos lipopolisacáridos termoestables con el ácido 2 -ceto 3 –desoxioctónico. Se pueden detectar anticuerpos a estos antígenos específicos mediante fijación de complemento o inmunofluorescencia. Los antígenos específicos de especie o específicos de variedad serológica son principalmente proteínas de membrana externa (2).

1.3.- Genoma de la *Chlamydia trachomatis*

El genoma de un considerable número de *Chlamydias* ha sido ampliamente estudiado desde 1998 (6). La *Chlamydia* tiene un genoma bacteriano pequeño comparado con el micoplasma. El genoma cromosómico de la *Chlamydia* tiene 1.042.519 pb, (58.7% de A-T) (7). *C. trachomatis* tiene un plásmido críptico de 7,493 pb que no posee la *C. pneumoniae*. Análisis del genoma Chlamydial ha mostrado que codifica para 875 proteínas aproximadamente, que nos son necesariamente expresadas, 70 de las cuales son exclusivas de *Chlamydia .trachomatis*. Es importante anotar que en la región cercana al origen de la replicación del cromosoma Chlamydial es donde existe mayor diversidad genética. Esta región incluye genes que controlan la síntesis del triptófano y su utilización, se ha relacionado con la mediación de interferón gamma en el desarrollo de la infección persistente. Las Chlamydias que se han hallado en el tracto genital humano poseen en esta región un gen homólogo de citotoxinas reportadas en *E.Coli* entero hemorrágica 0157 y *Clostridium*.

El análisis de la transcripción de genes en la infección activa versus la infección persistente sugiere que en la primera fase de la infección activa la energía requerida para el metabolismo es derivada del ATP de la célula huésped. A diferencia de lo que sucede en la infección persistente en donde la fuente primaria de energía no es producida por el huésped (4).

Todos los plásmidos Chlamydiales tienen 22 pares de bases repetidas en tandem en la región intergénica entre ORF1 y ORF8; este grado de conservación sugiere que esta región es extremadamente importante, por ser análogo con el origen de replicación de algunos plásmidos de *E. coli*.

1.4.- Interacción Huésped – Parásito

La característica más notable de la infección por *Chlamydia trachomatis* es el equilibrio que con frecuencia se alcanza entre el huésped y el parásito, y que resulta en una infección prolongada persistente. La propagación de una especie a otra conduce con frecuencia a la enfermedad. El huésped infectado regularmente produce anticuerpos a varios antígenos de *Chlamydia trachomatis* que tienen escaso efecto protector contra la reinfección. Por lo general, el agente infectante persiste en presencia de títulos aumentados de anticuerpos (8).

La infección por *Chlamydia trachomatis* es la enfermedad de transmisión sexual bacteriana más común en el mundo (35).

1.4.1.-Factores de Virulencia

Chlamydia trachomatis se ha clasificado en 18 serotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3, L3a. Esta clasificación está basada en el análisis de la proteína principal de la membrana externa (MOMP).

1.5.- Epidemiología:

La infección causada por *Chlamydia* es una de las enfermedades de transmisión sexual más prevalente. La Organización Mundial de la Salud estimó que en 1995 ocurrieron 89 millones de casos en el mundo y se calcula que el costo por morbilidad y secuelas de esta infección es de \$2.4 billones por año (4).

Las infecciones por *C. trachomatis* se dan en todas las sociedades; en países en desarrollo la enfermedad es mas común entre minorías, grupos socioeconómicos bajos y gente que vive en áreas urbanas. Las mujeres tienen mayor riesgo de ser asintomáticas que los hombres.

Otro problema causado por la infección con *Chlamydia trachomatis* especialmente por el serotipo G es el riesgo de desarrollar cáncer cervical, en los continentes africano y asiático es la principal causa de ceguera.

1.6.- Patogenia e Inmunidad

La pared celular de la *Chlamydia trachomatis* es muy similar al de las bacterias Gram negativas. Treinta al 60 por ciento del peso de la membrana de las *Chlamydia trachomatis* están compuestas por la proteína de membrana protéica mayor.

Varios estudios han indicado que varias porciones de esta proteína son fuertemente conservadas, pero podrían no ser la porción inmunodominante del organismo (8). Trabajos experimentales sobre la patogénesis e inmunidad a la infección por *Chlamydia trachomatis* ha rendido confusión y a menudo resultados contradictorios (8).

En un reporte, la vacunación de ratones con plásmidos que contiene el gen para la proteína de membrana protéica mayor provocó una modesta respuesta inmune pero no protegió contra el replicación vaginal del organismo o mejoró la fertilidad del ratón (9). La MOMP parece servir como una adhesión para la unión a las células epiteliales, quizás a través de los receptores de sulfato de heparina (10).

La superficie de lipopolisacáridos (LPS) y algunas proteínas termolábiles (HSP) se han estudiado, de esta forma la estructura de por lo menos un LPS de la *Chlamydia trachomatis* ha sido determinado (11), y este LPS parece ser importante para disparar la liberación de citoquinas que, a su vez, provoca una respuesta inflamatoria (12).

Se ha determinado la persistencia de proteína de membrana protéica mayor y antígenos de lipopolisacáridos por cuatro semanas in vitro, incluso después de la administración de antibióticos a dosis suficientes para matar los organismos dentro de las células.

La infección de la mucosa induce a una respuesta inflamatoria local que se caracteriza por linfocitos y células mononucleares. Esto puede demostrarse sobre todo en las cervicitis por *Chlamydia* donde la infiltración linfocítica de los tejidos cervicales adyacentes. La liberación de citoquinas por parte de los linfocitos produce la inflamación adicional. El interferón (IFN)-gamma y la molécula de adherencia intercelular (ICAM)-1 ambos parecen jugar un rol en el control de la infección por *Chlamydia trachomatis*.

Sobre la respuesta inmune a la *Chlamydia trachomatis* se han generado gran cantidad de interrogantes, incluyendo si es que se desarrolla o no inmunidad efectiva y si es que la re-infección o respuesta al organismo realmente activa continua inflamación, los datos son confusos y no concluyentes.

1.7.- Prevalencia

La tasa de *Chlamydia trachomatis* es más alta en las mujeres adolescentes (13). Las proporciones más altas están en las mujeres afro-americanas (14 por ciento) y en general fue superior en las mujeres que los hombres. Algunas creen que la disminución en la prevalencia ligado a la edad podría estar relacionada con el desarrollo parcial de la inmunidad a la infección clínica a través de exposiciones repetidas y periódicas así como a los cambios en la conducta.

En el caso del Ecuador, según datos del INEC en el año 2003, se presentaron 18 pacientes de ambos sexos con infección gonocócica ingresados por

complicaciones en diferentes casas de salud en Pichincha, de una total de 21 pacientes registrados en el territorio Ecuatoriano. En cambio de un total de 8 hospitalizados por *Chlamydia trachomatis*, tan solo dos estuvieron hospitalizados (14).

La prevalencia de *C. trachomatis* en diversos estudios varía entre el 3 y el 5 por ciento en mujeres asintomáticas que asisten a clínicas de planificación familiar, aumentando a cifras mayores del 20 por ciento en las clínicas de ETS (15).

En mujeres embarazadas, se han informado prevalencias de entre 2 y 26 por ciento (16), que adquieren importancia cuando se considera que aproximadamente 60 al 70 por ciento de los recién nacidos que atraviesan un canal cervical con *Chlamydia trachomatis*, pueden adquirir la infección durante el nacimiento (16). Uno de cada tres recién nacidos expuestos desarrollan conjuntivitis de inclusión y uno de cada seis puede desarrollar neumonía caracterizada por dificultad respiratoria, en algunos casos requiere de ventilación asistida (17,18). Debido a la relativa dificultad para establecer el diagnóstico de la infección, en razón de que la metodología de laboratorio es técnicamente demandante y costosa, se desconoce el impacto que tienen las infecciones genitales causadas por *Chlamydia trachomatis* en países como Ecuador.

En 1996, se reportaron 490,080 casos al centro para el control de enfermedades cifra que continúa una tendencia al aumento de la incidencia de la infección de *Chlamydia* en Estados Unidos (19). Sin embargo, tanto el aumento de la detección como el de los casos reportados han contribuido a esta tendencia.

A pesar de esta tendencia la verdadera prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* no se conoce, lo que representa un gran problema para evaluar las tendencias.

1.8.- Factores de Riesgo para la Infección

-Los factores de riesgo para la infección por Chlamydia son: raza negra, menores de edad, tener múltiples compañeros sexuales, menor tasa de uso de contraceptivos de barrera e historia de enfermedades de transmisión sexual. A pesar de que estos factores son conocidos, la enfermedad asintomática es común y los modelos empleados diagnostican hasta un tercio de los casos (Tabla I.1).

Tabla I. 1: Situaciones en las que se recomienda presentar un examen para el diagnóstico de *C. trachomatis*

Mujeres no embarazadas o menores de 20 años sexualmente activas:	Con cervicitis mucopurulenta evidenciada en el examen pélvico de rutina.
Mujeres entre 20 y 24 años	Sino utilizan métodos conceptivos de barrera o si tienen una nueva pareja o múltiples parejas en los últimos tres meses.
Mayores de 24 años	Que cumplen con los dos criterios anteriores.
Menores de 25 años	Con nueva pareja sexual. Con más de un compañero sexual. Con parejas sexuales que a su vez tienen múltiples parejas.
Embarzadas o en el tercer trimestre	Con riesgo de infección

1.8.1.- Aumento en la transmisión de VIH

Varias evaluaciones prospectivas de mujeres durante con VIH han documentado una asociación con *Chlamydia trachomatis* (33). Pese a los avances en materia de atención perinatal, tanto en países desarrollados como en los no desarrollados como el Ecuador, la incidencia de parto pretérmino no ha disminuido y se mantiene en orden del 5 al 10% de todos los nacidos vivos (20).

1.9.- Manifestaciones Clínicas en las mujeres

Aunque la mayoría de mujeres con la infección por *Chlamydia trachomatis* son asintomáticas, el rango de las manifestaciones clínicas van desde la cervicitis hasta la enfermedad inflamatoria pélvica.

1.9.1.- La relación entre la Infección por *Chlamydia trachomatis* y las complicaciones obstétricas asociadas a prematuridad.

Aunque existen diferencias poblacionales en cuanto a factores de riesgos implicados y relacionados al parto pretérmino, actualmente la etiología del mismo se la considera multifactorial en su origen pudiendo caer dentro de 4 posibilidades:

- a. Distensión uterina patológica.
- b. La activación del eje-hipotálamo-hipofisario materno o fetal.
- c. Las hemorragias a nivel decidual.
- d. Inflamación sistémica o localizada (probablemente debido a infecciones). (17).

Un número importante de nacimientos pretérminos son consecuencia directa de la ruptura prematura de membranas (RPM) y aunque siendo dos entidades totalmente diferentes actuales estudios indican que están íntimamente

relacionadas ya que la invasión microbiana de la cavidad amniótica se relaciona con el desarrollo de ambas (18).

La Ruptura prematura de membranas (RPM) es una ruptura (apertura) de las membranas (bolsa amniótica) antes de que se inicie el trabajo de parto. Si la RPM ocurre antes de las 37 semanas de gestación, se denomina ruptura prematura de membranas pretérmino (RPMPt). La RPM se produce en aproximadamente el 10 por ciento de todos los embarazos.

En un estudio recientemente se ha determinado que los niveles séricos maternos de citoquinas pro inflamatorias, interleucina-6, interleucina-8 y el factor de necrosis tumoral alfa, se encontraron significativamente más elevados en mujeres con RPMPt y un periodo de latencia < 48 horas en comparación con controles (18). Se ha reportado la asociación entre la infección por *Chlamydia trachomatis*, determinada por serología materna y/o cultivo de secreción endocervical, y resultantes perinatales adversas como la RPMPt, bajo peso al nacer y parto pretérmino. La ruptura prematura de membranas es la segunda complicación más prevalente del embarazo (34). Su incidencia es del 15 %, correspondiente en la mayoría de a embarazos mayores de 34 semanas (80 al 98 % de todos los embarazos con RPM) (34). Las complicaciones más frecuentes son infecciones fetoamniónica con sepsis materna o fetal y todas las consecuencias derivadas de ellas, tanto para la madre como para el recién nacido (34). Con el feto pueden existir anomalías a nivel pulmonar si es antes de las 37 semanas, prolapso del cordón umbilical, partes fetales, mayor compresión de la cabeza (34). La causa de ruptura de membranas puede estar dada por una infección intravaginal, ya que la pared

de algunos microorganismos puede producir colagenasas, mucinasas y proteasas que debilitan el corion y el amnios produciendo su ruptura.

La membrana corioamniótica está constituida básicamente por colágeno, fibronectina y proteoglicanos (34).

Los pocos estudios que han correlacionado las resultantes perinatales adversas antes mencionadas con la infección por *Chlamydia trachomatis* determinada por PCR han sido realizados en mujeres en el primer y segundo trimestre de la gestación o en muestras de vellosidades coriónicas.

A pesar de que en estos estudios la asociación causa-efecto se hace difícil de establecer pues aquellos casos positivos una vez tratadas no significa necesariamente que se establezca una re-infección poco tiempo antes de producir la resultante perinatal adversa. A pesar de esto sus hallazgos indican que el tamizaje de rutina para esta infección parecería estar plenamente justificada.

1.9.2.- Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis*.

Las complicaciones por *Chlamydia trachomatis* en la mujer por orden de aparición son:

- (1) Infección vaginal: al inicio del contacto, portadora asintomática.
- (2) Cervicitis: Inflamación del cuello de la matriz por la infección.
- (3) Endometritis: Infección de la mucosa de la cavidad de la matriz
- (4) Salpingitis: Inflamación de las trompas de Falopio
- (5) Enfermedad Inflamatoria Pélvica: Infección de la cavidad peritoneal y estructuras anexas.

Infección en Niños: *C. trachomatis* es la causa más común de conjuntivitis neonatal y una de las causas más comunes de neumonía en la infancia

temprana. En las mujeres, el diagnóstico se basa en una prueba positiva para *Chlamydia*. Tradicionalmente, el hisopado cervical ha sido la técnica para la obtención de la muestra pero esto requiere un examen pélvico completo. Nuevos métodos diagnóstico pueden utilizar hisopados cervicales, de orina, o hisopados vaginales auto-administrados.

El desarrollo de nuevas técnicas, no invasivas basadas en hisopados endocervicales y en la tecnología del ácido nucleicos producirán expansión importante en las actividades del control debido a la necesidad disminuida de realizar el examen clínico.

Las pruebas diagnósticas más comunes disponibles incluyen:

- El cultivo.- Detecta cuerpos de inclusión en cultivos celulares (*Chlamydia trachomatis* es muy lábil y difícil de cultivar).
- La detección de antígeno (anticuerpo fluorescente directo, ELISA).-Todavía requiere de un hisopado cervical o de uretra. Con una sensibilidad del 80 a 95% comparado al cultivo.
- Los métodos con sondas genéticas (métodos de hibridación).-Basado en muestras tomadas directamente del cérvix o de la uretra. Con una sensibilidad 80 a 95% comparado con el cultivo.
- La amplificación del ácido nucleico.-Dos pruebas actuales incluyen la reacción en cadena del polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa. Con una sensibilidad y especificidad de > 95% para muestras de hisopado directo.
- El Kit de ROCHE AMPLICOR CT/NG es una prueba cualitativa que combina la reacción en cadena de la polimerasa y la técnica ELISA, lo que asegura que los resultados sean más sensibles y específicos razón por lo cuál permite

detectar de manera simultánea *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (32).

2.- *Neisseria gonorrhoeae*

Es un coco Gram-negativo de 0.6 a 1 µm de diámetro (Figura I.4), estos organismos se los encuentra en los leucocitos polimorfonucleares provenientes de los exudados.

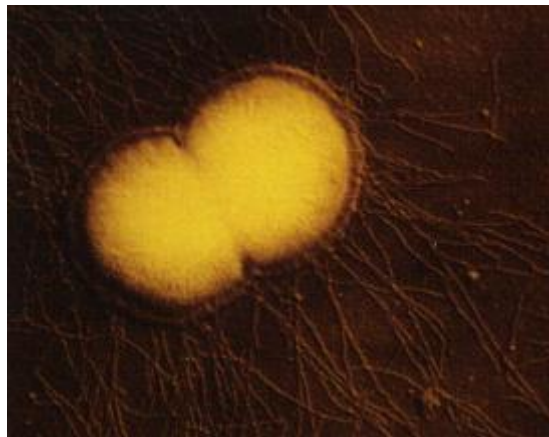


Figura I.4: *Neisseria gonorrhoeae* (Leiderman E, Restrepo A, Robledo R y otros, 1996, Enfermedades Infecciosas, *Neisseria gonorrhoeae*, Quinta Edición, Medellín, Colombia, 484-487).

Las colonias de *N. gonorrhoeae* son de color café claro (Figura I.5), después de las 48 horas de incubación toma un color café oro, esto ocurre por la autólisis de las células.



Figura I.5: Colonia de *Neisseria gonorrhoeae* (Leiderman E, Restrepo A, Robledo R y otros, 1996, Enfermedades Infecciosas, *Neisseria gonorrhoeae*, Quinta Edición, Medellín, Colombia, 484-487).

La especie *Neisseria gonorrhoeae* es el agente causal de la gonorrea. Es altamente sensible a los cambios de temperatura, humedad y pH, por lo que su transmisión requiere un contacto estrecho. *N. gonorrhoeae* puede infectar cualquier mucosa como uretra, endocérvix, faringe, conjuntiva y recto. Tanto la uretritis como la cervicitis gonocócica continúan teniendo una elevada frecuencia. El riesgo de infección gonocócica para una mujer postexposición con un hombre infectado es del 50 a 90%, mientras que el riesgo postexposición en un hombre es de alrededor del 30%; esta probabilidad incrementa con el número de relaciones sexuales.

Cuando la infección ocurre antes de las 12 semanas de gestación se pueden presentar casos de aborto; después de la semana 16 es más común la presencia de corioamnioitis con amenaza de aborto, amenaza de parto pretérmino y ruptura de membranas.

Las formas más graves de infección materna son la perihepatitis y la enfermedad pélvica inflamatoria. (24).

Posterior al parto más de la mitad de los hijos de madres con gonorrea presentan oftalmia neonatorum, que es la forma clínica más común de infección gonocócica de transmisión perinatal (23). El neonato presenta dentro de la primera semana de vida (alrededor del tercer día) acentuada inyección conjuntival, secreción purulenta abundante y edema palpebral (20). En la actualidad son escasos los reportes de pacientes que terminan con ceguera, que fue una de las complicaciones comunes en el pasado. En forma ocasional pueden presentarse manifestaciones sistémicas de infección y en forma tardía pueden presentar artritis.

El diagnóstico además de los datos clínicos debe apoyarse en la realización de frotis y cultivo de la secreción purulenta en el cual deberá (20) buscarse *N. gonorrhoeae* en medio de Thayer-Martin y gelosa chocolate y al mismo tiempo enviar muestra para inmunofluorescencia o ELISA y/o cultivo para *Chlamydia trachomatis*.

3.- Diagnostico Molecular.

3.1.- Características principales.

La aplicación de técnicas de biología molecular en la investigación biomédica (Tabla I.2) ha sido inmensa y sin duda que su aplicación, cada vez más difundida en la actividad clínica, permite vislumbrar un enorme impacto en los fundamentos y en la práctica diaria de la medicina del presente y del futuro (26).

Tabla I.2. Aplicaciones de la medicina molecular en el estudio y manejo de las enfermedades -Cartwright C.P. 1994, Clin Microbiol News; 16:33-40

Identificación de la etiología genética
Estudio de patogenia
Diagnóstico prenatal, pre-mórbido y mórbido
Producción de nuevos agentes terapéuticos
Terapia génica
Desarrollo de la farmacogenética
Prevención

A pesar de que las técnicas diagnósticas de biología molecular son poderosas, simples, se las puede aplicar a gran escala y entregan información muy precisa, la experiencia y los controles de calidad de los laboratorios que las aplican pueden ser muy variadas, la interpretación de los resultados de un análisis molecular en el contexto clínico o epidemiológico puede ser muy

complejo y no siempre existe una relación estricta entre genotipo y fenotipo (24). Por lo tanto se debe ser muy cuidadoso en interpretar los datos moleculares en el contexto global de cada situación clínica particular.

3.1.1.-Hibridación por sondas:

Las sondas son segmentos de ADN o ARN que han sido marcados con enzimas, sustratos antigénicos, quimioluminiscencia o radioisótopos, los que se pueden unir con una alta especificidad a una secuencia complementaria de ácido nucleico. Estas sondas pueden ser dirigidas a un segmento de ADN o ARN seleccionado, que puede tener de veinte a miles de bases de largo.

Las sondas de menos de 50 pares de bases son denominadas oligonucleótidos y pueden ser sintetizadas y purificadas con relativa facilidad por instrumentos comerciales actualmente disponibles. Las sondas de oligonucleótidos tienen la ventaja de hibridar más rápidamente a las moléculas blanco (target) y pueden, bajo ciertas condiciones, detectar el cambio de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico (26).

Existen varias condiciones que afectan el proceso de unión o hibridación entre la sonda y el segmento blanco, como temperatura, concentración de sal y pH de la reacción. Es por esta razón que bajas concentraciones de sal y altas temperaturas permiten que sólo el segmento blanco se una a la sonda, mientras que, por el contrario, si la temperatura de la reacción es baja, segmentos no complementarios pueden unirse a la sonda. Por lo tanto, las condiciones deben ser cuidadosamente controladas para evitar falsos positivos (26).

La detección de la hibridación puede hacerse de varias maneras, dependiendo del método usado para marcar la sonda. Si se usa una enzima, la hibridación se puede visualizar por un cambio de color y si se usa quimioluminiscencia, por emisión de luz (26).

3.1.2.-Indicaciones para el uso de sondas en el laboratorio.

Las pruebas de hibridación a menudo disminuyen el tiempo necesario para identificar organismos fastidiosos. Además, permiten que los laboratorios puedan aumentar el número de patógenos que pueden ser identificados.

En el estudio de costos, debe considerarse que aunque los exámenes que usan sondas son más caros que los métodos tradicionales, el hecho de tener un resultado en un mínimo de tiempo puede significar un ahorro para el paciente y el hospital.

Las sondas pueden ser usadas para detectar microorganismo directamente de una muestra clínica (expectoración, orina, sangre, endocervical) o para confirmar la identificación de un cultivo que por otros métodos tarda varios días (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*). Además, las sondas pueden ser usadas para hibridación in situ para evaluar la respuesta del huésped a un agente infeccioso en particular y también para determinar la extensión de la infección mediante el estudio de muestras de tejidos de varios órganos.

3.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.2.1.-Características principales

La PCR es una técnica que permite la amplificación enzimática in vitro de un segmento de ADN específico (26) imitando así la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN.

3.2.2.- Elementos de la PCR y Optimización:

El ADN es un ácido nucleico, y los ácidos nucleicos se componen de nucleótidos. El ADN existe como dos hebras complementarias en forma de doble hélice (27). La molécula de nucleótido tiene tres partes diferentes: el grupo fosfato y el azúcar, que forman la columna vertebral o estructura en forma de cinta o hebra en la imagen, y la base. Hay cuatro tipos diferentes de bases: A, T, C y G (Adenina, Timina, Citosina y Guanina). Las bases de una hebra se unen a las bases de la otra hebra, y esto da al ADN su estructura estable de doble hélice.

La naturaleza diferente del código del ADN de un organismo depende del orden o secuencia de las bases a lo largo de la cadena de ADN (27).

El ADN debe ser aislado y purificado, si se encuentra contaminado la eficiencia de amplificación en PCR disminuye.

3.2.2.1.-Iniciadores:

Los iniciadores son nucleótidos que constituyen una corta secuencia de la nueva hebra. Los iniciadores están diseñados para ser complementarios de una secuencia conocida que es parte de otra más larga, y así se sabe en qué lugar de las secuencias largas se unirán (o hibridarán) estos iniciadores. Los iniciadores se enganchan a los extremos del segmento de ADN que debe ser copiado. Los iniciadores sirven para dos fines:

- a. Para marcar los extremos del segmento diana, de manera que solamente este segmento será ampliado y no toda la hebra.
- b. Iniciar el proceso de duplicación.

Guías generales para seleccionar los iniciadores:

Los iniciadores deben poseer 20-25 pares de bases (26).

El contenido de GC debe ser del 40% al 60% (27).

La secuencia del iniciador no debe poseer secuencias palindrómicas o repeticiones simples. (27).

Los pares de iniciadores no deben tener secuencias complementarias, para evitar la formación de "primer-dimer" (27).

La concentración de primers debe estar entre 0.2 a 1 μ M.

3.2.2.2.- ADN polimerasa:

La generación de la cadena de ADN complementaria esta dada por acción de la ADN polimerasa. El problema con la técnica surge al aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores por encima de los 70°C para que las dos cadenas de ADN se separen. A estas temperaturas tan elevadas la ADN polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo.

Por este motivo la enzima más usada es la *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya ADN polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario (31). La excesiva cantidad de ADN polimerasa puede dar como resultado un amplificación no específica de los productos del PCR.

Lo recomendable es de 1- 5 unidades (31). Se usa frecuentemente 2 unidades/ 100 µl de reacción (31).

3.2.2.3.-SUBSTRATO (dNTP's)

La concentración de cada dNTP en PCR no debe exceder de 200 µm, está cantidad de substrato es suficiente para sintetizar 12.5 µg de ADN., los cuatro dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP,) deben ser usados de manera proporcional (31), el exceso de nucleótidos inhibe la actividad enzimática, y puede contribuir al apareamiento de falsos productos (31).

3.2.2.4.-MgCl₂

El ion magnesio es requerido como cofactor para la ADN polimerasa y su concentración puede afectar (31):

- Alineación del iniciador (primer).
- Temperatura de disociación del templado y producto.
- Productos específicos.
- Formación de "primer-dimer".

3.2.2.5.-Buffer y sal:

El buffer estándar del PCR es el Tris-HCL en cantidades de 10 a 50 mM, el PH debe estar entre 8-9 (31). Las sales usadas en la mayoría de las reacciones son de potasio o de sodio. Y usualmente se añade para facilitar la alineación del primer (31).

La PCR consiste de un número de ciclos cambios de temperatura que producen:

- Separación de las hebras de ADN.
- Unión del oligonucleótido (partidor o primer) al segmento ADN.
- Extensión que permite a la ADN polimerasa sintetizar el resto de la hebra complementaria.

3.2.3.- Etapas principales

Hay tres pasos importantes en un PCR, que se repiten en un número de ciclos determinado (30-40 ciclos). Esto se hace en un termociclador, que es un aparato que puede calentar y enfriar los tubos con la mezcla de reacción en un tiempo muy corto. (37).

3.2.3.1.-Desnaturalización:

Desnaturación por calor (usualmente mayor o igual 90 ° C) separa la doble hebra de DNA en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos (37).

3.2.3.2.-Alineación - Unión del Primer al Objetivo.

Los primers son secuencias sintéticas cortas de DNA de una sola hebra que consisten de 20-30 bases. Son específicos y delimitan la región objetivo del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos primers en la reacción de la PCR, cada uno complementario de una de las hebras de DNA que se separaron durante la desnaturalización (31). Este proceso se lleva a cabo entre 40°C y 65°C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los partidores. Esto permite la unión específica de los partidores a su hebra complementaria.

3.2.3.3.-Extensión.

Una vez que los partidores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72°C y la enzima *Taq* DNA polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA (31). La *Taq* polimerasa comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA.

Al final del primer ciclo de la PCR, hay dos dobles hebras de DNA idénticas a la original, cada nueva hebra producida se denomina **AMPLICIÓN (31)**.

3.2.4.- Aplicación.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos (36).

Detección de mutaciones: La técnica de PCR nos permite localizar mutaciones previamente descritas. Se emplea así en la secuenciación de ADN como un método de diagnóstico (36).

Diagnóstico prenatal/Diagnóstico preimplantación: Diagnóstico de [enfermedades](#) hereditarias o determinación del [sexo](#) del feto previamente a su implantación en procesos de [fecundación](#) in Vitro.

Secuenciación de ADNs fósiles.

Identificación de especies y [Control](#) de cruzas entre [animales](#): Mediante **ADN mitocondrial** el cual presenta secuencias altamente [variables](#) entre especies distintas, aunque sean cercanas entre sí, y bastante conservadas dentro de la misma especie.

3.3.- MicroELISA

3.3.1.- Principios Básicos

Procedimientos Generales de la Técnica Elisa:

Dispensar muestras.

Dispensar conjugados.

Incubar a 37° C o a temperatura ambiente.

Lavar los pocillos.

Dispensar cromógeno –sustrato.

Incubar a 37° C o a temperatura ambiente.

Dispensar solución de parada.

Leer en un lector de placas ELISA.

3.3.2.- Etapas Principales

Comprenden 4 etapas y son las siguientes:

Conjugación del anticuerpo o del antígeno marcado con un enzima (Figura I.6) (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (38).

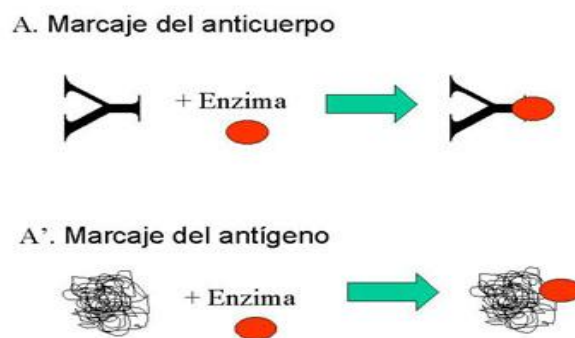


Figura I.6: Conjugación del anticuerpo o del antígeno marcado con un enzima; Crowther, J.(1995), Métodos moleculares: ELISA 1-107

Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos (Figura I.7) se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas (38).

B. Unión del anticuerpo o del antígeno a la fase sólida

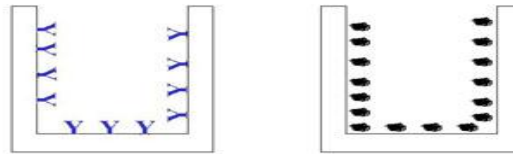


Figura I.7: La unión de anticuerpos o antígenos; Crowther, J.(1995), Métodos moleculares: ELISA 1-107

Formación de una o más capas de inmunocomplejos (38). En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto).

En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado.

Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado (Figura I.8). Es el ensayo de competición del antígeno (38).

C. Se forman una o más capas de complejos inmunes sobre la fase sólida

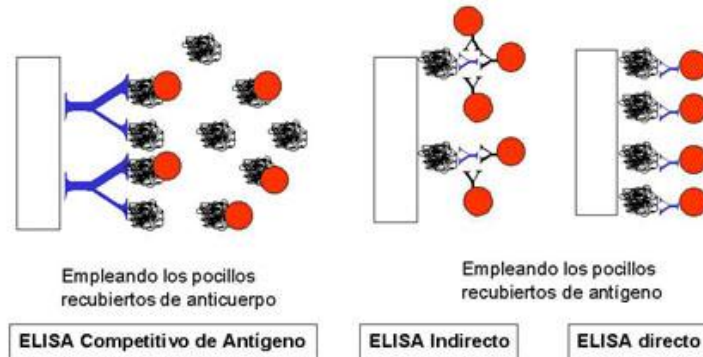


Figura I.8: Formación de complejos; Crowther, J.(1995), Métodos moleculares:

ELISA 1-107

Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución (Figura I.9). Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría (38).

D. Reacción entre el enzima fijado y el sustrato forma un producto coloreado que se mide por espectrofotometría



Figura I.9: Formación del producto coloreado: Crowther, J.(1995), Métodos moleculares: ELISA 1-107

3.3.3.-ELISA Directo:

- Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados (38).
- Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado (38).
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

3.3.4.-Tipos de Técnica ELISA

Técnicas cualitativas:

Indican la ausencia ó presencia de un antígeno o anticuerpo determinando. Los kits incluyen controles positivos y negativos para determinar esta presencia o ausencia de antígenos (38).

Técnicas cuantitativas:

Indican la cantidad de antígeno ó anticuerpo presente en la muestra. Los kits incluyen +/-6 estándares con los cuales se realiza una curva para así poder determinar la concentración de la muestra.

Técnicas semi-cuantitativas:

Proporcionan indicio de la cantidad de antígeno ó anticuerpo presente en la muestra con la utilización de un estándar ó calibrador

3.3.5.-.- Optimización.

Optimización de la elección de la superficie de la placa; ya que del material de la superficie de la placa depende mucho la inmovilización del antígeno/anticuerpo, la mayoría de las proteínas poseen afinidad con las superficies de plástico, probablemente por el resultado de la interacción hidrofóbica (38). En la proteína no polar y la matriz de plástico. Esto depende de factores como temperatura (38), tiempo de absorción, concentración del sustrato (absorbido). Deben estar en una concentración de $-10 \mu\text{g/ml}$ de proteína en un volumen de $50 \mu\text{l}$.

Optimización del tapizado de la placa con la proteína/anticuerpo de interés.

Optimización del paso de bloqueo de los sitios de unión inespecíficos.

Optimización de los pasos de lavado para la eliminación de las uniones inespecíficas (38), se debe golpear fuertemente una sola vez tratando de no dejar burbujas en el interior.

Optimización del método de detección: colorimetría, luminiscencia marcados que no hayan reaccionado (38), por el hecho de ser estable durante unas pocas horas. El color puede ser afectado por diversos parámetros: la composición del buffer y pH, concentración del sustrato – cofactor y estabilidad, temperatura de reacción, estabilidad del producto y la enzima (38).

II. MÉTODOS Y TÉCNICAS

Diseño General:

Descriptivo en 60 mujeres embarazadas el cual se realizará a partir de muestras endocervicales y/o parto prematuro. Mediante un muestreo de tipo aleatorio simple.

Obtención de la muestra

Criterios de inclusión

1. Pacientes de cualquier edad con una gestación < 37 semanas, y producto vivo (único o doble).
2. Con o sin leucorrea sugestiva de infección por Chlamydia Trachomatis y/o Neisseria Gonorrea.
3. Diagnóstico clínico de amenaza de parto pretérmino.

4. Ruptura prematura de membranas (evidenciable clínica o ecográficamente. Anexo 1: Hoja de Recolección de datos

AMPLICOR CT/NG test cualitativo

La prueba AMPLICOR *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* es una prueba de detección in Vitro cualitativa en muestras endocervicales de mujeres, torundas uretrales de varones, orina de mujeres y varones. Esta prueba utiliza la amplificación e hibridación del ácido nucleico mediante PCR.

Principios del Ensayo:

La prueba se basa en cuatro procesos principales:

- Obtención y preparación de las muestras.
- Amplificación de ADN objetivo por PCR, con iniciadores biotinados.
- Hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleótidas específicas para el/los objetivos/s.
- Detección por colorimetría de los productos amplificados y unidos a las sondas (ELISA).

La prueba AMPLICOR es un ensayo múltiple que permite la amplificación simultánea del ADN objetivo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y del ADN del control interno (32).

El master mix contiene primers biotinados específicos para *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y el control interno.

Preparación de las muestras:

Las células epiteliales, los leucocitos y las células de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* asociadas, obtenidas son tratadas con una solución detergente para liberar el ADN de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria*

gonorrhoeae contenido en los cuerpos reticulares, y la segunda solución detergente lisa la muestra para la amplificación.

Amplificación por PCR:

Amplificación objetivo:

Chlamydia trachomatis además de un ADN cromosómico contiene un plásmido críptico de 7.500 pares de bases, común a todas las variedades serológicas de *Chlamydia trachomatis* (32). La prueba utiliza los iniciadores CP24 y CP27 para definir una secuencia de 207 nucleótidos dentro del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y para *Neisseria gonorrhoeae* utiliza los iniciadores SS01 y SS02 para definir una secuencia de 201 nucleótidos dentro del gen de citosina ADN metiltransferasa. (32).

Una vez preparados las muestras, se añade la mezcla de amplificación en los tubos para PCR, el termociclador calienta la mezcla de reacción y desnaturaliza la doble hélice del ADN y exponer así las secuencias objetivo a los iniciadores .Al enfriarse la mezcla los iniciadores biotinados CP24 y CP27 se hibridan con ADN objetivo de *Chlamydia trachomatis* y los iniciadores biotinados SS01 y SS02 se hibridan con ADN objetivo de *Neisseria gonorrhoeae* en presencia de dNTP's y más la acción de la ADN polimerasa extiende los iniciadores a lo largo de la plantilla objetivo para sintetizar una secuencia complementaria de ADN llamada AMPLICON(32).

Amplificación del control interno:

En los procesos de amplificación con base enzimática la PCR puede verse disminuida por inhibidores que pueden estar presentes en la muestra clínica. El

control interno es un ADN plásmido con: regiones de unión a los iniciadores idénticas a las de la secuencia objetivo de *Chlamydia trachomatis*, secuencia interna aleatoria de composición y longitud similares a las de la secuencia objetivo *Chlamydia trachomatis* y una región exclusiva a las sondas de unión que diferencia el control interno de CT/NG del amplicón objetivo. El mismo que se introduce a cada reacción de amplificación (32).

Amplificación selectiva:

El uso de la enzima Amperasa; uracil-N-glucosidasa y trifosfato de desoxiuridina, permite una amplificación selectiva (32).

La enzima reconoce, cataliza la destrucción de las cadenas que contienen desoxiuridina, pero no las cadenas de ADN que contienen desoxitimidina. La desoxiuridina no está presente en el ADN natural, pero siempre está presente en el amplicón (32).

Reacción de hibridación:

Luego de la PCR, el amplicón se desnaturaliza hasta formar un ADN monocatenario. Se transfieren alícuotas de la mezcla a los pocillos de la microplaca de ELISA; que contiene sondas oligonucléotidas (CP35, SS06T5 Y SK535 respectivamente) específicas en cada placa para CT/NG y CI, las mismas que se hibridan (32).

Reacción de detección:

Se lava la placa y se añade el conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante, se une al amplicón marcado con biotina unida a la microplaca (32).

Se añade TMB para eliminar el conjugado no unido y se forma un complejo coloreado, se añade un ácido débil para detener la reacción y determinar la absorbancia.

1. Obtención de la muestra:

- Obtener consentimiento verbal del la paciente, indicarle cual es el objetivo del estudio y que beneficios tiene. Solo a pacientes con diagnóstico estricto de inclusión.
- Colocar un espejo y visualizar el cerviz, se debe usar el medio M4RT, el cuál viene provisto de dos hisopos con el primer hisopo se elimina todas las secreciones y descargas del canal cervical. (Figura I I.1)



Figura II.1: Colocación del espejo vaginal para la toma de muestra endocervical

- Introducir el segundo hisopo de en el canal endocervical. (Figura I I.2)



Figura II.2: Introducción del hisopo en el canal endocervical.

- Extraer el hisopo sin que toque ninguna superficie vaginal e introducirlo en el tubo con el medio de transporte.

2.- Extracción ADN.

Torundas recogidas en medios para transporte de cultivos

- Las muestras endocervicales o uretrales pueden recogerse y transportarse en medio para transporte de cultivos 2-SP, medio para transporte de clamidias ChlamTrans (Bartels, Inc.) o medio para transporte de cultivos M4 (MicroTest, Inc.). (Figura II.3)



Figura II.3: Medio M4RT

- Es preciso dejar las torundas en el medio de transporte.
- Estas pueden conservarse de 2 a 8° C durante un máximo de 7 días a contar desde la fecha de recogida, o a -70° C durante un período máximo de 2 meses.
- Dejar que los reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente
- Registrar las localizaciones de los especimenes en una cartilla de trabajo. Determinar el número correcto de tubos necesarios de 2,0 mL.
- Pipetear **100 µL** de **CT/NG Lysis Buffer** a cada tubo.
- Si se guardaron congeladas las muestras descongélelas a temperatura ambiente antes de someterlas al vórtex.
- Pipetear **100 µL** de la muestra bien mezclado en vórtex al apropiado tubo empleando un tip de pipeta suficientemente largo. Tapar y mezclar bien en el vórtex.
- Incubar a temperatura ambiente por **10 minutos**. Pipetear **200 µL de CT/NG DIL** a cada tubo empleando un nuevo tip para cada muestra.
- Tapar y mezclar bien en el vórtex.

- Incubar a temperatura ambiente por **10 minutos**. **Las muestras hasta aquí procesadas pueden ser guardadas por 2 horas a temperatura ambiente ó 1 semana entre 2 - 8 ° C.**
- Pipetear **50 µL de las muestras preparadas** y los controles procesados a los tubos MicroAmp apropiados que contienen la Mezcla Maestra.
- Tapar los tubos y llevarlos a la zona de Post-PCR para la amplificación. Estas muestras pueden ser conservadas hasta 16 horas de 2 - 8 °C. **No olvidar cambiarse de mandil.**

Preparación de los controles de trabajo:

CT:

- a) Etiquetar un tubo de 2 mL como **Control CT de Trabajo**.
- b) Pipetear **1000 µL de CT/NG Specimen Diluent** al tubo.
- c) Pipetear **100 µL de Control (+) CT** bien mezclado en vórtex al tubo.
- d) Tapar y volver a mezclar en vórtex.

NG:

- a) Etiquetar un tubo de 2 mL como **Control NG de Trabajo**.
- b) Pipetear **1000 µL de CT/NG Specimen Diluent** al tubo.
- c) Pipetear **100 µL de Control (+) NG** bien mezclado en vórtex al tubo.
- d) Tapar y volver a mezclar en vórtex.

Preparación de los controles procesados:

Control Procesado de CTM para CT:

- a) Etiquetar un tubo de 2 mL como **Control CT de CTM**.
- b) Pipetear **100 µL de CT/NG Lysis Buffer** al tubo.
- c) Pipetear **100 µL del medio M4RT (CTM)** al tubo.

d) Pipetear **200 µL** de **Control (+) CT de Trabajo** bien mezclado en vórtex al tubo.

e) Tapar y volver a mezclar en vórtex. Incubar por **10 minutos** a **temperatura ambiente**. Conserve a temp. Ambiente hasta 8h.

Control Procesado de CTM para NG:

a) Etiquetar un tubo de 2 mL como **Control NG de CTM**.

b) Pipetear **100 µL** de **CT/NG Lysis Buffer** al tubo.

c) Pipetear **100 µL** del medio M4RT (CTM) al tubo.

d) Pipetear **200 µL** de **Control (+) NG de Trabajo** bien mezclado en vórtex al tubo.

e) Tapar y volver a mezclar en vórtex. Incubar por **10 minutos** a **temperatura ambiente**. **Conserve a temperatura ambiente hasta 8 h.**

Lleve las muestras y controles ya preparados al área Post-PCR. Se pueden conservar hasta 16 h a 2-8° C.

Determinar el número de tubos MicroAmp necesarios para realizar una carga de trabajo. Colocar los tubos en la gradilla

2.1.- Amplificación del ADN (PCR).

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA MAESTRA:

- Añadir **100 µL** de **Internal Control (IC)** mezclado en vórtex a un vial de la Mezcla Maestra CT/NG (**CT/NG MMx**).
- Mezclar por inversión (**10 a 15 veces**). La cantidad es suficiente para 32 determinaciones. Los amplicones son estables durante 4 semanas almacenadas de 2 ° C a 8 ° C.

- Añadir **50 µL** de la **Mezcla Maestra de Trabajo** a c/tubo utilizando una pipeta de repetición con una punta de 1,25mL o bien utilizar una micropipeta y puntas con filtro.

No tape los tubos aún (50 µl de muestra o control más 50 µl de MMX).

- Colocar la gradilla con los tubos MicroAmp **DESTAPADOS** dentro de una bolsa resellable de plástico y en otra las respectivas tapas. Registrar el número de lote del reactivo en la cartilla de trabajo.
- Llevar la gradilla a la zona de preparación de las muestras. Almacenar de 2 - 8°C hasta su uso. Estables hasta 48 h.

3.- Micro-Elisa.

- Retirar la gradilla del termociclador y colocarla en la base. Retirar con cuidado las tapas de los tubos evitando la formación de aerosoles (Figura II.4).



Figura II.4: Retirar los tubos de PCR del termociclador

- Añadir de inmediato **100 µL** de la **Solución de Desnaturalización (DN)** a los tubos empleando una pipeta con puntas con filtro. Mezclar 5 veces con pipeteo arriba y abajo. Incubar por **10 minutos** a temperatura ambiente. Estabilidad: 2h a temperatura ambiente / una semana 2-8° C.
- Preparar la **Solución de Lavado** añadiendo 1 volumen de la solución concentrada (**10X**) (si la solución de lavado presentara cristales, calentar a **37 °C**) a 9 volúmenes de agua destilada ó desionizada. Transferir la solución de trabajo al reservorio del lavador.
- Permitir que el plato (**CT, NG, IC**) llegue a temperatura ambiente antes de sacarlo de la bolsa de aluminio.
- Sacar el número adecuado de tiras de la bolsa y guardar las restantes en la misma bolsa. Sellar la bolsa. Añada **100 µL** de la **Solución de Hibridación (CT/NG HYB)** a cada pocillo que se vaya a utilizar.

Añadir **25 µL** de los amplicones desnaturalizados a los pocillos apropiados del plato. Agitar con suavidad hasta que aparezca un color amarillo.

- Cubrir el plato. Incube por **1 hora a 37°C**.
Lavar el plato cinco veces con la solución de lavado diluida.
 - a) Aspirar contenido.
 - b) Añadir 250-300 µl de solución de Lavado
 - c) 30 segundos de reposo y aspirar nuevamente el contenido. Repetir el paso b cuatro veces.
 - d) Remover el exceso de Solución de Lavado con golpes suaves del plato en papel toalla.
- Añadir **100 µL** del **Conjugado (AV-HRP)** a cada pocillo.

- Cubrir el plato. Incube por **15 min.** a **37°C**.
- Preparar el sustrato de trabajo mezclando **2 mL** del sustrato A (**4A**) **SUB A** y **0,5 mL** del Sustrato B (**4B**) **SUB B** por cada dos tiras del plato (16 pruebas). Almacenar protegido de la luz. No más de 3h antes de usar.
- Lavar el plato 5 veces con solución de lavado diluida como y repita el proceso de lavado.
- Añadir **100 µL** de **Sustrato de trabajo** a cada pocillo. Permitir que se desarrolle el color por **10 minutos** a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Añadir **100 µL** de la **Solución de Detención (Stop)** a cada pocillo.

4.- Determinación de la densidad óptica.

Determinar la densidad óptica a **450 nm** dentro de los **60 minutos** siguientes a la adición de la solución de detención. Registrar el valor de la absorbancia de cada muestra y control procesado (32).

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

RESULTADOS

Capacitación en el Manejo y Aplicación AMPLICOR *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* CT/NG Test.

Primero en un curso de 16 horas realizado en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil gracias al auspicio del Centro de Biomedicina del Universidad Central del Ecuador, fui entrenada para el manejo y aplicación de AMPLICOR CT/NG, por la División Diagnóstica de ROCHE Ecuador.

Implementación de la técnica AMPLICOR ROCHE CT/NG en el Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.

Se adecuó una área del CBM para que cumpla con las normas básicas para realizar trabajo en biología molecular: zona de pre y post amplificación; para evitar la contaminación cruzada de los productos amplificados, además se equipó el laboratorio con los materiales; puntas con filtro, pipetas de 100 µl, 200 µl y 1000 µl, vórtex, eppendorf de 2 ml, tubos MicroAmp, y equipos; PCR System 2400 GeneAmp de Applied Biosystems (kit validado con este termociclador), incubadora 37 ° C, congelador -80 ° C para conservar la muestra y refrigeradora para conservar los reactivos del kit en buen estado.

Al inicio utilizamos el termociclador Techne Gene; equipo no validado con el Kit, el cual posee la placa térmica en la base y no en la tapa razón por la cuál debíamos adicionar aceite mineral para evitar que la muestra se evapore, lo que ocasionó problemas con la muestra.

Razón por la cuál el CBM adquirió el Perkin Elmer 2400; modelo GeneAmp de Applied Biosystems.

Además, debido a que la posibilidad de obtener muestras endocervicales de las mujeres con los criterios de inclusión propuesto no era muy alta, se cambió el medio de transporte STM puesto que debía ser analizado en un plazo de 10 días, por el medio Micro test-M4RT el mismo que es un medio líquido que se recomienda en procedimientos cualitativos para el transporte de la muestra y posee un período máximo de conservación a -80°C durante 2 meses.

En el primer ensayo, realizado en el CBM, con los reactivos y muestras (orina) transportadas desde Guayaquil, desafortunadamente no se obtuvo buenos resultados. (Figura III.1 y Tabla III.1)

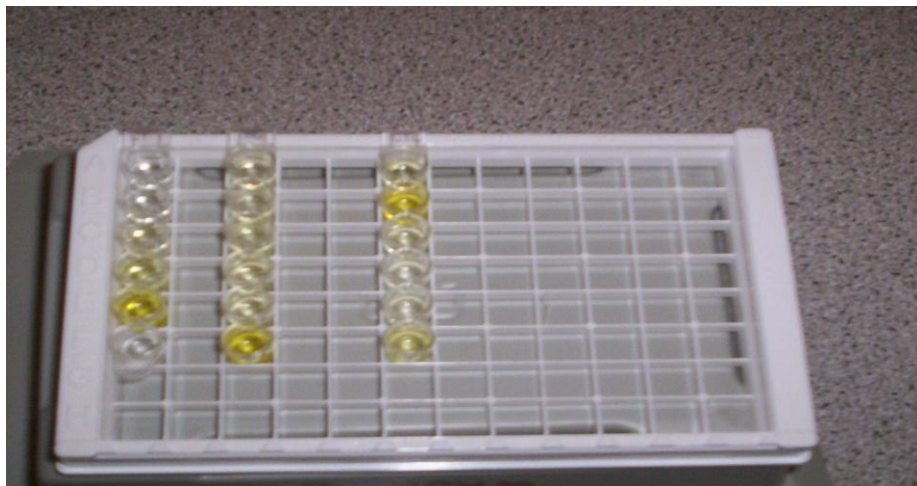


Figura III. 1: Fotografía correspondiente al primer ensayo realizado.

En el segundo intento con el termociclador adecuado y el Kit de AMPLICOR de CT/NG en el CBM, se realizó un ensayo que aparentemente arrojó buenos resultados, sin embargo, al analizar los mismos se encontró que el control positivo y negativo para *Neisseria gonorrhoeae* no fueron válidos y por tal motivo se decidió repetir una vez más todo el procedimiento. (Figura 2 y Tabla 2).

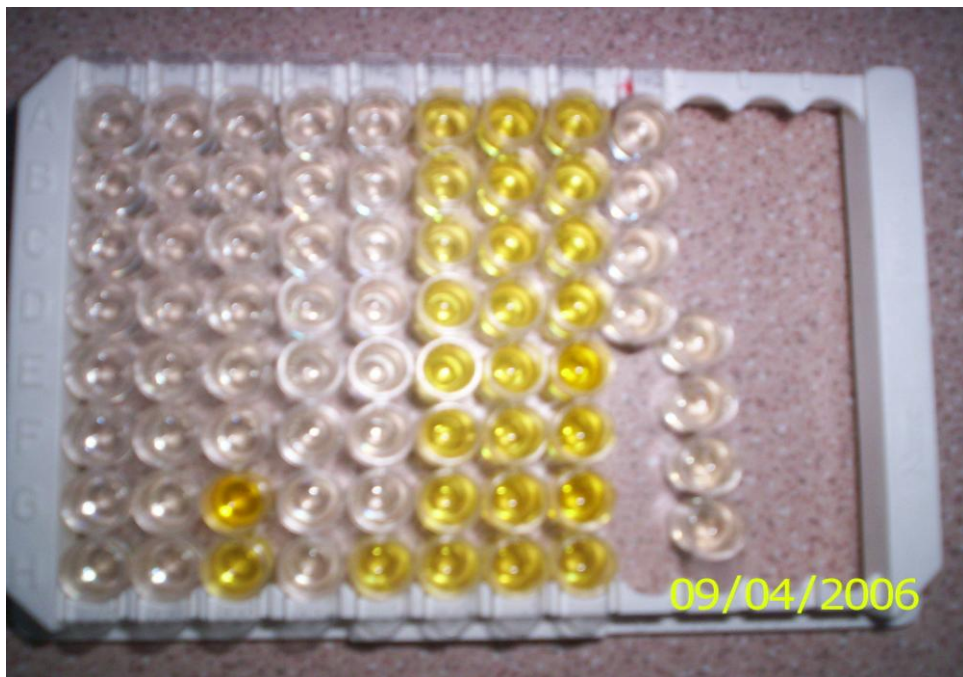


Figura III.2: Fotografía correspondiente del segundo ensayo realizado

Tabla III. 2.- Hoja de resultados correspondiente al segundo ensayo realizado, AMPLICOR CT/NG, 09/04/2006.

		Controles						Valores obtenidos (A₄₅₀)					
		Control Negativo CT y NG:						1.357; 0.318					
		Control Positivo CT: CT(+) en CT						2.949					
		Control Positivo NG: NG(+) en NG						1.241					
Disposición de las muestras en la Placa de Micropocillos													
	CT			NG			CI						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	¹ 0.285	⁹ 0.289	¹⁷ 0.297	¹ 0.355	⁹ 0.323	¹⁷ 0.313	0.985	1.367	1.198				
B	² 0.287	¹⁰ 0.2669	¹⁸ 0.308	² 0.348	¹⁰ 0.323	¹⁸ 0.327	0.893	1.233	1.203				
C	³ 0.277	¹¹ 0.288	¹⁹ 0.313	³ 0.355	¹¹ 0.342	¹⁹ 0.341	0.835	1.181	1.282				
D	⁴ 0.284	¹² 0.300	²⁰ 0.322	⁴ 0.364	¹² 0.330	²⁰ 0.337	1.102	1.158	1.347				
E	⁵ 0.283	¹³ 0.303	²¹ 0.315	⁵ 0.391	¹³ 0.331	²¹ 0.336	1.317	1.261	2.633				
F	⁶ 0.277	¹⁴ 0.307	²² 0.314	⁶ 0.396	¹⁴ 0.322	²² 0.323	1.210	1.190	1.705				
G	⁷ 0.280	¹⁵ 0.304	CT 2.949	⁷ 0.417	¹⁵ 0.324	CT 0.318	1.213	1.367	2.112				
H	⁸ 0.383	¹⁶ 0.335	NG 1.357	⁸ 0.417	¹⁶ 0.338	NG 1.241	1.178	1.180	1.240				

Toma de Muestras Endocervicales mediante M4RT

Las muestras fueron tomadas por ginecólogos de manera aséptica. Se destapa el tubo cónico, se introduce el primer hisopo en el canal endocervical, y el segundo hisopo en el medio de transporte lo que ofrece un signo visual de la inoculación de la muestra. De esta forma se validado la prueba.

En los laboratorios del CBM se analizaron muestras que no poseían el hisopo en el interior del tubo y muestras endocervicales con sangre, obteniendo resultados válidos.

Detección de CT/NG mediante el kit AMPLICOR ROCHE CT/NG:

Una vez estandarizado (obtención de resultados válidos) la técnica en el los laboratorios del CBM, se evaluó mediante un método descriptivo a 60 mujeres embarazadas con RPM y/o APP de la Maternidad Isidro Ayora, muestras endocervicales con el fin de detectar CT/NG.

Interpretación de Resultados:

Se deben incluir al menos dos réplicas del control (+) de CT dos réplicas del control (+) para NG por cada serie de muestras, con el fin de analizar por duplicado.

Controles	Rango Aceptable (A₄₅₀)
Control Negativo CT y NG:	≤ 0.2
Control Positivo CT: CT(+) en CT	≥ 2.0
Control Positivo NG: NG(+) en NG	≥ 1.5

Es muy importante verificar que los valores de los controles para confirmar que la serie es válida, y se debe leer a una absorbancia de 450 nm.

Interpretación de los resultados para CT

A_{450}	Interpretación
< 0.2	ADN de <i>C. trachomatis</i> no detectado: La muestra es presuntamente negativa para la presencia de <i>C. trachomatis</i> .
≥ 0.8	Detectado ADN de <i>C. trachomatis</i>. La muestra es positiva para la presencia de <i>C. trachomatis</i> .

Interpretación de los resultados para NG

A_{450}	Interpretación
< 0.2	ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> no detectado: La muestra es presuntamente negativa para la presencia de <i>N. gonorrhoeae</i> .
≥ 0.8	Detectado ADN de <i>N. gonorrhoeae</i>. La muestra es positiva para la presencia de <i>N. gonorrhoeae</i> .

Se procesaron las primeras 30 muestras, se evaluó el ensayo y se consideraron como resultados válidos los obtenidos. De estas muestras, fueron positivas para CT la número 28, 29 y 30. (Figura 3 y Tabla 3)



Figura III.3. Fotografía correspondiente a las 30 primeras muestras

Tabla III.3. Hoja de resultados correspondientes a las 30 primeras muestras, AMPLICOR CT/NG, 09/26/2006

		Controles					Valores obtenidos (A ₄₅₀)						
		Control Negativo CT					0.255,0.278, 0.280						
		Control Negativo NG:					0.266,0.268,0.289						
		Control Positivo CT: CT(+) en CT					3.00; 3.00; 2.980						
		Control Positivo NG: NG(+) en NG					1.670.1.677,2.490						
Disposición de las muestras en la Placa de Micropocillos													
CT							NG						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	¹ 0.270	⁹ 0.284	¹⁷ 0.246	^{NG} 0.255	²⁹ 3.00	0.248	0.259	0.279	1.670	29			
B	² 0.262	¹⁰ 0.268	¹⁸ 0.252	^{NG} 0.278	³⁰ 0.481	0.259	0.268	0.269	1.677	30			
C	³ 0.270	¹¹ 0.275	¹⁹ 0.267	²³ 0.258	^{CT} 2.980	0.254	0.262	0.271	0.266	2.490			
D	⁴ 0.263	¹² 0.262	²⁰ 0.282	²⁴ 0.277	^{NG} 0.280	0.251	0.255	0.263	0.279	0.289			
E	⁵ 0.301	¹³ 0.268	²¹ 0.256	²⁵ 0.255		0.257	0.263	0.265	0.276				
F	⁶ 0.281	¹⁴ 0.300	²² 0.268	²⁶ 0.261		0.264	0.262	0.265	0.272				
G	⁷ 0.280	¹⁵ 0.276	^{CT} 3.00	²⁷ 0.258		0.270	0.262	0.266	0.258				
H	⁸ 0.263	¹⁶ 0.290	^{CT} 3.00	²⁸ 3.00		0.275	0.327	0.286	0.260				

Tabla III.3. Hoja de resultados correspondientes a las 30 primeras muestras, AMPLICOR CT/NG, 09/26/2006

	CI											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	¹ 2.105	⁵ 1.544	¹³ 0.415	²¹ 0.511	²⁵ 0.379							
B	² 1.457	⁶ 1.057	¹⁴ 0.976	²² 0.834	²⁶ 0.398							
C	³ 1.120	⁷ 0.819	¹⁵ 0.403	^{CT} 1.011	²⁷ 1.457							
D	⁴ 1.570	⁸ 1.219	¹⁶ 0.734	^{CT} 0.959	²⁸ 1.337							
E		⁹ 1.305	¹⁷ 0.860	^{NG} 1.263	²⁹ 1.474							
F		¹⁰ 0.939	¹⁸ 0.887	^{NG} 1.356	³⁰ 0.582							
G		¹¹ 2.047	¹⁹ 0.513	²³ 0.663	^{CT} 0.834							
H		¹² 1.323	²⁰ 0.643	²⁴ 1.252	^{NG} 0.949							

Posteriormente se procesó un segundo grupo de otras 30 muestras, de las cuales, al validar el ensayo se determinó como positivas para CT las muestras número 43, 44 y 58, además se procesa nuevamente las muestras 29 y 30 como controles adicionales propios positivos para *Chlamydia trachomatis* y como estas muestras ya se encontraban en su tiempo máximo para ser conservadas, verificar si las muestras siguen siendo viables. No se obtuvieron resultados positivos para *Neisseria gonorrhoeae*. (Figura 4 y Tabla 4).



Figura III.4.- Fotografía correspondiente a las 30 muestras finales.

Tabla III.4. Hoja de resultados correspondientes a las 30 muestras finales, AMPLICOR CT/NG, 10/26/2006.

Controles	Valores obtenidos (A ₄₅₀)
Control Negativo CT	0.255, 0.255
Control Negativo NG:	0.356, 0.262
Control Positivo CT: CT(+) en CT	3.00; 3.00;
Control Positivo NG: NG(+) en NG	1.554. 2.279

Disposición de las muestras en la Placa de Micropocillos

	CT					NG				CI		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	³¹ 0.276	³⁹ 0.303	⁴⁷ 0.262	⁵⁵ 0.257	²⁹ 0.5	³¹ 0.269	³⁹ 0.267	⁴⁷ 0.265	⁵⁵ 0.270	³¹ 1.178	³⁹ 0.786	⁴⁷ 0.336
B	³² 0.256	⁴⁰ 0.268	⁴⁸ 0.270	⁵⁶ 0.243	³⁰ 0.5	³² 0.296	⁴⁰ 0.264	⁴⁸ 0.262	³⁶ 0.260	³² 0.410	⁴⁰ 0.875	⁴ 0.685
C	³³ 0.282	⁴¹ 0.265	⁴⁹ 0.272	⁵⁷ 0.251	NG 0.255	³³ 0.266	⁴¹ 0.289	⁴⁹ 0.257	⁵⁷ 0.265	³³ 0.957	⁴¹ 0.805	⁴⁹ 0.277
D	³⁴ 0.265	⁴² 0.271	⁵⁰ 0.263	⁵⁸ 3.00	NG 0.255	³⁴ 0.263	⁴² 0.268	⁵⁰ 0.278	⁵⁸ 0.270	³⁴ 0.843	⁴² 1.277	⁵⁰ 0.594
E	³⁵ 0.261	⁴³ 3.00	⁵¹ 0.263	⁵⁹ 0.252	CT 0.356	³⁵ 0.263	⁴³ 0.256	⁵¹ 0.263	⁵⁹ 0.269	³⁵ 0.863	⁴³ 0.272	⁵¹ 0.350
F	³⁶ 0.271	⁴⁴ 0.5	⁵² 0.276	⁶⁰ 0.244	ct 0.262	³⁶ 0.260	⁴⁴ 0.254	⁵² 0.261	⁶⁰ 0.252	³⁶ 0.276	⁴⁴ 0.626	⁵² 0.381
G	³⁷ 0.265	⁴⁵ 0.257	⁵³ 0.248	CT 3.00	NG 1.554	³⁷ 0.294	⁴⁵ 0.277	⁵³ 0.253	²⁹ 0.266	³⁷ 1.678	⁴⁵ 0.860	⁵³ 0.284
H	³⁸ 0.286	⁴⁶ 0.299	⁵⁴ 0.262	CT 3.00	NG 2.279	³⁸ 0.303	⁴⁶ 0.279	⁵⁴ 0.278	³⁰ 0.278	³⁸ 0.411	⁴⁶ 0.973	⁵⁴ 0.607

Para el manejo de los datos y posterior análisis de la información obtenida en las 60 muestras se empleó el programa EPlinfo v6.04.

DISCUSIÓN:

Indiscutiblemente AMPLICOR CT/NG es PCR innovador sumamente específico, sensible, rápido y fácil de realizar, puesto que se ha remplazado a la electroforesis por la técnica ELISA; mostrando de esta manera la factibilidad y utilidad de la misma para detectar ADN amplificado de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Cuando se evalúa la posibilidad de usar PCR y ELISA de manera simultánea como método de detección de ADN amplificado y dejar de un lado a la tradicional electroforesis, surgen muchas interrogantes; en primer lugar el factor económico, siempre importante cuando tratamos de desarrollar nueva tecnología, AMPLICOR CT/NG es una técnica sumamente costosa cuando se la compara con tecnología de diagnóstico más sencilla (inmunofluorescencia, cultivo celulares, etc). Sin embargo, existe la posible falencia de estos métodos cuando se trata de obtener el diagnóstico correcto rápidamente, ya que esto no siempre es posible.

En futuros estudios se puede evaluar la factibilidad y eficiencia de realizar la detección de CT/NG con tecnología " IN HOUSE ", mediante la tecnología existente en el CBM que bajaría los costos para poder brindar un servicio de diagnóstico molecular al público.

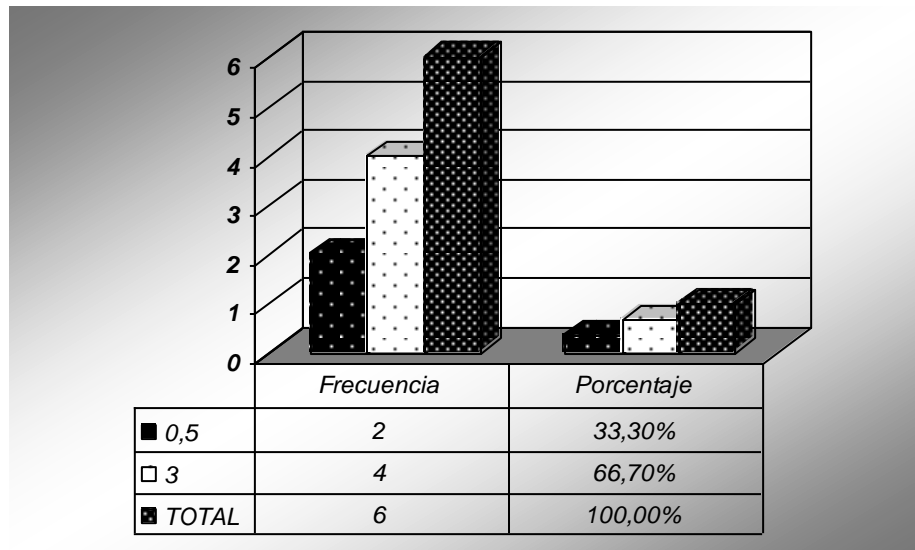
Además es importante recalcar que *C. trachomatis* es una bacteria difícil de cultivar, es muy lábil por tales motivos no importan cepas de ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLECTION).

Por ello, planteamos que la técnica de AMPLICOR CT/NG puede ser utilizada como prueba de confirmación o en caso de dudas diagnósticas, especialmente para estudios epidemiológicos en zonas de baja prevalencia.

La técnica de AMPLICOR CT/NG tiene valores de sensibilidad y especificidad que la convierten en un examen potencialmente útil para la detección de CT y NG, sin embargo debemos recordar que un resultado negativo no excluye una infección por CT y/o NG, ya que los resultados dependen de la toma de muestra adecuada, ausencia de inhibidores y la existencia de la suficiente cantidad de ADN que pueda detectarse. La detección de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* depende del número de microorganismos presentes en la muestra, que puede variar según el método de recolección de muestras, diversos factores dependientes del paciente (por ejemplo: edad, antecedentes de ETS, sintomatología), la fase de la infección o la variedad serológica de *C. trachomatis* o fase de la infección o la cepa de *N. gonorrhoeae*.

Es por este motivo que en el laboratorio del CBM resultados de CT >0.5 se le considera positiva, por dos razones primero por ser una prueba colorimétrica cualitativa, presentaban coloración y la segunda debido a que mediante los controles positivos y negativos se podía interpretar los resultados dentro de un rango determinado.

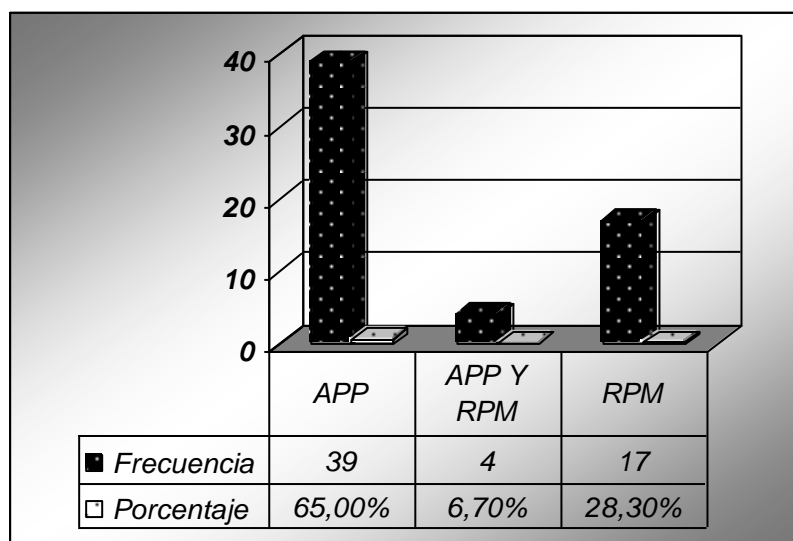
Dentro de las 6 muestras positivas; 4 muestras obtuvieron un valor de 3.00 y 2 muestras de 0.5 (Cuadro 1). La prueba AMPLICOR CT/NG no detecta las cepas de *C. trachomatis* carentes de plásmidos.



Cuadro III.1.- Resultado de detección de CT en mujeres embarazadas con APP y/o RPM

En relación a los resultados obtenidos con las 60 mujeres embarazadas, se concluye que el corrimiento de un número mayor de muestras implica una mayor posibilidad de detectar CT/NG, sin embargo debido a que el grupo poblacional dentro del estudio no afecta a los resultados puesto que la frecuencia sigue siendo la misma, ya que la prevalencia no varía. No se justifica aumentar el valor de la n. Aunque es importante recordar que la incidencia de la infección gonocócica en una población puede afectar el rendimiento de la prueba por que los valores predictivos positivos disminuyen cuando se examinan poblaciones con una baja incidencia o individuos sin riesgo de infección.

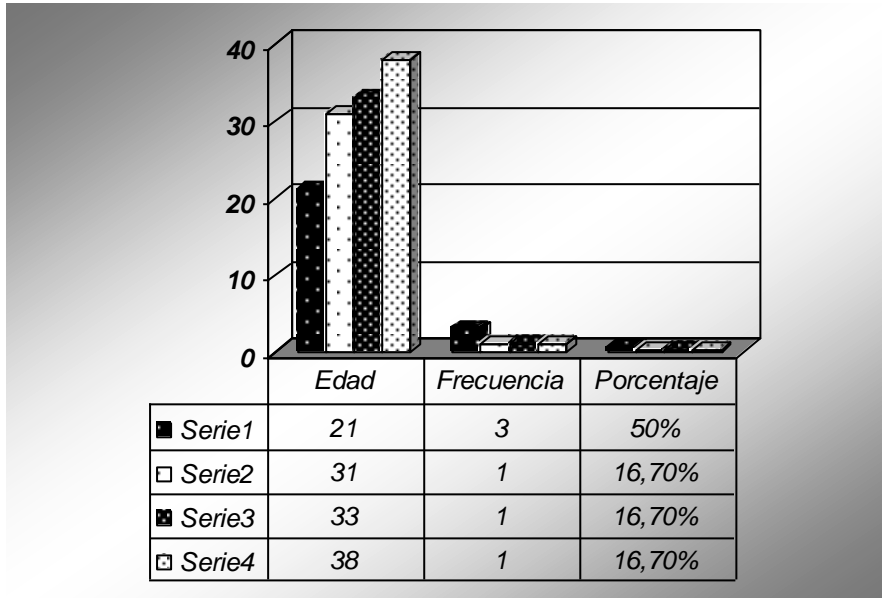
Puesto que la incidencia de *N. gonorrhoeae* puede que sea baja en algunas poblaciones o grupos de pacientes, un índice de falsos positivos del 4% al 5% puede sobrepasar el índice de positivos verdaderos de forma que el valor predictivo de una prueba con resultado positivo es muy bajo. Razón por la cuál que algunos pacientes que están verdaderamente infectados no se identificarán analizando una única muestra de cultivo, el índice real de falsos positivos no puede determinarse ni estimarse a partir de datos clínicos. De las 60 muestras analizadas 6 (10 %) resultaron positivas para *Chlamydia trachomatis*. El 65 % de estas pacientes ingresaron con un diagnóstico de APP, seguida de las complicaciones APP +RPM (6.7%) y finalmente el 28.3% ingresaron con un diagnóstico de RPM (Cuadro 2).



Cuadro III.2.- Resultado de las mujeres embarazadas con APP y/o RPM.

Las pacientes con resultados positivos se encuentran entre los 21-38 años de edad (Cuadro 3), imaginémonos la cadena de infección tan grave que esto representa primero por que la mujer pueden producir secuelas

obstétricas serias durante el embarazo y para el recién nacido al pasar a través del canal de parto.



Cuadro III.3.- Muestras positivas para CT relacionadas con la edad.

Considerando que este modelo analítico aplicado a mujeres embarazadas con APP y/o RPM en la Maternidad Isidro Ayora en la ciudad de Quito constituye la primera tesis realizada utilizando el PCR innovado (AMPLICOR CT/NG), los resultados del estudio ratifican que en el país se puede introducir nueva tecnología diagnóstica, e incentiva a la realización de investigaciones de este estilo que permiten que el Ecuador tenga datos e información propias de referencia, para no recurrir a investigaciones realizadas en otros países como modelo.

Razón por la cuál se torna necesario realizar un estudio para prevenir que las mujeres embarazadas se infecten con CT y/o NG, a su vez que reciban el tratamiento adecuado para de esta manera evitar complicaciones durante el embarazo mediante el diagnóstico molecular.

CONCLUSIONES:

- Amplicor CT/NG es un método de diagnóstico específico de PCR innovado, que usa la técnica ELISA para detectar ADN amplificado y es útil en caso de dudas en diagnóstico o como método confirmatorio, que desplaza totalmente a métodos tradicionales y poco específicos usado por los médicos; tal es el caso de la proteína C reactiva que únicamente determina si existe o no inflamación esto genera una infección no importa de que tipo sea bacteriana, micótica y se trata a la paciente de manera muy general con la aplicación de antibióticos.
- AMPLICOR CT/NG debido a su costo no es un método adecuado para screening en poblaciones de riesgo.
- AMPLICOR CT/NG es un kit que posee una elevada especificidad analítica lo que minimiza la posibilidad de que la gran mayoría de microorganismos genitourinarios o virus no generen reactividad con la prueba.
- El uso de AMPLICOR CT/NG debe estar limitado al personal capacitado en las técnicas de PCR, así como de infraestructura y equipamiento adecuado para tal tipo de técnica.
- La presencia de enzima AmpErase en la mezcla maestra de CT/NG reduce el riesgo de contaminación del amplicón. Sin embargo, la contaminación por controles positivos de CT/NG y muestras clínicas positivas para la presencia de CT/NG puede evitarse solamente recurriendo a buenas prácticas de laboratorio y siguiendo estrictamente los procedimientos especificados.

- En el Centro de Biomedicina aplicamos la técnica con muestras endocervicales sin dejar el hisopo en el medio M4RT y muestras con endocervicales con sangre que demostraron no interferir en los resultados.
- *Chlamydia trachomatis* es sensible a condiciones ambientales adversas y requiere de un medio de transporte específico para mantener su viabilidad (e infectividad) durante su traslado al laboratorio, por tal motivo se utiliza el medio M4RT que contiene formulaciones con; sacarosa, gelatina, proteínas para la estabilización, antibióticos (gentamicina y anfotericina B) para minimizar la contaminación bacteriana y micótica y un tampón para mantener el PH neutro.
- *Neisseria gonorrhoeae* es coco Gram negativo altamente sensible a los cambios de temperatura, humedad y pH, razón por la cuál se utiliza el medio M4RT para su transporte y conservación hasta ser procesadas.
- La fiabilidad de los resultados depende en gran medida del procedimiento adecuado de recolección y transporte apropiado de las muestras, es por está razón que las muestras fueron tomados por médicos capacitados (ginecólogos) previo conocimiento del manejo del medio M4RT, además el medio M4RT posee crioprotectores que garantizan la conservación, evitando que se degraden las muestras.
- Para confirmar que la serie es válida es necesario verificar los valores de los controles se encuentren dentro de los parámetros establecidos mayor de 2.00 para CT y mayor de 1.5 para NG, caso contrario la serie no es válida y deberá repetirse el procedimiento analítico completo (preparación de las muestras, amplificación y detección).

- Se debe analizar por duplicado solo los controles, mientras que las muestras por el excesivo costo de la prueba, debe hacerse solo si la muestra es sospechosa o el resultado es dudoso.
- Pueden obtenerse resultados falsos negativos debido a inhibición de la polimerasa. Con el fin de identificar las muestras ya preparadas que contengan sustancias que puedan interferir con la amplificación por PCR, se añade un control interno de CT/NG a la prueba AMPLICOR CT/NG.
- El índice de resultados falsos positivos puede depender de la formación, habilidad para la manipulación de los reactivos y las muestras u otros factores de cada laboratorio. Debe considerarse otra prueba de amplificación de ácido nucleico o, preferiblemente, cultivo para confirmar si un diagnóstico de falso positivo para la presencia de *N. gonorrhoeae* por que tendría consecuencias graves.
- Como con cualquier otra prueba diagnóstica, los resultados de la prueba AMPLICOR CT/NG deben interpretarse teniendo en cuenta el resto de los datos clínicos y analíticos.
- Para comprobar que ADN se ha amplificado se debe usar la microplaca revestida con sondas específicas para CT y NG según corresponda. No es posible detectar el ADN amplificado en gel de agarosa, ya que el kit de tipo comercial contiene reactivos que interfieren con el corrido electroforético (Figura 5,6).

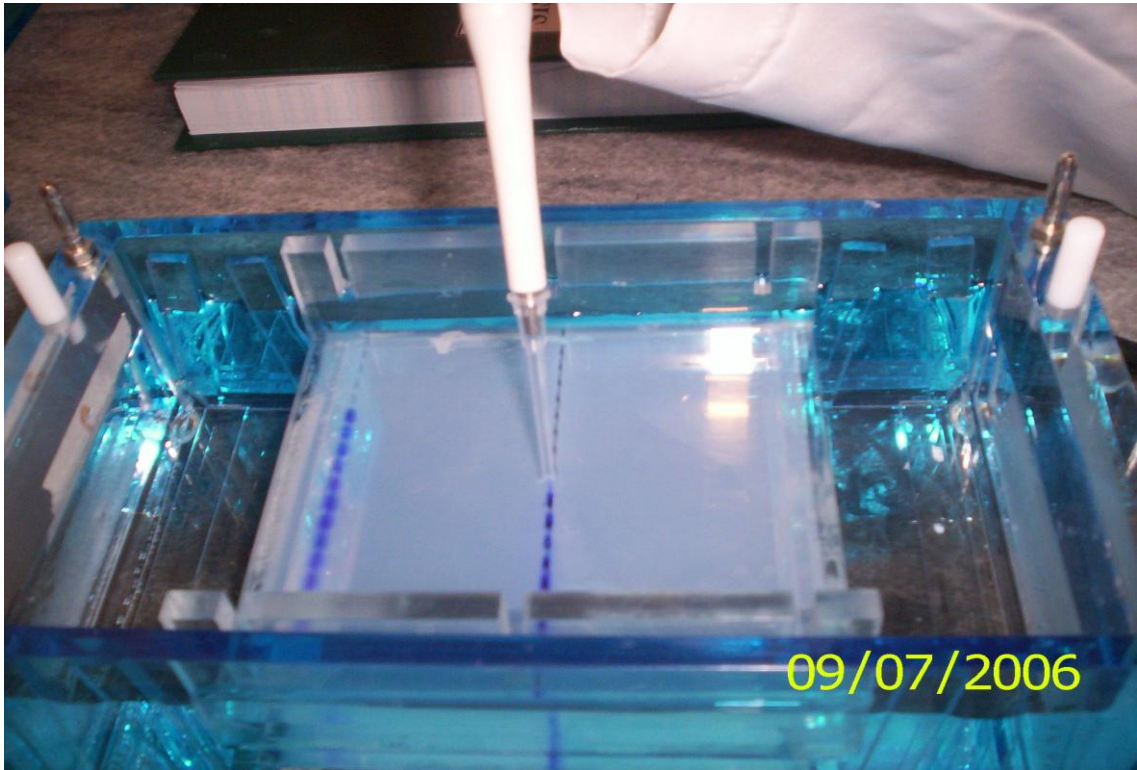


Figura III.5.- Colocación del ADN amplificado en los pocillos del gel de agarosa

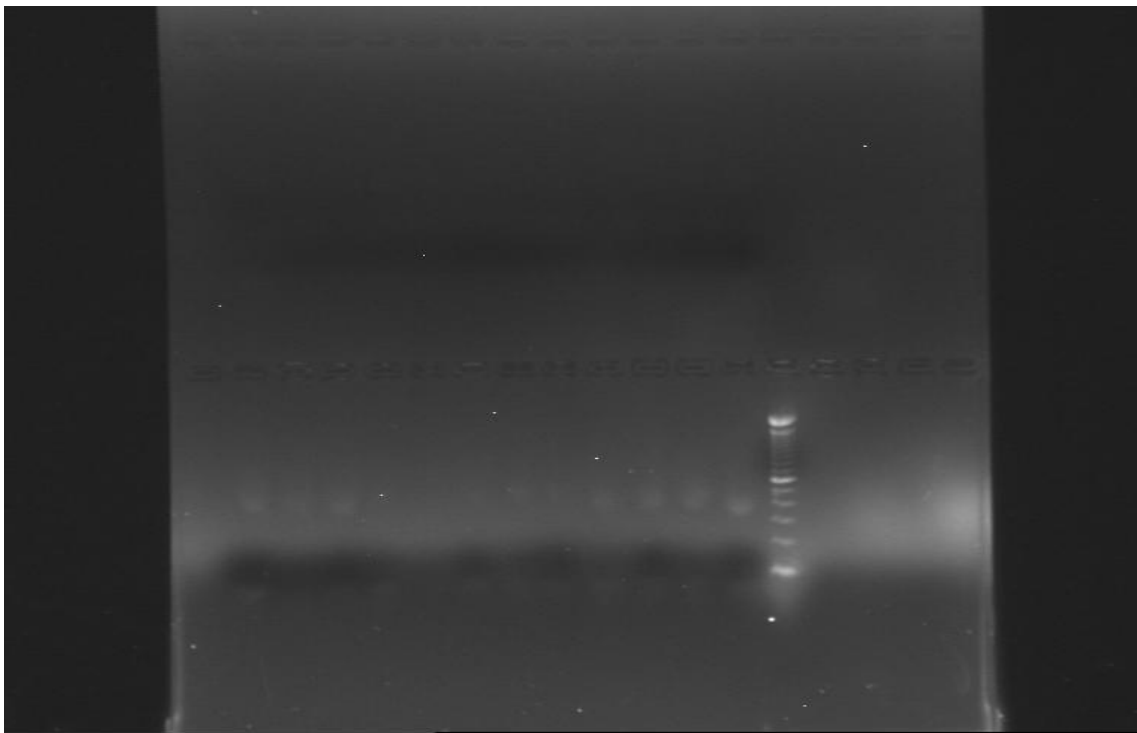


Figura III.8.- Detección del ADN amplificado en el Gel de agarosa visualizado en la cámara de U.V.

- Las madres infectadas con CT y NG no recibe seguimiento y muchos menos sus hijos.

RECOMENDACIONES

- Las tareas de laboratorio deben realizarse de modo unidireccional, desde la zona de preamplificación hacia la zona de postamplificación (amplificación/detección).
- Las actividades de preamplificación deben iniciarse con la preparación de los reactivos y proceder a la preparación de las muestras.
- Los materiales y equipos deben estar dedicados a cada actividad de preamplificación y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra.
- En cada área deben usarse guantes que deben cambiarse antes de dejar el área. El equipo y los materiales usados para la preparación de reactivos no deben usarse para actividades de preparación de las muestras ni para pipetear o procesar ADN amplificado u otras fuentes de ADN objetivo.
- Los materiales y equipos usados para postamplificación deben permanecer en la zona de postamplificación en todo momento.
- Es indispensable utilizar una buena técnica de laboratorio para obtener un rendimiento apropiado en la prueba.
- Debido a la gran sensibilidad analítica de la prueba, se debe proceder con extrema cautela a fin de conservar la pureza de los reactivos del kit o de las mezclas de amplificación.
- Se debe desechar todos los reactivos sospechosos.

- Las tiras de pocillos para ELISA se envía cerrada en una bolsa estéril. Una vez abierta la bolsa, se deben sacar sólo los pocillos que se van a utilizar. El resto se deben dejar en la bolsa cerrada a 4 ° C, para mantenerlos secos.
- La solución de sustrato/cromógeno es sensible a la luz por lo que se debe evitar la exposición directa a ésta. Cerrar el tubo después de usarlo.
- La solución de conjugado, una vez preparada, es estable 3 horas por lo que se debe prepara únicamente lo necesario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schachter, J. AND Stamm, W.E. 1999. Chlamydia IN Manual of Clinical Microbiology, Balowz, A., W.J. Hausler, Jr., K.H. Hermann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (Eds), 7th Ed. , Washington, D.C. 795-800.
2. Jawezt E, 1996, Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno, 25-30.
3. Everett K. 2002, IV Encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones de Chlamydia. Helsinki, Finlandia.
4. Ostos. O., Mérida. R., 2003, Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas, Bogotá D.C., Colombia, 81-93.
5. Paavonen J. 1998, *Chlamydia trachomatis* infection -from diagnosis to treatment and prevention. Kempers RD et al. Fertility and Reproductive Medicine. Elsevier Science BV,; 497-509.
6. Bush RM, Everett KDE. 2001, Molecular evolution of the Chlamydiaceae. International Journal of systematic and evolutionary microbiology; 51:203-20.
7. Kalma, et al. 1999, Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. Nature Genetics; 21:385.
8. Murray. R, Rosenthal K, Kobayashi, Pfaller. A., 2004, Microbiología Médica, Madrid, España, Cuarta Edición, 405-410.
9. Pal S, Barnhart KM, Wei Q, Abai AM, Peterson EM, de la Maza LM. 1999, Vaccination of mice with DNA plasmids coding for the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein elicits an immuneresponse but fails to protect against a genital challenge. Vaccine; 17:459-65.

10. Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. 1996, A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A; 93:11143-8.
11. Rund S, Lindner B, Brade H, Holst O. 1999, Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Chlamydia trachomatis* serotype L2. J Biol Chem;274:16819-24.
12. Ingalls RR, Rice PA, Qureshi N, Takayama K, Lin JS, Golenbock DT. 1995, The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. Infect Immun;63:3125-30
13. Centers for Disease Control, Division of Sexually Transmitted Diseases. 1997 Annual Report.
14. INEC 2003, Anuario de camas y egresos hospitalarios 2:12-18.
15. Hilton AA, Richmond SJ, Milne JD, Hindley F, Clarke SKR, 1974, *Chlamydia* in the female genital tract. Br J Vener Dis 50:1-10.
16. Hammerschlag MR, Anderka M, Semine DZ, McComb D McCormack WM. 1979, Prospective study of maternal and infantile infection 2 with *Chlamydia trachomatis*. Pediatrics;64:14
17. Attenburrow AA, Baker CM. 1985, Chlamydial pneumonia in the lowbirth weight neonate. Arch Dis Child; 60:1169-1172.
18. Schachter J. 1988, Overview of human diseases. En: Barron AL, ed. Microbiology of *Chlamydia*. Florida, USA.: CRC Press Inc, 153-165.
19. *Chlamydia trachomatis* genital infections--United States, 1995. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997 Mar 7;46(9):193-8.

20. Chedraui PA, Hidalgo LA, Chavez MJ, San Miguel G. 2004, Determinant factors in Ecuador related to pregnancy among adolescents aged 15 or less. *J Perinat Med*;32:337-41.
21. Lockwood CJ, Kuczynski E. 2001, Risk stratification and pathological mechanisms in preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*; 15:S78-89.
22. Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH, Romero R. 2003, Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med*;31:12-22.
23. Cohen I, Tenenbaum E, Fejgin M, Altaras M, Ben-Aderet N, Sarov I. 1988, Serum-specific antibodies for *Chlamydia trachomatis* in premature contractions. *Am J Obstet Gynecol*; 158:579-82.
24. Leiderman E, Restrepo A, Robledo R y otros, 1996, Enfermedades Infecciosas, *Neisseria gonorrhoeae*, Quinta Edición, Medellín, Colombia, 484-487.
25. Sanchez, C, Salazar R, 1997, Tratado de Microbiología Médica, *Neisseria gonorrhoeae*, Primera Edición, Quito ,Ecuador, 201-205; 233.
26. Cartwright C.P. 1994, Techniques and diagnostic applications of in vivo nucleic acid amplification. *Clin Microbiol News*;16:33-40
27. ZANLUNGO S, RIGOTTI A, ARRESE M. 1999, Biología Molecular: Conceptos básicos. *Rev Méd Chile*; 127: 839-47.
<http://www.scielo.cl/scielo.php?pid> _Accesado 05 de Julio del 2006.
28. ZANLUNGO S, RIGOTTI A, ARRESE M. 1999, Medicina Molecular: Presente y Futuro. *Rev Méd Chile*; 127 n. 8 Santiago ago.

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498871999000800014&script=sci_arttext Accesado 10 de Julio del 2006

29. Eisenstein B I. 1990, the polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New Engl J Med*; 322:178-183.
30. Graham. A, Newton C.R., 1994, *Introduction to Biotechniques PCR*, Oxford,U.S.A, Primera Edición, 1-35.
31. Surzycki, S.,1936, *Basic techniques in molecular biology*, Springer, Germany-Berlin,406-420.
32. Roche Diagnostics Corporation, *Amplicor CT/NG ®*, 1999; 13-06-83252-005.
33. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7:95-102.
34. Cifuentes Rodrigo, 2002, *Ginecología y Obstetricia Basada en Evidencias: Ruptura Prematura de membranas*, Bogotá –Colombia, 464-479.
35. Davis A. Chlamydia: the most common sexually transmitted infection. *Nursing Times* 1998; 94 (5): 56-8.
36. Mullis, K.B. 1990. El origen inusual de la reacción en cadena de la polimerasa, 262: 56 - 65.
37. White TJ, Arnheim N y Erlich HA (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5, 185-189

38. Crowther, J.(1995), Methods in Molecular Biology: ELISA Theory and Practice, New Jersey, 1-107.

ANEXO 1

HOJA RECOLECCION: Infección por *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoea* en gestantes con amenaza de parto pretérmino y/o ruptura prematura de membranas

Fecha: / / Hora Ingreso _____ Historia Clínica # _____
 Nombre: _____, _____ Edad: _____ años G ___ P ___ C ___ A ___
 Ciudad _____ Procedencia: Urbano ___ Urbano Marginal ___ Rural ___
 Edad Gestacional (sem) _____ Diagnóstico: APP _____ RPM _____
 Primer ingreso ___ subsecuente ___ No. ___ Intervalo RPM – ingreso (hr) _____
 Período latencia (hr) _____ (intervalo rpm/ parto)

Resultante materna		Ponga visto (√) si es afirmativo	
Parto inicia espontáneo - inducido		Neonato	
Cesárea		Peso: Talla:	PC: _
Fecha y hora		Apgar al min. ___ 3' ___	5 ' ___
Motivo cesárea:		EGA (sem)	
Corioamnionitis?		AEG / PEG / GEG	
SFA?		Ingreso a TIN	
Otra causa cesarea: _____		Muerte neonatal?	
# transfusiones :			
Muerte materna			
Ingreso - alta (días)			

Factores Riesgo RPM y/o APP	Ponga visto (√) si es afirmativo
Coito	
STV < 20 sem.	
IVU < 20 sem.	
IVU actual	
Leucorrea actual _____ color _____	
No. Total de Control prenatales hasta el momento	

Laboratorio y manejo	
CT x PCR : _____	Antibióticos? _____ cual _____
NG x PCR : _____	Tocolítico _____ Cual? _____
Leucocitos ingreso	Corticosteroide _____ Cual? _____
ILA ingreso (cm)	

