



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

UNIDAD DE POSTGRADO, INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (UPID)

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER
EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* MEDIANTE qPCR EN
MUJERES CON ITU QUE ACUDEN A CONSULTAS GINECOLÓGICAS EN LA
CIUDAD DE CUENCA”

AUTOR:

LCDA: RUTH YUNGA LEÓN

TUTORA:

Dra. NORA UGALDE DE ORDÓÑEZ

GUAYAQUIL - ECUADOR

JUNIO 2016



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS

"DETERMINACIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* MEDIANTE qPCR EN MUJERES CON ITU QUE ACUDEN A CONSULTAS GINECOLÓGICAS EN LA CIUDAD DE CUENCA"

AUTOR:	TUTOR:	
RUTH CECILIA YUNGA LEÓN	Dra. Msc. NORA UGALDE DE ORDOÑEZ	
	REVISORES:	
	ING. SISIANA CHÁVEZ CHICA, Mg	
INSTITUCIÓN: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	FACULTAD: UNIDAD DE POSTGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO	
CARRERA: MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR		
FECHA DE PUBLICACIÓN: JUNIO 2016	No. DE PÁGS: 107	
TÍTULO OBTENIDO: LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO		
ÁREAS TEMÁTICAS: DETERMINACION Y DIGANOSTICO DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>		
PALABRAS CLAVE: Chlamydia Trachomatis, qPCR, amplificación, estándar, umbral, fluorescencia		
RESUMEN: La infección por Chlamydia trachomatis es una enfermedad de transmisión sexual (ITS) que afecta a órganos genitales de mujeres y varones, y además es la más frecuentemente reportada a nivel mundial. Produce complicaciones en el aparato reproductor como: uretritis, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad, embarazos ectópicos, en embarazadas podrían producir abortos en las primeras etapas de gestación, infecciones oculares o en las vías respiratorias del feto al momento del parto. Estudios realizados en Chile han detectado entre 70% y 90% en mujeres asintomáticas. En el presente estudio se recolectaron 100 muestras de hisopado cérvico-uterino en mujeres que acudieron a consulta ginecológica, el 12% dieron positivos para Chlamydia mediante el método qPCR. Esta técnica amplificó una secuencia conocida del plásmido críptico. Se utilizó el programa estadístico SPSS Versión 23, para realizar comparaciones entre variables de pacientes positivas, encontrándose de 12 mujeres participantes con resultado positivo el 9,0% iniciaron su actividad sexual entre los 16 y 20 años. De este grupo el 75% manifestaron tener problemas para embarazarse. El 16,7% de pacientes positivas sufrieron un aborto y están relacionadas con el inicio de actividad sexual. El 66,7% mujeres no tienen conocimiento acerca de Chlamydia y sus consecuencias. En conclusión, existe mayor probabilidad de infección por este patógeno lo cual desencadena en problemas de infertilidad al iniciar la actividad sexual a edades tempranas. Por ello es importante concientizar a la población de llevar una vida monogámica, para evitar la propagación de esta infección silenciosa. Palabras Claves: Chlamydia trachomatis, qPCR, amplificación, umbral, fluorescencia.		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	☒ SI	☐ NO
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 0986666707	E-mail: rutyung@hotmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Laboratorio Biomolecular	
	Teléfono: 2844-111	
	E-mail: gerencia@laboratoriobiomolecular.com	

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutora del programa de maestría en Biotecnología Molecular, CERTIFICO: que he analizado la tesis presentada como requisito para optar por el grado académico de Magister en Biotecnología Molecular, titulada: "DETERMINACIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* MEDIANTE qPCR EN MUJERES CON ITU QUE ACUDEN A CONSULTAS GINECOLÓGICAS EN LA CIUDAD DE CUENCA" la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de postgrado.

Dra. Nora Ugalde de Ordoñez, MSc.

Guayaquil, 28 de Junio del 2016

C.I. 010140865-6

Tutora

CERTIFICADO DE REDACCIÓN Y ESTILO

Juan Diego Marcillo Noroña, Licenciado en Ciencias de la Educación, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado elaborada por la **LCDA. RUTH CECILIA YUNGA LEÓN** con C.I. 010295966-5, previo a la obtención del título de **MAGISTER EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**.

TEMA DE TESIS:

“DETERMINACIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* MEDIANTE qPCR EN MUJERES CON ITU QUE ACUDEN A CONSULTAS GINECOLÓGICAS EN LA CIUDAD DE CUENCA”

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

.....

Lcdo. Juan Diego Marcillo Noroña

C.I. 010187143-2

NUMERO DE TELÉFONO FIJO Y CELULAR: 0984310759/2811-500

CORREO : juandiegomarcillo@ hotm ail.com

A U T O R I A

La información obtenida en este trabajo así como también las ideas, pensamientos, opiniones, definiciones, conclusiones y recomendaciones mencionadas en esta investigación, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Debo indicar también que éste trabajo de grado no ha sido presentado anteriormente para optar algún otro título o grado.

Atentamente,

.....

Ruth Cecilia Yunga León

CI: 010295966-5

A G R A D E C I M I E N T O

En primer lugar a Dios por haberme guiado por el camino de la felicidad hasta ahora; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia a mi PADRE José Yunga, mi MADRE Ana León, a mis hermanos y amigos(as); por siempre haberme brindado su apoyo incondicional que me llevado hasta donde estoy ahora. A los profesionales de los diferentes centros médicos de la ciudad de Cuenca, quienes me brindaron la ayuda y facilitaron la obtención de las muestras, depositando su confianza en mí. Por ultimo agradezco a mi director de tesis quien me brindo el tiempo y los conocimientos para llevar a cabo este estudio, Msc. Nora Ugalde de Ordoñez.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi carrera han estado pendientes por mi bienestar siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba. También agradezco a toda mi familia y amigos por paciencia y comprensión sobre todo en los momentos difíciles. Por esta razón este esfuerzo va dedicado a todo ellos.

Muchas Gracias

Ruth Cecilia Yunga León

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	I
REPOSITORIO DE LA SENESCYT	II
CERTIFICADO DEL TUTOR	III
CERTIFICADO DE REDACCIÓN Y ESTILO	IV
AUTORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
INDICE DE GRÁFICOS	XI
INDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	- 1 -
CAPÍTULO N° 1	- 3 -
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	- 3 -
1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:	- 4 -
1.2.1 OBJETIVO GENERAL:	- 4 -
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	- 4 -
1.3 HIPÓTESIS Y VARIABLES DE INVESTIGACIÓN	- 5 -
1.3.1 HIPOTESIS:	- 5 -
CAPÍTULO 2	- 8 -
2.1. MARCO TEÓRICO	- 8 -
2.2 <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	- 8 -
2.2.1 TAXONOMÍA	- 8 -
2.2.2 GENERALIDADES	- 10 -
2.2.3 FORMA DE VIDA	- 11 -
2.2.4 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	- 11 -
2.2.5 GENOMA DE LA <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	- 12 -
2.2.6 CICLO DE DESARROLLO DE LA <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	- 14 -

2.2.6.1 ADHERENCIA Y ENTRADA	16 -
2.2.6.2 DIFERENCIACIÓN PRIMARIA Y DIVISIÓN CELULAR	17 -
2.2.6.3 DIFERENCIACIÓN SECUNDARIA	19 -
2.2.6.4 SALIDA	19 -
2.2.7 EPIDEMIOLOGÍA	21 -
2.2.8 MECANISMO DE INFECCIÓN	24 -
2.2.9 PERÍODO DE INCUBACIÓN	26 -
2.2.10 SEROTIPOS	26 -
2.2.11 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	26 -
2.2.12 SISTEMA INMUNITARIO	31 -
2.2.13 INMUNIDAD ADAPTATIVA	33 -
2.2.15 DIAGNÓSTICO	34 -
2.2.16 TRATAMIENTO	36 -
2.2.17 COMPLICACIONES	37 -
2.3 PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA (qPCR)	38 -
2.3.1 Desnaturalización	40 -
2.3.2 Hibridación	40 -
2.3.3 Extensión	40 -
2.4 TERMOCICLADOR PCR TIEMPO REAL	42 -
2.5 FUNDAMENTO DEL MÉTODO	43 -
2.6 GENES ESTANDARES	46 -
2.6.1 Genes constitutivos	46 -
2.6.2 Genes del ARN ribosomal (ARNr)	47 -
2.6.3 ARN total	47 -
2.6.4 ARNm múltiples	47 -
2.7 VALOR DE CT	49 -
2.8 ENSAYOS DE CUANTIFICACIÓN	53 -
2.8.1 Cuantificación absoluta	53 -
2.8.2 Cuantificación relativa	53 -
2.8.3 Método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	54 -
2.9 Normalización Y Controles Endógenos	54 -
2.10 APLICACIONES	54 -

2.11 VENTAJAS DEL PCR TIEMPO REAL	55 -
2.12 TÉCNICAS DE DETECCIÓN	57 -
2.13 SONDAS	57 -
2.13.1 SYBR Green	57 -
2.13.2 HYDROLYSIS PROBES TaqMan)	58 -
2.13.3 FLUOROFOROS PARA SONDAS TaqMan	59 -
2.15 PLASMIDOS:	60 -
CAPÍTULO N° 3	61 -
3.1 METODOLOGÍA	61 -
3.1.1 TIPO DE ESTUDIO	61 -
3.1.2 ÁREA DE ESTUDIO	61 -
3.1.3 PERÍODO DE ESTUDIO	61 -
3.1.4 FUENTES DE INFORMACIÓN	61 -
3.1.5 UNIVERSO Y MUESTRA	62 -
3.1.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	62 -
3.2 MÉTODO, TÉCNICA E INVESTIGACIÓN	63 -
3.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS	63 -
3.2.2 TOMA DE MUESTRAS:	64 -
3.2.2.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PREVIO A LA EXTRACCIÓN:	66 -
3.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN:	66 -
3.2.4 AMPLIFICACIÓN:	68 -
3.2.4.1 PERFIL TÉRMICO	71 -
3.2.5 FUNCIONAMIENTO DEL TERMOCICLADOR TIEMPO REAL DAAN 7600	72 -
3.2.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	74 -
3.2.7 CONTROL DE CALIDAD INTERNO	79 -
3.3 ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES	80 -
3.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	80 -
CAPÍTULO N°4	81 -
4.1 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	81 -
CAPÍTULO N° 5	89 -
5.1 DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89 -
5.1.1 DISCUSIÓN	89 -

5.1.2 CONCLUSIONES	92 -
5.1.3 RECOMENDACIONES	94 -
BIBLIOGRAFÍA	96 -
ANEXOS	100 -

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Plásmido Críptico Chlamydial.....	13 -
GRÁFICO N° 2: Ciclo de Desarrollo de la <i>Chlamydia trachomatis</i>	16 -
GRÁFICO N° 3: Mecanismo de salida de <i>Chlamydia trachomatis</i> . A: lisis de la célula huésped. B:	20 -
GRÁFICO N° 4: Estructura química de la envoltura celular de <i>C. trachomatis</i>	21 -
GRÁFICO N° 5: Etapas de la Amplificación PCR Tiempo Real	41 -
GRÁFICO N° 6: Termociclador Tiempo Real	42 -
GRÁFICO N° 7: Diagrama de amplificación PCR Tiempo Real.....	44 -
GRÁFICO N° 8: Estos dos diagramas y junto con la gráfica de amplificación ilustran los principios básicos de la cuantificación en tiempo real de PCR.	45 -
GRÁFICO N° 9: Esquema de las fases y diagrama de amplificación del PCR Tiempo Real	49 -
GRÁFICO N° 11: Acción de la sonda TaqMan.	58 -
GRÁFICO N° 12: Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente usados en la PCR en tiempo real.	60 -
GRÁFICO N° 13: Demostración de hisopado endocervical	64 -
GRÁFICO N° 14: Hisopos Dacron	65 -
GRÁFICO N° 15: Reactivos y materiales empleados	66 -
GRÁFICO N° 16: Reactivos para q PCR TIEMPO REAL	68 -
GRÁFICO N° 17: Muestras extraídas para realizar la q PCR	71 -
GRÁFICO N° 18: TERMOCICLADOR qPCR TIEMPO REAL DAAN 7600	72 -
GRÁFICO N° 19: Esquema de Funcionamiento de Termociclador DAAN	74 -
GRÁFICO N° 21: Gráfica de la curva de amplificación por q PCR de una muestra negativa	77 -
GRÁFICO N° 22: Imagen del Termociclador DAAN 7600 utilizado en el estudio.	79 -

INDICE DE TABLAS

TABLA N°1 : Taxonomía de <i>Chlamydia trachomatis</i>	- 10 -
TABLA N°2: Reactivos empleados para la q PCR Tiempo Real <i>Chlamydia trachomatis</i>	- 70 -
TABLA N°3: Protocolo para el termociclador	- 71 -
TABLA N°4 Indicadores de fluorescencia	- 73 -
TABLA N°5: Cuadro explicativo acerca de los resultados y el empleo de controles internos.....	- 75 -
TABLA N°6: Prevalencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> de acuerdo a resultados de q PCR Tiempo Real	- 81 -
TABLA N°7 Edad de inicio de la actividad sexual y su relación con los resultados qPCR	- 82 -
TABLA N°8 Distribución de las participantes del estudio por edades... ..	- 82 -
TABLA N°9 Relación entre edades de mujeres participantes con resultados positivos	- 83 -
TABLA N°10 Número de parejas sexuales y su relación con resultados q PCR ..	- 83 -
TABLA N°11 Frecuencia de resultados positivos de acuerdo al número de parejas sexuales	- 84 -
TABLA N°12 Frecuencia de infecciones del Tracto Urinario (ITU) y su relación con los resultados	- 85 -
TABLA N°13 Conocimiento acerca de Clamidia en pacientes con resultados positivos q PCR	- 85 -
TABLA N°14 Frecuencia de problemas para embarazarse en las participantes del estudio	- 86 -
TABLA N°15 Pacientes con problemas para embarazarse de acuerdo con la edad de inicio de actividad sexual	- 87 -
TABLA N°16 Frecuencia de abortos en el grupo estudiado	- 87 -
TABLA N°17 Resultados q PCR distribuidos de acuerdo al número de abortos-	- 87 -
TABLA N°18 Frecuencia de abortos y su relación con el inicio de la actividad sexual... ..	- 88 -

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

UNIDAD DE POSGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

“DETERMINACIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* MEDIANTE qPCR EN MUJERES CON ITU QUE ACUDEN A CONSULTAS GINECOLÓGICAS EN LA CIUDAD DE CUENCA”

Autor: Lcda. Ruth Cecilia Yunga León

Tutora: Dra. Nora Ugalde de Ordóñez, M SC.

RESUMEN

La infección por *Chlamydia trachomatis* es una enfermedad de transmisión sexual (ITS) que afecta a órganos genitales de mujeres y varones, y además es la más frecuentemente reportada a nivel mundial. Produce complicaciones en el aparato reproductor como: uretritis, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad, embarazos ectópicos, en embarazadas podrían producir abortos en las primeras etapas de gestación, infecciones oculares o en las vías respiratorias del feto al momento del parto. Estudios realizados en Chile han detectado entre 70% y 90% en mujeres asintomáticas. En el presente estudio se recolectaron 100 muestras de hisopado cérvico-uterino en mujeres que acudieron a consulta ginecológica, el 12% dieron positivos para *Chlamydia* mediante el método qPCR. Esta técnica amplificó una secuencia conocida del plásmido críptico. Se utilizó el programa estadístico SPSS Versión 23, para realizar comparaciones entre variables de pacientes positivas, encontrándose de 12 mujeres participantes con resultado positivo el 9,0% iniciaron su actividad sexual entre los 16 y 20 años. De este grupo el 75% manifestaron tener problemas para embarazarse. El 16,7% de pacientes positivas sufrieron un aborto y están relacionadas con el inicio de actividad sexual. El 66,7% mujeres no tienen conocimiento acerca de *Chlamydia* y sus consecuencias. En conclusión, existe mayor probabilidad de infección por este patógeno lo cual desencadena en problemas de infertilidad al iniciar la actividad sexual a edades tempranas. Por ello es importante concientizar a la población de llevar una vida monogámica, para evitar la propagación de esta infección silenciosa.

Palabras Claves: *Chlamydia trachomatis*, qPCR, amplificación, umbral, fluorescencia.

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

UNIDAD DE POSGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

"DETERMINATION BY qPCR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN WOMEN WITH
ITU ATTENDING CONSULTATIONS GYNECOLOGIC IN THE CITY OF
CUENCA "

Author: Lcda. Ruth Cecilia Yunga León

Tutor: Dra. Nora Ugalde de Ordoñez, M SC

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is a sexually transmitted disease (STD) that affects genitals of women and men, the most frequently reported worldwide. Produces complications in the reproductive system as urethritis, pelvic inflammatory disease, infertility, ectopic pregnancies and abortions in the early stages of pregnancy, also cause eye infections or respiratory tract in the fetus at the time of delivery. Studies in Chile have detected between 70% and 90% in asymptomatic women. In this study 100 samples of cervical swab in women attending gynecological consultations were collected, 12% tested positive for *Chlamydia* by qPCR method. This technique amplified a known sequence of the cryptic plasmid. SPSS version 23 was used for comparisons between variables of positive patients, this found 12 participants with positive result 9.0% started their sexual activity between 16 and 20 years. Of this group, 75% say they have problems getting pregnant. 16.7% positive patients had an abortion and are related to the onset of sexual activity. 66.7% women have not knowledge about *chlamydia* and its consequences. In conclusion, there is more likelihood of infection by this pathogen and trigger infertility problems when starting sexual activity at an early age. It is therefore important to raise public awareness of leading a monogamous life, to prevent the spread of this silent infection.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, PCR, amplification, threshold, fluorescence.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis (CT) es una bacteria Gram negativa que afecta las células y su reproducción es intracelular, es similar a la de los virus. La infección por *Chlamydia trachomatis* provoca una respuesta autoinmune de anticuerpos específicos. Es una infección que ocasiona patología ocular, pulmonar, digestiva y del tracto-genital inferior (Duarte C, et al.2011, p4).

Chlamydia trachomatis se considera a nivel mundial como uno de los principales agentes etiológicos bacterianos de infecciones de transmisión sexual (ITS), causando cervicitis mucopurulenta en mujeres y uretritis en los varones. Es el causante de dos manifestaciones clínicas características como el linfogranuloma venéreo y el tracoma. Los recién nacidos infectados por esta bacteria, vía cervical de madre a hijo en el momento del parto, pueden desarrollar conjuntivitis y/o neumonía. (López V. et al.2010. p15).

Chlamydia trachomatis es un patógeno muy peligroso y merece la atención de las entidades de salud a nivel mundial, es la causa principal de la infertilidad, artritis reactiva, perihepatitis, síndrome de Reiter, abortos continuos, embarazo ectópico y enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) (Estrada C. 2010). Los estudios recientes han demostrado que esta bacteria facilita la transmisión del VIH y del virus del papiloma humano. Debido a que los individuos infectados pueden portar la bacteria durante meses o años y transmitir la enfermedad a sus parejas sexuales, su diagnóstico sigue siendo un reto. Las personas infectadas experimentan síntomas muy leves o son portadores asintomáticos, causales que dificultan el diagnóstico y aumentan

el riesgo de secuelas a largo plazo. (Sánchez M, et al. 2009). Tanto en Ecuador como en otros países se observa un incremento en las relaciones sexuales extra-matrimoniales en adolescentes, con altos porcentajes de los que han tenido intimidad antes de los 18 años siendo la media reportada de 15 a 18 años en el 62.2%, lo que conlleva a graves consecuencias como: infecciones de transmisión sexual como lo detectaron en un 4.3% de alumnos que los tienen; en embarazos también se observaron e inclusive se detectó un aborto. (Ramírez V, 2011.p 2).

En Chile, ha sido de 4,7%, sin embargo, la infección por *C. trachomatis* permanece como una infección silente en 70 a 90% de las mujeres y en 30 a 40% de los hombres (Ramón S, et al, 2013, p 611).

En México no se conoce con exactitud la prevalencia de la infección genital; algunos reportes sugieren una frecuencia de 4% en población abierta de mujeres en edad reproductiva, aparentemente sanas, en colonias suburbanas; del 3 al 18% en pacientes asintomáticas que asisten a la clínica de Gineco-Obstetricia, del 3 al 40% de las pacientes que asisten a la clínica de Gineco-Obstetricia y cursan con leucorrea y síntomas, del 10 al 13.5% en pacientes embarazadas, el 8% en pacientes con daño tubárico y del 12 al 25% en trabajadoras sexuales. (Sánchez M. et al, 2009. p14).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, cada año se registran 105,7 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 26,4 millones corresponden a América Latina. (Ramón S, 2013.p 612).

Debido a la gravedad de estas complicaciones, diversos países han tomado acciones para reducir la prevalencia de esta infección, sin embargo, el diseño de programas de control epidemiológico se ve obstaculizado porque no se dispone de técnicas que reúnan criterios de sensibilidad satisfactorios.

CAPÍTULO N° 1

1.1 FORMULACION DEL PROBLEMA.

A nivel mundial la infección por *Chlamydia trachomatis* es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente y se ha convertido en una de las principales causas de infertilidad en mujeres en edades reproductivas, debido a que produce obstrucción de las trompas de Falopio. El rápido diagnóstico y tratamiento de esta infección reduciría los niveles de infertilidad y el daño del tracto reproductor femenino. En el Ecuador no se cuenta con muchos estudios realizados en este tema en particular, por esta razón no se conoce cifras exactas de la infección causada por esta bacteria, tampoco se cuenta con datos de infertilidad femenina asociada a la infección por *Chlamydia trachomatis* en nuestro país.

La técnica de referencia para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia* sigue siendo el cultivo en líneas celulares, la que teniendo una especificidad de 100%, pero carece de una buena sensibilidad, siendo esta técnica de alto costo y de difícil mantenimiento en un laboratorio de rutina, por lo cual muchos laboratorios han abandonado la práctica de investigación de *Chlamydia*. Pero en la actualidad se cuenta con técnicas molecular que se trabaja a partir del ADN de la bacteria, las mismas que son de alta sensibilidad y un alto grado de especificidad, lo que contribuye a la obtención de resultados de óptima calidad, la qPCR de *Chlamydia* es una técnica que permite detectar un bajo número de copias de DNA de la bacteria, lo que la hace más sensible que otras pruebas, además se realiza de manera rápida y económica.

El diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en nuestro medio se basa fundamentalmente en las manifestaciones clínicas, estrategia que presenta muchas limitaciones en casos de infecciones frecuentes de manera asintomáticas. Por tal motivo, desconocemos la estimación de la verdadera frecuencia de la infección en nuestra población.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION:

1.2.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* mediante qPCR en mujeres con Infección del Tracto Urinario (ITU) que acuden a consulta ginecológica en la ciudad de Cuenca 2015.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en muestras de pacientes mujeres con Infecciones del Tracto Urinario (ITU) que acuden a consulta ginecológica en la ciudad de Cuenca, empleando la Técnica de qPCR Tiempo Real.
- Relacionar las manifestaciones clínicas de la enfermedad con *Chlamydia trachomatis*, de acuerdo a la edad, abortos, inicio de actividad sexual y número de compañeros sexuales.
- Establecer la frecuencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* para difundir y concienciar a la población en realizarse exámenes para tener diagnóstico preventivo con el fin de reducir los casos de infertilidad o abortos tempranos.

1.3 HIPÓTESIS Y VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

1.3.1 HIPOTESIS:

La hipótesis que se investiga es la presencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres con infección del tracto urinario mediante la técnica de qPCR Tiempo Real, pues la infección por *Chlamydia trachomatis* estaría relacionado con problemas de infertilidad. Si la mujer se encuentra en estado de gestación podría transmitir la infección al recién nacido en el momento del parto, además si no recibe tratamiento podría sufrir complicaciones como un embarazo ectópico. Al tratarse de una enfermedad silenciosa, asintomática en los primeras etapas de la infección, las personas portadoras podrían transmitir la infección a su o sus parejas sexuales. El diagnóstico preventivo de esta bacteria mediante la Técnica de qPCR podría disminuir los riesgos de infecciones en mujeres con vida sexual activa, al tratarse de una prueba molecular rápida en realizarse con alta sensibilidad y que está a nuestro alcance.

1.3.2 VARIABLES:

La investigación se realizó de acuerdo con las variables aplicadas:

VARIABLE INDEPENDIENTE:

- Análisis de Infecciones del tracto Urinario (ITU) por *Chlamydia trachomatis*.

VARIABLE DEPENDIENTE:

- Infertilidad, embarazos ectópicos, abortos frecuentes.

VARIABLE INTERVINIENTE:- hisopado cérvico-uterino, qPCR tiempo Real.

1.4. JUSTIFICACION:

La infección por *Chlamydia trachomatis* es la más común de todas las enfermedades de transmisión sexual (ETS) existentes, que afecta a hombres y a mujeres. En la actualidad están incrementando posiblemente debido a que existe una mayor libertad sexual y un inicio de la actividad sexual a edades más tempranas y con múltiples parejas sexuales durante su vida, representando un serio problema tanto en términos de salud como económicos y sociales. Su control es decisivo para mejorar la salud reproductiva y de toda la población.

Muchas personas con infección por *Chlamydia trachomatis* indican manifestar pocos o ningún síntoma. Las complicaciones más comunes y graves de esta infección ocurren en las mujeres e incluyen Enfermedad Inflamatoria Pélvica, Embarazo Ectópico e infertilidad. Las mujeres sufren síntomas más frecuentes y más grave que los hombres. No obstante, la infección puede ser asintomática hasta en el 80% de los casos, siendo difícil su diagnóstico. Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en mujeres también pueden asociarse con Cáncer Cervical. (Vaca N, 2014).

Se considera que la *Chlamydia trachomatis* es uno de los patógenos de transmisión sexual más prevalentes a nivel mundial, según la organización mundial de Salud OMS se estima que un 4,4 – 6,6 % de casos son positivos para *Chlamydia* anualmente (Sánchez V, 2009).

El diagnóstico puede realizarse a partir de una complicación de la infección. Esto conlleva a que un gran número de pacientes con infección no reciba tratamiento de manera oportuna. Lo que hace imprescindible tener conocimiento de las consecuencias que resultan él no realizar un

diagnóstico temprano o preventivo y un tratamiento oportuno para evitar consecuencias irreversibles. En el laboratorio existen muchos métodos de diagnóstico para *Chlamydia trachomatis*, pero es importante recalcar que cada uno tiene diferente especificidad y sensibilidad, siendo en la actualidad las pruebas moleculares (qPCR en tiempo real) las más sensibles y específicas, debido a que se trabaja directamente con el ADN de la bacteria. Por otro lado al tratarse de una prueba que tarda poco tiempo en realizarse se considera que son las ideales para el diagnóstico de las pacientes en las casas de salud y de esta manera aportar para el diagnóstico rápido y oportuno de las mismas.

Este estudio tiene una alta relevancia para la salud de nuestros jóvenes y en general para las mujeres que asisten a la consulta ginecológica en algunas casas de salud de la ciudad de Cuenca, debido a las graves consecuencias que conlleva una infección por *C. trachomatis*, pues permite analizar y dar a conocer la problemática de esta enfermedad, como también permite indagar los factores de riesgo que conllevan a contraer este tipo de infecciones.

Es importante mencionar que debido a que no existen estudios sobre infecciones a causa de *Chlamydia trachomatis*, ya sea por lo costoso de los métodos diagnósticos, la co-infección con otro tipo de infecciones o simplemente por no reportarlo, no se han podido encontrar estadística en el Ministerio de Salud Pública. Por estas razones y las anteriormente mencionadas se justifica este estudio.

CAPÍTULO 2

2.1. MARCO TEÓRICO

2.2 *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

2.2.1 TAXONOMÍA

Los primeros estudios fueron realizados en China y Egipto hace miles de años en patologías infecciosas para investigar la presencia de *Chlamydia trachomatis*, dichos estudios se lo realizaron en los tracomas. En 1906, los austríacos Halbertaедter y Von Prowazek realizaron estudios en frotis de conjuntiva de orangutanes que previamente fueron inoculados con material tracomatoso de humanos y emplearon una coloración de Giemsa, con la cual observaron cuerpos punteados intracitoplasmáticos, que más tarde se los denominaron "inclusiones". En 1930, Bedson señaló inclusiones similares a las del tracoma en macrófagos de ratones que fueron inoculados por vía peritoneal con esputo de pacientes infectados de neumonía grave. En 1940, Rake y Jones mencionaron inclusiones muy similares en células obtenidas mediante punción de ganglios hipertrofiados originarias de pacientes que cursaban linfogranulomas venéreos.

A partir de la década de los 80 la *Chlamydia trachomatis* fue reconocida como un patógeno genital causante de una serie de síndromes clínicos. El género *Chlamydia* está clasificado dentro del grupo 9 familia *Chlamydiaceae* en el Bergeys Systematic Bacteriology con el género *Rickettsia*. La secuenciación del 16s ARNr manifestó que existe un 95% de homología en las 4 especies de *Chlamydia* estrechamente relacionadas: *C. trachomatis*, *C.*

psittaci, *C. pneumoniae* y *C. pecorum* patógeno de rumiantes. (Arango A, et al, 2001, p 87).

Las técnicas de secuenciación permiten descifrar genomas bacterianos completos, que propone una verdadera revolución en la taxonomía bacteriana. Hoy en día disponemos de secuencias de genomas completos de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* o *Chlamydia psittaci* y especies relacionadas. Los análisis bioinformáticos también han servido para debatir el paradigma de la escasa tasa de recombinación en este grupo de bacterias, sospechado por lo particular de su ciclo biológico, que sugería escasas oportunidades de intercambio genético.

La existencia de recombinación tiene su interés clínico en la descripción de la cepa hipervirulenta de Linfogramuloma Venéreo (LGV) L2c, relacionada con el brote de LGV14, resultado de la recombinación entre serovares L2b y D de *Chlamydia trachomatis*. Estos serovares están asociados a la sero-especificidad de la proteína más importante de la membrana externa, MOMP. Sin embargo, actualmente existe relación entre la secuencia del gen ompA (que codifica para MOMP) y el tropismo celular o la virulencia, por lo que la genotipificación basada en el gen ompA como biomarcador no es válida, aunque ha sido ampliamente usada.

REINO	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Bacteria	Chlamidiales	Chlamydiaceae	Chlamydophila	C. Abortus
				C. Psittaci
				C. Pecorum
				C. Caviae
				C. Felis
			Chlamydia	C. Trachomatis
				C. Muridarum
				C. Suis

TABLA N°1 : Taxonomía de *Chlamydia trachomatis*

FUENTE: (Rayo J, 2015, p 14).

Cambios suficientes para realizar una actualización de esta familia bacteriana, donde *Chlamydia trachomatis* es responsable de más de 100 millones de infecciones de transmisión sexual y de 90 millones de casos de tracoma en el mundo. (Rodríguez M, et al, 2013.p 2).

2.2.2 GENERALIDADES

Chlamydia es un grupo de bacterias de tamaño pequeño y forma cocos en cadenas. Su principal característica es el ciclo replicativo intracelular, lo cual las convierte en parásitos obligados. Con una pared celular tipo Gram negativa, sin embargo, el peptidoglicano es nulo o casi imperceptible (a pesar de tener genes para su síntesis). Los principales antígenos de las *clamidias* están presentes en la pared (en la "membrana externa"), la cual contiene el lipopolisacárido (LPS), la proteína principal de la membrana

externa (M O M P, del inglés "M a j o r O u t t e r M e m b r a n e P r o t e i n") y otras dos proteínas ricas en cisteína: una proteína de envoltura (62Kd) y una lipoproteína (12Kd). Tanto la M O M P como los LPS, son los componentes antigénicos más importantes. Estas bacterias expresan un epítipo lipopolisacárido específico de familia (ex epítipo específico de género). Contenido G + C aproximadamente 40 mol% .

2.2.3 F O R M A D E V I D A

Son parásitos intracelulares obligados de las células de los vertebrados, debido a esta característica escapan frecuentemente del sistema inmunitario. Su ciclo de desarrollo adquiere dos formas: el corpúsculo elemental y el corpúsculo reticulado o inicial, que representan la forma extracelular e intracelular del parásito respectivamente (Ramos B, 2011,p7).

2.2.4 C A R A C T E R Í S T I C A S G E N É T I C A S D E C H L A M Y D I A T R A C H O M A T I S

El genoma cromosómico de la *Chlamydia trachomatis* es pequeño, de 1.042.519 pares de bases (58,7% de A-T), y se caracteriza por tener un plásmido críptico de 7.493 pares de bases. Su genoma codifica aproximadamente para 875 proteínas de las cuales 70 son propias de *Chlamydia trachomatis*. Posee genes similares a otros en especies como *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, que codifican proteínas que intervienen en la estructura, función y en los aspectos inmunológicos de la bacteria (Ramos B.2011,8).

2.2.5 GENOMA DE LA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Es importante destacar que cerca de región de origen de la replicación del cromosoma *Chlamydia* existe mayor diversidad genética. Incluye genes que regulan la síntesis del triptófano y su aplicación, se ha relacionado con la mediación de interferón Gamma en el desarrollo de la infección persistente. Las *Chlamydias* que han infectado el tracto genital humano poseen en esta región un gen homólogo de citotoxinas reportadas en *E. coli* entero hemorrágica 0157 y *Clostridium*.

Chlamydia es un organismo aeróbico que utiliza el glutamato como fuente primaria de carbono, complementada por glucosa y 2 oxoglutarato, cada uno tiene diferentes papeles dependiendo de la fase del desarrollo *Chlamydia*. Se cree que *Chlamydia* es un parásito energético porque importa ATP de la célula huésped; sin embargo, en el análisis de la secuencia de su genoma se encontraron genes que codifican ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares probablemente involucradas en la síntesis de ATP. La presencia y expresión de genes involucrados en las vías metabólicas para la generación de ATP sugiere que *Chlamydia* no es un estricto auxótrofo de ATP. 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.

Todos los plásmidos de *Chlamydia trachomatis* aislados de humanos son extremadamente similares con menos de un 1% de variaciones en la secuencia de nucleótidos, todos tienen alrededor de 7.500 nucleótidos, con 8 marcos abiertos de lectura.

2.2.6 CICLO DE DESARROLLO DE LA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Chlamydia trachomatis presenta un ciclo de desarrollo que comprende dos morfologías, una llamada cuerpo elemental (CE) y otra que se conoce como cuerpo reticular o de inclusión (CR). Los CE miden alrededor de 300 nm, son extracelulares, redondos electro densos bajo infectivos, antigénicos y no proliferativos. El DNA dentro de ellos se encuentra altamente compactado por la acción de dos proteínas semejantes a histonas.

Los CRs tiene un tamaño variable que va desde 400 nm a 1µm, son intracelulares, no infectivos ni antigénicos, metabólicamente activos y representa la forma reproductiva de la bacteria. Microscópicamente el citoplasma se observa granulosos y difuso, el material nuclear se aprecia de aspecto fibrilar y relajado. Se precia una membrana externa y una interna por lo que es considerada una bacteria Gram negativo.

El ciclo de desarrollo involucra la infección y entrada de la bacteria a células eucariotas y su posterior replicación dentro de una vacuola modificada conocida como inclusión. Este ciclo ha sido dividido en varias etapas para su estudio:

- Adherencia y entrada, transformación primaria (transformación de Ces a CRs),
- División, transformación secundaria (transformación CRs a Ces) y
- Liberación de los nuevos Ces.

Durante estas etapas existe una estrecha relación entre la bacteria y su célula huésped. A nivel molecular existen eventos que van desde el

reconocimiento de ligandos y receptores, hasta la señalización y regulación del metabolismo.

El ciclo de desarrollo comienza con la interacción del ligando presente en la superficie del CE con los receptores presentes en la célula eucariotas (adherencia), lo cual desencadena una serie de señales dentro de la célula eucariota que culminara con la interiorización del CE dentro de una vacuola fagocítica. En el caso de *Chlamydia trachomatis*, ambos procesos no tardan más de 15 min. en realizarse.

La vacuola fagocítica que contiene el CE es transformada por la bacteria y es conocida como inclusión, evade la función fagolisosomal y se desplaza por el citoplasma hasta localizarse en el núcleo. Durante este trayecto, el CE se convierte en CR y comienza a desarrollarse. Aproximadamente entre 6 y 8 h después de la infección, el CR se encuentra plenamente desarrollado y se divide, produciendo nuevos CR los cuales a su vez se desarrollan y dividen. Entre las 24 y 48 horas de iniciado el ciclo, los nuevos CE son liberados al medio externo, donde pueden infectar a las células vecinas e iniciar nuevamente el ciclo.

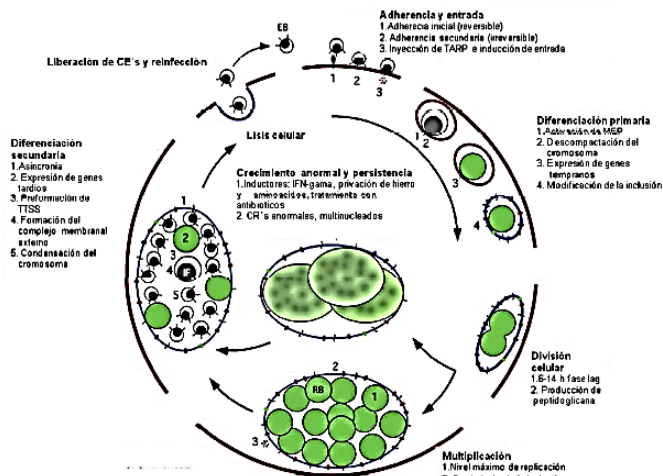


GRÁFICO N° 2: Ciclo de Desarrollo de la *Chlamydia trachomatis*.

FUENTE: (González B, 2011, pág. 1).

2.2.6.1 ADHERENCIA Y ENTRADA

La adherencia es el primer paso en la infección de la célula hospedera y se desarrolla en dos eventos seguidos. El primero involucra una interacción electrostática reversible entre heparan sulfato glicosaminas presentes en la membrana celular y la proteína de membrana externa OmpA de la bacteria. El segundo evento es irreversible y significa el reconocimiento específico ligando-receptor entre el CE y la célula huésped, sin embargo las moléculas implicadas no han podido ser identificadas.

Los candidatos para intervenir como ligandos son proteínas presentes en la membrana externa de los Ces: la misma OmpA, así como OmcB y Hsp70. El

receptor celular no han sido descrito, sin embargo algunos estudios demuestran una asociación importante entre el serovar E de *Chlamydia trachomatis* y la proteína disulfuro isomerasa (PDI), que forma parte del complejo estrógeno receptor de las células polarizadas HEC-1B.

La internalización de los Ces a la célula después de la adherencia representa un paso crítico en el ciclo de desarrollo de la bacteria. Varios mecanismos de entrada a células no fagocitadas han sido descrito para *Chlamydia trachomatis*: 1) endocitosis mediada por clatrin, 2) entrada mediada por caveolinas, 3) fagocitosis directa, 4) pinocitosis generalizada, 5) polimerización localizada de actina por un efecto secretado por TTSS conocido como Tarp y 6) mecanismos relacionados como anexinas dependientes de calcio y calmodulina. No hay un mecanismo exclusivo debido a que no existen bloqueadores que impiden totalmente la entrada de las bacterias, la *Chlamydia trachomatis* es capaz de presentar varios de estos mecanismos de manera simultánea.

2.2.6.2 DIFERENCIACIÓN PRIMARIA Y DIVISIÓN CELULAR

Una vez dentro de la célula, los Ces se convierten en CRs. Transformación que involucra varios eventos. En primer lugar se produce el desempaqueamiento del DNA de la *Chlamydia trachomatis* para su inmediata transcripción y traducción. Las proteínas parecidas a las histonas como HctA y HctB deben ser eliminados del DNA bacteriano y esto se debe a la acción 2C-metileritritol 2,4ciclodifosfato, un metabolito de la vía del mevalonato (MEP) que actúa como antagonista HctA, aunque se desconoce cómo rompe la interacción DNA-HctB. Evento que sucede de manera

inmediata a la infección 15 min después, en la que se expresa la primera proteína clamidial. La Euo la cual se desconoce su función.

Durante la primera hora después de la infección se sintetizan varias proteínas que participan en la translocación de las moléculas (ADP/ATP translocasa, olipeptidos, permeasas, acarreador de NTP's y D - alanina - glicina permeasa), en la transformación de metabolitos (malato. deshidrogenasa, nucleosido-fosfatohidrolasa y metioninamino peptidasa), en la modificación de la inclusión (CT228, CT229 y CT149) y otras de función desconocida. El objetivo primordial es establecer un sistema de adquisición de nutrientes y modificar la vacuola parasitófora evitando así la función fagolisosomal.

La membrana de inclusión es modificada por la inserción de varias proteínas producidas por la bacteria, llamadas Inc unas se encuentran en la membrana de la inclusión y otras en el interior de la misma, proteínas que son reconocidas por anticuerpos de pacientes infectados. Su expresión puede ser detectada dos horas después de la infección.

El CR aumenta su tamaño conforme avanza la síntesis de las proteínas alistándose para su división, que se da en un lapso de 14.16 horas después de la infección. Al mismo tiempo la inclusión aumenta de tamaño y ocupa gran parte del citoplasma desplazando al núcleo hacia la periferia. Momento en el que se expresan varios genes metabólicos así como efectores durante la infección.

2.2.6.3 DIFERENCIACIÓN SECUNDARIA

La fase tardía del ciclo de desarrollo se caracteriza por la transformación de los CRs en nuevos CEs. Podemos encontrarlos en diferentes estadios de maduración de los CR dentro de la misma inclusión y durante las últimas hora del ciclo, la inclusión *clam idial* contiene tanto CR y como CE. A partir de las 40 horas de post-infección se expresan aproximadamente unos 28 genes cuando la mayor parte de los CRs se han diferenciado. Dentro de los cuales se encuentran las proteínas similares a las histonas HctA y HctB que condensan el DNA en cromatina, y las proteínas de la membrana externa ricas en cisteína OmcA y OmcB que forman el complejo OmpA en la membrana externa. Y también CT780, CT783, mtpA y mtpB que posiblemente participan en la formación del complejo membranar externo de los Ces.

2.2.6.4 SALIDA

La liberación de los Ces producidos representa la fase final y la infección de las células vecinas cerrando de esta forma el ciclo de desarrollo. Esto se puede dar por dos situaciones: la lisis total de la célula infectada o la liberación de un parte de la inclusión envuelta en la membrana celular, proceso denominado extrusión.

Se presenta la disgregación de la membrana de inclusión como resultado final de la acción de las proteasas, la inclusión se rompe, liberando a las bacterias dentro del citoplasma. Posteriormente se rompe la membrana plasmática en la cual participan algunas proteasas y depende dela

concentración de calcio extracelular, liberando las bacterias y restos celulares. Proceso que dura aproximadamente entre 15-20 min.

La extrusión es el empaquetamiento de varias bacterias en pequeñas vesículas provenientes de la inclusión y su posterior liberación de la célula envueltas en la membrana celular. Es un proceso lento que dura de 2-3 horas dejando la célula intacta. Esto está íntimamente relacionado con la polimerización de actina y proteínas clave en la formación del anillo contráctil en la citocinesis: la Miosina II, la proteína de síndrome neuronal Wiskott-Aldrich (N-WASP) y la GTPasa Rho, esta última está relacionada con la liberación de las vesículas, debido a que participan inhibidores de las Rho GTPasas forman extrusiones y quedan adheridas a la célula (González B, 2011).

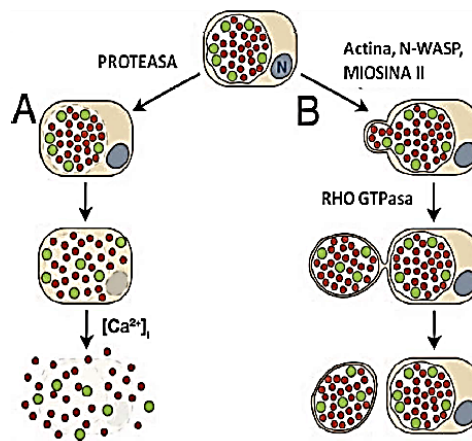


GRÁFICO N° 3: Mecanismo de salida de *Chlamydia trachomatis*. A: lisis de la célula huésped. B:

FUENTE: (Extrusión Tomado de Hybiske y cols, 2007).

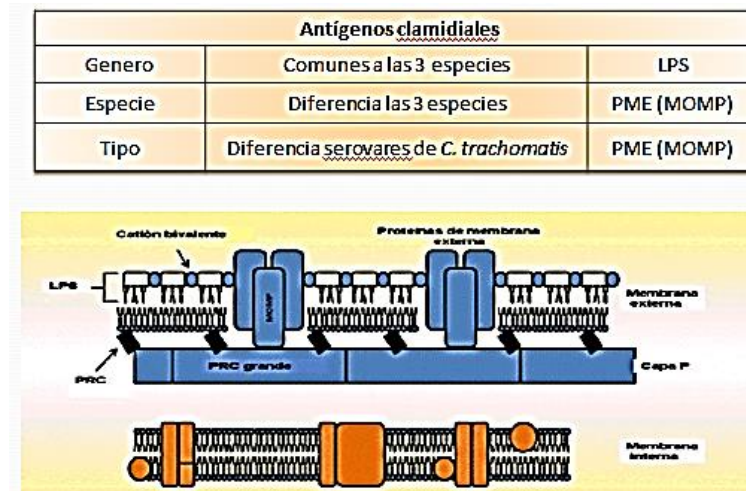


GRÁFICO N° 4: Estructura química de la envoltura celular de *C. trachomatis*.
FUENTE: (Osto O. Sánchez R. 2003).

2.2.7 EPIDEMIOLOGÍA

La importancia epidemiológica de la infección por *Chlamydia trachomatis* radica en las características clínicas que manifiesta, haciendo optimo el tamizaje de las poblaciones de riesgo, como jóvenes de ambos sexos con conductas sexuales promiscuas (se ha establecido que la enfermedad estaría presente en adolescentes y jóvenes menores de 25 años). (Vacana, 2014, p 9).

Estudios realizados en un Centro de Salud de la policía nacional en Quito - Ecuador en el 2013, manifiestan una prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* que varía del 3 al 5% en mujeres. Si revisamos estas estadísticas en mujeres se tiene que casi un 5% de jóvenes asintomáticas de

educación secundaria se encuentran infectadas. Por otro lado un 10% de mujeres que asisten a centros de planificación familiar están infectadas, así como más del 20% de mujeres que asisten a casas de salud de atención de ETS (Vaca N, 2014, p 9,10).

En algunas ciudades de los Estados Unidos se han emprendido programas de diagnóstico que han logrado reducir las cifras de prevalencia hasta un 30%; sin embargo, se necesita de tamizajes más intensos debido al tipo de población asintomática que se puede presentar para la investigación. En los países subdesarrollados no se dispone de estudios permanentes que permitan establecer el grado de infección.

Por otro lado, de los pocos estudios realizados se han logrado determinar que los grupos raciales afro-americano e hispano tendrían más riesgo de infección. De la misma manera, la infección por *Chlamydia trachomatis* se encuentran fuertemente asociada a un bajo nivel socio-económico y a un bajo nivel educativo (Vaca N, 2014, p10).

En América Latina el problema de las ITS especialmente, de la infección por *Chlamydia trachomatis* en adolescentes y adultos jóvenes, está limitada a un pequeño número de estudios y a datos oficiales incompletos de los países de la región. En muchos países como por ejemplo Inglaterra y EE.UU, han implementado estrictas campañas de prevención y control con cribados al menos una vez al año, para detectar una infección por *Chlamydia trachomatis* en todas las mujeres que se encuentran sexualmente activas, asintomáticas y menores de 25 años (Vaca N, 2014, p70,71).

Estudios europeos acerca de poblaciones de estudiantes de educación superior han encontrado una prevalencia que oscilan del 0-12 % de infección por *Chlamydia trachomatis*. Es una de las enfermedades de transmisión sexual más prevalente. En los Estados Unidos, las infecciones bacterianas por *Chlamydia trachomatis* son las más comúnmente reportadas con 4.5 millones de casos anualmente. Las tasas de la infección van desde el 2,3% hasta el 10% en estudiantes de educación superior (Occhonerio M , et al, 2015,p10).

En Argentina, los estudios acerca de poblaciones de estudiantes universitarios son escasos y los valores de prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* informados oscilan entre el 0 % y el 4,5 % . En Colombia, no se conocen datos reales de la prevalencia de la enfermedad (Occhonerio M , et al, 2015,p10).

La infección por *Chlamydia trachomatis* puede ser asintomática en mujeres y pudiendo causar daños en el aparato genital y reproductor con complicaciones a largo plazo en la fertilidad, debido a que podría ocasionar inflamaciones del cuello uterino llamadas cervicitis, o Enfermedad Inflamatoria Pélvica o EPI, siendo la principal causa de abortos y esterilidad, siendo la mujer ser el principal medio contagio, sin saber siquiera que estaba enferma. Las mujeres tienen mayor riesgo de ser asintomáticas que los hombres.

Los profesionales de la salud utilizan métodos de diagnóstico de laboratorio para detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en las mujeres. Algunas pruebas emplean muestras de orina y otras pruebas requieren de muestra de células del cuello uterino. La *Chlamydia trachomatis* se puede curar con antibióticos. Se recomienda que las mujeres embarazadas soliciten a su médico que les realice una prueba de detección de esta bacteria durante la primera etapa del embarazo, si es tratado a tiempo se evitarán complicaciones para la madre y el feto durante el parto.

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* se dan en todas las sociedades, esta enfermedad es más común en países en desarrollo en una minoría, grupos socio-económicos bajos y personas que vive en áreas urbanas (Ostrosky, et al, 2003 p 86).

Otro problema ocasionado por la infección con *Chlamydia trachomatis*, principalmente por el serotipo G, es el riesgo de desarrollar cáncer cervical y en los continentes africano y asiático es la principal causa de ceguera. El Linfogranuloma Venéreo es una infección transmitida sexualmente que ocurre con poca frecuencia en Norteamérica y Europa pero es más común en África, Asia y Sudamérica (Ostrosky, et al, 2003 p 86).

2.2.8 MECANISMO DE INFECCIÓN

La *Chlamydia trachomatis* es una bacteria que puede soportar la acción de aerosoles a temperatura ambiente y de igual forma puede soportar condiciones de humedad elevadas, durante los periodos cortos de tiempo por

esta razón la transmisión persona-persona se puede dar especialmente en situaciones de hacinamiento.

Aquí citamos cinco mecanismos de transmisión de *Chlamydia trachomatis*:

- Transmisión por contagio sexual,
- Transmisión de la bacteria por el canal de parto,
- Por medio de aerosoles con la formación de pequeñas partículas $< 10 \mu\text{m}$.
- Por inoculación directa por gotas o partículas grandes y
- A través de fómites y superficies contaminadas.

De todos estos mecanismos la vía de transmisión sexual es la más común.

Chlamydia trachomatis tiene un tiempo aproximado de vida de 12 a 30 horas en lugares sólidos y de escasa humedad. También es posible una transmisión mano-mano desde los lugares que están contaminados, aunque el inoculo contagiado sea poco y su supervivencia se limita a 15 minutos. El portador asintomático y si la excreciones prolongadas del microorganismo también favorecen la transmisión.

La infección por *Chlamydia trachomatis* se da cuando la bacteria emplea las células para desarrollar sus ciclos reproductivos, para esto la bacteria presenta dos formas:

- **Cuerpos elementales**, se encuentran en el medio externo de la célula (extracelulares) y se adaptan al medio para mantenerse 'latentes' allí, son la forma infectante que se contagia de una persona a otra.

- **Cuerpos reticulados**, estas formas son *no infectantes*, metabólicamente activos, están adecuados para la tener una vida intracelular y son capaces de reproducirse (Ramos B, 2011, p 11).

2.2.9 PERÍODO DE INCUBACIÓN

Se considera que la infección se puede llegar a desarrollarse entre 7 a 21 días después del contacto con persona infectada por *Chlamydia trachomatis*.

2.2.10 SEROTIPOS

Chlamydia trachomatis puede clasificarse en 15 serotipos con funciones características antigénicas del antígeno proteico de tipo. Existe una estrecha relación entre el serotipo y la enfermedad (forma clínica) que producen las diferentes cepas de esta especie. Los serotipos encontrados son: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 y L3 (Rodríguez M, et al 2013, p381).

2.2.11 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección por *Chlamydia trachomatis* es asintomática en la mayoría de casos; pero se conocen dos principales cuadros clínicos frecuentes que están asociados a la infección por esta bacteria, tanto en hombres como en mujeres (Aleman L, et al.2010, p71).

Dentro de las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* pueden mencionarse:

- Linfogranuloma venéreo (LGV), producido por los serotipos L1, L2, y L3.
- Tracoma, producido por los serotipos A, B, Ba y C.

- Infecciones óculo-genitales, producido por los serotipos B y D a K.
- Neumonía del recién nacido, producido por los serotipos D a K.
- Síndrome de Reiter: uretritis, artritis, conjuntivitis.

Pueden tratarse de infecciones genitales causadas por el uso de lugares húmedos por ejemplo o bien por enfermedades de transmisión sexual, como las uretritis no gonocócicas y el linfogranuloma venéreo (Rodríguez M, et al 2013, p381).

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* se puede dividir en tres categorías: tracoma, LGV e infección perinatal.

TRACOMA:

Esta enfermedad se produce por los serovares A, B/Ba y C de *Chlamydia trachomatis*, y puede dividirse en 2 etapas: fase aguda o tracoma activo y fase crónica. La fase aguda es más frecuente en niños mientras que la fase crónica es más frecuente común en adultos jóvenes. La fase aguda tiene un periodo de incubación que oscila entre 5-12 días, se caracteriza por una conjuntivitis folicular de la conjuntiva del párpado superior y una descarga mucoide. Que es más fácil de tratar que en la fase crónica que podría aparecer hasta hinchazón del párpado y cicatrización de la conjuntiva, que podrían deformar el párpado (triquiasis).

LINFOGRANULOMA VENÉREO (LGV):

El LGV es una enfermedad de transmisión sexual causada por los serovares L1, L2 (y sus geno-variantes reciente descritas 2^a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f y 2g) y L3 de *Chlamydia trachomatis* que causa una infección sistémica que implica invasión de los nodos linfoides. Se pueden diferenciar tres fases:

- Desde los 3-30 días después se caracteriza por lesiones ulcerativas en la mucosa genital o piel adyacente. Esta lesión puede ser también intrauretral, cervical o rectal produciendo uretritis, cervicitis o proctitis, respectivamente. Generalmente en esta etapa no suelen presentar síntomas o muy pocos.
- La segunda etapa se produce de 2-4 semanas después con una linfadenopatía inguinal eritematosa y dolorosa, que pueden romperse espontáneamente, drenando el pus. Presentan manifestaciones clínicas como fiebre, cefalea, mialgias, etc.
- La tercera etapa implica complicaciones serias como engrosamiento hipertrófico crónico con ulceraciones de los genitales externos pudiendo llegar a elefantiasis e infertilidad.

INFECCIÓN OCULO-GENITAL:

Los serovares D, K de la *Chlamydia trachomatis* y no frecuentemente B y Ba producen una amplia variedad de infecciones óculo-genitales. En caso de las mujeres embarazadas responsable de partos prematuros e infecciones en el recién nacido ocasionando conjuntivitis y neumonía.

URETRITIS:

La *Chlamydia trachomatis* es la causante principal de las uretritis en el varón en un 22-55%. La infección por *Chlamydia trachomatis* se caracteriza por pocos PMNs y ausencia de microorganismos. Finalmente el tratamiento empírico de la uretritis gonocócica con B-lactámicos, facilitara la eliminación de *N. gonorrhoeae*, pero no eliminara *Chlamydia trachomatis* facilitando incluso la formación de las formas aberrantes.

Cuando *Chlamydia trachomatis* se disemina desde la uretra al epidídimo, causa epididimitis que afecta alrededor de un 3% de varones infectados. Caracterizado por un dolor testicular y escrotal unilateral. Observándose generalmente en la fase aguda oligoespermia, pero no se ha confirmado que produzca esterilidad.

Una respuesta inflamatoria da como resultado la artritis reactiva de origen inmune. Los casos de infección primaria por *Chlamydia trachomatis* asociados a los serovares D-K, también los casos asociados a la infección por el genotipo L2b están relacionados con la Linfogranuloma Venéreo LGV(síndrome de Reiter). En estos pacientes hay un elevado nivel de anticuerpos en suero y líquido sinovial frente a Hsp60. La uretritis también se puede producir en mujeres y se caracteriza por disuria, piuria y micción frecuente que podría desencadenar en una infección urinaria.

CERVICITIS:

La cervicitis mucopurulenta causada por *Chlamydia trachomatis* en mujeres es el equivalente a la uretritis no gonocócica del hombre. Alrededor del 70%

de mujeres no presenta sintomatología, siendo más seria en los varones. En las mujeres la infección puede persistir por tiempos prolongados en el aparato genital femenino. Esta infección puede hacerse crónica llegando hasta el endometrio causando endometriosis, llegar hasta las trompas de Falopio causando Salpingitis o peritonitis. O puede seguir avanzando afectando otros órganos produciendo la Enfermedad Inflamatoria Pélvica que trae como consecuencia a largo plazo dolor pélvico crónico, embarazo ectópicos, prematuridad e infertilidad. Razón por la que se recomienda un cribado sistemático a mujeres de edad fértil.

La mayor probabilidad de desarrollar complicaciones podría estar relacionada también con el tipo de serovar. Existen serovares B, D, E, H, I, J y K son dos veces más propensos a la persistencia que los serovares F y G, revelando la importancia del subtipado de los serovares de la *Chlamydia trachomatis* en las infecciones genitales en mujeres.

INFECCIÓN PERINATAL:

Inicialmente afecta a las membranas mucosas de los ojos, produciendo conjuntivitis, desarrollando conjuntivitis de inclusión que tarda de 5 a 12 días desde el momento de nacimiento, tras el contacto con la *Chlamydia trachomatis* en el cuello uterino de la madre infectada, se observa una inflamación de la conjuntiva con un exudado claro o mucopurulento, pero se puede tratar de 3 a 12 meses a pesar de que la infección subclínica permanezca por varios años. La neumonía se puede producir por la diseminación desde la nasofaringe de los recién nacidos de madres infectadas (Rodríguez M, et al 2013, p381).

2.2.12 SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa contra la invasión microbiana. Antes de la adquisición del anticuerpo específico para el agente invasor, antígenos específicos y a las respuestas inmunes mediadas por células, los componentes de inmunidad innata reconocen y responden a estructuras conservadas que se encuentran presentes en diferentes microorganismos.

Respuesta inmune humoral durante la infección por *Chlamydia trachomatis* con relación a la respuesta humoral frente a *Chlamydia*, se ha encontrado que existe mayor producción de anticuerpos Inmunoglobulina G (IgG) en mujeres con infertilidad y patología tubárica con presencia de *Chlamydia trachomatis*, frente a aquellas mujeres que no tienen esta infección, pero no se conoce con seguridad si este tipo de respuesta humoral es protectora o está por el contrario asociada a mayor susceptibilidad.

Actualmente existen técnicas para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* y la relación con infertilidad, ya que existen un porcentaje alto en un 70% de mujeres con oclusión tubárica, siendo el más común la detección de IgG anti-CHSP60. Modulación de la respuesta inmune del huésped emplea mecanismos para desviar la respuesta inmune y producir cambios celulares que permitan su supervivencia para perpetuar la inflamación. Uno de los mecanismos que utiliza *Chlamydia trachomatis* para evadir la respuesta inmune de reconocimiento y destrucción por los linfocitos T citotóxicos es la regulación negativa de la expresión.

Durante la infección, algunas proteínas se translocan al núcleo de la célula huésped y se asocian con la cromatina; su actividad enzimática permite unir grupos metilo a residuos de lisina de las histonas produciendo modificaciones en la acetilación, fosforilación y metilación, contribuyendo a la activación o supresión de genes de forma directa o indirecta, por un cambio en la estructura de la cromatina, esto permite a las bacterias resistir a los mecanismos inmunológicos de huésped.

Chlamydia trachomatis modifica en forma negativa la respuesta de NF- κ B mediante su interacción con la proteína inhibidora B, para favorecer su supervivencia dentro de la célula huésped debido a que evita la expresión de los genes que codifican para citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y reguladores de apoptosis, ya que el objetivo principal que tiene es reclutar macrófagos y polimorfonucleares, cuyo propósito es la erradicación de la infección.

Por último, la *Chlamydia trachomatis* incrementa la duración de los polimorfonucleares, la producción de citocinas y metaloproteinasa-9 de matriz (MMP9) vía dependiente de TLR-2, a más de encontrarse con una gran actividad de la oxidasa fagocitaria, con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo cual se encuentra asociado con lesión tisular (López M, et al, 2012, p348).

El enlace de MB conocida como una molécula de reconocimiento de patrón en la defensa del huésped de primera línea, presente en la membrana externa. El efecto inhibitor es mediado por la manosa. El gen humano de MBL (MBL2) presente en el cromosoma 10 (q21-24), y los polimorfismos funcionales identificados en el exón 1. El sitio del polimorfismo MBL más común en las poblaciones blancas está presente en el codón 54. El MBL se

encuentra en concentraciones muy reducidas en la circulación y en el líquido vaginal (Soto C, 2010,p46).

Tanto las células epiteliales como la circulación de células del sistema inmunitario innato, poseen Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR) enlazados a la superficie celular o intracelular. Existen dos familias que sobresalen: la familia del receptor tipo Toll (TLR) y las proteínas de dominio (NOD) de oligomerización de enlace de nucleótido. Los PRR reconocen y enlazan al agente patógeno con los Patrones Moleculares Asociados, también conocidos como Patrones Asociados a Microorganismos Patógenos (PAMPs), que son componentes de los organismos extraños(Soto C, 2010,p46).

El enlace de un PRR a su PAMP produce varias reacciones intracelulares, incluyendo la cascada de transducción de señal con el Factor Nuclear (NF)-B como el producto final. El NF-B capaz de enlazar en el núcleo secuencias específicas de DNA, aumentando de esta manera la producción de citocinas pro-inflamatorias. Debido a que PRR diferentes reconocen otros PAMPs, el sistema PRR permite la iniciación de la respuesta inmune innata de una manera flexible y compleja. Cuando un agente agresor ingresa al cuerpo, las células epiteliales son la primera línea de defensa (Soto C, 2010,p46).

2.2.13 INMUNIDAD ADAPTATIVA

El sistema inmunitario adaptativo es un sistema específico, que se desarrolla luego del primer contacto con un agente patógeno. Construye una memoria contra el patógeno, que es responsable de una rápida respuesta inmune tras la re-infección.

Se han identificado 11 TLRs diferentes. Las PAMPs de todos los TLRs, salvo TLR10, son conocidas. El enlace de un TLR a su PAMP inicia la inmunorrespuesta activando la cascada de transducción de señal del NF- κ B. El TLR2 es el PRR para el componente péptido glucano de *Chlamydia trachomatis*, y TLR4 es el PRR para los componentes lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de choque térmico de *Chlamydia trachomatis*. El TLR9 reconoce al DNA bacteriano. Esto sugiere que estos TLRs pueden desempeñar un papel en la defensa del huésped contra infecciones de tracto genital por *Chlamydia trachomatis* o polimicrobial (Soto C, 2010, p49).

2.2.15 DIAGNÓSTICO

Las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* pueden ser diagnosticadas a través de una detección directa de antígenos en muestras clínicas, por técnicas genéticas, cultivo o por serología.

El diagnóstico de la infección se evidencia adecuado a un examen físico de la persona sospechosa de la enfermedad, pero la confirmación del mismo se da especialmente por pruebas de laboratorio como son:

- **A través de Tinción de muestras de exudado**, la técnica empleada es por IFD Inmunofluorescencia Directa, para visualizar la presencia de cuerpos de inclusión. Pero, su eficacia y practicidad no es la más adecuada como método de diagnóstico en grandes poblaciones.

- **Cultivo de células para detectar *Chlamydia trachomatis***, no es la más indicada ya que necesita de condiciones muy rigurosas de preparación del cultivo, el medio de cultivo empleado es el McCoy para el aislamiento de *Chlamydia trachomatis* o un cultivo de líneas celulares Hela 229, esto se lo puede realizar solamente en laboratorios de alto nivel de complejidad y la sensibilidad como prueba es variable entre 60-80% .
- **Prueba de ELISA** (ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas) para detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis*, perfeccionado en muestras de exudado, su ventaja es la de poseer una gran especificidad (90-97%) y una regular sensibilidad (60-80%), se adecua al tamizaje de grandes poblaciones (Ramos B, 2011, p16, 20).
- **Ensayos de hibridación de ADN**, su importancia es similar a la anterior prueba, y mantiene similares niveles de especificidad y sensibilidad, esta prueba es empleada con más frecuencia en pruebas de diagnóstico en muestras uretrales y rectales.
- **Ensayos de amplificación de material genético**, que emplean las pruebas PCR (reacción en cadena de polimerasa) convencional o en la actualidad contamos con nuevas técnicas de diagnóstico como la PCR Tiempo Real o LCR (reacción en cadena de ligasa), para amplificar el material genético de la bacteria obtenido a partir de muestras de orina y/o de secreciones. Esta es una prueba muy específica y sensible, detectando hasta el 90-95% de las infecciones, este método está considerado como el método de elección para el diagnóstico de la infección (Ramos B, 2011, p16, 20).

2.2.16 TRATAMIENTO

Este tipo de infección requiere de un tratamiento que debe ser siempre prescrito y supervisado por un médico profesional. Los protocolos de tratamiento varían de acuerdo en los diferentes países. Pero, existen características específicas de tratamiento que también son aplicables a otras enfermedades de transmisión sexual ETS como en este caso:

- Cumplimiento del tratamiento en su totalidad, de acuerdo a la prescripción médica, ya sea en cuanto al esquema del tratamiento y al tiempo de duración.
- Identificar a la(s) pareja(s) sexual(es) de la persona infectada, con el fin de considerar la necesidad del tratamiento y de esta manera evitar la diseminación de la enfermedad.
- Concientizar en el cambio de comportamientos sexuales de riesgo.
- Mientras el tratamiento se lleva a cabo, y no se ha tratado a la(s) pareja(s) sexual(es) de la persona infectada, evitar en lo posible tener relaciones sexuales o utilizar preservativos si desea mantenerlo teniendo.

El tratamiento se realiza con antibióticos suministrado por vía oral, pueden consistir en Azitromicina en una sola dosis o Doxiciclina en tres dosis diarias durante una o dos semanas. Es importante nunca automedicarse porque sólo el médico es el que sabe que tratamiento es efectivo y en que dosis se debe tomar, de acuerdo a cada caso particular (Villacrés S. 2013p 22).

2.2.17 COMPLICACIONES

Las complicaciones se presentan cuando no se ha identificado el cuadro clínico de *Chlamydia* en la persona infectada, ocasionando una demora en el tratamiento que a la larga supone el compromiso de otros órganos. La posibilidad de re-infecciones, la persistencia de conductas sexuales riesgosas y la presencia de nuevos serotipos se han considerado como causa de las complicaciones de la infección, aquí mencionamos:

- En el varón: La infección puede llegar hasta el epidídimo, y ocasionar un proceso inflamatorio-infeccioso que a la larga puede producir una disminución y/o obstrucción considerable de la luz del conducto, lo que se traduce en infertilidad, sobre todo en varones menores de 35 años. También puede haber compromiso testicular. Algunos autores indican que ha llegado afectar hasta la próstata, sin embargo, esta información no ha sido comprobada. La presencia de infección en la zona rectal (Proctitis), se presenta en la mayoría de veces como asintomática, pero se han descrito síntomas como secreción mucosa, diarrea y rectorragia.
- En la mujer: se presenta complicaciones con mayor severidad y la posibilidad de tener secuelas. La diseminación vertical puede ocasionar endometritis, salpingitis que al producir inflamación de la luz de la trompa de Falopio dando como consecuencia la posibilidad de embarazo ectópico o infertilidad siendo tres veces mayor que en el caso de gonorrea. La infección de la cavidad abdominal por esta bacteria ocasiona un proceso inflamatorio-infeccioso crónico conocido como enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) que se caracteriza por dolor pélvico (en abdomen bajo), uretrorragia y fiebre, cuyo tratamiento es bastante largo y no siempre efectivo. El cuadro puede variar desde una

enfermedad leve hasta un cuadro de peritonitis pélvica. Por último, se ha determinado que la infección por *Chlamydia* durante la gestión puede causar rotura prematura de membranas y parto prematuro, además da lugar a la posibilidad de aborto.

Es importante mencionar que la madre puede transmitir la bacteria al bebe durante el momento del parto, lo que ocasionaría la presencia de infecciones conjuntivales y del tracto respiratorio.

La artritis reactiva presenta un cuadro clínico con un grupo de síntomas como artritis, dermatitis y uveítis que se evidencia luego de la infección por variados gérmenes, entre ellos *Chlamydia trachomatis*. Se trata de una reacción exagerada de la producción de anticuerpos por parte del sistema inmunitario, que ataca estructuras como son la cápsula articular, la piel y la  vea ocasionando su inflamación y consecuente daño (Ramos B.2011. P16,20).

2.3 PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA (qPCR)

PCR cuantitativa.-qPCR (del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) o **PCR en tiempo real** (del inglés *real time PCR*) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y al mismo tiempo cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Para ello emplea, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable de igual manera que en la PCR convencional; la diferencia es que a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con

un fluoróforo, el mismo que en un termociclador que contenga sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda correspondiente que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Tamay de Dios L, et al, 2013, p 72).

Esta medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación razón por la que se denomina PCR en Tiempo Real. En muchos casos el molde que se utiliza para la PCR Cuantitativa no es de ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retro-transcripción de ácido ribonucleico (ARN) y la técnica que se emplea RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real o RT-Q-PCR. Debe evitarse la confusión con la técnica denominada PCR tras transcripción inversa (*RT-PCR*, del inglés *reverse transcriptase PCR*), aquí se realiza un paso de retro-transcripción de ARN a ADN pero que no necesariamente cuantifica el producto a tiempo real.

La PCR cuantitativa es la técnica más moderna para el estudio de la expresión génica, junto a chip de ADN. Se han desarrollado numerosos sistemas de estandarización para cuantificar de forma absoluta la expresión génica, comúnmente se orientan a la cuantificación relativa del gen de estudio respecto de otro, denominado normalizado, seleccionado por su expresión casi constante; estos genes suelen denominarse, en inglés, *house-keeping genes*, los mismos que suelen involucrarse en funciones básicas en la supervivencia celular, lo que se denomina expresión constitutiva. (Tamay de Dios L, et al, 2013, p 73).

Los genes normalizadores más utilizados son los que codifican para las siguientes proteínas: tubulina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, albumina, ciclofilina, RNA ribosomales, etc.

Hay que considerar en cuenta que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. A continuación se explica con detalle lo sucede en cada una:

2.3.1 Desnaturalización

En esta primera etapa, las cadenas de ADN se separan calentándose a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo va a depender de la secuencia del templado, si la cantidad de G-C es muy alta, será necesario emplear más tiempo para romper sus uniones, las C-G requieren más tiempo que las A-T ya que tiene un enlace más. La velocidad del termociclador en aumentar su temperatura será la importante ya que esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa las cadenas se encuentran separadas y servirán como templado para el siguiente paso (Tamay de Dios L, et al, 2013, p 74).

2.3.2 Hibridación.

En esta etapa, se alinean los primers en el extremo 3' del templado anteriormente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Es necesario que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima para que se forme el complejo templado-primers; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

2.3.3 Extensión.

En esta última etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza a una velocidad muy rápida su actividad catalítica y con la ayuda de dNTP's complementarios crean las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas van en dirección de la síntesis del ADN, esta es de

5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, habremos obtenido los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb), que serán conocidos por la persona que investiga. (Tamay de Dios L, et al, 2013, p75).

Etapas de la PCR

1. **Desnaturalización:** Apertura de la doble cadena
2. **Alineamiento:** Anillaje de primers
3. **Extensión:** Generación de la nueva cadena

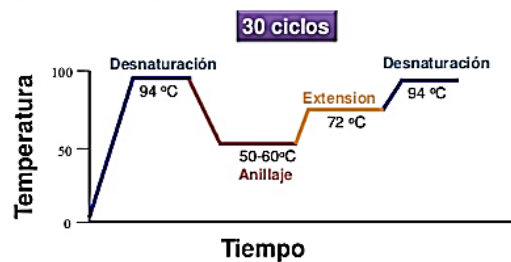


GRÁFICO N° 5: Etapas de la Amplificación PCR Tiempo Real

FUENTE: http://es.slideshare.net/LU_CGG/clase-3-28137096

Un diagrama de amplificación es una gráfica en la cual se evidencia la señal de la fluorescencia contra el número de ciclos. En los ciclos iniciales de PCR, existe un pequeño cambio en señal de fluorescencia, el mismo define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en la fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (Sandoval A, et al, 2010, p8).

2.4 TERMOCICLADOR PCR TIEMPO REAL

El termociclador PCR Tiempo Real es un equipo con un software sofisticado que brinda una eficiencia de alta calidad, este equipo le da un excelente rendimiento y fiabilidad. Es ideal para los laboratorios que realizan diagnóstico e investigación. Tiene la característica que implica la detección de 101 copias / ml a 1.010 copias / ml, no sólo se puede amplificar y detectar sino que hacer un análisis cuantitativo de la muestra amplificada. Una unidad de alta sensibilidad que ofrece una precisión de clase mundial.

El equipo de tiempo real tiene capacidad para analizar hasta 96 muestras simultáneamente partiendo de una cantidad inicial de DNA o con diluciones seriadas del mismo, generando curvas. Asimismo, tiene la capacidad de detectar simultáneamente cinco filtros de emisión y cinco filtros de excitación distintos (Sandoval A, et al, 2010, p 9).



GRÁFICO N° 6: Termociclador Tiempo Real

FUENTE: Autora

2.5 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador que tenga una capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromos excitado. Los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en esta técnica pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

El proceso de PCR en Tiempo Real por lo general consiste en una serie de cambios de temperatura en una primera etapa de 50°, una segunda de 95°C y un tercera etapa que a su vez que comprende dos fases o etapas: la primera a 95°C y la segunda a 60°C. En esta última etapa se puede evidenciar las primeras curvas de amplificación en tiempo real.

La PCR Real Time es la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. Con el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra. (Cortázar M, Silva E, 2004, p 9).

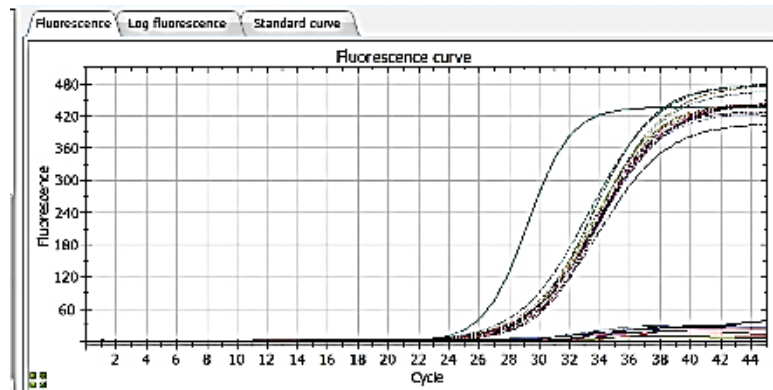


GRAFICO N°7:Diagrama de amplificación PCR Tiempo Real

FUENTE: Autora

Los datos de la PCR Real Time se adquieren cuando la amplificación se encuentra en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclos en donde la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con relación al ruido de fondo. (background). Este número de ciclos se llama ciclo umbral (Ct: threshold cycle). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción, lo que le hace más confiable que las mediciones en PCR punto final convencional. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del DNA blanco es decir a mayor concentración de blanco, menor Ct medido.

La gráfica de logaritmo del número inicial de copias del blanco para un sistema de estándares contra Ct es una línea recta. La cuantificación de la cantidad de blanco en las muestras desconocidas se obtiene midiendo el Ct y utilizando una curva estándar para la determinar el inicio del número de copias. Todo el proceso de calcular los Cts, de preparar una curva estándar, y de la determinación del número de copias iniciales para las muestras es realizado por un sistema software del Termociclador Real Time empleado.

El software calcula el C_t para cada reacción. Los valores de C_t se trazan contra el logaritmo de la cantidad inicial de DNA para dar la curva estándar. Para esto se emplea diferentes diluciones de un gen generalmente es un "house-keepinggen" que se exprese en la mayoría de tejidos como por ejemplo la *B-actina*.

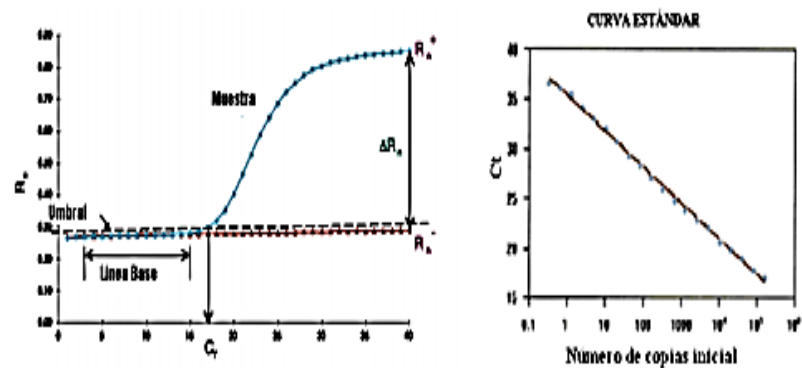


GRAFICO N° 8: Estos dos diagramas y junto con la gráfica de amplificación ilustran los principios básicos de la cuantificación en tiempo real de PCR.

FUENTE: (Cortázar M, Silva E, 2004, p 11).

Recopilado se puede decir que mientras más alta es la cantidad inicial de DNA, más pronto se detecta el producto acumulado en el proceso de PCR y por ende más bajo es el valor de C_t . Los valores de C_t son reproducibles en la replicas porque el umbral se elige en la fase exponencial de la PCR y esto se demuestra en la gráfica de amplificación, la región en la cual existe una relación lineal entre el logaritmo del cambio en fluorescencia y el número de ciclo. En la fase exponencial, los componentes de la reacción no están limitados y las reacciones de replicación es muestran resultados reproducibles y uniformes.

2.6 GENES ESTANDARES

La PCR Tiempo Real utiliza un control interno que es un gen cuya expresión no cambia, este debe cumplir con las siguientes características:

- Este gen debe tener el mismo número de copias en todas las células.
- Debe expresarse en todas las células del cuerpo.
- Un número de copias intermedio es muy ventajoso.

Se puede decir que no existe un estándar perfecto por lo que el estándar que se utilice debe ser validado por la muestra, debe ser capaz de demostrar que la expresión del mismo no cambia significativamente en las células o tejidos cuando están sujetos a las reacciones de experimentos que se pretenden someter.

Entre los estándares o controles endógenos más usados están:

- ARN Ribosomal (rRNA)
- Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa,
- Beta-actina,
- MHC I (complejo de mayor histocompatibilidad),
- Ciclofilina,
- rRNAs 28s o 18s (RNAs ribosomales). (Cortázar M, Silva E, 2004, p16)

Se les puede clasificar como:

2.6.1 Genes constitutivos

Los genes como de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y de la β -actina, son los más utilizados. Sin embargo, debido a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, se ha observado que en práctica, algunos procesos biológicos o también el uso de diferentes tipos de

células se van a ver afectada en su expresión. Por lo tanto, es prescindible validar la estabilidad de expresión del gen control empleado en base de un experimento a realizar antes de llevar a cabo la estandarización.

2.6.2 Genes del ARN ribosomal (ARNr)

Frecuentemente, se emplea el 18S. Estos ARNr son sintetizados por medio de una polimerasa distinta a la que sintetiza los ARNm, por consiguiente la expresión del ARNr se encuentra menos afectada por el tratamiento a las que se encuentran sometidos las muestras.

2.6.3 ARN total

La cantidad del ARN total se usa para estandarizar la expresión de genes. Esta estandarización presenta dos inconvenientes. El primero que es la cuantificación del ARN tiene que ser muy exacta, por lo que los métodos espectrofotométricos que se emplean rutinariamente no pueden ser utilizados y el proceso de normalización depende precisamente de la cuantificación del ARN. El segundo es la concentración del ARN total se encuentra está afectada por distintos procesos celulares.

2.6.4 ARNm múltiples

Se emplean varios genes constitutivos y se obtiene un factor de normalización que proviene de la media de los niveles de expresión. La utilización de varios ARNm constitutivos transforman en el método más aceptado en la actualidad para normalizarlos datos en la expresión génica, reducen los problemas mencionados con los otros métodos (Aguilera P, et al, 2014).

Los ciclos iniciales de la PCR se caracterizan por un aumento exponencial en la amplificación del blanco. Al ser limitados los componentes de la reacción, el índice de amplificación disminuye hasta que se alcanza una meseta y como consecuencia hay poco o nada de producto amplificado.

En la fase exponencial ninguna de los componentes de la reacción están limitado, por lo tanto los valores de Ct son muy reproducibles para las reacciones que inicien con el igual número de copias. Esto conlleva a una mayor precisión en la cuantificación del DNA o RNA.

La detección de la fluorescencia en los sistemas de software permite que el Ct sea evidente mientras la amplificación está todavía en la fase exponencial. Por esta razón el Ct es una medida más confiable del número de copias que comienza, comparando con una medida del producto acumulado mediante PCR punto final.

El valor de Ct proporcionó la información más importante de la reacción, ya que permite calcular la cantidad de ADN inicial. Más ADN inicial más pronto se llega al umbral en número de ciclos. A menor Ct, mayor cantidad de ADN molde inicial. (Cortázar M, Silva E, 2004, p 26).

UMBRAL.- Nivel para el cual la amplificación es la mejor para la detección.

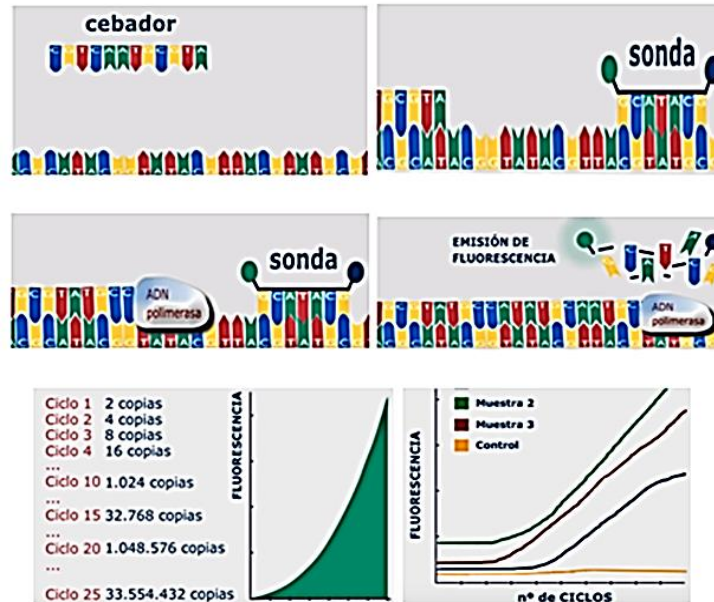


GRÁFICO N° 9: Esquema de las fases y diagrama de amplificación del PCR Tiempo Real

FUENTE: <https://www.youtube.com/watch?v=e74YYdSHraY>

2.7 VALOR DE CT

El Ct (cycle threshold), nos indica el número de ciclos necesarios para que una curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. Los Ct comparados de las muestras analizadas permiten calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea estudiar, ya que a mayor cantidad del ADN blanco existente en la muestra, menor será el número de ciclos (Ct) que se requieran para alcanzar este umbral. Se debe considerar que el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco a partir del cual se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN.

El valor de Ct puede ser obtenido de manera automática por el Software del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. El Ct es un valor de fluorescencia, que podría ser afectado por características propias del equipo detector, como son los filtros utilizados, la ganancia, el tiempo de vida de la lámpara, entre otros, por lo que se hace posible comparar valores de Ct entre diferentes experimentos y/o equipos.

Para evaluar la cantidad del ADN de interés, se considera la eficiencia de la amplificación. En el caso más simple, la eficiencia de la amplificación es 100%, es decir, el Ct se determina sólo durante la fase geométrica de la amplificación donde ésta es 100% eficiente. Si se asume esta eficiencia, la proporción entre la cantidad inicial de copias del ADN blanco entre dos muestras diferentes se calcula como:

$$[No]A/[No]B = 2(\Delta Ct)$$

Donde:

[No]A = número inicial de moléculas del ADN en la muestra A

[No]B = número inicial de moléculas del ADN en la muestra B

ΔCt = la diferencia entre $CtB - CtA$

Si el Ct de la muestra A es tres veces mayor que el de la muestra B, en otras palabras, B requiere de tres ciclos adicionales para alcanzar el mismo umbral de fluorescencia que A, eso quiere decir que hay 8 ($2 \times 2 \times 2$) veces más ADN blanco en la muestra A que en la B.

La fórmula 1 sólo se puede utilizar en la fase geométrica cuando la eficiencia es 100%.

Sin embargo, en los casos experimentales la eficiencia no siempre es el 100%, razón por la que es necesario incluir la eficiencia de la reacción en la fórmula:

$$[N_0]A/[N_0]B = (1+E)(\Delta C_t)$$

Donde

E es la eficiencia de la reacción (validación de los ensayos de la PCR en tiempo real).

Dicha eficiencia de amplificación debe considerarse para tener una cuantificación confiable. Al inicio, se consideraba que era suficiente elegir valores de C_t en la fase geométrica para asumir una eficiencia total. Sin embargo, en la mayor parte de los casos experimentales no la presentan, es necesario calcularla para lograr un factor de corrección que impida una sobreestimación de la concentración del ADN inicial.

La eficiencia de la reacción de la PCR se calcula usando una "curva" proveniente de la amplificación de una serie de diluciones de un estándar, la desviación estándar entre los diferentes puntos debe tener un valor de C_t menor a 0.2.

La recta está descrita por la siguiente ecuación:

$$C_t = k \log(N_0) + C_t(1)$$

Donde

$C_t(1)$, corresponde a una dilución del estándar que contiene una sola molécula del ADN blanco. La eficiencia de la reacción se calcula con la siguiente fórmula: $E = 10^{-1/k} - 1$

Cuando la pendiente (k) de la recta obtenida es cercana o igual a -3.32 , la eficiencia de la amplificación es igual a 100% . El valor calculado de E debe sustituirse en la ecuación.

El método es utilizado comúnmente para cuantificar la eficiencia de la reacción de la PCR. Existen muchos autores que opinan que puede sobreestimar el valor de E . En la actualidad, además de la curva estándar se recomienda involucrar algún método alternativo para establecer la eficiencia con el fin de confirmar (especialmente en los ensayos de cuantificación relativa).

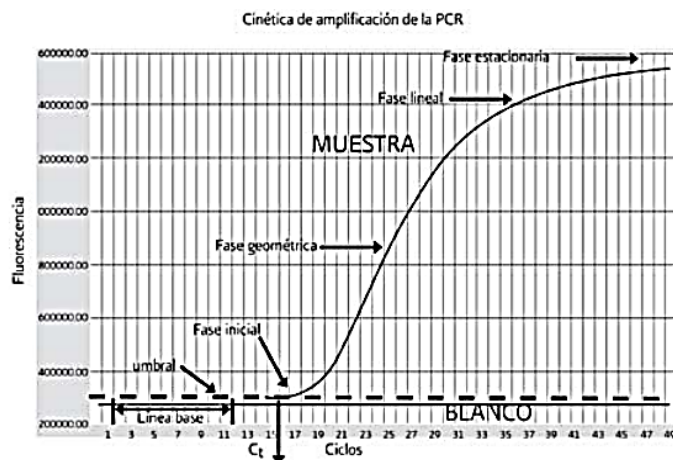


GRAFICO N° 10: Cinética de amplificación de la PCR. Durante los ciclos iniciales de la PCR no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia emitida, por lo que es indistinguible el ADN amplificado y el ruido basal, pero permiten fijar la línea base. En la siguiente etapa, aumenta la cantidad del ADN amplificado y la señal fluorescente. El punto donde se observa un sensible incremento en la fluorescencia se conoce como fase inicial, la cual es el origen de la fase logarítmica o geométrica. Posteriormente, inicia la fase lineal en la cual la eficiencia de amplificación no es constante. Finalmente, se llega a la fase estacionaria donde el producto obtenido permanecerá constante aunque se aumente el número de ciclos.

FUENTE: (Aguilera P, Tachiquín M, Rocha M, Pineda B y Cháñez M, 2014).

2.8 ENSAYOS DE CUANTIFICACIÓN

Existen dos tipos de cuantificación para PCR en tiempo real, la absoluta y la relativa. En donde se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN para los dos tipos de cuantificación.

2.8.1 Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta es usada para determinar cargas virales, para determinar la presencia de agentes patógenos y transgénicos. Este tipo de ensayo permite establecer el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra. Para esto se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/ μ L, μ mol/ μ L, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo.

El estándar puede ser una secuencia del ADN de doble cadena o sencilla, un ADNc, un producto amplificado por la PCR de ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco. El estándar externo se debe usar para hacer diluciones seriadas y obtener una curva, a partir de los valores de Ct adquiridos para cada concentración y su logaritmo correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras estudiadas y obtener su concentración.

2.8.2 Cuantificación relativa

Este tipo de cuantificación se emplea para ensayos de expresión génica. Se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es importante realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real. Este tipo de cuantificación nos permite medir

los cambios en el estado basal de un gen de interés contra un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta está en que no se parte de una cantidad conocida de ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del control interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno.

2.8.3 Método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en este método (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno. Se lleva a cabo una prueba de validación usando diluciones seriadas tanto del gen problema como para el gen endógeno.

2.9 Normalización Y Controles Endógenos

En el caso de las pruebas de RT-PCR en Tiempo Real para medir la expresión génica, es importante corregir la variación entre las muestras. En este proceso se compara la cantidad del ARNm en dos muestras distintas.

2.10 APLICACIONES

El diagnóstico por método convencional de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* resulta complicado debido a que es un germen es un patógeno intracelular obligatorio, por lo que no crece en cualquier medio de cultivo bacteriológico común, ya que requiere de cultivos de líneas celulares, siendo

éste de alto costo y de difícil mantenimiento para un laboratorio de rutina debido a que este examen es poco frecuente, por esta razón muchos laboratorios han abandonado la práctica de este tipo de estudios.

Esta problemática propone llevar un registro de las infecciones urogenitales causadas por *Chlamydia* en nuestra población, por lo cual se hace necesario la estandarización y aplicación de pruebas de diagnóstico que reúnan criterios de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que pueden ser aplicables a poblaciones de mujeres en riesgo de infección, con el fin de conocer la prevalencia real de *Chlamydia trachomatis* en nuestra comunidad.(Rodríguez N,2006,p4).

Recientemente se han desarrollado técnicas comerciales para la detección directa de *Chlamydia trachomatis* en muestras clínicas por inmunofluorescencia o inmunoensayo enzimático y se han introducido nuevas estrategias de diagnóstico basadas en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, con altos porcentajes de especificidad y sensibilidad.

La PCR en tiempo real se ha transformado en una herramienta común en la investigación en las diferentes áreas de la industria, la agricultura, la medicina forense y la clínica, la misma que se han visto beneficiadas por la sensibilidad, velocidad y especificidad de éste método.(Aguilera P, Tachiquín M, Rocha M, Pineda B y Chánez M, 2014).

2.11 VENTAJAS DEL PCR TIEMPO REAL

Siguiendo la cinética en PCR en Tiempo Real la determinación de los valores de Ct eliminan la necesidad de un competidor que debe de ser amplificado con el blanco. La cuantificación se puede realizar empleando una curva

estándar y la cantidad desconocida de la muestra se determina por comparación con esta curva estándar. Comparando con las medidas del método convencional punto final, el uso de los valores de Ct amplía la gama dinámica de la cuantificación porque los datos se recolectan para cada ciclo de PCR.

La PCR en Tiempo Real permite realizar una amplificación confiable con una alta especificidad y sensibilidad. El producto de PCR se cuantifica con cada ciclo realizado. Existe una alta correlación entre la señal (Ct) y la cantidad de blanco. Esta técnica nos permite tener una alta precisión y exactitud. El sistema de tubo cerrado sirve como control de contaminación. Mediante esta técnica se puede realizar un mayor número de reacciones por día. El diseño de los primers y sondas son mucho más exigentes (Cortazar M, et al, 2004).

Un factor de importancia en la metodología es la selección de marcadores fluorescentes apropiados para la detección de amplificaciones de genes, los más comúnmente utilizados son el ROX, el TAMRA y el FAM. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje horizontal el número de ciclos. La Baseline o línea base, se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia basal. Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el punto en el que localiza la desviación estándar de la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva. (Sandoval A, et al, 2010, p 9).

2.12 TÉCNICAS DE DETECCIÓN

Las técnicas de PCR cuantitativa se pueden clasificar de acuerdo al fluoróforo que utilice:

La química de la detección está dada por:

- Agentes intercalantes fluorescentes (SYBR Green)
- Sondas hidrolizadas
- Hairpin probes (molecular Beacons, Scorpions)
- Sondas de hibridización

2.13 SONDAS

2.13.1 SYBR Green

Es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil y no necesitan sondas específicas. Sin embargo durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de primers y a otros productos inespecíficos, resultados en una sobreestimación de la concentración del ADN blanco.

Cuando se emplean fluoróforos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN doble cadena, se unen de manera inespecífica como lo hace el SYBR Green, que emite una luz verde a 522nm, empleando un par de cebadores para realizar la amplificación el mismo que puede amplificar solo un producto y su costo es mucho más económico.

2.13.2 HYDROLYSIS PROBES TaqMAN)

Se emplea una sonda que tiene unidos un fotocromo reportero y un fotocromo quencher. Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia e interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa corta al fotocromo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión una señal fluorescente.

Cuando se emplean sondas específicas que contienen por lo menos un oligonucleótido marcados con fluoróforos, generalmente esta sonda está unida a dos fluorocromos, hibridando una zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse) dando como resultado un amplicón.

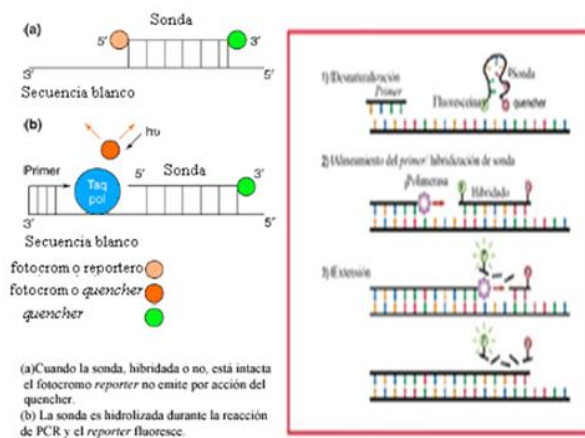


GRÁFICO N° 11: Acción de la sonda TaqMan.

FUENTE: Autor (modificado de Rodríguez M, Rodríguez W, "Métodos físico-químicos en Biotecnología" 2006).

Cuando la sonda está intacta produce una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Esta emisión de fluorescencia no se produce si los dos fluoróforos se encuentran alejados debido a que existe degradación de la sonda con la acción de exonucleasa 5' – 3' de la ADN polimerasa o por la separación física de los fluorocromos por el cambio conformacional de la fluorescencia y concluir el nivel de amplificación del gen.

2.13.3 FLUORÓFOROS PARA SONDAS TaqMan

Los filtros en el espectro de absorbancia se encuentran en nanómetros (nm), contienen diferentes longitudes de onda que van desde los 500, 600, 700 nm,

REPORTEROS: FAM, NED, JOE, VIC. **QUENCHER:** TAMRA, MGB+NFQ.

Es importante la selección adecuada del par Fluoróforo/Quencher. (Cortázar M, et al, 2004, p16).

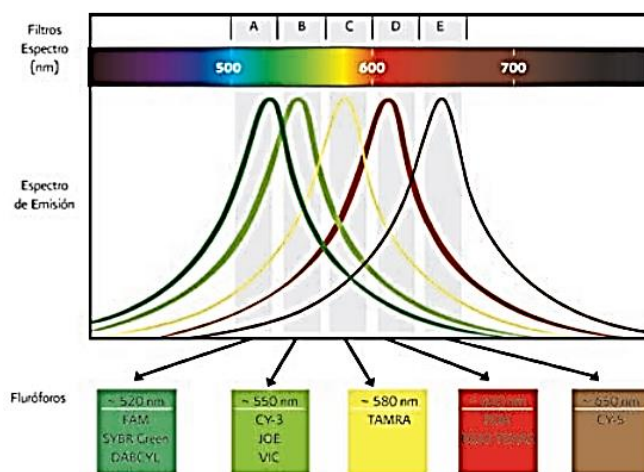


GRAFICO N°12. Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente usados en la PCR en tiempo real. En la figura se observan los espectros de emisión de diversos fluoróforos a diferentes longitudes de onda. Las letras A a la E representan las longitudes de onda empleadas por diferentes filtros para detectar el grupo de fluoróforos listados en la parte inferior.

FUENTE :(Aguilera P, et al, 2014, p 179).

2.15 PLÁSMIDOS:

La *Chlamydia trachomatis* contiene un único cromosoma de 1.043000 bp. El genoma codifica aproximadamente 875 proteínas, de las cuales no todas se expresan necesariamente. Además del cromosoma, la *Chlamydia trachomatis* normalmente posee un elemento genético extracromosómico (plásmido críptico) de 7493 bp. El plásmido se conserva muy bien, con menos del 1% de variación en la secuencia nucleótida. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) han superado al cultivo celular y a la detección del antígeno para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis* debido a su sensibilidad aumentada.

Se han localizado en este plásmido ocho marcos de lectura abiertos y las secuencias completas que están altamente conservadas entre las diferentes cepas. El análisis de las funciones biológicas del plásmido clamidial in situ se ha imposibilitado enormemente por la carencia de un sistema de crecimiento libre para *Chlamydia*. Se han publicado varias secuencias completas del plásmido de *Chlamydia trachomatis* aisladas de humanos, se ha identificado un marco de lectura abierta que codifica una proteína homóloga a ADN B de *E. coli*, una helicasa que participa en la replicación, pudiendo ser de gran importancia para la fase replicativa de la infección (Arráiz N, et al, 2008,p 197).

CAPÍTULO N° 3

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 TIPO DE ESTUDIO

En el presente estudio se realizó un estudio de tipo DESCRIPTIVO que permitió identificar la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres con infección del tracto urinario ITU que asistieron a la consulta ginecológica a las diferentes casas hospitalarias y OBSERVACIONAL ya que no hay la intervención por parte del investigador debido a que se limita solamente a medir las variables que se define en este estudio.

3.1.2 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en los servicios de Ginecología de cuatro casas hospitalarias (Hospital de Río, Maternidad Sanmartín de Porres, Clínica La Paz, Clínica Médica del Sur), donde se tomaron las muestras de hisopado Cérvico-uterino, las cuales fueron trasladadas al LABORATORIO BIOMOLECULAR para su análisis.

3.1.3 PERÍODO DE ESTUDIO

Marzo 2016 – Mayo 2016.

3.1.4 FUENTES DE INFORMACIÓN

- A través de la entrevista y exploración de la paciente.
- También por medio del reporte de los resultados de laboratorio de las muestras tomadas.
- Recolección de la Información, se le realizó un cuestionario que fue llenado en el momento de la toma de muestra.

3.1.5 UNIVERSO Y MUESTRA

Se procedió en muestras de secreción cérvico-uterino en 100 pacientes que acudieron a consulta ginecología con infecciones del tracto genito-urinario en 4 casas de salud de la ciudad de Cuenca: Clínica La Paz, Clínica Médica del Sur, Hospital del Río, Maternidad San Martín de Porres.

3.1.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

➤ Criterios de inclusión:

- Que se encontraran en el período de estudio.
- Que aceptaran participar del estudio que hayan firmado el consentimiento informado.
- Que estén cursando infecciones del tracto urinario ITU, presenten cuadros de leucorrea, vaginitis, inflamación, etc.
- Que hayan cursado múltiples abortos o tengan problemas para embarazarse.
- Que estén entre edades de 19-50 años.
- Que tengan una vida sexual activa.

➤ Criterios de exclusión:

- Pacientes atendidos fuera del periodo de estudio.
- Pacientes que no acepten firmar el consentimiento informado.

3.2 MÉTODO , TÉCNICA E INVESTIGACIÓN

3.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

1. Kit de extracción de DNA "NUCLEOSPIN TISSURE".
2. Kit PCR Real Time qualitative.
3. Agua destilada estéril de grado molecular (libre de RNasa y DNasa).
4. Lapicero señalador (Marcador) de laboratorio.
5. Gradillas (racks) refrigerantes para tubos de mini centrífuga de 1.5 y tubos de reacciones de PCR 0.2ml de 96 pocillos.
6. Tubos para PCR ependorf de 0.2ml.
7. Tubos para mini centrífuga estériles, libres de nucleasa, de 1.5 ml.
8. Guantes desechables de vinilo.
9. PBS 1%.
10. Aplicadores DACRON.
11. Tubos con medio de transporte para *Chlamydia trachomatis*.

Equipos

- 1.- Mini centrífuga
- 2.- Centrífuga
- 3.- Pipetas automáticas de diferentes cantidades.
- 4.- Sistema de detección PCR a tiempo real con un bloque termociclador para 96 reacciones (DAAN 7600).
- 5.- Cabina de Flujo laminar
- 6.- Vórtex

3.2.2 TOMA DE MUESTRAS:

Se procedió a informar a la paciente acerca del estudio del cual va a formar parte, el objeto que tiene y luego se le hizo firmar el consentimiento en el cual consta los datos personales de la paciente como: nombres completos, cédula, etc. y también se procedió a llenar la encuesta.

Las muestras fueron obtenidas por los profesionales ginecólogos mediante hisopados del cuello uterino, cumpliendo consideraciones como: estar sin previo aseo genital, no utilizaron óvulos ni tratamiento alguno, abstinencia sexual mínimo 24 horas antes de la misma. Se introdujo un hisopo en el endocérvix a una altura aproximada de 2 cm donde se desprendieron células epiteliales haciendo girar el hisopo cuidadosamente. Las muestras fueron trasladadas al LABORATORIO BIOMOLECULAR para ser procesadas.

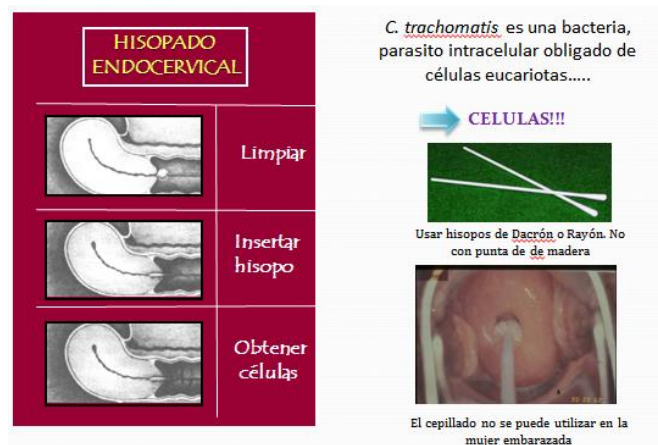


GRÁFICO N° 13: Demostración de hisopado endocervical

FUENTE: Autora

Las muestras fueron obtenidas con hisopos de DACRON sintético en tubo con VICUM que es un medio de transporte especial para *Chlamidia* que inhibe el crecimiento de bacterias y hongo asegurando de esta forma la idoneidad en la recuperación de la muestra, contiene unas perlas de vidrio que facilita la lisis celular y la homogenización de la muestra, potencializando su elución (rehidratación del material genético ADN). Los hisopos de DRACON son los más recomendados para la toma y transporte de muestras clínicas, adecuados para los métodos de detección directa de DNA, RNA o Antígenos microbianos.

Las muestras fueron tratadas con PBS al 1% antes de iniciar el proceso de extracción del ADN. Phosphate Buffered Salina (PBS) de allí su nombre, es una solución salina amortiguada por fosfatos de pH semejante a la del líquido extracelular (Cl^- , Na^+ , y K^+) es una solución isotónica y no toxica, es un vehículo neutro para células ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal se trata de un medio de conservación.



GRAFICO N° 14: Hisopos Dacron

FUENTE: Autora

Las muestras obtenidas fueron trasladadas en cadena de frio hasta el laboratorio y almacenadas a -20°C hasta ser procesadas.

3.2.2.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PREVIO A LA EXTRACCIÓN:

Se descongelaron las muestras y se mezclaron moviendo el hisopo con el medio VICUM la muestra quedó impregnada en el líquido. Centrifugamos por 10 minutos a máxima velocidad. Luego se descartó el líquido sobrenadante y al sedimento que quedó en el fondo se le añadió 250 ul de PBS, vortexamos por unos segundos y se continuó con el proceso de extracción.



GRAFICO N° 15: Reactivos y materiales empleados

FUENTE: Autora

3.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN:

La extracción del ADN bacteriano se realizó con un kit comercial a base de columnas de purificación para tejidos NUCLEOSPIN TISSUE empleando 200ul de la muestra del paciente previamente tratada.

Se adicionó 180ul de buffer de lisis T1 (este buffer contiene las sales que van a lisar las células, además va a permitir regular la acidez y osmolaridad del lisado), se colocó 5ul del Control Interno provisto en el kit de PCR para dar seguimiento al ensayo desde la extracción, se añadió 25ul de proteinasa K que permitió desnaturalizar las proteínas, mezclamos bien y se incubó a una temperatura de 56°C en baño seco por 1 hora, homogenizando cada 15 minutos hasta que no se vean restos de células o tejido y que estén completamente digeridos.

Luego se realizó lavados con un segundo buffer de lisis B3 200 ul y se incubo a 70°C por 10 min. en esta etapa optimizamos la lisis con una sal caotrópica como el cloruro de guanidinio (poderoso desnaturalizante que impide el plegamiento de las bandas de ADN), seguidamente se adicionó etanol absoluto 210ul para los lavados en donde se pudo observar unas pequeñas fibras blanquecinas que indican la precipitación del ADN y pasamos a las columnas de purificación, estas columnas constan de un tubo filtro con una membrana de sílica en donde los ácidos nucleicos se unieron selectivamente a la membrana y nos ayudó a retener el ADN en los procesos posteriores de adsorción y desorción.

Se procedió a centrifugar a 11000 rpm por un minuto, se colocó en un tubo colector nuevo y adicionó 500ul de Buffer BW wash para eliminar todo tipo de contaminante, centrifugamos por un min. a 11000 rpm. Descartamos el líquido filtrado y colocamos la membrana en un nuevo tubo colector.

Adicionamos 600ul de Buffer B5 para un segundo lavado este contiene etanol que va deshidratar el ADN, centrifugamos por un min. a 11000 rpm. volvimos a centrifugar para eliminar cualquier residuo de etanol y colocamos en un nuevo tubo colector. Y procedimos con la elución el mismo que se

realizó colocando 50ul de buffer BE a temperatura de 70°C se dejó reposar por 1 min. a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó, en la parte inferior el líquido filtrado que quedó en el fondo del tubo contenía el ADN bacteriano de *CLAMIDA* listo para realizar el siguiente procedimiento que es la PCR.

3.2.4 AMPLIFICACIÓN:

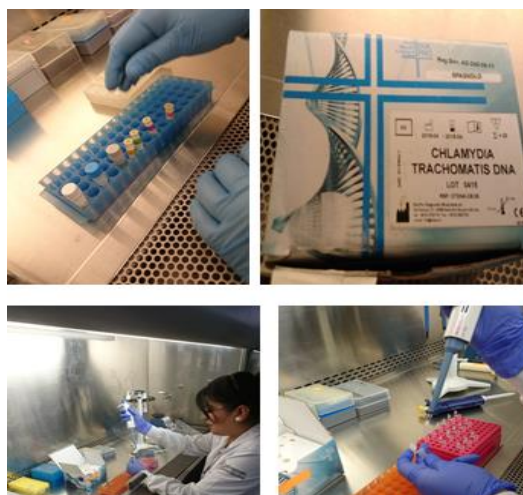


GRÁFICO N° 16: Reactivos para q PCR TIEMPO REAL

FUENTE: Autora

Para la PCR se empleó un kit comercial DIA PRO provisto de los siguientes reactivos:

- **A** Mezcla maestra que contiene: (Taq Polimerasa, Cl_2Mg , dNTPs),
- **B** Sondas/ Cebadores, son los iniciadores del proceso de amplificación que vienen marcados con fluorocromos, que van a ser captados por el láser del equipo.

- **IC** Control interno, que es una secuencia conocida de genes que normalmente se expresan en todas las células del organismo debido a que sus productos desempeñan funciones indispensables para la supervivencia celular.
- **C** Agua grado III Ultrapura, libre de nucleasas
- **NTC** Controles Negativo y **CPH CPL** Control Positivo.

La Taq polimerasa llamada así porque se obtiene de la bacteria *Thermophilus aquaticus* se caracteriza por soportar temperaturas altas mayores a 95°C, que fue purificada en *E. coli* y contiene un pH 7.9. Será la encargada de construir una cadena simple de ADN con la ayuda de un cebador en una cadena doble, es decir participará en el proceso de replicación.

Los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP Y dTTP) provistos en este kit se encontraron en las mismas concentraciones ya listos para ser utilizados disueltos en una solución de PCR.

Se revisaron que los tubos estén en el orden que iban a ser amplificadas, que estén perfectamente rotuladas de acuerdo a la lista que está en el equipo, también rotulamos tubos para un control positivo y un control negativo. Se realizó un master mix con las soluciones A, B y C y luego se distribuyó 15ul de la mezcla de amplificación en cada tubo Eppendorf de 200ul de PCR o pocillo.

TABLA N°2: Reactivos empleados para la q PCR Tiempo Real *Chlamydia trachomatis*

Numero de reacciones	X 1		X 12
A	Mezcla maestra	12,5 ul	150 ul
B	Cebadores/ Sondas	2 ul	24 ul
C	Agua grado Molecular	0,5 ul	6 ul
Volumen total		15 ul	180 ul

FUENTE: Autora

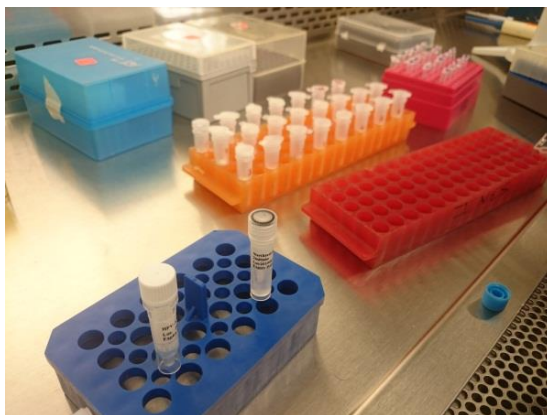
Luego se añadió 10ul de la muestra del paciente, control negativo o control positivo de acuerdo a lo que corresponda, todo este procedimiento se realizó en cadena de frío.

Un posible juego de primers:

- Juego de primers (partidor forward GGGATTCTGTAACAACAAGTCAGG y partidor reverse CCTCTTCCCCAGAACATAAGAACAC) diseñados por McKechnie y cols. 20099. Estos partidores están dirigidos al plásmido críptico de *C. trachomatis* y generan un producto de 208 pares de bases. (Ramón S, 2013,p 612)

Se eliminaron las burbujas existentes y se llevó al Termociclador Tiempo Real DA 7600.

GRÁFICO N°17: Muestras extraídas para realizar la q PCR



FUENTE: Autora

3.2.4.1 PERFIL TÉRMICO

El perfil térmico que se empleó fue el siguiente.

TABLA N° 3:PROTOCOLO PARA TERMOCICLADOR

FASE	CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	50 °C	2 min.
1	1	95 °C	10 min.
2	45	95 °C	15 seg.
		60 °C (*)	1 min.

Fuente: Autora

-La primera fase es de incubación a 50°C digiere secuencias con U de secuencias UNG

-La segunda fase HOLD a 95°C, activación de la Taq, desnaturalización de UNG.

-Una tercera fase que a su vez contiene 2 etapas:

La primera a 95°C se da la Desnaturalización y la segunda a 60°C Hibridación y Polimerización.

La fase de detección de la fluorescencia está marcada con el (*), en esta etapa se empiezan a obtener los primeros datos de producto amplificado, cuando un experimento corre, el valor de la fluorescencia de cada muestra y el estatus de corrida son mostrados en Tiempo Real en la página del monitor de corrida.

GRÁFICO N° 18: TERMOCICLADOR qPCR TIEMPO REAL DAAN 7600



FUENTE: Autora

3.2.5 FUNCIONAMIENTO DEL TERMOCICLADOR TIEMPO REAL DAAN 7600

Se trata de un Termociclador DA 7600 al que está acoplado un monitor con un software en el cual pudimos observar la adquisición del producto de amplificación en Tiempo Real, debido a que este equipo cuenta con diferentes filtros de absorción con diferente longitud de onda, la luz emitida por los fluorocromos presentes en la PCR fue medida y esta información fue

enviada al procesador de datos del equipo y este a su vez se reflejó en la pantalla en el momento del análisis.

- La sonda excitada por la máquina paso su energía, vía FRET hacia el quencher (acceptor). El FRET corresponde a FAM como fluoróforo y TAMRA como quencher.
- FAM: 6-carboxifluoresceína, emplea una longitud de onda 500nm, con una absorbancia 0,08.

Los canales de detección previamente determinaron que fluoróforo debió ser utilizado, y los canales de excitación y detección determinan que sistema de sonda debió ser escogido. En este caso fue el FAM (para las muestras de pacientes, controles positivos y negativos), con y HEX (para el control interno). Los datos fueron recolectados en la fase exponencial de la reacción de PCR.

TABLA N°4 Indicadores de fluorescencia

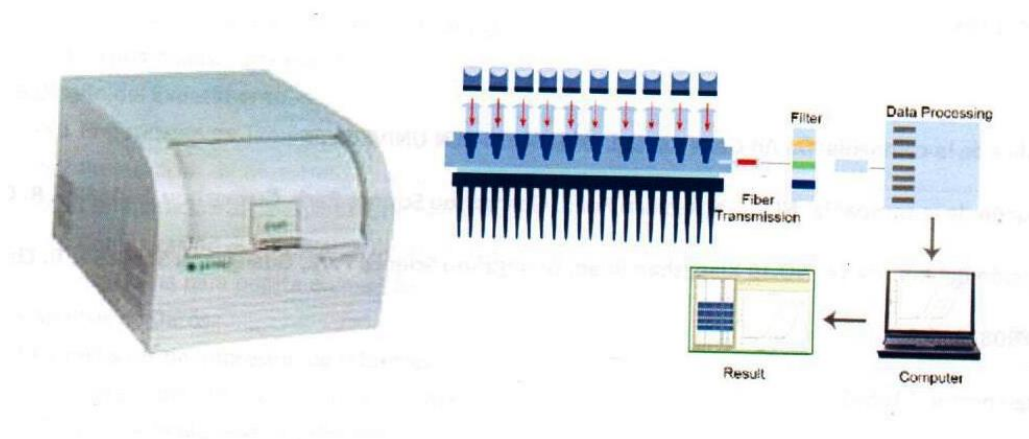
DETECCIÓN	INDICADOR	TEMPLADOR
Chlamydia Trachomatis	FAM	No Fluorescente
Control Interno IC	JOE/VIC	No Fluorescente
referencia pasiva	ROX	No presente

FUENTE: Autora

Para la detección de 1 solo color se recomienda la combinación FAM - TAMRA. Estas combinaciones fueron las más estándares. Puede detectarse en toda máquina de Real Time PCR y son más fáciles de sintetizar.

La fluorescencia medida en los primeros ciclos de la reacción de PCR fue baja hasta que llega al ciclo umbral (threshold cycle) o valor Ct, en donde se detectó por primera vez un aumento significativo en la fluorescencia. El método de detección empleado fue el TaqMan. Es muy específico, sensibilidad absoluta de detección después del ciclo 40.

GRÁFICO N° 19: Esquema de Funcionamiento de Termociclador DAAN 7600



FUENTE: Autora

3.2.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para el análisis de datos lo primero que se consideró para saber si la reacción se realizó de la manera correcta, fue revisar que en el control negativo en el canal HEX exista una curva de amplificación que sobrepase el umbral y en el control positivo exista una curva de amplificación tanto en el canal HEX como en el FAM, luego se procedió con el análisis de las muestras a investigar.

En las muestras de los pacientes se puede apreciar o no dos curvas pero la que siempre debe estar presente es el control interno del canal HEX dependiendo que el paciente tenga o no el patógeno. El control negativo solo amplifica una sola curva del canal HEX que es del control interno.

TABLA N° 5: Cuadro explicativo acerca de los resultados y el empleo de controles internos.

CLAMIDIA FAM	JOE/VIC del control interno	Resultados de ensayos
muestra positiva	+	Correcto
	-	correcto *
muestra negativa	Ct < 40	Correcto
	Ct > 40 o indeterminada	invalido **

FUENTE: Inserto reactivo q PCR DIAPRO para *Chlamydia Trachomatis*

* Una concentración de ADN de *Chlamydia trachomatis* en la muestra (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

** En este caso han aparecido problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos.

El procedimiento de prueba debe repetirse empezando desde la fase de extracción, utilizando una muestra fresca procedente del paciente.

La sensibilidad analítica se puede expresar para los métodos cualitativos como límite de detección. El límite de detección es la cantidad mínima de sustancias que puede detectarse por un sistema de comprobación con una probabilidad establecida. Las pruebas NAT se expresan como la concentración mínima del analito que, tras probarse en múltiples repeticiones, da un resultado positivo.

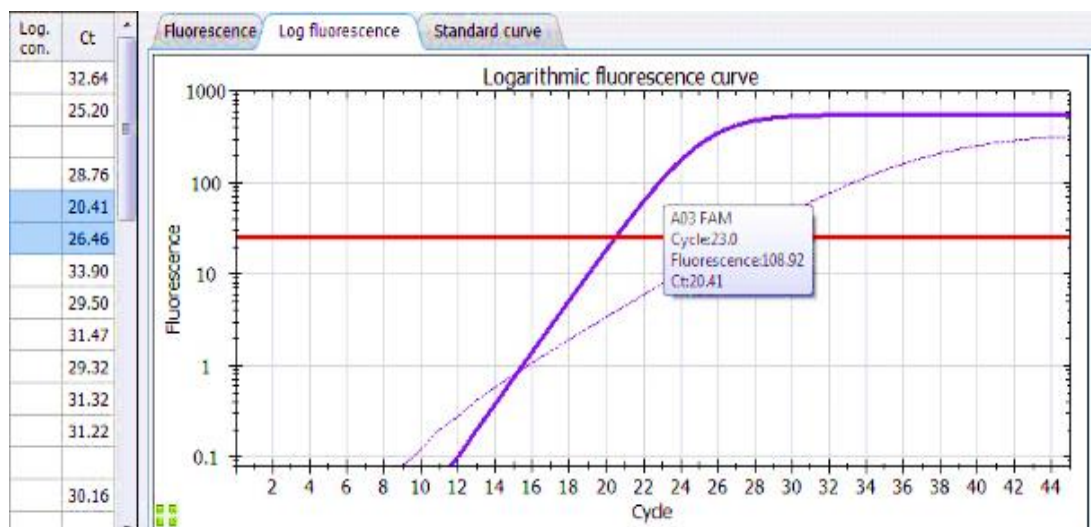


GRAFICO N° 20: Gráfica de la curva de amplificación de una muestra positiva relaciona de acuerdo al número de ciclos con la fluorescencia emitida mediante q PCR en donde se aprecian dos curvas que atraviesan el umbral (línea de color rojo), la curva del control interno (línea punteada) y otra curva que corresponde a la muestra del paciente (color morado). En el extremo de la gráfica se observan los ct, cuyos valores son inversamente proporcional a la muestra.

FUENTE: Autora

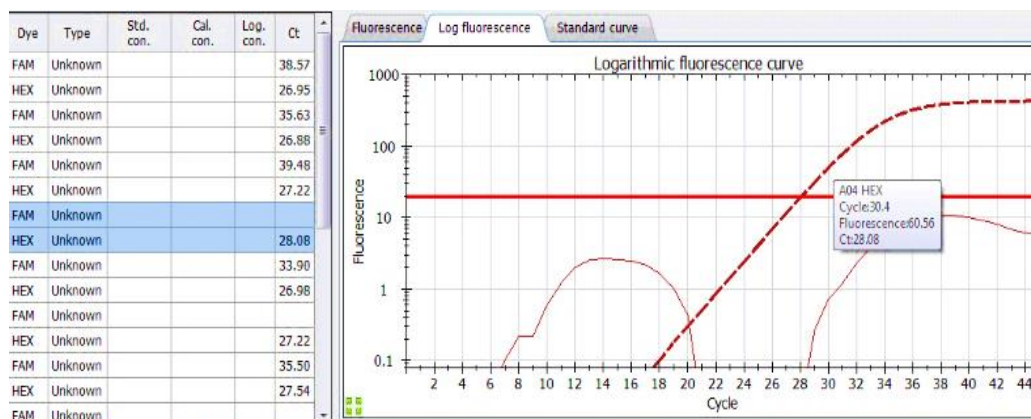


GRAFICO N°21: Gráfica de la curva de amplificación por q PCR de una muestra negativa, en este se puede observar solo una curva amplificada que sobrepasa el umbral, que corresponde al control interno (línea punteada) y que es captada por el canal HEX. En el extremo de la gráfica se visualiza los Ct de los canales FAM que no tiene valor y en el canal HEX con un valor de 28,08.

FUENTE: Autora

➤ LIMITE DE DETECCIÓN : 0,53 copias/ul

La meta es una secuencia de plásmido críptico que se repite 1-10 veces en el genoma de *Chlamydia trachomatis*.

Para transformar los resultados en copias/ml se transforma con la siguiente formula:

Copias /ul (datos de la serie) x volumen de muestra de elución (ul)

Volumen de extracción de muestra (ml)

0,53 copias/ul x 50 ul

0,2 ml

Resultado : 132,5 copias / ml

GRAFICO N°22: Imagen del Termociclador DAAN 7600 utilizado en el estudio.



FUENTE: Autora

3.2.7 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

La "línea de base" es automática y el "umbral fluorescente" FAM es de 0,13, el umbral fluorescente JOE/VIC 0,08.

Se realiza una comprobación en los controles positivo alto y bajo cada vez que se usa el equipo para verificar si sus valores Ct. Son los esperados e indicados en la tabla.

El principio del Ensayo y la especificidad analítica de esta técnica se encuentran establecidos en el inserto del Reactivo DIA PRO. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* DNA. Doc. INS CTDNA pag, 1- 9, rev.: 3, fecha 07/2013e.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

No hay ninguna fuente en el documento actual aspectos éticos de la misma, tanto por el tema elegido como por el método seguido, así como plantearse si los resultados que se puedan obtener son éticamente posibles, ante cualquier duda sobre este respecto, una de las posibles soluciones podría ser someterlo a la opinión de un Comité de Ética.

3.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los datos obtenidos en este estudio fueron sometidos a un análisis descriptivo, para lo cual las variables cualitativas se expresaron en frecuencias y porcentajes.

La información se digitó en el programa de Excel y SPSS versión 23. Se realizó un análisis inferencial para lo cual se calculó el Chi², en donde el valor de "p" fue considerado como estadísticamente significativo si era igual o menor a 0,05.

Los resultados obtenidos de la presente investigación, fueron presentados en tablas. Se realizarán cuadros de tendencias, mediante análisis de correlación.

CAPÍTULO N°4

4.1 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En este estudio mediante la PCR Real Time se pudo analizar un total de 100 muestras de hisopado cérvico-uterino en mujeres que asistieron a consulta ginecológica, las cuales fueron analizadas mediante el Kit PCR Real Time DIA PRO para *Chlamydia trachomatis*, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA N° 6

PREVALENCIA DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* DE ACUERDO A RESULTADOS DE q PCR TIEMPO REAL

RESULTADOS q PCR	Frecuencia	Porcentaje
NEGATIVO	88	88,0
POSITIVO	12	12,0
Total	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Reportes aplicados en la investigación.

En la tabla N° 6 se pudo observar que el 12% de las mujeres que participaron en este estudio tienen *Chlamydia trachomatis*.

TABLA N° 7

**EDAD DE INICIO DE LA ACTIVIDAD SEXUAL Y SU RELACIÓN CON
RESULTADOS q PCR**

EDAD INICIO DE ACTIV. SEXUAL	RESULTADOS					
	NEGATIVO		POSITIVO		TOTAL	
	n°	%	n°	%	n°	%
12 A 15 AÑOS	9	9,0	2	2,0	11	11,0
16 A 20 AÑOS	58	58,0	9	9,0	67	67,0
21 A 25 AÑOS	16	16,0	1	1,0	17	17,0
MÁS DE 30 AÑOS	5	5,0	0	0,0	5	5,0
TOTAL	88	88,0	12	12,0	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrollada y reportes aplicados en la investigación

En la tabla N° 7 se observó que el 67% de participantes manifiestan haber iniciado su actividad sexual en edades entre 16 y 20 años, seguida de un 17% indican haber iniciado en edades de 21 y 25 años y un 11% en edades entre 12 y 15 años.

TABLA N° 8

DISTRIBUCIÓN DE LAS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO POR EDADES

EDAD	Frecuencia	Porcentaje
20 A 25	30	30,0
26 A 30	29	29,0
31 A 35	28	28,0
36 A 40	7	7,0
41 A 45	3	3,0
46 A 51	3	3,0
Total	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: encuestas realizadas.

En la tabla N° 8 se pudo apreciar que el 59% de participantes pertenece a edades entre 20 y 30 años, el 28% pertenecen a edades entre 31 y 35 años, siendo menor en edades superiores a los 35 años.

TABLA N° 9

RELACIÓN ENTRE EDADES DE MUJERES PARTICIPANTES CON RESULTADOS POSITIVOS

EDAD	Frecuencia	Porcentaje
20 A 25	7	58,3
26 A 30	4	33,3
31 A 35	1	8,3
Total	12	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y reportes aplicados en la investigación,

En la tabla N° 9 se pudo observar que el 58,3% de las mujeres con q PCR positivo tienen edades comprendidas entre 20 y 25 años, seguida de un 33.3% de edades entre 26-30 años.

TABLA N°10

**NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES Y SU RELACIÓN CON
RESULTADOS q PCR**

NUMERO PAREJAS SEXUALES	RESULTADOS q PCR					
	NEGATIVO		POSITIVO		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%
una pareja sexual	49	49,0	6	6,0	55	55,0
dos parejas sexuales	20	20,0	1	1,0	21	21,0
tres parejas sexuales	17	17,0	5	5,0	22	22,0
más de cuatro parejas sexuales	2	2,0	0	0,0	2	2,0
Total	88	88,0	12	12,0	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrollada y reportes aplicados en la investigación.

En la tabla N° 10 se encontró que un 6% de las pacientes con resultados positivos manifestaron tener una sola pareja sexual, seguida de un 5% que indicaron tener tres parejas sexuales. Mientras que en las pacientes con resultados negativos un 49% mencionaron que tienen una pareja sexual, un 20% dos parejas sexuales y finalmente un 17% manifestaron tres parejas sexuales.

TABLA N° 11

**FRECUENCIA DE RESULTADOS POSITIVOS DE ACUERDO AL NÚMERO DE
PAREJAS SEXUALES**

NÚMERO PAREJAS SEXUALES	RESULTADOS qPCR	
	n°	%
Una pareja sexual	6	50,0
Dos parejas sexuales	1	8,3
Tres parejas sexuales	5	41,7
Más de cuatro parejas sexuales	0	0,0
Total	12	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y reportes aplicados en la investigación.

En la tabla N° 11 se observó que el 50% de mujeres, indican tener una sola pareja sexual, el 41,7% que tienen tres parejas sexuales y el 8,3% que tiene dos parejas sexuales de un total de 12 pacientes con resultados positivos.

TABLA N° 12

**FRECUENCIA DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO (ITU) Y SU
RELACIÓN CON LOS RESULTADOS**

INFECCIÓN DE VIAS URINARIAS	RESULTADOS qPCR					
	NEGATIVO		POSITIVO		TOTAL	
	n°	%	n°	%	n°	%
SI	43	43	7	7	50	50
NO	45	45	5	5	50	50
Total	88	88	12	12	100	100

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y reportes aplicados en la investigación

En la tabla N° 12 se observó que el 50 % de mujeres participantes en el estudio manifiestan cursar frecuentemente infecciones del tracto urinario.

TABLA N°13

**CONOCIMIENTO ACERCA DE CLAMIDIASIS EN PACIENTES CON
RESULTADOS POSITIVOS q PCR**

CONOCIMIENTO DE CLAMIDIASIS	RESULTADOS q PCR	
	n °	%
S I	4	33,3
N O	8	66,7
Total	12	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrollada y aplicada en la investigación

En la tabla N° 13 se indicó que el 33% mujeres con resultados positivos manifiestan tener conocimiento acerca de la infección por *Clamidia*.

TABLA N°14

**FRECUENCIA DE PROBLEMAS PARA EMBARZARSE EN LAS
PARTICIPANTES DEL ESTUDIO**

PROBLEMAS AL EMBARAZARSE	n °	%
S I	12	12,0
N O	88	88,0
Total	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y aplicadas en la investigación.

En la tabla N° 14 se pudo observar que el 12% del total de las pacientes que fueron objeto de estudio manifestaron cursar problemas para embarazarse.

TABLA N°15

**PACIENTES CON PROBLEMAS PARA EMBARAZARSE DE ACUERDO CON LA
EDAD DE INICIO DE ACTIVIDAD SEXUAL**

EDAD INICIO VIDA SEXUAL	PROBLEMAS PARA EMBARAZARSE	
DE 12 A 15 AÑOS	2	16,7
DE 16 A 20 AÑOS	9	75,0
DE 21 A 25 AÑOS	1	8,3
Total	12	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y aplicadas en la investigación.

En la tabla N° 15 se observa que el 75% de mujeres con q PCR positivo tienen problemas para embarazarse al iniciar una actividad sexual en edades comprendidas de 16 a 20 años. $P < 0.00$.

TABLA N°16

FRECUENCIA DE ABORTOS EN EL GRUPO ESTUDIADO

ABORTOS	N °	%
sin abortos	68	68,0
un aborto	22	22,0
dos abortos	6	6,0
tres o más abortos	4	4,0
Total	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y aplicadas en la investigación.

En la tabla N° 16 se indicó que del total del grupo estudiado el 22% manifiestan haber cursado un aborto, el 6% han tenido dos abortos y el 4% manifiestan haber tenido más de tres abortos.

TABLA N°17

RESULTADOS q PCR DISTRIBUIDOS DE ACUERDO AL NÚMERO DE ABORTOS

ABORTOS	RESULTADOS q PCR					
	NEGATIVO		POSITIVO		TOTAL	
	n°	%	n°	%	n°	%
sin abortos	58	58,0	10	10,0	68	68,0
un aborto	20	20,0	2	2,0	22	22,0
dos abortos	6	6,0	0	0,0	6	6,0
tres o más abortos	4	4,0	0	0,0	4	4,0
Total	88	88,0	12	12,0	100	100,0

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y aplicadas en la investigación.

En la tabla N° 17 se indicó que el 10 % de casos positivos manifestaron no haber tenido ningún aborto anterior, y un 2% mencionó que ha tenido un aborto.

TABLA N°18

FRECUENCIA DE ABORTOS Y SU RELACIÓN CON EL INICIO DE LA ACTIVIDAD SEXUAL

EDAD INICIO DE LA ACTIVIDAD SEXUAL	ANTECEDENTES DE ABORTOS					
	SIN ABORTOS		UN ABORTO		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%
DE 12 A 15 AÑOS	0	0,0	2	16,7	2	16,7
DE 16 A 20 AÑOS	9	75,0	0	0,0	9	75
DE 21 A 25 AÑOS	1	8,3	0	0,0	1	8,3
Total	10	83,3	2	16,7	12	100

Realizado por: Autora

Fuente: Encuestas desarrolladas y aplicadas en la investigación.

En la tabla N° 18 se observó que el 16,7% de mujeres con resultados positivos han sufrido un aborto y están relacionadas con el inicio de actividad sexual en edades comprendidas entre 12 a 15 años. $P < 0.002$.

CAPÍTULO N° 5

5.1 DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.1 DISCUSIÓN

Este estudio se lo realizó en la ciudad de Cuenca, se obtuvo 12% de casos positivos utilizando el método q PCR Tiempo Real en muestras de hisopado cérvico-uterino, en mujeres de edades comprendidas entre 20 años y 50 años. El método empleado para este estudio tiene una alta especificidad y sensibilidad (superior al 95%), comparando con los cultivos microbiológicos y pruebas inmunológicas, razón por lo que se debe utilizar solo cuando los métodos anteriores no cumplen con el cuadro diagnóstico (Vaca N, 2013, p70).

En estudios realizados en Chile el resultado obtenido por q PCR en hisopados cérvico-uterino es de 11,49% y en muestras de orina es de 18.39%. En otro estudio realizado en Brasil en mujeres utilizando muestras endo-cervicales, se encontró el 20,79% de casos positivos mediante PCR convencional, sobresaliendo el 80% de los casos positivos correspondieron a mujeres de menos de 23 años. (Vaca N, 2013, p613), siendo muy similar a este estudio realizado, en Quito se realizó pruebas inmunológicas por Elisa obteniéndose un 18,1 % de prevalencia. Lo que valida el método aplicado en este proyecto (Silva R. et al, 2013, p 611).

Cuando las pacientes infectadas no son diagnosticadas a tiempo, facilita la propagación del agente infeccioso, este puede llegar a invadir los tejidos, causando estadios patológicos en el aparato reproductor. Como consecuencias de estas infecciones tenemos a la cervicitis, uretritis, enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), infertilidad, entre otras. Además existen estudios que comprueban que la presencia de *Chlamidia* favorece la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del *virus papiloma humano* (HPV) (Vaca N, 2013, p).

En cuanto al inicio de la actividad sexual y sus relación con la infección por *Chlamydia trachomatis*, aquellas que iniciaron entre los 16-20 años tiene mayor probabilidad de infectarse por *C. trachomatis*, en este estudio es del 67% y en otros estudios es del 84,21%, lo que demuestra que el inicio de la actividad sexual en este grupo etario es el más vulnerable para adquirir la infección y sus consecuencias (Vaca N, 2013, p72).

En este estudio el 55% de mujeres, indicaron tener una sola pareja sexual, el 22% tres parejas sexuales de un total 100 mujeres estudiadas. Comparando con otros estudios realizados se encontró que del total de la población de estudio se encontró que el 42,5% de las pacientes habían tenido al menos un compañero sexual en su vida; resaltando que existió una paciente con veinte compañeros sexuales, no obstante, no se encontró ninguna relación significativa frente a los casos positivos detectados. (Rayo J, 2016).

En cuanto al conocimiento de la infección por *Chlamydia trachomatis* el 66.7% mujeres con resultados positivos manifiestan no tener conocimiento acerca de la infección por *Chlamidia*, otros estudios similares manifiestan que el 64,5% de la población desconoce totalmente acerca de la infección y de sus

consecuencias; demostrando de esta manera la carencia de educación y enseñanza para este tipo de infecciones (Rayo J, 2016, p 60).

En este estudio el 75% de casos positivos tiene problemas para embarazarse cuando el inicio de la actividad sexual es más temprana en edades comprendidas entre 16 y 20 años. Comparando con estudios similares se encontró que la edad media de las 64 mujeres estudiadas fue de 32,32 (24-42) años. En donde 27 mujeres refirieron el antecedente de perdida gestacional temprana, es decir en las primeras 8 semanas de desarrollo embrionario; el número de abortos referidos varió entre 1 y 5 sumando 53 abortos entre todos los casos. (Ramos B, 2011,p 128).

5.1.2 CONCLUSIONES

- En este estudio se encontró que el 12% de mujeres que participaron son portadoras de esta bacteria, la misma que se da con una frecuencia del 58.3% , en mujeres en edades comprendidas entre 20 y 25 años, seguida de un 33.3% en mujeres de edades entre 26-30 años.
- De 12 mujeres participantes en el estudio con resultados positivos el 9 (75,0%) iniciaron su actividad sexual entre los 16 y 20 años. De éste grupo el 75% tienen problemas para embarazarse. Esto nos indica que mientras más temprano se inicia la vida sexual hay mayor probabilidad de estar infectados y desencadenar problemas de infertilidad al no ser diagnosticada y tratada a tiempo.
- El 16,7% de mujeres con resultados positivos han sufrido un aborto y están relacionadas con el inicio de actividad sexual en edades comprendidas entre 12 a 15 años. La importancia del diagnóstico preventivo de la infección por esta bacteria se convierte en una herramienta fundamental para evitar contratiempos futuros que podrían terminar con la pérdida del embarazo.
- El 50% de mujeres que participaron en el estudio manifiestan cursar frecuentes infecciones del tracto urinario. La infección recurrente por *C. trachomatis* es causa más común de un embarazo ectópico, ampliando la probabilidad de riesgo de acuerdo al número de infecciones presentadas, siendo directamente proporcional el número

de infecciones por C. T. con el grado de riesgo. (Salazar A, et al, 2011, p34).

- Con respecto al número de parejas sexuales el 50% de mujeres, indicaron tener una sola pareja sexual, el 41,7% que tienen tres parejas sexuales y el 8,3% que tiene dos parejas sexuales de un total de 12 de pacientes con resultados positivos.
- El 66,7% mujeres con resultados positivos manifiestan no tener conocimiento acerca de la infección por clamidia y sus consecuencias de no ser tratada a tiempo.
- Cabe mencionar que las pacientes que formaron parte de este estudio también participaron en un estudio para determinar el Virus del Papiloma Humano (HPV), en las cuales encontramos casos positivos y concluimos que en una misma paciente podemos encontrar la infección por *Chlamydia trachomatis* y HPV, por esta razón se hace más imprescindible realizar estudios de este tipo para poder tener una base estadística y poder reducir los riesgos de la infección y sus graves secuelas.

5.1.3 RECOMENDACIONES

- Este estudio nos permitió confirmar la importancia que tiene el diagnóstico preventivo de la infección por *Chlamydia trachomatis* tanto en pacientes embarazadas como las que se encuentran en edades reproductivas, debido a que se trata de una bacteria que produce una infección asintomática y podría pasar desapercibida. Facilitando la infección al resto de parejas sexuales.
- La importancia de concientizar a las personas, acerca de la importancia de su transmisión y las consecuencias de la infección, por lo que es importante llevar una vida monogamia para evitar problemas futuros si se encuentra en una edad reproductiva. Por lo que se recomienda que jóvenes, adolescentes y profesionales del área de la salud sean informados acerca de los riesgos de adquirir la infección por *Chlamydia trachomatis* y colaboren en la propagación de los riesgos que ella conlleva.
- Se recomienda ampliar este estudio con más muestras y de preferencia que sean muestras de orina, para colaborar con el desarrollo de programas preventivos y de control, de esta manera concientizar a la población acerca del problema que incide la infección de esta bacteria, y de esta manera junto con el equipo y entidades de salud, lograr evitar que se propague en nuestra población.
- Implementar en el panel de exámenes para control prenatal y planificación familiar, el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* para evitar problemas posteriores. Realizar un monitoreo rutinario

incluyendo su determinación en el control ginecológico anual, que es de gran utilidad para diagnosticar, tratar y erradicar la infección mediante un seguimiento; medidas que con seguridad disminuirían la prevalencia de la infección. Es necesario resaltar que aunque se diagnostique el problema solo en un miembro de la pareja los dos deberán ser tratados, con el fin de evitar daños severos como infertilidad.

- Actualmente, las técnicas moleculares, (qPCR) Tiempo Real son ensayos relativamente sencillos, seguros y rápidos, que han demostrado mayor sensibilidad que otros procedimientos. Este estudio pone de manifiesto la importancia de hacer el diagnóstico de *C. trachomatis* con métodos de detección sensibles (PCR), para iniciar el tratamiento en forma prematura y reducir la diseminación de la infección, evitando secuelas a largo plazo en la salud. Por este motivo es viable la implementación de rutina el uso del qPCR para identificar *Chlamydia trachomatis* en mujeres con síntomas de ITU.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera P, Tachiquín M, Rocha M, Pineda B y Chánez M, (2014), "PCR en Tiempo Real".
- Alemán L, Martínez C, Fernández O. (2010) "Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales".
- Arango A, Máttar S, Visbal J, 2001. "*Chlamydia trachomatis*: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos", Colombia.
- Arráiz N, Marcucci R, Urdaneta B, Colina S, Romero Z, (2008) "Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*".
- Chlamydia Trachomatis DNA PCR cualitativa en tiempo real para detección de *Chlamydia trachomatis*, (2013). Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"-REF. CTDNA.CE 25/50/100/150 Tests DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl Via G. Carducci n° 27 20099 Sesto San Giovanni (Milán) – Italia.
- Cortázar M, Silva E. (2004), "Métodos Físicos-Químicos en Biotecnología".
- Duarte C, Soilán A. (2011) "Detección de *Chlamydia Trachomatis*, esporos micóticos y *Trichomonas vaginalis* en mujeres en edad fértil que acuden a los Hospitales San Pablo y Regional de San Lorenzo. Asunción, Paraguay.
- Estrada C. (2010), "Infección por *Chlamydia trachomatis* asociado a factor tubérico de subfertilidad". Nayarit.
- Estrella C. G1, (2009). "Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*". Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

- Galarza G. Patricia, (2012), "Conferencia Endocervicitis producidas por Chlamidia y Gonorrea".
- González B, (2011), "Fragmentación del ADN espermático de hombres infértiles con infección genitourinaria ocasionada por chlamydia trachomatis y mycoplasma sp. Efecto de la terapia antibiótica y antioxidante".Osto O. Sánchez R.(2003),"Chlamydia trachomatis: avance y perspectivas".
- López M, Rojas L, Rojas N, Díaz I, Muñoz J,(2012). "Mecanismos de modulación de la respuesta inmune por Chlamydia Trachomatis Asociados a infertilidad" Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, vol. 63.
- López V. Edgar O. "Estudio de las Características del Ciclo de desarrollo de Chlamydia Trachomatis relacionadas a la presencia del plásmido 7.5 Kb".
- Occhionero M, Panicia L, Pedersena D, Rossi G, Mazzucchini H, Entrocassi A, Gallo L, Gualtieri V y Rodríguez M, 2015 "Prevalencia de la infección por Chlamydia trachomatis y factores de riesgo de infecciones transmisibles sexualmente en estudiantes universitarios." Argentina.
- Pacheco S, 2011, "La Chlamydia trachomatis como factor de riesgo de aborto espontáneo en mujeres". México, p 36.
- Ramírez V,(2011)"Situación del Ecuador sobre infección de enfermedades de transmisión sexual".
- Ramos B.(2011), "Fragmentación del ADN Espermático de Hombres con infecciones Genitourinaria ocasiona por Chlamydia Trachomatis y Mycoplasma Sp. Efecto de la Terapia Antibiótica y Antioxidante".

- Ramón S, Daniela I, Viscarra T, Ili C, Roa J C, Sánchez R, Guzmán P y Brebi P, (2013) "Frecuencia de la infección por *Chlamydia Trachomatis* en un grupo de mujeres de la región de la Araucanía", Chile.
- Ramos B.(2011), "Fragmentación del ADN espermático de hombres infértiles con infección genitourinaria ocasionada por *chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas*. Efecto de la terapia antibiótica y antioxidante"
- Rayo J, 2016, "Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres de edad fértil, utilizando PCR en tiempo real en el servicio de laboratorio del hospital Carlos Andrade Marín "periodo diciembre 2014 – Agosto 2015. Quito, p14.
- Robert J, Bastidas, Cherilyn A. Elwell, Joanne N. Engel and Raphael H. Valdivia, (2014),"Chlamydial Intracellular Survival Strategies" *Cold Spring Harb Perspect Med*; California-San Francisco.
- Rodríguez-Domínguez M, Sanbonmatsu S, Salinas J, Alonso R, Gutiérrez J, y Galán J. (2013) "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas". Madrid-España.
- Rodríguez M, Rodríguez W,(2006),"Métodos físico-químicos en Biotecnología". Tomo II.
- Salazar A, et al,(2011). "Complicaciones Clínicas de las pacientes en edad fértil no embarazadas con infección genital por *chlamydia trachomatis*. Análisis de la mejor evidencia disponible", Bogotá.
- Sánchez M. Torres A, Villalba J. (2009)"Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional " México.

- Sandoval A, Medrano G, Cervantes F, (2010), "Aplicación de RT-PCR en Tiempo Real para evaluar el efecto de contaminantes en biomarcadores".
- Soto C, (2010). "Infección por *Chlamydia Trachomatis* asociado a factor tubárico de subfertilidad: aspectos inmunogenéticos".
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, (2013), "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real".
- Villacres S.(2013), "Prevalencia de las infecciones de transmisión sexual en mujeres en edad fértil diagnosticadas por medio de estudios citológicos".

ANEXOS

INFORMACIÓN ACERCA DEL ESTUDIO

Su participación en este estudio es necesaria, para determinar la frecuencia de la infección en nuestro medio por "*Chlamydia trachomatis*" que es un germen patógeno que puede causar infertilidad, daños severos en el aparato reproductor, graves infecciones en el recién nacido, abortos frecuentes, etc.

Luego de que firme este Consentimiento Informado:

a) La muestra de secreción cérvico-uterino será obtenida por su ginecólogo con un aplicadores apropiados para esta prueba. No existe ningún riesgo para el paciente.

b) Además nos brindará la información necesaria en un formulario que deberá llenarlo en ese momento. Toda la información será completamente confidencial. Usted no tendrá ningún gasto en esta investigación.

Esta prueba se realizará en el LABORATORIO BIOMOLECULAR el mismo que cuenta con la certificación ISO 9001-2008 con lo que se garantiza el resultado, ya que se utilizara un sistema de calidad con protocolos estandarizados.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Cuenca, 2016

He recibido una explicación satisfactoria sobre la finalidad de obtener mi muestra y mi participación es voluntaria.

Yo, con C.I., autorizo a la Lcda. Ruth Cecilia Yunga León utilizar mi muestra de secreción cervico-uterino para proceder a realizar el estudio de "Determinación de *Chlamydia trachomatis* mediante qPCR en mujeres con ITU que acuden a consultas ginecológicas en la ciudad de Cuenca".

Firma del paciente.....

Ginecólogo responsable de la toma de muestras

Dr.

C.I.

ENCUESTA

Datos del Investigador

N o m b r e: Lcda. Ruth Yunga León

Dirección del lugar de trabajo: "LABORATORIO BIOMOLECULAR " Tadeo Torres y José

Alvear esquina. Sector parque de la madre

Teléfono: 2844111 / 0986666707

Edad Actual... ..

Edad de iniciación de actividad sexual 12-15 años



16-20 años



21 - 25 años

10

M á s 30 a ñ o s

10

O t r a s e s p e c i f i q u e n

10

*** ** * * * * *

Numero de compañeros sexuales... ..

Número de abortos o antecedentes de abortos:

Hijos con infecciones cutáneas luego del parto

Si

9

no



Infecciones frecuentes del tracto genitourinario:

si

10

no

10

Problemas para embarazarse

si

7

no

7

Sabe Ud. que es la infección por *Chlamydia trachomatis* si

si

1

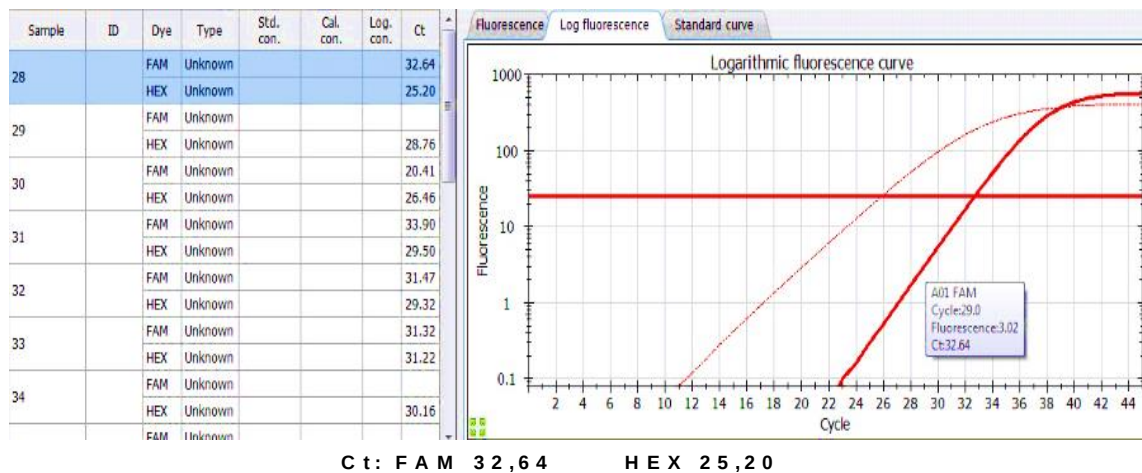
no

1

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

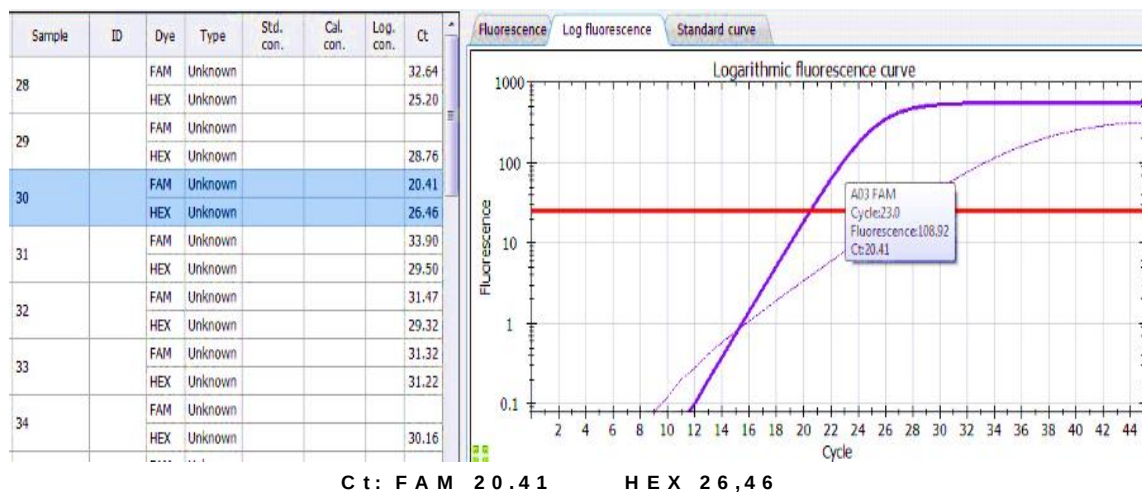
MUESTRAS POSITIVAS

A



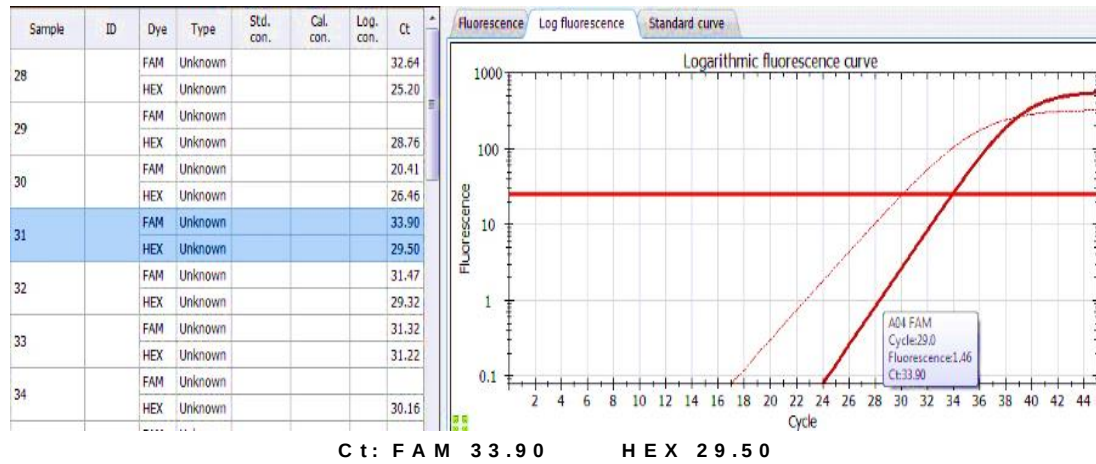
C t : F A M 3 2 , 6 4 H E X 2 5 , 2 0

B

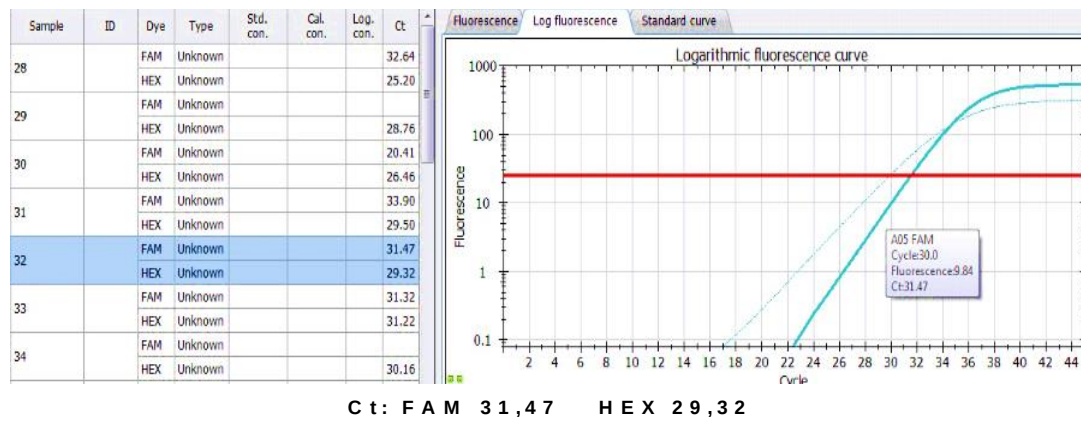


C t : F A M 2 0 , 4 1 H E X 2 6 , 4 6

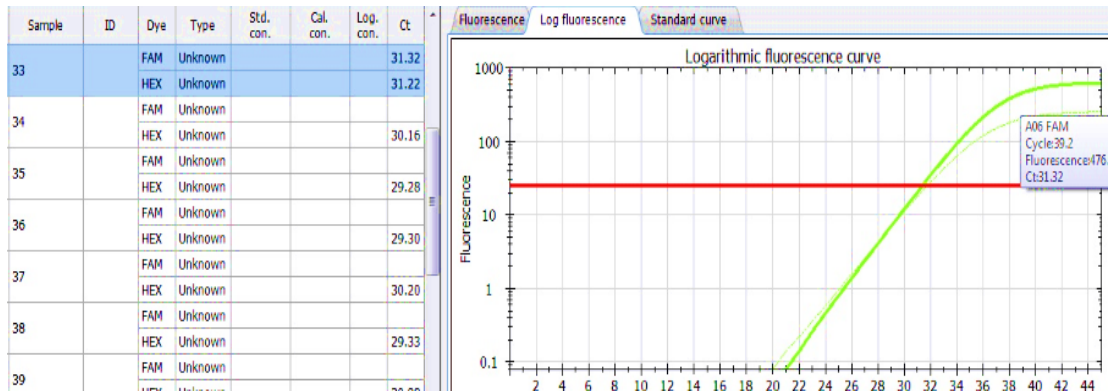
C



D

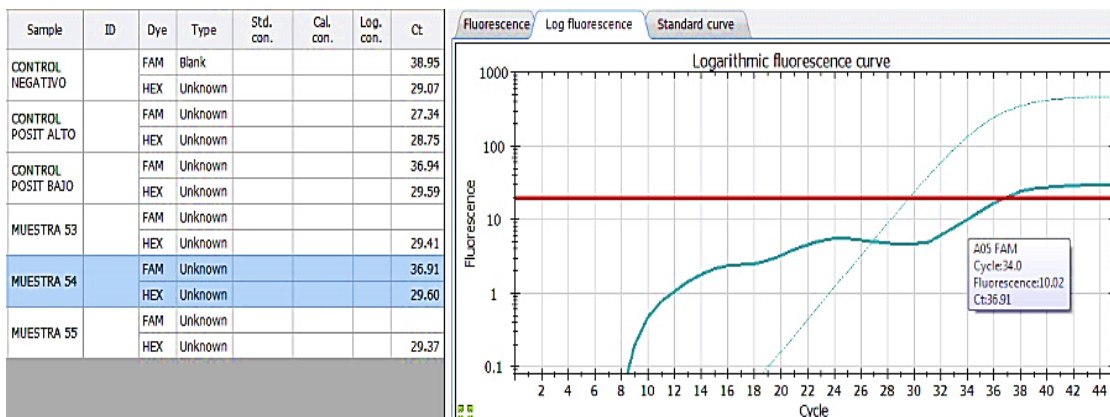


E



C t : F A M 3 1 , 3 2 H E X 3 1 , 2 2

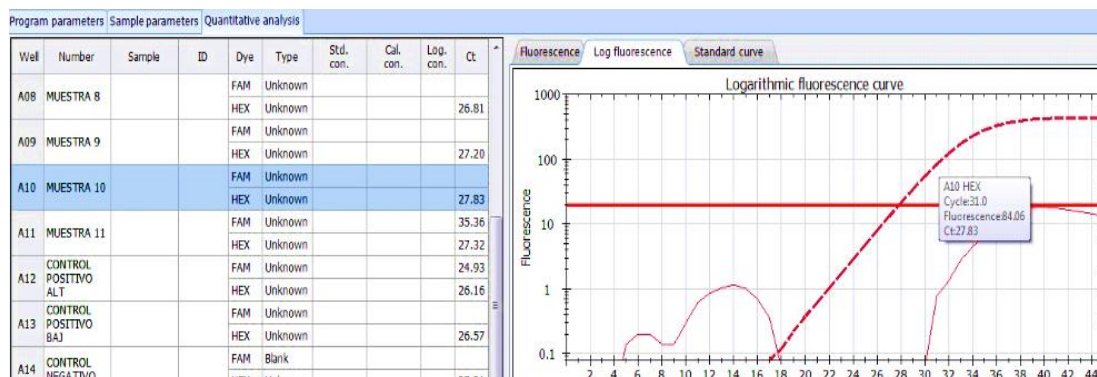
F



C t : F A M 3 6 , 9 1 H E X 2 9 , 6 0

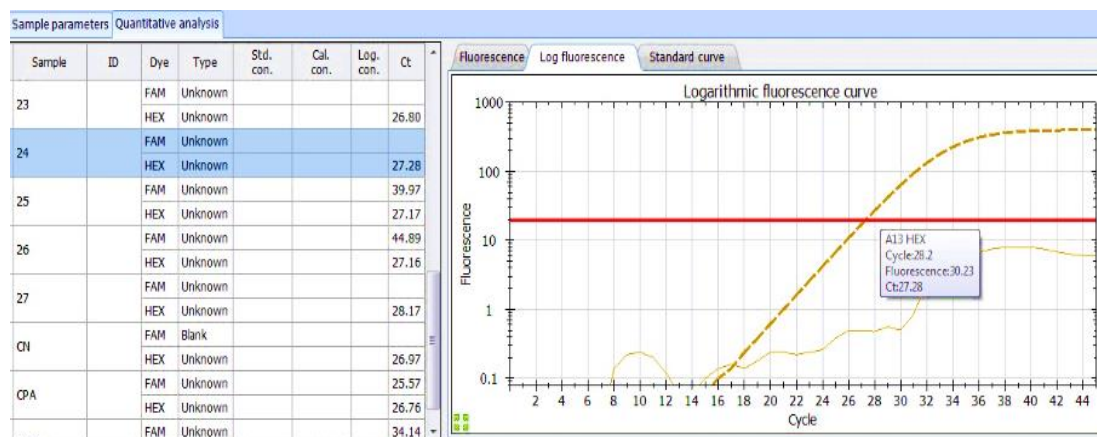
MUESTRA NEGATIVAS

A



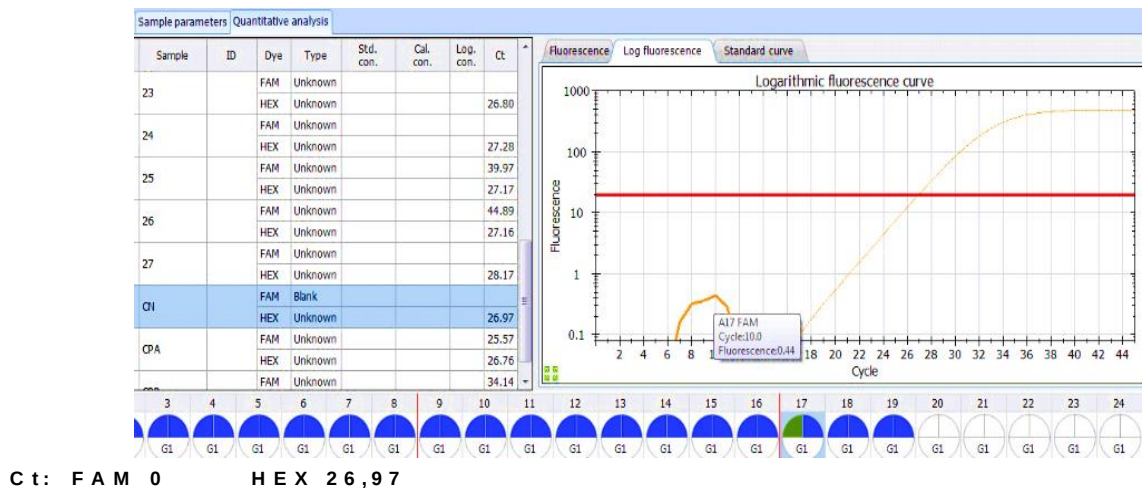
Ct: FAM 0 HEX 27,83

B

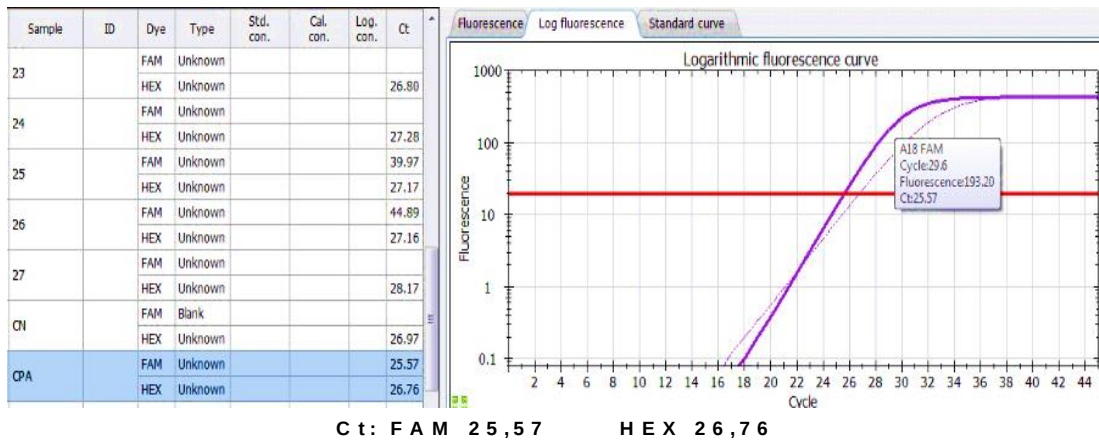


Ct: FAM 0 HEX 27,28

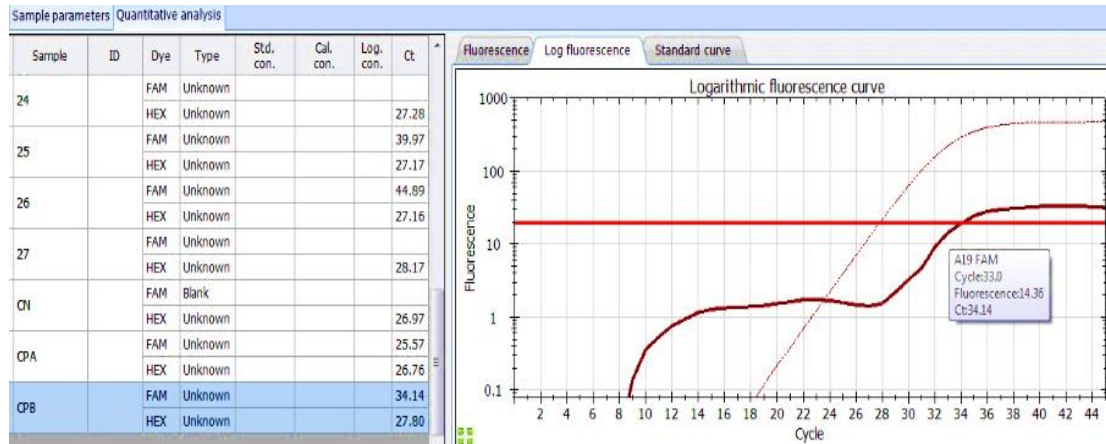
CONTROL NEGATIVO



CONTROL POSITIVO ALTO



CONTROL POSITIVO BAJO



C t: F A M 3 4 , 1 4

H E X 2 7 , 8 0