

Instituto Politécnico Nacional

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular

Asociación de la infección del virus de papiloma humano y los microorganismos causantes de cervicovaginitis en mujeres mexicanas

Que como uno de los requisitos
para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biomedicina y
Biotecnología Molecular**

P r e s e n t a:

Q.B.P. Juan Alfredo Hernández García

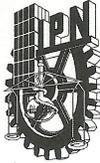
Directoras:

Dra. en C. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola
Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli



México, D.F.

2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 7 del mes de Marzo del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Asociación de la infección entre el virus de papiloma humano y los microorganismos causantes de cervicovaginitis en mujeres mexicanas

Presentada por la alumna:

Hernández
Apellido paterno

García
Apellido materno

Juan Alfredo
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	4	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola

Dra. Graciela Castro Escarpulli

Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández

Dra. Adela Astudillo Vázquez

M. en C. Carmen Soler Claudín

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López

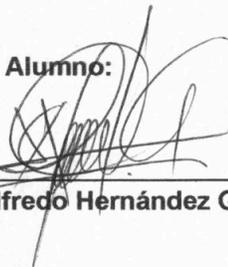
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 10 del mes de enero de 2012, el que suscribe Q.B.P. Juan Alfredo Hernández García alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular, con número de registro A100147, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola y la Dra. Graciela Castro Escarpulli y cede los derechos del trabajo intitulado "Asociación del virus de papiloma humano y los microorganismos causantes de cervicovaginitis", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

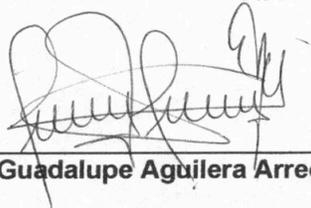
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: lupita_aguilera@hotmail.com, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alumno:



Q.B.P. Juan Alfredo Hernández García

Directoras de tesis



Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola



Dra. Graciela Castro Escarpulli

Este trabajo formó parte de los proyectos:

“Análisis de la frecuencia de coinfección cervicovaginal de origen bacteriano con el virus de papiloma humano”. Clave: SIP 20121193.

“Utilidad del diagnóstico molecular en las infecciones cervicovaginales de origen bacteriano”. Clave: SIP 20110246.

Dirigidos por la Dra. en C. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola

Dentro del programa:
“Diagnóstico bacteriológico y molecular de bacterias de interés médico”.
Clave: SIP 20110246

Dirigido por la Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli



No becario: 369256

Lugar de realización:

Laboratorio de Bacteriología Médica. Departamento de Microbiología. ENCB. IPN.

Proyecto aprobado por el Comité de Bioética de la ENCB.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la M. en C. Oyuki Ishida Pinzón por su colaboración en este proyecto haciendo el diagnóstico citológico a las muestras de las participantes.

A mis compañeras de laboratorio: Q.B.P Alma Maria Rodríguez Olvera, M. en C. Cecilia Hernández Cortez, M. en C. Fabiola Hernández Martínez, estudiante de Q.B.P Araceli Roldán López y Q.B.P Lorena Velázquez Salguero por su participación en diferentes etapas y actividades del proyecto que permitieron la ejecución exitosa del mismo.

A Martín Jesús L. por haber tomado algunas de las fotos de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE.....	<i>i</i>
ÍNDICE DE CUADROS.....	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>iv</i>
ABREVIATURAS.....	<i>v</i>
RESUMEN.....	<i>vi</i>
ABSTRACT.....	<i>vii</i>
1. Introducción.....	1
1.1 Infecciones del tracto reproductivo.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.2 Infecciones iatrogénicas (Ii).....	2
1.3 Infecciones endógenas (Ie).....	4
1.3.1 Vaginosis bacteriana.....	4
1.3.2 Candidosis vulvovaginal.....	7
1.3.3 Micoplasmas genitales.....	9
1.4 Infecciones de transmisión sexual.....	14
1.4.1 Virus de papiloma humano (HPV).....	16
1.4.2 Gonorrea.....	22
1.4.3 Cervicitis mucopurulenta.....	26
1.4.4 Tricomonosis.....	30
2. Antecedentes.....	34
3. Justificación.....	36
4. Objetivos.....	37
4.1 Objetivo general.....	37
4.2 Objetivos particulares.....	37
5. Materiales y Métodos.....	38
5.1 Estrategia general de trabajo.....	38
5.2 Tipo de estudio.....	39
5.3 Reclutamiento (Anexo 1).....	39
5.3.1 Criterios de inclusión (Anexo 2).....	39
5.3.2 Criterios de no inclusión.....	39
5.3.3 Criterios de exclusión o eliminación.....	40
5.4 Material biológico.....	40
5.4.1 Consentimiento informado (Anexo 3).....	40
5.4.2 Cuestionario epidemiológico (Anexo 4).....	41
6. Toma de muestra.....	42
6.1 Condiciones de la paciente para la toma de muestra.....	42
6.2 Técnica para la toma de muestra.....	42
7. Detección de infecciones de tipo viral.....	44

	Página
7.1 Metodología para el diagnóstico citológico de HPV.....	44
7.2 Detección de DNA HPV.....	46
8. Detección de infecciones bacterianas.....	47
8.1 Detección de vaginosis bacteriana.....	47
8.1.1 Criterio de Nugent.....	47
8.1.2 Criterio de Amsel.....	48
8.1.3 Cultivo de <i>Gardnerella vaginalis</i>	48
8.2 Detección de micoplasmas genitales.....	49
8.3 Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>	52
8.3.1 Lisis celular.....	52
8.3.2 PCR para la amplificación del gen <i>16S rRNA</i>	53
8.4 Metodología para la detección de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	54
8.4.1 PCR para la detección del gen <i>16S rRNA</i>	55
9. Detección de infecciones genitales de tipo micótico.....	56
9.1 Detección de vaginitis por <i>Candida</i> spp.....	56
10. Detección de infecciones genitales de tipo parasitario.....	57
10.1 Detección de vaginitis por <i>Trichomonas vaginalis</i>	57
11. Análisis de datos sociodemográficos.....	57
12. Resultados.....	59
12.1 Infecciones determinadas en la población.....	59
12.2 Análisis de la infección con el virus de papiloma humano en las participantes	62
12.3 Variables sociodemográficas y de conducta de la población estudiada.....	65
13. Discusión.....	68
13.1 Análisis de la infección con el virus del papiloma humano en las participantes.....	68
13.2 Variables sociodemográficas y de conducta de la población estudiada.....	77
14. Conclusiones.....	82
15. Perspectivas de desarrollo.....	83
16. Referencias bibliográficas.....	84
16.1 URL's.....	98
17. Anexos.....	99
17.1 Reclutamiento (Anexo 1).....	99
17.2 Criterios de inclusión (Anexo 2).....	100
17.3 Consentimiento informado (Anexo 3).....	101
17.4 Cuestionario epidemiológico (Anexo 4).....	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Número de casos de ITS de reporte obligatorio en la República Mexicana hasta la semana 52, 2011.....	15
2. Patógenos causantes de ITS e infecciones endógenas, patología que causan y principales métodos de diagnóstico.....	17
3. Métodos utilizados frecuentemente para la detección de los diferentes genotipos de HPV.....	22
4. Agentes antimicrobianos recomendados por los CDC (2010) y la dosis empleada para el tratamiento de la gonorrea.....	26
5. Métodos de diagnóstico para <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
6. Agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones por <i>Chlamydia trachomatis</i> según la NOM-039-SSA2-2002.....	29
7. Reportes de la frecuencia de co-infección entre HPV y otros microorganismos causantes de ITS.....	34
8. Descripción del puntaje de Nugent para el diagnóstico de vaginosis bacteriana...	47
9. Agentes etiológicos y/o patologías detectados en las participantes.....	60
10. Alteraciones citológicas e infección del virus de papiloma humano encontradas en las participantes.....	63
11. Frecuencia y análisis estadístico de las variables y su relación con los hallazgos microbiológicos.....	66
12. Relación entre el estado de salud con el uso del condón	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Diagrama general de trabajo.....	38
2.	Detección y genotipificación de HPV mediante el sistema INNOLiPA®.....	44
3.	Tira de nitrocelulosa que se usa para detectar diferentes genotipos de HPV por hibridación reversa y PCR (INNOLiPA®).....	46
4.	Galería IST-2 para detección de micoplasmas.....	50
5.	Galería <i>AF genital system</i> ® para la detección de micoplasmas y otros patógenos de la región genitourinaria.....	52
6.	Morfología colonial de las diferentes especies de <i>Candida</i> utilizando el medio de cultivo cromogénico.....	56
7.	Trofozoito de <i>Trichomonas vaginalis</i> en una preparación en fresco.....	57
8.	Frecuencia de las infecciones detectadas en la población de estudio.....	61
9.	Frecuencia de los genotipos de HPV detectados en las participantes.....	64

ABREVIATURAS

2-SP	2 Sacarosa fosfato
ASCUS	Atípia celular de significado incierto
BAVB	Bacterias asociadas a vaginosis bacteriana
CaCu	Cáncer Cérvico-uterino
CDC	Centros de control de enfermedades
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CTA	Cistina tripticaseina agar
CVV	Candidosis vulvovaginal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Enfermedad pélvica inflamatoria
LEIAG	Lesión intraepitelial de alto grado
LEIBG	Lesión intraepitelial de bajo grado
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HPV	Virus de papiloma humano
HSV	Virus de herpes simplex
ITS	Infección de transmisión sexual
MOMP	Proteína principal de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
NOM	Norma Oficial Mexicana
Pap	Papanicolaou
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSF	Solución salina fisiológica
VB	Vaginosis bacteriana

RESUMEN

Las infecciones del tracto reproductor (ITR) se agrupan en tres categorías: las infecciones endógenas (IE), las infecciones de transmisión sexual (ITS) y las infecciones iatrogénicas, y en su nombre señalan la forma en que son adquiridas y se propagan. Las dos primeras categorías representan un serio problema de salud a nivel mundial que afecta a hombres y mujeres, a sus familias e inclusive a comunidades enteras. Por su parte, debido a que aproximadamente un 85 % de la población mundial es sexualmente activa las ITS son de gran importancia. La detección de infecciones genitales es importante para revelar la presencia simultánea de los diferentes microorganismos causantes de ITS, así como la identificación certera de estos patógenos, la cual permite dar un tratamiento efectivo a las pacientes que evita el desarrollo de enfermedades más graves. Por este motivo, el presente trabajo ofreció un servicio para el diagnóstico oportuno de las alteraciones cervicovaginales producidas por los principales agentes causales de IE e ITS y brindó información de la frecuencia de co-infección que existe en este tipo de patologías y el HPV en una población de mujeres mexicanas.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la ENCB-IPN. La difusión del protocolo se hizo entre la población transeúnte del casco de Santo Tomás y áreas aledañas a la que previo a la toma de la muestra, se le cuestionó para conocer si cumplían con los criterios de inclusión. Cada participante firmó un consentimiento informado y completó un cuestionario sobre datos demográficos y clínicos. El diagnóstico de infección se realizó usando la siguiente metodología: criterio de Amsel, cultivo de *Gardnerella vaginalis*, criterio de Nugent, el examen en fresco, cultivo en medio cromogénico, la detección, cuantificación y susceptibilidad antimicrobiana de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* usando las galerías IST 2® o AF Genital System®, *Chlamydia trachomatis* se detectó por PCR y *Neisseria gonorrhoeae* por cultivo y PCR. A todas las participantes se les realizó Papanicolaou y en aquellas en las que se encontraron datos sugerentes de HPV, éste se buscó usando el sistema INNOLiPA®. El análisis de frecuencias de los resultados obtenidos se hizo con el software PASW-18, aplicando la prueba de χ^2 para determinar si existió relación entre las infecciones mixtas con HPV y los microorganismos causantes de cervicovaginitis y determinar si el estado de la participante, es decir, estar o no enferma tiene relación con el grupo de edad, uso de condón, inicio de vida sexual, y el número de parejas sexuales.

La búsqueda de los agentes etiológicos bacterianos se realizó en las 207 muestras, a diferencia de la infección con HPV que sólo se ejecutó en aquellas participantes que tuvieron alteraciones citológicas en el resultado de Papanicolaou (n=34). Los resultados muestran que 127 de las 207 participantes (61.3%) presentaban, al menos una infección o agente etiológico. El resto de las participantes (78/207=38.7%) no presentaron alteraciones citológicas o alguna patología, considerándolas así como participantes sanas, al menos desde el punto de vista microbiológico.

El genotipo de alto riesgo más frecuentemente detectado fue el 52, seguido de los genotipos 16 y 58 es relevante mencionar que el genotipo 18, considerado como uno de los más frecuentes después del genotipo 16, se encontró sólo en 1 de las 34 participantes. Además de la co-infección entre los diferentes genotipos virales, en la población analizada se detectó también infección mixta, definida como la presencia de HPV (uno o varios) acompañada de un microorganismo causante de patología genital. Esto último ocurrió en 11 casos, la infección con HPV se acompañó de candidosis, de VB y de la presencia de *U. urealyticum* $\geq 10^4$ UFC/mL. Las infecciones mixtas fueron muy frecuentes, circunstancia que es ampliamente reportada en la literatura de ITR. Se observó relación estadísticamente significativa en el número de parejas sexuales totales y el estar o no enfermo, está relación ($p=0.047$), indica que el tener múltiples parejas sexuales es un condicionante de adquirir al menos una de las infecciones estudiadas, mientras que en las otras variables no hay relación significativa.

La asociación de *U. urealyticum* con VB resultó ser la más frecuente. Las infecciones con ASCUS presentaron al menos un genotipo de alto riesgo. Más de la mitad de las participantes presentó por lo menos una infección y/o colonización con al menos uno de los microorganismos buscados en esta investigación.

ABSTRACT

Reproductive tract infections are grouped into three categories: endogenous infections, sexually transmitted infections and iatrogenic infections; the way each one is acquired and disseminated is pointed out by their name. The first two represent a worldwide health problem since they affect men and women, as well as whole communities. Particularly, sexually transmitted diseases affect 85% of the sexually active global population and occupy one of the top five causes of first level medical attendance; in Mexico sexually transmitted infections are between the top ten causes of morbidity. The detection of genital infections allows us to reveal the simultaneous presence of different microorganisms causing sexually transmitted infections, the accurate identification of such pathogens is the key to an effective therapy avoiding the development of more serious infections. This is why the present work offered a service for the opportune diagnosis of cervicovaginal alterations caused by the main agents of genital tract infections; on the other hand, it showed information about the possible synergic effects of the concurrent infections with HPV in Mexican women. The project was evaluated and approved by the Ethics Committee of ENCB-IPN. The spreading of the protocol was done in Casco de Santo Tomas and surroundings. Each participant was interrogated in order to determine if they gathered the inclusion criteria and each one signed an informed consent and answered a survey about clinical and epidemiological data.

Diagnosis was performed as follows: Amsel's criterion, Nugent's score, *Gardenerella vaginalis* culture, wet mount, culture in chromogenic medium, quantification and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* was done phenotypically with IST 2® galleries or AF Genital System®, *Chlamydia trachomatis* was detected by PCR and *Neisseria gonorrhoeae* by culture and PCR. Papanicolau test was done to all participants and those where HPV infection was suspected were tested with INNOLipa® system. The analysis of the data obtained was done with PASW-18 software and the χ^2 test was applied to determine if there was an association between mixed infections and other microorganisms causing cervicovaginitis, as well as the probable relationship between the state of health and the age, use of condom, age of first intercourse, among others.

The search of bacterial pathogens was performed in 207 samples, HPV diagnosis was done only in those participants that presented cytological alterations in the Papanicolaou test (n=34). The results show that 127 from the 207 participants (61.3%) presented at least one infection or etiological agent. The rest of them (78/207=38.7%) did not show signs of cytological alterations or any other pathology, which is why, from a microbiological approach they were considered as "healthy" participants.

The most frequently detected high risk genotype was 52, followed by genotypes 16 and 58, it is important to emphasize that genotype 18, considered as one of the most frequent after genotype 16, was detected in only one participant. As well as the concurrent infection between the different viral genotypes, mixed infection was detected in the studied population, and it was defined as the presence of HPV along with a genital pathogen. This happened in 11 cases, HPV infection was accompanied by candidosis, BV and the presence of *U. urealyticum* $\geq 10^4$ UFC/mL. These kinds of infections were quite common, which has been previously widely reported. There was a significant relationship between the number of sexual partners and being healthy or sick, this relationship ($p=0.047$), means that having multiple sexual partners leads to acquiring at least one of the studied pathologies, meanwhile, in other variables there is no significant association.

The association between *U. urealyticum* and BV was the most frequent. The infections with ASCUS presented at least one high-risk HPV genotype.

More than half of the participants presented one infection and/or colonization with at least one of the microorganisms studied in the present work.

1. Introducción

1.1 Infecciones del tracto reproductivo

1.1.1 Definición

Las infecciones del tracto reproductivo (ITR) son causadas por microorganismos que normalmente se encuentran presentes en algunas partes del organismo, pero que son transportados a otras partes del tracto reproductivo durante el contacto sexual, por organismos transmitidos durante el acto sexual o por algunos procedimientos médicos. Representan un serio problema de salud a nivel global, que afecta a hombres y mujeres, a sus familias y a comunidades enteras, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados (Grosskurth *et al.*, 1995; NOM-039-SSA2-2002).

No todas las infecciones de transmisión sexual (ITS) son infecciones del tracto reproductivo y no todas las ITR se transmiten por vía sexual. El término ITS alude a la forma de transmisión, mientras que el de ITR se refiere a la zona afectada.

Por su origen, las ITR se agrupan en tres categorías: infecciones endógenas, infecciones de transmisión sexual (ITS) e infecciones iatrogénicas, su nombre señala la forma en que son adquiridas y se propagan.

Los géneros de microorganismos que normalmente habitan el tracto urogenital masculino y femenino especies de *Neisseria* saprófitas, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma*, por mencionar algunos.

En las ITR femeninas es de suma importancia conocer cuál es la microbiota normal que presenta la vagina, así como los agentes que pueden alterar este hábitat y por lo tanto provocar o permitir el desarrollo de una infección. En el ambiente vaginal de las mujeres sexualmente activas, predominan cuantitativamente diferentes especies del género *Lactobacillus*, productores de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácidos orgánicos que mantienen un pH considerado normal por debajo de 4.5, y han sido consistentemente asociados con embarazos sanos.

Las especies más comúnmente aisladas de lactobacilos con microambientes sanos son *L. crispatus* y *L. jensenii*.

Algunas especies que predominan en la vagina sana incluyendo a *L. jensenii* reducen la adherencia de los gonococos (*Nesisseria gonorrhoeae*) y la invasión a células epiteliales endometriales. Los lactobacilos son autoinhibidos por altos niveles de peróxido de hidrógeno de manera que los niveles de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno se auto regulan en la vagina. Además de los efectos directos antimicrobianos del ácido láctico y la consecuente acidificación del pH que estas bacterias producen, los mecanismos naturales de defensa en la vagina incluyen la producción de defensinas endógenas, un inhibidor de proteasas, citosinas y moco endocervical (Marrazzo, 2011).

1.2 Infecciones iatrogénicas (Ii)

Son aquellas provocadas por alguna intervención médica. Los casos más comunes se originan durante el alumbramiento o como resultado de algún otro procedimiento transcervical, como el aborto inducido o la inserción del dispositivo

intrauterino (DIU). En algunas ocasiones, durante tales intervenciones los microorganismos endógenos de la vagina que se encuentran en el cuello uterino llegan a ser transportados hasta el tracto genital superior donde pueden causar infecciones graves, en el útero, trompas de Falopio, ovarios y otros órganos de la pelvis. Los microorganismos que están en otras partes del cuerpo, como los que forman parte de la microbiota normal de la piel, también pueden ser introducidos en el tracto genital durante algunos procedimientos médicos (OMS, 2005).

Las infecciones iatrogénicas son el resultado de la introducción de una bacteria u otro microorganismo en el tracto reproductivo, como consecuencia de algún procedimiento médico como el aborto inducido, la inserción del dispositivo intrauterino (DIU) o durante el alumbramiento, entre otros (Vázquez *et al.*, 2007). Este tipo de infecciones pueden cursar con leucorrea o ulceraciones y tumoraciones.

Entre los microorganismos causantes de cervicitis que cursan con leucorrea se encuentra *Mycoplasma genitalium*, y entre los causantes de vulvovaginitis están algunas especies del género *Candida*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.

También el virus del herpes simple (HSV) puede causar la aparición de úlceras genitales sin ser necesariamente de transmisión sexual. Otra infección que cursa con úlceras genitales es la sífilis, la cual es causada por *Treponema pallidum* y puede ser transmitida de madre a hijo, en cuyo caso se denomina “sífilis congénita” (Vázquez *et al.*, 2007).

1.3 Infecciones endógenas (Ie)

La ITR endógena se presenta principalmente en las mujeres. Algunos microorganismos endógenos se encuentran habitualmente en la vagina, pero pueden causar una ITR cuando tienen un crecimiento excesivo. La infección por levaduras del género *Candida* o la vaginosis bacteriana son de este tipo.

Las infecciones endógenas son el resultado de una inmunosupresión, inmunodeficiencia o aumento excesivo de la población de bacterias que normalmente se encuentran presentes en la vagina, por ejemplo la vaginosis bacteriana (VB) (Vázquez *et al.*, 2007). Las dos afecciones endógenas que afectan a las mujeres y son más numerosas en las consultas de visita médica general son la VB y la candidosis, las cuales no necesariamente son infecciones de transmisión sexual.

1.3.1 Vaginosis bacteriana (VB)

La VB es una condición común que afecta a millones de mujeres anualmente y está asociada con numerosos problemas de salud como parto pretérmino, bajo peso del recién nacido, aborto espontáneo, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) y adquisición de HIV.

La descarga vaginal mal oliente o la irritación local suelen ser los únicos síntomas de la VB, por lo que un buen porcentaje de mujeres con dicha afección pueden ser asintomáticas (Fredricks *et al.*, 2005; Srinivasan y Fredricks, 2008).

La VB representa una condición caracterizada por la sustitución de la microbiota normal, es decir, la disminución o sustitución de los bacilos de Döderlein

(*Lactobacillos*) por altas cantidades de microorganismos anaerobios comensales, resultando en algunas mujeres como una vaginitis sintomática. Es la más prevalente de las infecciones vaginales en mujeres en edad reproductiva. Existen reportes (Nugent *et al.*, 1991) en los cuales mencionan que al menos 1 de 3 pacientes puede tener VB detectada por tinción de Gram en fluidos vaginales.

Esta afección ocurre con mayor frecuencia en mujeres que han reportado tener sexo con mujeres, y mujeres con un elevado número de parejas sexuales. Otros factores de riesgo son la aplicación de duchas vaginales, la colocación de DIU, el uso de anticonceptivos hormonales, el hábito de fumar, la menstruación y el estrés crónico.

En la práctica clínica, la VB es generalmente diagnosticada usando el criterio de Amsel, para lo cual se deben cumplir al menos 3 de los siguientes 4 posibles hallazgos: pH mayor a 4.5, descarga vaginal homogénea, detección de olor a pescado bajo la adición de KOH al 10% al fluido vaginal (prueba de Whiff positiva) y la presencia significativa de células clave (definidas como más del 20% del total de células epiteliales vaginales vistas a 100x en microscopía salina). En la práctica clínica, la exactitud del criterio de Amsel está limitada por la nula o pobre habilidad en el uso del microscopio para detectar células clave (Amsel *et al.*, 1983; Spiegel, 1991; Marrazzo, 2011).

La VB también puede ser diagnosticada empleando la tinción de Gram directa del fluido vaginal y el criterio de Nugent, el cual cuantifica el número de lactobacilos y morfotipos bacterianos asociados a VB para crear una escala de la normalidad de la microbiota que va desde normal (puntaje= 0-3), intermedio (puntaje=4-6) y hasta la

VB franca (puntaje= 7-10). El puntaje de Nugent es ampliamente reconocido como el estándar de oro para el diagnóstico de la VB en estudios de investigación.

Recientemente se han descrito ensayos de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa y cuantitativa para la detección de bacterias asociadas a la VB (BAVB); esto podría ser de utilidad en el futuro, pero no se ha validado para el diagnóstico de VB en poblaciones grandes y diversas de mujeres. Además, la PCR cuantitativa no se ha estudiado lo suficiente en cuanto a su precisión para diferenciar entre las mujeres que tienen una microbiota intermedia y mujeres con una VB franca, las mujeres con una biota intermedia por el puntaje de Nugent pueden tener altas cantidades de las BAVB, *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* (Nugent *et al.*, 1991).

En cuanto al tratamiento, los antibióticos de amplio espectro contra de la mayoría de las bacterias anaerobias son efectivos para aliviar los síntomas de la VB, el alivio es a corto plazo y la mayoría de las mujeres con VB experimentarán recurrencia en los siguientes meses. El metronidazol y la clindamicina son la terapia de elección. Estudios publicados han reportado consistentemente la resolución de la VB en el 71-89% o más de las mujeres un mes después de la administración de éste régimen. Las terapias intravaginales han tenido una eficacia similar al régimen de metronidazol oral con menos efectos colaterales (Spiegel, 1991; Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Marrazzo, 2011).

A pesar de que cada episodio sintomático usualmente responde rápidamente al tratamiento convencional con antibióticos, la recurrencia rápida es frecuentemente inevitable a menos que sea suprimida con terapia continua de antibiótico (gel vaginal

de metronidazol dos veces por semana) (Spiegel, 1991; Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Marrazzo, 2011).

1.3.2 Candidosis vulvovaginal

La presencia de *Candida* en la vagina, en ausencia de inmunosupresión o daño en la mucosa, usualmente no está asociada con ningún signo de enfermedad y los especialistas se refieren a ella como una colonización. En contraste con esta colonización asintomática, la candidosis vulvovaginal (CVV) se define como la existencia de signos y síntomas de inflamación en presencia de *Candida* spp. y en la ausencia de otra etiología infecciosa. La CVV está caracterizada por la ocurrencia esporádica o infrecuente de la enfermedad causada por *C. albicans* en mujeres inmunocompetentes (Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Achkar y Fries, 2010).

La CVV complicada incluye casos de CVV severa, CVV causada por especies no *C. albicans*, CVV asociada con embarazo u otras condiciones concurrentes como diabetes no controlada o inmunosupresión, y la CVV recurrente en mujeres inmunocompetentes (Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Achkar y Fries, 2010).

La distribución de *Candida* spp. identificada en mujeres con CVV varía ampliamente dependiendo de la localidad, así como de la población estudiada. Típicamente, se identifica una sola especie, pero una infección mixta de dos o más especies también se ha reportado en el mismo cultivo vaginal en la minoría de las mujeres (2-5%) con CVV (Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Achkar y Fries, 2010).

En cuanto a su distribución geográfica, en diversos países *C. albicans* es la especie más común identificada con CVV (76-89%), seguida por *C. glabrata* (7-17%). El porcentaje general de especies no *C. albicans* asociadas con CVV en estos países

va desde el 24 hasta el 11%. Algunos estudios reportaron una tendencia en aumento en la ocurrencia de especies no *C. albicans*, mientras que en un estudio reciente de 90,000 muestras en los Estados Unidos de América se encontró una distribución anual consistente de 2003-2007. En contraste a los casos de los Estados Unidos, Europa y Australia, las especies de *Candida* no *C. albicans*, en particular *C. glabrata* parecen estar más comúnmente asociadas con CVV en algunos países asiáticos y africanos (Achkar y Fries, 2010).

Aunque muchas mujeres saludables desarrollan CVV esporádicamente, diferentes factores de riesgo, de conducta y relacionados al hospedero se asocian con la CVV y con episodios recurrentes. Los factores de riesgo por comportamiento que se asocian significativamente con una mayor incidencia de CVV incluyen el contacto sexual frecuente y sexo oral receptivo, así como el uso de anticonceptivos orales con altas concentraciones en estrógenos, condones y espermicidas (Sobel, 1997; Achkar y Fries, 2010).

Usando la microscopía de una preparación en fresco, se encuentran levaduras y las pseudohifas en cerca del 50% de las pacientes examinadas. El examen se hace con una preparación de 10% de KOH, lo cual es un procedimiento más sensible que la preparación con solución salina para la identificación de levaduras o pseudohifas. El pH vaginal se mide para excluir otras infecciones como VB o tricomonosis en las que éste es mayor a 4.5, mientras que en la CVV éste es normal (<4.5) (Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Achkar y Fries, 2010).

El cultivo vaginal es el método más certero para el diagnóstico de CVV y es indicado cuando la microscopía es negativa pero se sospecha de CVV, o en casos de alto riesgo para una CVV por *Candida* no *C. albicans*. Existen varios métodos de

cultivo y no existe mayor diferencia entre las gelosas Sabouraud, Nickerson o Microstix-*Candida*. El Chromagar® *Candida* es un medio selectivo que incluye sustancias cromogénicas permitiendo la rápida identificación de varias especies de *Candida* basadas en su pigmentación, lo cual también facilita la detección de infecciones mixtas con más de una especie de *Candida* (Sobel, 1997; NOM-039-SSA2-2002; Achkar y Fries, 2010; CENAVECE, 2011).

Para el tratamiento se utilizan formulaciones tópicas de azoles, las cuales son efectivas en candidosis no complicadas. En el caso de las candidosis complicadas, se recomienda extender el tiempo de terapia, seguido de un régimen de mantenimiento antifúngico que consiste en ingerir semanalmente fluconazol. Este régimen debe seguirse durante 6 meses (NOM-039-SSA2-2002; CENAVECE, 2012).

1.3.3 Micoplasmas genitales

Los expertos de las enfermedades infecciosas del aparato genital han identificado desde hace décadas a *M. hominis* y a *U. urealyticum*, ya que pueden formar parte de la biota normal en mujeres sexualmente activas. Ambas bacterias pueden jugar un papel importante en corioamnioitis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), VB, endometritis postparto e infertilidad. También afectan al recién nacido, provocando bajo peso al nacer, meningitis y bacteriemia, entre otras (Waites *et al.*, 2005; Larsen y Hwang, 2010; Taylor-Robinson y Skov, 2011). A pesar de la abundancia de reportes de estos microorganismos, el trabajo ha progresado lentamente, principalmente debido a que se trata de bacterias que necesitan métodos de cultivo complejos (Waites *et al.*, 2005; Larsen y Hwang, 2010; Taylor-Robinson y Skov, 2011).

El primer reporte de un micoplasma recuperado directamente de un humano y asociado a una condición patológica ocurrió en 1937, cuando Dienes y Edsall aislaron de un absceso de glándula de Bartholin un organismo que era muy probablemente el ahora conocido *M. hominis*.

El término micoplasmas fue usado por primera vez para describir a los organismos tipo pleuropneumonia en la década de 1950. En años siguientes se describieron otras especies de micoplasmas humanos y en 1954, Shepard realizó la primera descripción de una cepa T de micoplasmas, después conocida como *Ureaplasma*, cultivada de una muestra uretral de un hombre con uretritis no gonocócica (Waites *et al.*, 2005).

En 1960 se probó que los micoplasmas eran incapaces de producir paredes celulares, lo que los hace únicos entre los procariones (Waites *et al.*, 2005).

Los micoplasmas son los organismos autoreplicativos más pequeños, en cuanto a dimensiones celulares y tamaño genómico, que son capaces de sobrevivir sin necesidad de una célula. Sus genomas pequeños y habilidades biosintéticas limitadas son responsables de muchas de sus características biológicas y requerimientos para su complejo cultivo *in-vitro*. Carecen de pared celular, lo que evita su tinción por la técnica de Gram, esta singularidad les confiere pleomorfismo celular y los hace muy susceptibles a la deshidratación. Otra característica es su requerimiento de esteroides en medios de cultivo artificiales, suplementados con la adición de suero para proveer los componentes necesarios para la membrana trilaminar que les da soporte estructural (Waites *et al.*, 2005).

En los años siguientes a la primera descripción y caracterización como un patógeno humano, se acumuló evidencia adicional que relaciona al *Ureaplasma* con

infertilidad, endometritis post-parto, corioamnioitis, aborto espontáneo, parto prematuro, neumonía, bacteriemia, meningitis y enfermedad crónica pulmonar en bebés prematuros. *M. hominis* también se ha involucrado con un gran número de estas condiciones, las cuales pueden afectar a mujeres embarazadas y a sus neonatos (Waites *et al.*, 2005).

Hasta el momento el papel de estos organismos como patógenos humanos se mantiene indefinido debido a diversas razones, entre ellas su alta prevalencia en personas sanas, el pobre diseño de muchas investigaciones previas, la poca consideración dada a otros aspectos como las condiciones del microambiente vaginal, la poca familiaridad de los clínicos y microbiólogos, los requerimientos nutricionales complejos necesarios para su cultivo *in-vitro* y su búsqueda como último recurso (Waites *et al.*, 2005).

Ureaplasma spp. puede encontrarse en las superficies mucosas del cérvix o vagina del 40 al 80% en mujeres asintomáticas sexualmente maduras, mientras *M. hominis* se encuentra en un 21 a 53%. Recientemente se realizaron estudios clínicos que emplearon métodos como el cultivo, la serología y ensayos de PCR. Tales estudios reportan que estos organismos tienen un rol etiológico en una variedad de enfermedades urogenitales (Taylor-Robinson, 1983; Waites *et al.*, 2005).

La naturaleza fastidiosa y la susceptibilidad de estos microorganismos al secado obligan a tomar especial atención a la recolección de muestras, a realizar la inoculación del medio de transporte al momento de tomar la muestra cuando sea posible, a la transportación y al envío adecuados si se quiere que los microorganismos se mantengan viables. Aunque el cultivo es considerado el estándar de oro para la detección de *M. hominis* y *U. urealyticum*, éste es muy caro y

requiere medios especiales, así como experiencia, los cuales no están disponibles fuera de los laboratorios de investigación o de referencia (Taylor-Robinson, 1983; Waites *et al.*, 2005; Muñíz-Becerril *et al.*, 2010).

Mientras los *Ureaplasmas* pueden ser identificados a nivel de género por su morfología colonial, así como por su producción de ureasa, en contraste, las especies de micoplasmas como *M. hominis* que producen colonias de “huevo frito” pueden ser identificados presuntivamente basados en sus tasas de crecimiento, hidrólisis de arginina y su sitio de origen; su identificación a nivel de especie requiere de pruebas adicionales, entre las que se encuentran *immunoblot* con anticuerpos monoclonales, coloniepiimmunofluorescencia y más recientemente ensayos de PCR (Waites *et al.*, 2005; Muñíz-Becerril *et al.*, 2010).

Las técnicas diseñadas para *M. hominis* están dirigidas a genes como el 16S *rRNA*. Las ventajas de la PCR para la detección de los micoplasmas genitales incluyen el hecho de que no se necesitan organismos viables, su límite de detección es mucho mejor que el del cultivo y los resultados pueden estar disponibles hasta en un día. Los ensayos de PCR también han sido evaluados como una herramienta diagnóstica para la rápida detección de infección del tracto respiratorio en neonatos por micoplasmas y se ha encontrado una concordancia del 91 al 95% entre la PCR y el cultivo (Taylor-Robinson, 1983; Waites *et al.*, 2005; Muñíz-Becerril *et al.*, 2010).

Por otro lado, también se han descrito sistemas de PCR múltiple para la detección de los micoplasmas genitales en muestras clínicas que tienen resultados favorables en comparación al cultivo. Desafortunadamente esta técnica no existe de manera comercial y su uso se ha limitado a laboratorios de investigación y laboratorios de diagnóstico molecular de referencia (Waites *et al.*, 2005).

La infección causada por los micoplasmas genitales tiene diversas agravantes, y entre las más importantes se encuentran las complicaciones clínicas de la mujer durante el embarazo, así como, para el feto y los neonatos. Debido a lo cual es importante aplicar un esquema antimicrobiano eficaz para evitar llegar a tales complicaciones.

Las tetraciclinas son el tratamiento de elección para la uretritis no gonocócica en hombres y mujeres; sin embargo, a nivel mundial los aislados clínicos tanto de *M. hominis* como *U. urealyticum* han mostrado un aumento en la resistencia a las tetraciclinas debido a la presencia de un transposón determinante de resistencia llamado *tet* (M) (Ullmann *et al.*, 1999).

Los micoplasmas genitales carecen de peptidoglicana, por lo que no se ven afectados por los β -lactámicos o la vancomicina. No son susceptibles a las sulfonamidas o al trimetoprim debido a que no sintetizan ácido fólico. Por otro lado, generalmente son susceptibles a antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas como las tetraciclinas. Mientras *Ureaplasma* es susceptible generalmente a los macrólidos, es resistente a las lincozamidas, excepto en altas concentraciones. En contraste, *M. hominis* es naturalmente resistente a la eritromicina pero susceptible a algunos macrólidos (josamicina y miocamicina) y lincomicina (Waites *et al.*, 2005).

Los tipos de agentes antimicrobianos actualmente disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por *Mycoplasma* y *Ureaplasma* son limitados y cuando el tratamiento falla es porque normalmente se prescribe sin hacer pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Éstas pruebas son de gran valor para infecciones serias como la meningitis, para la evaluación de actividades *in vitro* de nuevas

drogas o para propósitos de vigilancia epidemiológica de desarrollo de resistencia (Waites *et al.*, 2005).

Se han desarrollado fluoroquinolonas con excelentes perfiles farmacocinéticos y actividad en contra de Gram negativos y Gram positivos. Una de estas fluoroquinolonas es la levofloxacin; el isómero L de la ofloxacin. Estudios previos han demostrado que ésta tiene una muy buena actividad en contra de los micoplasmas (Ullmann *et al.*, 1999; Waites *et al.*, 2005).

1.4 Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son aquellas que, como su nombre lo indica, se transmiten predominantemente por contacto sexual, sin embargo algunas pueden transmitirse verticalmente (transmisión perinatal madre-hijo) durante el embarazo, el parto o el riesgo laboral (Calderón, 2002; CDC, 2010). Estas infecciones pueden ser causadas por bacterias, virus, protozoarios o por hongos. La comprensión del comportamiento sexual es una pauta para la prevención de las ITS y el desarrollo de programas que propongan soluciones a éstas (Mateo de Acosta-Andino *et al.*, 2002; Aral y Ward, 2005).

Las ITS son un problema de salud pública a nivel mundial y los países en vías de desarrollo son los más afectados, ya que 85% de su población es sexualmente activa, por lo cual el riesgo de contraer estas infecciones es mayor. En el caso de México, entre las ITS que más afectan a la población están: la tricomonosis, el virus del papiloma humano (por sus siglas en inglés HPV), el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la sífilis adquirida, la infección gonocócica

genitourinaria, el chancro blando y el linfogranuloma venéreo (Cuadro 1); su distribución en el país depende mucho de las condiciones económicas y educativas de la región (NOM-O39-SSA2-2002; CDC 2010; Boletín epidemiológico, 2011).

Las ITS representan un grave problema de salud sexual y reproductiva, no sólo al interior de los grupos de población con prácticas de riesgo, sino también en aquellas personas de la población general que llegan a exponerse al contagio inadvertido con parejas ya infectadas pertenecientes a grupos con prácticas de riesgo para adquirir y transmitir estas infecciones como contactos sexuales sin protección (NOM-O39-SSA2-2002; CDC, 2010; Boletín epidemiológico, 2011).

Cuadro 1. Número de casos de ITS de reporte obligatorio en la República Mexicana hasta la semana 52, 2011.

Infección de transmisión sexual	Número de casos
Sífilis congénita	167
Sífilis adquirida	2,771
Infección gonocócica genitourinaria	1,390
Linfogranuloma venéreo	249
Chancro blando	722
Tricomosis	113,334
Herpes genital	2,815
Candidosis	285,069
HPV	35,073
SIDA	3,959

(Modificado de: Boletín epidemiológico, Semana 52, 2011)

Se calcula que en el mundo existen alrededor de 333 millones de casos de ITS

en edades comprendidas entre los 15 y 49 años de edad, de los que millones se producen en Europa; así mismo, en México se producen aproximadamente 500,000 casos de ITS anualmente y ocupan uno de los cinco primeros lugares de demanda de consulta en el primer nivel de atención médica y se ubican entre las diez primeras causas de morbilidad general en el grupo de 15 a 44 años de edad, con un efecto diferencial para la vida y el ejercicio de la sexualidad de mujeres y hombres (Da Ros y Schmitt, 2008; Boletín epidemiológico, 2011).

El problema de las ITS no se conoce debidamente en México; las pocas clínicas especialmente instaladas con ese propósito atienden a un número muy limitado de hombres, mujeres y trabajadoras sexuales, de manera que la información relacionada con su actividad no es representativa de lo que ocurre en la población. Algunas de estas infecciones son consideradas de notificación obligatoria en la mayoría de los países, y continúan teniendo una frecuencia inaceptablemente alta, con mayor incidencia en personas en edad reproductiva (NOM-039-SSA-2002). Los virus, bacterias, hongos y parásitos producen en su mayoría cambios inflamatorios específicos y algunas de sus patologías se muestran en el cuadro 2 (Novoa-Vargas, 2001; Carrillo *et al.*, 2003; Lewis, 2004; Cox, 2006; Verteramo *et al.*, 2009).

1.4.1 Virus de papiloma humano (HPV)

La infección genital por el HPV, es una de las ITS más común del aparato reproductor femenino, provocando prácticamente todos los casos (99%) de cáncer cervicouterino (CaCu) en mujeres en edad reproductiva (Lewis, 2004; King *et al.*, 2011). El CaCu es el segundo tumor maligno, en frecuencia, que afecta a las

mujeres; cada año se registran alrededor de 500,000 casos nuevos y 250,000 muertes en todas partes del mundo. Durante los últimos años, la incidencia y mortalidad por CaCu en los Estados Unidos de América (EUA) y otros países desarrollados han disminuido notablemente. Sin embargo, en los países en desarrollo, esta patología no ha presentado una disminución importante. Son los países del Sur y Este de África y Latinoamérica los que informan una tasa de incidencia de casi 40 por 100,000 mujeres por año (OMS; 2011).

Cuadro 2. Patógenos causantes de ITS e infecciones endógenas, patología que causan y principales métodos de diagnóstico.

Microorganismo	Patología	Diagnóstico
HPV	CaCu y lesiones intraepiteliales	Papanicolaou, detección del DNA viral, histología de biopsia y colposcopia (NOM-014-SSA2-1994)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Cervicitis	Imunofluorescencia directa, PCR del gen <i>omp1</i> , cultivo celular (Valassina <i>et al.</i> , 1995)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrea	Cultivo y PCR para el gen <i>16S rRNA</i> (Hernández-Martínez, 2009)
Micoplasmas genitales (<i>U. urealyticum</i> y <i>M. hominis</i>)	Cervicitis y vaginitis	PCR dirigida al gen <i>16S rRNA</i> y cultivo (Biomeriux) (Solis <i>et al.</i> , 2006)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Vaginosis bacteriana	Criterio de Amsel, puntaje de Nugent y Cultivo (Nugent <i>et al.</i> , 1991; Amsel <i>et al.</i> , 1983)
<i>Candida</i> spp.	Candidosis	Agar cromogénico, API C 20 AUX y observación de pseudomicelio en el examen en fresco (Calderón, 2002)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Tricomonosis	Observación en el examen en fresco y cultivo (Sánchez-Hernández <i>et al.</i> , 2008)

Los estudios sobre la epidemiología del CaCu han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, que diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo y que entre los más importantes se pueden mencionar: inicio temprano de relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales, infección previa por herpes simple y verrugas genitales. Los factores de riesgo adicionales para neoplasia cervical incluyen tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, paridad incrementada y exposición previa a otras infecciones (gonorrea, cervicitis, candidosis, tricomonosis, VB, etc.) (NOM-014-SSA2-1994; Franco *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 2003; Cox, 2006).

En 1989 Schmauz y su grupo investigación, encontraron que varias infecciones de transmisión sexual constituyen un factor de riesgo importante para el cáncer cervical, además de la presencia de HPV. A partir de estos estudios, varios trabajos han evaluado la asociación entre otras enfermedades infecciosas y el proceso de carcinogénesis generado por HPV. Esencialmente estos estudios se han enfocado a *C. trachomatis*. Heilmann y Kreinbergm, en 2002, mostraron que aquellas mujeres que poseían infección por esta bacteria y que presentaron anticuerpos anti *C. trachomatis* tenían un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical. Otro estudio multicéntrico (Mantovani y Banks, 2001) también mostró una fuerte evidencia de que la infección con virus del herpes tipo 2 (HSV-2), constituye un importante cofactor de HPV en el desarrollo de cáncer cervical. Sin embargo, ambos hallazgos tienen que ser claramente documentados valorando cuidadosamente la participación de otras variables tales como el estatus inmunológico y hormonal de las pacientes (Gissman *et al.*, 1983; Evans *et al.*, 2001; Heilamann y Kreienberg 2002; Shukla *et al.*, 2010).

Sin lugar a dudas la asociación entre el HPV y el CaCu se ha convertido en la principal causa de carcinogénesis. Es decir, ahora es claro que no existe el CaCu sin la presencia persistente de DNA del HPV. A tal grado, que la existencia del cáncer en individuos HPV negativos no constituye una prioridad debido a que son casos extremadamente raros (Gissman *et al.*, 1983).

Aproximadamente, una tercera parte de los papilomavirus conocidos infectan específicamente el tracto genital. Y un subgrupo de éstos está asociado a las malignidades cervicales (Clifford *et al.*, 2003). En la actualidad, se acepta que la infección persistente por algunos genotipos del HPV, es un factor determinante en el desarrollo de lesiones anogenitales, incluyendo CaCu. Por su frecuencia, es considerado el segundo tipo de cáncer en mujeres, siendo el primer tipo de cáncer que la OMS acepta como 100% atribuible aun proceso infeccioso (Bosch *et al.*, 2002). Desde 1995, la OMS estableció que al menos los genotipos de HPV 16 y 18 causan cáncer cervical, también existen evidencias (aunque no tan claras) que implican al HPV en el desarrollo de algunas formas de cáncer vulvar, anal, boca, orofaríngeo y de las células escamosas del pene (Evans *et al.*, 2001, Heilamann y Kreienberg 2002; Shukla *et al.*, 2010).

La evidencia epidemiológica que relaciona al HPV con el cáncer se encuentra sustentada en dos estudios principales:

- La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) efectuó un estudio en el que participaron 22 países, encontrándose la presencia de HPV en el 99.7% de los casos. La prevalencia de los genotipos virales fue: HPV 16 (53%), HPV 18 (15%), HPV 45 (9%), HPV 31 (6%) y HPV 33 (3%). HPV 16 fue el genotipo más

común encontrado en todas las regiones geográficas, seguido por el genotipo 18. El HPV 39 y 59 fueron encontrados exclusivamente en América latina.

- En el segundo estudio, donde participaron 13 países y se incluyeron 2000 casos y 2000 controles, se encontró una fuerte relación entre los genotipos de HPV 16 y HPV 18 con cáncer CaCu. De acuerdo con los resultados de este estudio, los genotipos 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 y 59 también deben de ser considerados cancerígenos (Muñoz *et al.*, 2003; OMS, 2011).

Tomando como base su asociación con el CaCu, el HPV se agrupa en genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70) y de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81) (Burd, 2003).

Dado que HPV no se puede cultivar y los métodos inmunológicos no son los adecuados para detectar la infección, las herramientas más utilizadas para hacer el diagnóstico de infección por el virus son la citología y la histología. El diagnóstico de infección se efectúa mediante la identificación de coilocitos en la citología cervical (Papanicolaou), lo cual es considerado un signo patognomónico de la infección por HPV. Según la edad de la paciente y la localización de la infección, la sensibilidad del método varía entre el 30% y el 90%, para un diagnóstico oportuno se recomienda realizar el Papanicolaou, colposcopia y detección de material genético de HPV, además se requiere de la biopsia para confirmar el diagnóstico (NOM-014-SSA2-1994; Wen-Jin *et al.*, 2011).

Los factores de riesgo para la infección por el HPV ya se conocen bien y aún no se sabe con certeza si las alteraciones en la microbiota vaginal se relacionan con la predisposición a la infección. Las infecciones genitales, incluyendo BV, infección por *T. vaginalis*, *C. trachomatis* y herpes genital se han identificado como factores de

riesgo para la adquisición de la infección por HPV o para el desarrollo de CaCu (Watts *et al.*, 2005).

La susceptibilidad biológica y la respuesta inmunológica para la adquisición del HPV podrían verse afectados por infecciones vaginales comunes y tratables que alteran el equilibrio del ecosistema vaginal, así como los mecanismos intrínsecos de protección innata. La VB y la infección por *T. vaginalis* se asocian con altos niveles de microorganismos anaerobios productores de citotoxinas, sialidasas y mucinasas, que pueden dañar el epitelio cervicovaginal, degradar el moco y la inmunoglobulina IgA (Rottini *et al.*, 1990; Wiggins *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011)

La demostración de genotipos es posible solamente mediante técnicas de biología molecular. El método más utilizado es el de la PCR, usando diferentes grupos de iniciadores consenso. Las regiones utilizadas en los protocolos de extensión corresponden a secuencias de los genes L1 o E1 altamente conservadas, el procedimiento permite amplificar un amplio espectro de genotipos de HPV en una sola reacción.

En contraste con el comienzo, hace unos 20 años, de la era de la detección molecular del HPV, donde sólo estaban disponibles algunos métodos engorrosos como el Southern blot y el de hibridación *in-situ*, existe hoy en día una gran cantidad de métodos de DNA/RNA/Proteína del HPV más sencillos de realizar y que se usan básicamente con técnicas automatizadas; o bien detectar un cierto número de tipos de HPV en conjunto o el genotipo directamente.

Algunas de las metodologías *in-house* desarrolladas inicialmente en laboratorios de investigación han evolucionado hasta llegar a ser estandarizadas con

equipos comerciales, sus características se han mejorado, por ejemplo, la sensibilidad analítica y el aumento de cobertura para una amplia gama de genotipos virales. Sin embargo, hasta ahora no existe algún método de referencia (Kroupis y Vourlides, 2011). Los métodos más frecuentemente utilizados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Métodos utilizados frecuentemente para la detección de los diferentes genotipos de HPV.

Test (Compañía)	Método	Genotipos detectados
Captura de Híbridos II (QIAGEN)	Prueba de Híbridos RNA/DNA quimioluminiscencia, anticuerpos antiRNA/DNA	13 AR y/o 5 BR
Cervista HPV (Hologic)	Invasor Fluorométrico	14 AR en 3 tubos separado
Amplicor HPV Test (ROCHE)	Biotinilado MYC-PCR (gen L1) y colorimétrico ELISA	13 AR
Sistema de detección de todo el espectro de HPV (GENOID)	Biotinilado L1F/L1R PCR (gen L1) y colorimétrico ELISA	46 AR+BR
<i>In-house</i> Set de iniciadores MY, GP, GP+, SPF10 -CP, PU	PCR Consenso Gen L1Gen E1, Gen E6/E7	>35 AR+BR
Hibridación (ROCHE) CE-IVD	PGMY- PCR (L1 gene) + hibridación reversa	37 AR+BR
INNO-LiPa HPV Genotyping Extra (Innogenetics)	SPF10 PCR (gen L1)+hibridación reversa	28 AR+BR
Ampliquality HPV (AB analítica)	L1-PCR+hibridación reversa	18 AR+BR
Chip fácil HPV (King car)	MY-16/GP6+PCR+microarreglo	39 genotipos

HPV: virus de papiloma humano; AR: alto riesgo; BR: Bajo riesgo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Modificado de Kroupis y Vourlides, 2011.

1.4.2 Gonorrea

La gonorrea, es la ITS bacteriana más comúnmente reportada y la incidencia de nuevos casos es especialmente alta en países en desarrollo. La incidencia de la gonorrea varía de acuerdo con la edad. El 75% de los casos ocurre en personas mayores de 30 años y su incidencia es el doble para adolescentes sexualmente activos, así como mujeres entre 20 y 24 años de edad (Shim *et al.*, 2010).

N. gonorrhoeae, es el agente etiológico de la gonorrea y otros síndromes clínicos como uretritis, cervicitis, salpingitis, bacteriemia, artritis y otros. *N. gonorrhoeae* pertenece al género *Neisseria* y a la familia *Neisseriaceae*, es un microorganismo cocoide que frecuentemente se observa en pares. Los diplococos tienen lados adyacentes aplanados, lo que les da apariencia de “grano de café” (Murray *et al.*, 2003). *N. gonorrhoeae* es un microorganismo muy exigente a nivel nutricional, para su aislamiento están disponibles diversos medios enriquecidos y selectivos como el Thayer-Martin modificado (MTM) que son bases de agar chocolate suplementados con factores de crecimiento para microorganismos fastidiosos; el medio New York City (NYC) también es utilizado y contiene almidón, plasma y eritrocitos lisados de caballo. Estos medios contienen agentes antimicrobianos que inhiben a otros microorganismos y permiten el aislamiento de la *Neisseria*, por ejemplo, la vancomicina y colistina inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas respectivamente, el lactato de trimetoprim inhibe el *swarming* de *Proteus* presente en muestras rectales y, en algunas ocasiones, cervicovaginales (Murray *et al.*, 2003). *N. gonorrhoeae* requiere una tensión de CO₂ del 5% aproximadamente para su óptimo desarrollo, a las 48 horas forma colonias de 0.6 a 1.0 mm de diámetro. El gonococo produce diversos tipos coloniales relacionados con la presencia de pilus en las bacterias. Las típicas colonias tienden a ser pequeñas, brillantes y elevadas (Murray *et al.*, 2003).

La gonorrea se manifiesta con un amplio espectro de presentaciones clínicas, incluyendo infecciones locales sintomáticas y asintomáticas, infecciones locales complicadas y diseminación sistémica. El tiempo medio para desarrollar síntomas es

aproximadamente a las 72 horas (Shim *et al.*, 2010). Si esta infección se manifiesta de manera asintomática, la sintomatología que se observa es descarga vaginal e irritación, que puede ser o no apreciada hasta que la infección se disemina al tracto genital superior (Wolker y Sweet, 2011).

Debido a que la gonorrea es principalmente asintomática en las mujeres el diagnóstico es crítico para la identificación de la infección y la prevención o limitación de la diseminación al tracto genital superior, así como su transmisión vertical u horizontal. La búsqueda rutinaria de *N. gonorrhoeae* está recomendada de manera anual para todas las mujeres sexualmente activas con riesgo de infección, incluyendo mujeres menores a 25 años o mujeres con uno o más de los siguientes factores de riesgo: infección previa de gonorrea, uso inconsistente del condón, trabajo sexual comercial, uso de drogas o infección por HIV con vida sexual activa (Wolker y Sweet, 2011).

Entre los métodos de diagnóstico para *N. gonorrhoeae* la tinción de Gram aún es ampliamente utilizada debido a su bajo costo y sobre todo a su simplicidad. En hombres sintomáticos la sensibilidad de esta técnica es de poco más del 90%. Sin embargo, la sensibilidad disminuye significativamente en mujeres y hombres asintomáticos. Por otra parte, el cultivo sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones causadas por *N. gonorrhoeae*, y se reporta una sensibilidad de más del 90% y una especificidad cercana al 100% en cultivos de muestras uretrales y cervicales (Ghanem *et al.*, 2005). Existen diversos métodos confirmatorios para la identificación de *N. gonorrhoeae*, los más importantes son las pruebas de acidificación con carbohidratos, pruebas de sustratos cromogénicos

enzimáticos, pruebas inmunológicas (coagulación, inmunofluorescencia, etc.), sistemas de identificación múltiples y pruebas de DNA (Murray *et al.*, 2003; Ghanem *et al.*, 2005; Gaydos, 2005, Wolker y Sweet, 2011).

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002 especifica que los métodos de diagnóstico aceptados para cervicitis y uretritis gonocócica son el cultivo o pruebas de amplificación de DNA como lo son la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR) o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); estas pruebas se deben realizar a los casos sospechosos para poder definirlos como casos confirmados y proceder a dar tratamiento (Murray *et al.*, 2003; Ghanem *et al.*, 2005; Gaydos, 2005, Wolker y Sweet, 2011).

Una característica muy importante de *N. gonorrhoeae* es su capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a compuestos antimicrobianos. Para finales de los años 80's, las penicilinas y las tetraciclinas ya no eran recomendadas para el tratamiento de la gonorrea debido a la alta prevalencia de *N. gonorrhoeae* productora de beta lactamasas; en 1981, la espectomicina era el tratamiento de elección, sin embargo, en 1987 la prevalencia de *N. gonorrhoeae* resistente a espectinomicina aumentó (Ghanem *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Shim *et al.*, 2010).

En el 2010, los CDC publicaron una lista de agentes antimicrobianos recomendados para el tratamiento de infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* y la mejor vía de administración de los mismos, los cuales se muestran en el cuadro 4. En México, la Norma Oficial para la Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual puntualiza los signos y síntomas precisos que se deben vigilar para que se considere un caso confirmado de la misma, y se incluye el tratamiento

pertinente; en el caso de la uretritis y cervicitis gonocócica, el cual también se incluye en el cuadro 4.

Cuadro 4. Agentes antimicrobianos recomendados por los CDC (2010) y la dosis empleada para el tratamiento de la gonorrea.

ANTIMICROBIANO	DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN	
	CDC	NOM-039-SSA2-2002
Cefixime	400 mg VO (1 dosis)	400 mg VO (1 dosis)
Ceftriaxona	125 mg IM (1dosis)	125 mg IM (1 dosis)
Ciprofloxacina	500 mg VO (1 dosis)	500 mg VO (1 dosis)
Ofloxacina	400 mg VO (1 dosis)	400 mg VO (1 dosis)
Levofloxacina	250 mg VO (1 dosis)	NR
Espectomicina	2 g IM (1 dosis)	NR
Azitromicina	NR	1g VO (dosis única)
Doxiciclina	NR	100 mg VO (c/12 h por 7 días)

VO - vía oral; IM - vía intramuscular; NR- no recomendado (NOM-039-SSA2-2002).

El tratamiento debe ser administrado al momento del diagnóstico para asegurar la adherencia del paciente al mismo y los pacientes deben ser informados de abstenerse al contacto sexual hasta que la terapia se complete y hasta que ellos y sus parejas sexuales no presenten síntomas (Wolker y Sweet, 2011).

1.4.3 Cervicitis mucopurulenta

La cervicitis mucopurulenta es una infección causada por *C. trachomatis*, una bacteria intracelular obligada, que sintetiza su propio DNA utilizando a la célula huésped como fuente de ATP, por lo que se le considera un parásito energético intracelular estricto (Black, 1997). Se ha reportado que de 3 a 5% de mujeres con vida sexual activa están infectadas por este microorganismo; en México se ha reportado una incidencia general de ITS del 9% de *C. trachomatis* en mujeres que

acuden a clínicas, de 18 a 64% en mujeres que acuden a clínicas de esterilidad, 15.5% en embarazadas, 22% asociado a pérdida del embarazo y 4% en población abierta. Los casos de infección genito-urinaria por *C. trachomatis* no son de reporte obligatorio, por lo que no existen datos epidemiológicos exactos de la misma, sin embargo su incidencia es de suma importancia (Fagundo-Reynero, 2000).

La infección por *C. trachomatis* en cérvix puede cursar asintomática en la mayoría de los casos y tener manifestaciones inespecíficas por semanas o meses, por lo que el contagio a la pareja es frecuente. La infección endocervical representa un signo de alarma ya que puede cursar como un cuadro asintomático frecuentemente y causar una serie de complicaciones que incluyen síndrome uretral agudo, cervicitis purulenta y endometritis, entre otras (SINAVE, 1996). Esta infección afecta principalmente a mujeres jóvenes, debido a las diferencias anatómicas del cérvix, sitio primario de infección, pero la uretra y el recto también pueden ser infectados. Cuando aparecen síntomas, éstos consisten principalmente en descargas vaginales y disuria. En algunos casos hay sangrado después del coito (Black, 1997).

Como se mencionó anteriormente, *C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada, lo cual significa que su ciclo de desarrollo tiene etapas características y que la multiplicación bacteriana sólo ocurre en una célula huésped (Hatch, 1996).

El desarrollo del ciclo toma aproximadamente de 2 a 3 días e inicia con una forma infecciosa metabólicamente inactiva llamada cuerpo elemental (EB), una vez dentro de la célula huésped ocurre una diferenciación a cuerpo reticular (RB), el cual es metabólicamente activo pero no infeccioso (Hatch, 1996; Subtil y Dautry, 2004). La célula continúa manteniendo el ciclo de *C. trachomatis* hasta aproximadamente 30

a 72 horas después de la infección, tiempo en el que célula se lisa y libera EBs, RBs y otras formas intermedias (Hatch, 1996). En algunos casos ocurre una etapa de persistencia, durante la cual se producen RBs que no maduran a EBs, esta persistencia altera el ciclo alargándolo, y es la responsable de infecciones con términos de duración muy largos y con secuelas muy serias y difíciles de tratar (Subtil y Dautry, 2004).

Básicamente hay cuatro métodos de diagnóstico para confirmar la infección por *C. trachomatis*, a saber, examen microscópico directo de muestras de raspado tisular para buscar inclusiones citoplasmáticas típicas, el cual no es muy adecuado debido a su escasa sensibilidad e interpretaciones falsas positivas; aislamiento del microorganismo en cultivos celulares (el cual es el estándar de oro); identificación de antígenos y ácidos nucleicos e identificación de anticuerpos en el suero o secreciones locales (Fagundo-Reynero, 2000). Además, existen otros métodos que se muestran en el cuadro 5.

Las tetraciclinas, la rifampicina y los macrólidos, en particular la azitromicina, son los antibióticos más eficaces contra *C. trachomatis* (Fagundo-Reynero, 2000). Como ya se mencionó anteriormente, en México existe una Norma Oficial Mexicana, en la cual también se incluyen las infecciones por *C. trachomatis* y el tratamiento que esta norma recomienda para la cervicitis mucopurulenta y uretritis no gonocócica se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 5. Métodos de diagnóstico para *Chlamydia trachomatis*.

Tipo de método	Nombre del método	Características
Cultivo	Cultivo celular	Se usa una monocapa celular en la que se desarrolla la infección. Sólo si hay EBs viables.
Métodos de detección de antígeno	DFA	Prueba con anticuerpos monoclonales contra la MOMP.
	EIA	Detección inmunológica de LPS específicos
	Prueba Point-of-care	Detección inmunológica de LPS específicos mediante inmunodifusión en látex
Métodos de detección de ácidos nucleicos	PACE 2	Prueba de hibridación de DNA del 16S rRNA
	PACE 2C	Prueba de hibridación de DNA que también permite identificar infecciones por <i>N. gonorrhoeae</i>
	PCR	Prueba de amplificación de DNA que utiliza dos iniciadores sintéticos complementarios a sitios específicos del DNA de <i>C. trachomatis</i> .
	AMPLICOR	Prueba de PCR comercial
Pruebas serológicas	MIF	Detecta anticuerpos tipo IgM y detecta diferencias entre especie y serotipo.
	Prueba CF	Detecta anticuerpos anti LPS específicos de especie

EB's: cuerpos elementales; MOMP: Proteína mayor de membrana externa, LPS: Lipopolisacáridos, DFA: Tinción Directa con Anticuerpos fluorescentes, EIA: Inmunoensayo enzimático, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, MIF: Microinmunofluorescencia, CF: Fijación de complemento. Construido con información de Valassina *et al.*, 1995; Black, 1997 y Bañuelos *et al.*, 2000.

Cuadro 6. Agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones por *Chlamydia trachomatis* según la NOM-039-SSA2-2002.

Agente antimicrobiano	Dosis	
	Cervicitis mucopurulenta	Uretritis no gonocócica
Ofloxacina	NR	300 mg VO c/12 h durante 7 días
Doxicilina	100mg VO c/12h durante 7 días	100mg VO c/12h durante 7 días
Eritromicina	NR	500mg VO c/12h durante 7 días
Azitromicina	NR	1 gramo VO dosis única
Levofloxacina	NR	500 mg c/24h durante 7 días
Ceftriaxona	125 mg IM dosis única	NR

VO - vía oral, IM - vía intramuscular, NR- no recomendado

Diseñado a partir de: NOM-039-SSA2-2002.

1.4.4 Tricomonosis

La infección por *Trichomonas vaginalis* fue descrita por primera vez por Donne en 1836 y se creía que era un comensal no dañino de la cavidad vaginal. Sin embargo, en 1916 Hohne usó el término “tricomonosis” para describir la condición en la que se presentaba este parásito en la vagina. Se adoptó el concepto de *T. vaginalis* como un microorganismo patógeno, Trussell y Plass (1940) concluyeron que *T. vaginalis* producía vaginitis en 9 de 20 mujeres (Ryu y Min, 2006; Van Der Pol, 2007).

La tricomonosis es una infección de transmisión sexual causada por un protozooario llamado *T. vaginalis*, afecta aproximadamente 180 millones de personas alrededor del mundo, convirtiéndola en la ITS no viral más común. La OMS ha estimado que su prevalencia se encuentra entre 170 y 190 millones de casos anuales alrededor del mundo (Van Der Pol, 2007; Schwebke *et al.*, 2011). En México, hasta la semana 52 del 2011 se reportaron 113,334 casos de tricomonosis, en el 2010 se reportó un total de 111527 de tricomonosis únicamente en mujeres y en el 2009 se reportaron 119,163 casos (Boletín Epidemiológico, 2011).

En mujeres embarazadas las tricomonas están implicadas en ruptura temprana de membranas y partos prematuros, así como en el nacimiento de infantes de bajo peso. Además, la tricomonosis se ha propuesto como un factor de riesgo para la transmisión de HIV (Van Der Pol, 2007).

T. vaginalis varía en tamaño y forma; mide aproximadamente 10 y 7 μm de largo y ancho respectivamente, en cultivo *in-vitro* tiene una forma uniforme oval o tipo “pera”, cuando se encuentra unida al epitelio vaginal su apariencia es ameboide.

Este parásito tiene 5 flagelos, de los cuales, 4 se encuentran en su porción anterior y el quinto se encuentra asociado a la membrana ondulante, a la cual le da movilidad.

La infección puede ser asintomática o presentarse como una vaginitis flagrante, y un tercio de las pacientes asintomáticas se vuelven sintomáticas en los siguientes 6 meses. Una vez establecida la infección, ésta persiste por largos periodos de tiempo; la tricomonosis es una infección que generalmente ocurre en la edad reproductiva y raramente se observa en mujeres premenarcas o menopáusicas (Petrin *et al.*, 1998).

El periodo de incubación puede ser desde 4 hasta 28 días, y dependiendo de su gravedad, esta puede clasificarse en aguda, crónica o asintomática. En el caso de la infección aguda, se presenta descarga vaginal profusa, de color verde o amarillenta, se asocia con picazón, ardor, irritación y mal olor. Al realizar una revisión ginecológica, la mucosa vaginal y cervical se observa hiperémica, con lesiones puntiformes rojas, esta apariencia denominada “de fresa” se observa sólo en el 2% de los casos (Petrin *et al.*, 1998; Van Der Pol, 2007). En la infección crónica los síntomas son menos severos y consisten en prurito, dispareunia y secreción vaginal, la cual es poco abundante y con moco. Por otro lado, del 25 al 50% de las mujeres infectadas son asintomáticas y presentan características vaginales normales, y el 50% de estas mujeres desarrollan síntomas en los meses subsecuentes (Petrin *et al.*, 1998).

El diagnóstico se realiza inicialmente de acuerdo con la presentación clínica, sin embargo, éste no puede ser realizado únicamente de acuerdo con la sintomatología observada debido a que ésta es similar a la de otras ITS, además de que el signo patognomónico (el cérvix de fresa) se presenta únicamente en el 2% de las pacientes y la descarga vaginal espumosa se observa únicamente en el 12% de los casos. Se

reporta que si se emplean únicamente las características clínicas para realizar el diagnóstico, el 88% de las mujeres infectadas no serán diagnosticadas y el 29% de las mujeres no infectadas se reportarán como enfermas (Carr *et al.*, 1998; Petrin *et al.*, 1998).

Por estos motivos, el diagnóstico de la tricomonosis ha dependido de la observación microscópica del protozooario móvil en la secreción vaginal o cervical. Aunque este método es más económico, no es considerado el óptimo debido a su baja sensibilidad, pues el protozooario disminuye su movilidad característica una vez que fue removido de la temperatura corporal (Petrin *et al.*, 1998).

El cultivo es considerado el estándar de oro para el diagnóstico debido a su facilidad de interpretación y a que no se necesita un inóculo grueso para iniciar el cultivo. Desafortunadamente, éste también tiene ciertas limitantes, entre las que se encuentran el tiempo de incubación, de 2 a 7 días, tiempo en el que la infección puede seguirse transmitiendo, y el hecho de que los métodos de cultivo comerciales no se encuentran disponibles para todos los laboratorios clínicos (Petrin *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998).

Por todo lo anterior, se han desarrollado métodos tanto inmunológicos como moleculares para el diagnóstico de la tricomonosis. Entre los primeros se encuentran la aglutinación, la fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta, la difusión en gel y ELISA, entre otros. El método molecular más ampliamente utilizado es la PCR, aunque existen otros métodos comerciales como el Affirm VP III System que emplea sondas para realizar la detección de DNA no sólo de *T. vaginalis*, sino también de *G. vaginalis* y *Candida* spp. (Petrin *et al.*, 1998; Ryu y Min, 2006).

El metronidazol es el tratamiento de elección para la tricomonosis ya que es altamente efectivo y además se encuentra aprobado por la OMS en una sola dosis de 1.5 a 2 gramos por vía oral o en dosis de 500 mg dos veces al día durante 7 días; sin embargo, los CDC no lo recomiendan como primera opción debido a su potencial carcinógeno observado en ratas, además de que los reportes de resistencia al metronidazol van en aumento. A pesar de esto, no existen otros fármacos aprobados para el tratamiento de la tricomonosis (Petrin *et al.*, 1998; Dunne *et al.*, 2003; Ryu y Min, 2006, Boletín epidemiológico, 2011).

2. Antecedentes

Dado que la presencia de co-infecciones genitales, ya sean de transmisión sexual o no, puede tener importancia en la proliferación del HPV, algunos autores se han dado a la tarea de estudiar este aspecto de la microbiología cervicovaginal.

Cuando se revisa la literatura se encuentran algunos estudios que reportan la relación existente entre el HPV con otros microorganismos causantes de este tipo de infección en diversas poblaciones (cuadro 7).

Cuadro 7. Reportes de la frecuencia de co-infección entre HPV y otros microorganismos causantes de ITS.

Autor	No. Pacientes/Pais	Frecuencias
Candido-Murta <i>et al.</i> , 2000	390 pacientes Brasil (Centro de referencia público)	HPV + Gv 21.3%, HPV + CAN 12%, HPV + Tv 1.8%, HPV + CAN y Gv 1.8%, HPV + Gv y Tv 0.5%, HPV + otros agentes 62.6%.
Gopalkrishna <i>et al.</i> , 2000	50 pacientes India (clínica de enfermedades de transmisión sexual)	HPV + Ct 14% 78% con otras ITS (Sífilis, gonorrea, candidosis VB, tricomonosis, etc.)
Vertarano <i>et al.</i> , 2009	266 pacientes Italia (departamento de ginecología, universidad de Roma)	HPV + Uu 24.8%. HPV + CAN 13.5, HPV + Sa 9.4%, HPV + Gv 5.2%, HPV + Ct 5.4%, HPV + Tv 1.8%

HPV: virus de papiloma humano; Gv: *Gardnerella vaginalis*; CAN: candidosis; Tv: *Trichomonas vaginalis*; Uu: *Ureaplasma urealyticum*; Sa: *Streptococcus agalactiae*; Ct: *Chlamydia trachomatis*.

Realizado para fines de este trabajo.

Estas infecciones aumentan la posibilidad de desarrollar enfermedad pélvica inflamatoria, consecuencias adversas en el embarazo y riesgo de adquirir HIV/HPV, entre otras infecciones. En mujeres en edad reproductiva en las que se diagnosticó algunas afecciones como la VB, la microbiota autóctona productora de H₂O₂ (lactobacilos) se vio disminuida, por lo tanto, en esta población se favorece el establecimiento y desarrollo de otros microorganismos patógenos y la adquisición de otras ITS, incluyendo las causadas por virus como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus del herpes simplex tipo II (HSV-2); o bacterias como *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, las cuales a su vez también aumentan el riesgo de adquisición y desarrollo de infección por HPV. Así mismo, se ha sugerido que la presencia de *T. vaginalis* está asociada a un incremento en el riesgo de desarrollar CaCu, sin embargo, su relación con el HPV no ha sido estudiada detalladamente. Por otro lado, se ha reportado una fuerte asociación entre el desarrollo de CaCu invasivo en mujeres con infección por *C. trachomatis* actual o previa, aunque no se ha encontrado asociación entre esta infección y el grado de severidad de la neoplasia (Watts *et al.*, 2005; Marrazzo, 2011; King *et al.*, 2011).

3. Justificación

Debido a que aproximadamente un 85 % de la población mundial es sexualmente activa las infecciones de transmisión sexual son un problema de salud pública, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados.

Las ITS ocupan uno de los cinco primeros lugares de demanda de consulta en el primer nivel de atención médica y se ubican en las primeras 10 causas de morbilidad en la República Mexicana; se ha reportado en otros países que existe cierta relación entre las ITS y la infección por HPV, que a su vez favorece la progresión hacia el CaCu.

La detección de infecciones genitales es importante para revelar la presencia simultánea de los diferentes microorganismos causantes de ITS, así como la identificación certera de estos patógenos, la cual permitió dar un tratamiento efectivo a las pacientes que evitan el desarrollo de enfermedades más graves.

Por todo ello el presente trabajo ofreció un servicio para el diagnóstico oportuno de las alteraciones cervicovaginales producidas por los principales agentes causales de ITS y brindó información de las frecuencias de las co-infecciones que existen entre este tipo de patologías y HPV en una población de mujeres mexicanas ya que de existir el tratamiento tendría que ser basado en el diagnóstico diferencial.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de coinfección entre el virus del papiloma humano y los microorganismos causantes de cervicovaginitis en participantes mexicanas.

4.2 Objetivos particulares

Realizar el diagnóstico de alteraciones citológicas, infección con HPV y otras infecciones microbianas.

Determinar la frecuencia de los diferentes microorganismos causantes de infecciones de transmisión sexual detectados e identificados, así como, la frecuencia de co-infección existente en la población de estudio.

Realizar el diagnóstico oportuno e integral a las participantes para que reciban un tratamiento adecuado y eficaz.

5. Materiales y métodos

5.1 Estrategia general de trabajo

El siguiente diagrama muestra el desarrollo del presente trabajo (Figura 1).

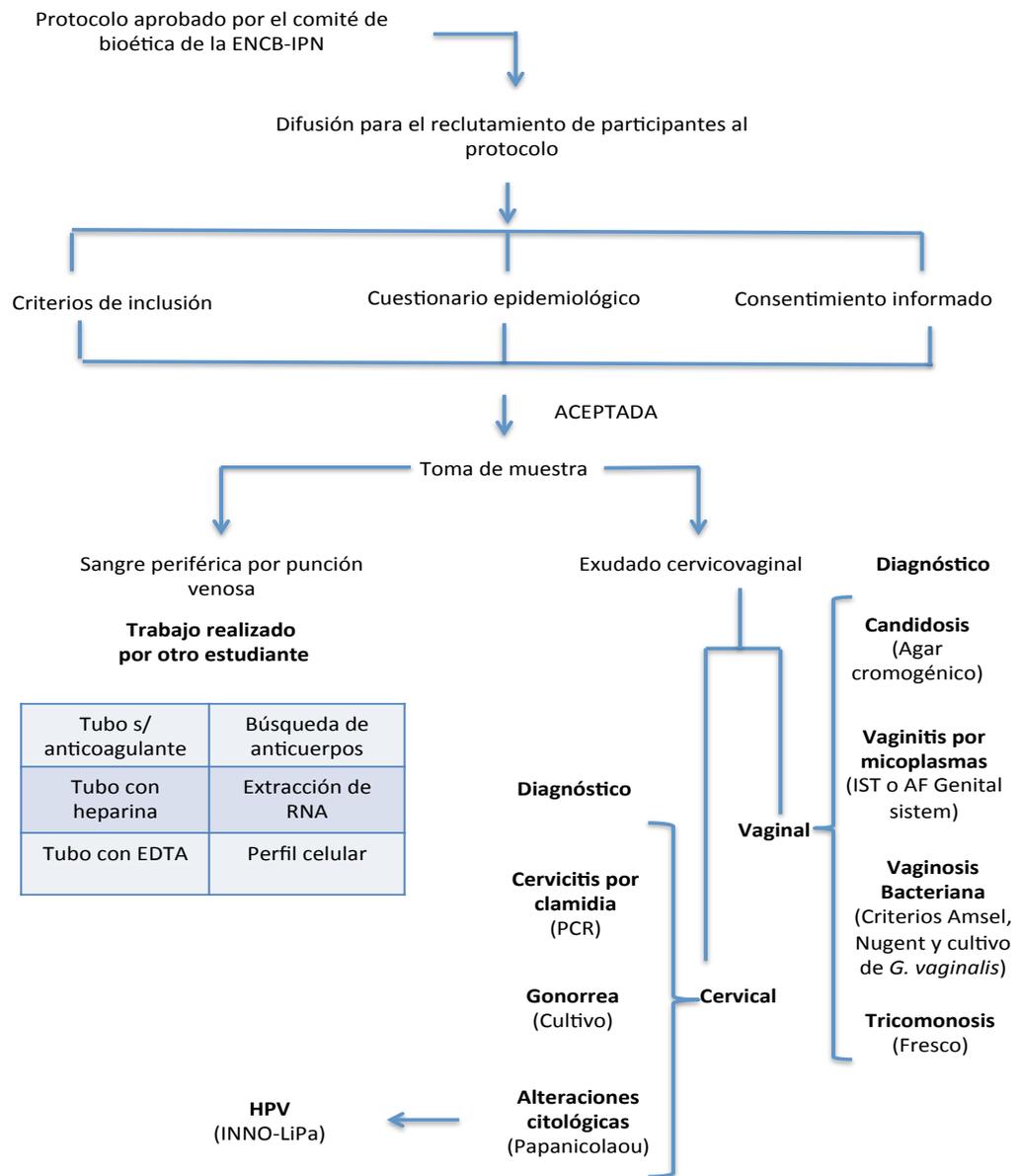


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

5.2 Tipo de estudio

Piloto, prospectivo, monocéntrico de 10 meses de duración. Este proyecto fue analizado, revisado y aprobado para su ejecución por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

5.3 Reclutamiento (Anexo 1)

Se difundió un tríptico informativo para invitar a mujeres que cumplieran con los criterios de inclusión. Participaron mujeres de población abierta en edad reproductiva (18 a 45 años) para la toma de muestra de exudados cervicovaginales y la detección de infecciones de transmisión sexual. Los criterios de inclusión se describen en las siguientes secciones.

5.3.1 Criterios de inclusión (Anexo 2)

Se aplicó un cuestionario vía telefónica o en persona con el objeto de asegurar que las participantes cumplieran con los criterios de inclusión requeridos para participar en el proyecto.

5.3.2 Criterios de no inclusión

Las pacientes con las siguientes características no pudieron participar en el proyecto:

- Gestantes.

- Estar tomando antimicrobianos.
- Estar en periodo menstrual o cursar con sangrado anormal.
- Estar participando en otros protocolos de investigación.
- Participantes hysterectomizadas.
- Participantes que se realizaban duchas vaginales cotidianamente.
- Participantes con enfermedades crónicas degenerativas.
- Participantes con cáncer y que estaban recibiendo quimioterapia.

5.3.3 Criterios de exclusión o eliminación

- No estar dispuesta a responder el cuestionario epidemiológico y/o relacionado con la vida sexual y posible sintomatología.
- Participantes que decidían voluntariamente retirarse del proyecto.

5.4 Material biológico

En el periodo comprendido entre Octubre 2010 y Agosto 2011, se colectaron 207 muestras de exudado cervicovaginal provenientes de mujeres voluntarias. Estas muestras fueron tomadas en el Laboratorio de Bacteriología Médica, del departamento de Microbiología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

5.4.1 Consentimiento informado (Anexo 3)

El consentimiento informado se realizó de acuerdo con los lineamientos del Comité de Bioética de la ENCB-IPN y fue aceptado por el mismo. En este documento se explicó a las pacientes los posibles riesgos y beneficios que pudieran adquirir

durante la participación en el proyecto, así como los derechos y obligaciones que la paciente adquiere al firmarlo. Se incluyó una sección en la cual se especificó el manejo que se haría de sus datos y la confidencialidad de los mismos. El consentimiento informado fue firmado en todos los casos de manera voluntaria, con la firma anexa de dos testigos y de la persona que explicó el documento. La química responsable de la toma de muestra firmó previamente a cada toma.

5.4.2 Cuestionario epidemiológico (Anexo 4)

Después de la firma del consentimiento informado, se le entregó a la paciente el cuestionario epidemiológico, donde brindó datos demográficos, clínicos y de riesgo relacionados con las patologías estudiadas.

6. Toma de muestra

6.1 Condiciones de la paciente para la toma de muestra

La paciente no debía estar empleando medicamentos intravaginales y sistémicos; se le instruyó para que no usara duchas vaginales y/o medicamentos por vía vaginal en el lapso de 15 a 30 días previos al día de la toma de muestra, y que se abstuviera del coito por 72 horas previas al día de la toma de la muestra. La muestra pudo tomarse cualquier día del mes, siendo necesario que la paciente no se encontrara en su periodo menstrual o presentara sangrado intravaginal anormal.

6.2 Técnica para la toma de muestra (Hernández-García, 2009)

Para la toma adecuada de las muestras fue condición previa, colocar a la paciente en posición ginecológica, visualizar el cérvix a través de un espéculo vaginal nuevo, desechable y estéril e introducir éste en la vagina sin utilizar algún tipo de lubricante.

La secreción vaginal se recolectó con 4 hisopos de algodón estériles introducidos de manera simultánea, en el fondo de saco anterior y posterior de la vagina.

Con el primer hisopo se realizó un frote en un portaobjetos para realizar una tinción de Gram, el cual se utilizó para el diagnóstico de VB basado en el puntaje de Nugent; el segundo hisopo se colocó en solución salina fisiológica (SSF) para

realizar la búsqueda en fresco del trofozoito móvil asociado a tricomonas, células clave, polimorfonucleares y levaduras. El tercer hisopo se colocó en un tubo con medio de transporte Stuart, el cual sirvió para inocular los medios de cultivo: gelosa base Casman adicionado con 5% de sangre de carnero, Chromagar *Candida* spp. y gelosa base sangre adicionado con 5% de sangre de carnero, el último hisopo se utilizó para la búsqueda de *M. hominis* y *U. urealyticum*, el cual se colocó en medio de transporte R1 para Mycoplasmas IST-2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia®) o la SSF del kit AF Genital system (Leofilchem®).

El pH se tomó directamente de la secreción de la parte interna de las valvas del espéculo ginecológico con papel indicador. La presencia de aminas (prueba de Wiff) se puso de manifiesto con KOH al 10 % a partir del hisopo con el cual se realizó el examen en fresco (SSF).

Para la toma de la muestra endocervical, se utilizaron 2 cepillos citológicos, los cuales se introdujeron uno por uno en el canal cervical rotándose suavemente; el primero se empleó para el diagnóstico de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* por la técnica de PCR, y en el caso de la búsqueda de *N. gonorrhoeae* por cultivo, para lo cual fue depositado en medio de transporte 2-sacarosa fosfato (2SP) sembrando antes el medio de Thayer-Martin por la técnica de la “z”, el segundo cepillo se utilizó para el diagnóstico citológico de HPV por la técnica de Papanicolaou (Pap) y para la detección del DNA de HPV por medio del sistema comercial HPV genotyping v2 by INNO-LiPA (Microgen bioproducts®) y se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 2).

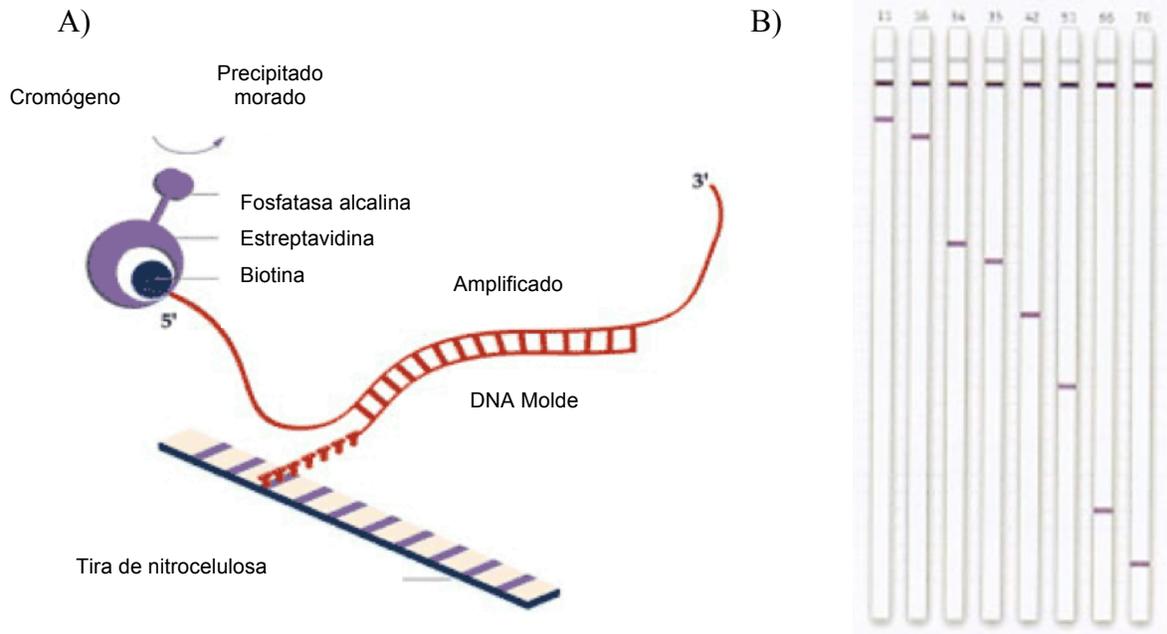


Figura 2. Detección y genotipificación de HPV mediante el sistema INNOLiPA®. A) Fundamento de la hibridación reversa con la sonda anclada a la membrana, B) representación de los resultados de la hibridación y la visualización de muestras positivas (URL-1).

7.0 Detección de infecciones de tipo viral

7.1 Metodología para el diagnóstico citológico de HPV (Wright y Goldie, 2008)

Se aplicó la técnica de Papanicolaou (Pap) en todas las muestras para realizar el diagnóstico citológico, y para ello, las muestras se fijaron con metanol.

1. Las laminillas previamente fijadas se lavaron con agua corriente durante 5 minutos.

2. Se fijaron durante 10 minutos en alcohol al 96 %, se continuó con cambios en gradientes descendientes de alcohol (96%, 70% y 50%) durante 1 minuto cada uno.
3. Se hidrataron en agua destilada tres minutos.
4. Se tiñó con hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
5. Se transfirieron rápidamente en un baño con agua amoniacal.
6. Se enjuagaron durante 6 minutos en agua corriente y 3 minutos en agua destilada.
7. Se diferenciaron con alcohol ácido, se lavaron con agua destilada, y se deshidrataron en gradientes ascendentes de alcohol (50%, 70% y 96%) durante 1 minuto cada uno.
8. Se tiñó con Orange G (OG) durante 6 minutos.
9. Se enjuagó 1 minuto con alcohol al 96%.
10. Se continuó tiñendo con el colorante EA₅₀ durante 6 minutos.
11. Se enjuagó 1 minuto con alcohol al 96%.
12. Se deshidrató 5 minutos en alcohol absoluto, 10 minutos en alcohol absoluto-xilol y por último 10 minutos en xilol.
13. Se montó en laminillas con resina sintética y se observaron al microscopio a 10X y 40X. El reporte de los resultados se hizo de acuerdo con la

nomenclatura de Bethesda, 2001 (Apgar *et al.*, 2003).

7.2 Detección de DNA de HPV (Fontaine *et al.*, 2007)

La detección de DNA de HPV se realizó a partir de uno de los cepillos cervicales mediante un sistema comercial, basado en la hibridación reversa (INNO-LiPA HPV Genotyping v2), el cual detecta hasta 28 genotipos clasificados en alto riesgo, riesgo indeterminado, probable alto riesgo y bajo riesgo, este estuche contiene 4 controles, el control de conjugado, que verifica que la hibridación se llevó acabo correctamente, un control de DNA humano para observar si la extracción de DNA fue adecuada y 2 controles de HPV para corroborar que la PCR se haya ejecutado correctamente. Una prueba positiva se lee con una franja morada sobre el papel de nitrocelulosa. La interpretación se hizo con una tabla interpolando las líneas moradas, las cuales indicaron cual fue el genotipo detectado (Figura 3) (Fontaine *et al.*, 2007; Safaeian *et al.*, 2007)

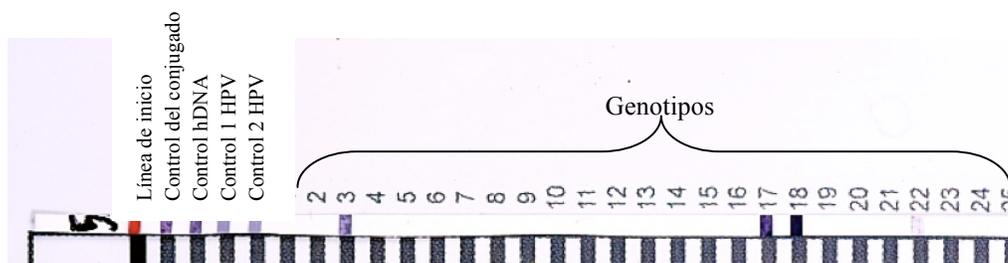


Figura 3. Tira de nitrocelulosa que se usa para detectar diferentes genotipos de HPV por hibridación reversa y PCR (INNOLiPA®).

8. Detección de infecciones bacterianas

8.1 Detección de vaginosis bacteriana

8.1.1 Criterio de Nugent (Nugent *et al.*, 1991)

El diagnóstico de VB se realizó a partir de un frote en un portaobjetos de 1.5 cm x 3.0 cm el cual se fijó por calor para posteriormente teñirlo por la técnica de Gram. La laminilla se examinó en busca de los cuatro morfotipos bacterianos siguientes: bacilos Gram positivos (lactobacilos), bacilos pequeños Gram variable (*G. vaginalis*), bacilos Gram negativos (*Bacteroides* spp.) y bacilos curvos Gram variables (*Mobiluncus* spp.). Finalmente se reportó el puntaje obtenido para cada laminilla de cada paciente y la interpretación de éste de acuerdo con el cuadro 8. Se denominó Normal cuando se obtuvo un puntaje de 0-3, intermedio con un puntaje de 4-6 y VB cuando el puntaje fue mayor o igual a 7.

Cuadro 8. Descripción del puntaje de Nugent para el diagnóstico de vaginosis bacteriana.

Cantidad de morfotipos de:			
Puntaje	Bacilos Gram positivos (<i>Lactobacilos</i> spp.)	Bacilos Gram-negativos y bacilos cortos Gram variable (<i>G. vaginalis</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.)	Bacilos curvos Gram variable (<i>Mobiluncus</i> spp.)
0	4+ (>30)	0	0
1	3+ (5-30)	1+ (< 1)	1+ ó 2+ (1 - 4)
2	2+ (1-4)	2+ (1 - 4)	3+ ó 4+ (5 - >30)
3	1+ (>1)	3+ (5 - 30)	
4	0+	4+ (> 30)	

Entre paréntesis se indica el número de células que se deben observar para asignar el número de cruces y el puntaje correspondiente por cada columna.

Modificado de: Nugent *et al.*, 1991.

8.1.2 Criterio de Amsel (Amsel *et al.*, 1983)

Para el diagnóstico con este método se requirió la presencia de al menos tres de las siguientes 4 características: presencia de una descarga vaginal gris, homogénea y adherente; pH \geq 4.5, el cual fue medido a partir de las valvas del espejo ginecológico; la presencia de células clave en la observación durante el examen en fresco al microscopio óptico y la liberación de aminas (olor a pescado) al adicionar KOH al 10% al flujo vaginal (Amsel *et al.*, 1983)

8.1.3 Cultivo de *Gardnerella vaginalis* (Wesley, 1991)

En primoaislamiento, las muestras clínicas de exudado vaginal fueron cultivadas a partir del hisopo contenido en medio Stuart, inoculando en placas de Petri con Medio Base Casman adicionado con 5% de sangre de carnero y/o conejo, sembradas por la técnica de estría cruzada e incubadas en recipientes de vidrio o acrílico con tapa hermética, en las que se genera una atmósfera parcial de CO₂ al 5% por extinción de flama de vela, y colocadas en una incubadora a 37°C por un lapso de 48 a 72 horas para su crecimiento.

A partir de los cultivos obtenidos de primoaislamiento, se seleccionaron aquellas colonias con la morfología colonial característica del género *G. vaginalis* presentando colonias redondas, brillantes y lisas que son puntiformes después de 24 horas de incubación y alcanzan un diámetro de 0.5 mm a las 48 horas, la mayoría con bordes enteros, convexas, lisas, brillantes, translúcidas y no pigmentadas

(Wesley, 1991).

Las colonias seleccionadas se sometieron a las pruebas de catalasa al 3% y oxidasa, considerando únicamente como *G. vaginalis* aquellas que den negativas ambas pruebas; de igual forma se realizó una tinción de Gram, corroborando la morfología microscópica del género, bacilos pleomórficos, Gram variable (generalmente Gram negativos), no esporulados (Wesley, 1991).

8.2 Detección de micoplasmas genitales

El cuarto hisopo se utilizó para sembrar un vial que contenía el medio de transporte denominado caldo R1 del sistema comercial Mycoplasma IST2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia®) o en SSF del kit AF Genital system (Leofilchem®, Italia) a partir del cual se inició la búsqueda de *M. hominis* y *U. urealyticum*.

Se empleó el micrométodo semiautomatizado Mycoplasma IST2 (bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francia®) o el AF Genital system (Leofilchem®, Italia), con el cual, además de la detección de los micoplasmas, se obtuvo también la sensibilidad antimicrobiana de los mismos. La muestra (caldo R1), se mezcló con el liofilizado (R2) que contiene los sustratos necesarios para el desarrollo de estos microorganismos y se repartió a razón de 55 µL en cada cúpula de la galería Mycoplasma IST2, posteriormente a cada cúpula se le agregó 2 ó 3 gotas de aceite mineral estéril para evitar la deshidratación y mantener un microambiente microaerofílico, la galería se incubó a 37°C y se realizó la lectura y el registro de los

resultados a las 24 y 48 horas.

La interpretación del sistema comercial empleado se realizó como a continuación se describe: en la primera sección de la galería IST2 se realizó la detección de los micoplasmas genitales; la alcalinización del medio contenido en el pozo se interpreta como un resultado positivo a la presencia del microorganismo bajo análisis, lo cual se observó por el vire del indicador de pH de color amarillo a color rojo cereza. En la segunda sección se realizó la titulación de los micoplasmas presentes en la muestra, reportando como positiva una muestra en la que el título de los micoplasmas resultara igual o mayor al umbral establecido en la literatura y por ende en la galería misma: $\geq 10^4$ UFC. Finalmente, en la tercera sección de la galería se determinó la sensibilidad a diferentes antimicrobianos, éstos se probaron en dos concentraciones diferentes. La galería IST2 incluye los siguientes antimicrobianos: Doxicilina (4 y 8 mg/L), Josamicina (2 y 8 mg/L), Ofloxacina (1 y 4 mg/L), Eritromicina (1 y 4 mg/L), Tetraciclina (4 y 8 mg/L), Ciprofloxacina (1 y 2 mg/L), Azitromicina (0.12 y 4 mg/L), Claritromicina (1 y 4 mg/L) y Pristinamicina (2 mg/L) (figura 4).

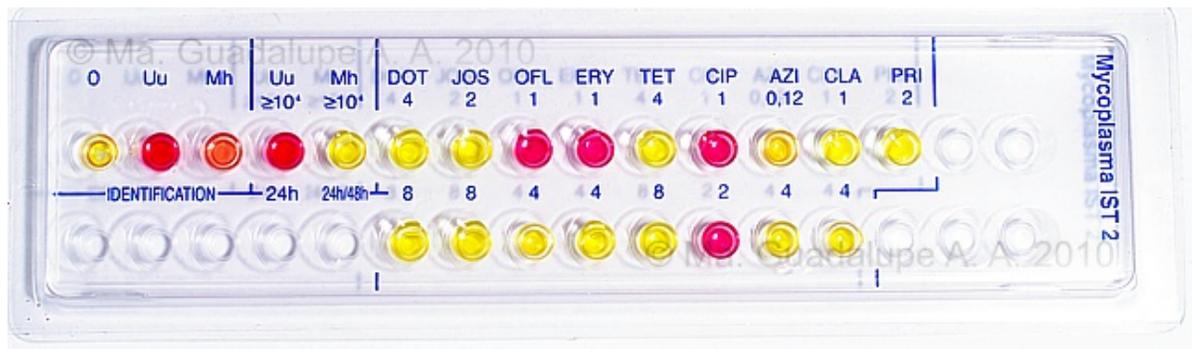


Figura 4. Galería IST-2 para detección de micoplasmas. (Foto tomada para propósitos de este trabajo).

En el caso del estuche comercial AF Genital system (Liofilchem®, Roseto D.A. Italy) se repartieron 200 µL en cada pozo de la galería, posteriormente a cada pozo se le agregaron 3 gotas de aceite mineral estéril excepto a los pozos 6, 16, 17, 18, 20, 21, 22 y 23, para evitar la deshidratación y generar condiciones microaerófilas, la galería se incubó a 37°C y se realizó la observación y el registro de los resultados a las 24 y 48 horas. Al término de la incubación se observa el vire del indicador en los pozos de 1-GR+ a 5GR+, para identificar la presencia de micoplasmas genitales y determinar el título presente de la bacteria en la muestra. En el caso de los pozos 1GR+, 2GR+ y 3GR+ cuantifican a *U. urealyticum* y *M. hominis*, hasta 10³ UFC, hasta 10⁴UFC o ≥10⁵ UFC respectivamente. El pozo 5-UR detecta cualitativamente a *U. urealyticum*, mientras que el pozo siguiente 4-ADC detecta cualitativamente a *M. hominis*, ambos determinando el vire del indicador de acuerdo a cambios de pH. Del pozo 6-TR/YE se retiró una gota de líquido, para depositarla en un portaobjeto y observar al microscopio (40x) la presencia de *T. vaginalis* y *Candida* spp. Se continuó con la lectura del antibiograma para micoplasmas observando el vire del indicador de los pozos 7-TE a 15-CD, los antibióticos que contiene esta galería son: Tetraciclina 8 µg/L, Pefloxacina 16 µg/L, Ofloxacina 4 µg/L, Doxiciclina 8 µg/L, Eritromicina 16 µg/L, Claritromicina 16 µg/L, Minociclina 8 µg/L, Josamicina 8 µg/L y Clindamicina 8 µg/L (Figura 5).



Figura 5. Galeria *AFgenital system*® para la detección de micoplasmas y otros patógenos de la región genitourinaria. (Foto tomada para propósitos de este trabajo).

8.3 Detección de *Chlamydia trachomatis* (González-Cardel, 2010)

La detección de *C. trachomatis* se llevó a cabo de una muestra cervical contenida en el medio de transporte 2SP a partir del cual se realizó la lisis celular de la misma y la posterior amplificación del gen *16S rRNA*.

8.3.1 Lisis celular

La lisis celular de las muestras se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Rivera-Méndez (2002) y Hernández-Cortez (2005) que a continuación se describe.

1. Se tomó 1 mL de la muestra en medio de transporte 2-SP conteniendo la muestra y se transfirió a un microtubo 1.5 mL estéril.
2. Se centrifugó a 15,000 g durante 10 minutos a 4°C.
3. Se colectó el sobrenadante en otro tubo etiquetado correctamente; el sedimento se resuspendió con un vórtex en 500 µL de agua estéril.

4. Se centrifugó nuevamente a 15,000 g durante 20 minutos a 4°C.
5. Se colectó el sobrenadante en el mismo tubo del paso 3; el sedimento se resuspendió con un vórtex en 46 µL de agua estéril.
6. El sedimento se colocó en un baño en ebullición durante 10 minutos.
7. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y al sedimento se le agregaron 2 µL de proteinasa K (400 µg/mL).
8. Se incubó 10 minutos a 56°C.
9. El tubo transfirió a un baño en ebullición durante 10 minutos.
10. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 2 µL de lisozima (400 µg/mL) al sedimento.
11. Se incubó 10 minutos a 37°C.
12. El sedimento se retiró del baño y se congeló a -20°C.

8.3.2 PCR para la amplificación del gen *16S rRNA*

La detección del gen *16S rRNA* se realizó según la técnica descrita en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la E.N.C.B. por González-Cardel (2010) como se muestra a continuación.

1. Se amplificó el gen *16S rRNA*, para obtener un amplicón de 402 pb.
2. Se descongeló el DNA obtenido de las muestras clínicas lisadas, al igual que los reactivos para PCR en un baño de hielo.
3. En un microtubo de 0.2 mL se montó la siguiente mezcla de reacción: agua 25.5 mL, regulador de PCR 5 mL (1X), $MgCl_2$ (2 µM), dNTP's 10 µM (0.4

μM), oligonucleótidos a $0.2 \mu\text{M}$, Taq polimerasa $5 \text{ U}/\mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$ de DNA molde en un volumen final de reacción de $5 \mu\text{L}$ y albúmina al 0.4% ; y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

4. Se homogeneizó con vórtex y se centrifugó 10 segundos.
5. Se agregó $1.0 \mu\text{L}$ del DNA problema.
6. Se acomodaron los tubos en el termociclador distribuyéndolos equitativamente.
7. La presencia del amplificado se valoró con un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.8% a 90 volts durante 30 minutos.
8. Paralelamente se corre un marcador de talla molecular. Posteriormente los geles se tiñen con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 minutos y estos se observaron en un documentador de geles.
9. El testigo positivo llevó $1 \mu\text{L}$ de DNA de *C. trachomatis* ATCC VR-878D, mientras que el negativo llevó $1 \mu\text{L}$ de agua.

8.4 Metodología para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* (Hernández-Martínez, 2009)

Las muestras se sembraron directa e inmediatamente después de la toma de muestra en una placa de Medio de Thayer Martin (MTM) por la técnica de la “z”, en la cual se rota el cepillo citológico sobre la placa dibujando una “z” y posteriormente se

estrió sobre la misma para expandir el inóculo.

1. Se incubó de 24 a 48 horas en atmósfera parcial al 5% CO₂ a 37°C.
2. Se observó desarrollo de colonias redondas, transparentes de 1 a 2 mm de diámetro a las 48 horas.
3. Cuando en un cultivo en MTM se observó crecimiento de colonias sospechosas se procedió a la identificación bioquímica.
4. Para la identificación de las colonias obtenidas del cultivo en MTM se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa.
5. Se sembraron con una suspensión densa y por goteo las pruebas de carbohidratos al 1% (maltosa, sacarosa, glucosa y lactosa) en base Cistina Trypticaseina agar (CTA).
6. Se incubó a 37°C durante 24 a 48 horas.
7. Se leyó como positivo aquel tubo en el que el indicador viró (cambió de color) debido a la acidificación del medio por la utilización del carbohidrato, y como negativo aquel en el que hubiese alcalinización del medio debido a la utilización de peptonas.
8. Se realizó el control de calidad del medio sembrando la cepa tipo de *N. gonorrhoeae* ATCC 53420.

8.4.1 PCR para la detección del gen 16S rRNA

El cultivo se confirmó aplicando una PCR dirigida al gen 16S rRNA, específico para *N. gonorrhoeae*. Las condiciones de reacción son las mismas que se aplican

para la detección por PCR de *C. trachomatis*. Los iniciadores que se utilizan en esta reacción se describen en González-Cardel, 2010.

9. Detección de infecciones genitales de tipo micótico

9.1 Detección de vaginitis por *Candida* spp. (Baixench et al., 2006).

Para la detección de vaginitis por *Candida* spp. se debió observar en el examen en fresco pseudomicelio y/o estructuras compatibles con levaduras, adicionalmente se sembró a partir del tercer hisopo contenido en el medio Stuart por estría cruzada en Gelosa Cromogénico *Candida* (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hants., England), se incubó de 24 a 48 horas a 37°C, posteriormente se dio lectura al color del crecimiento para identificar algunas especies de *Candida* (Figura 6).

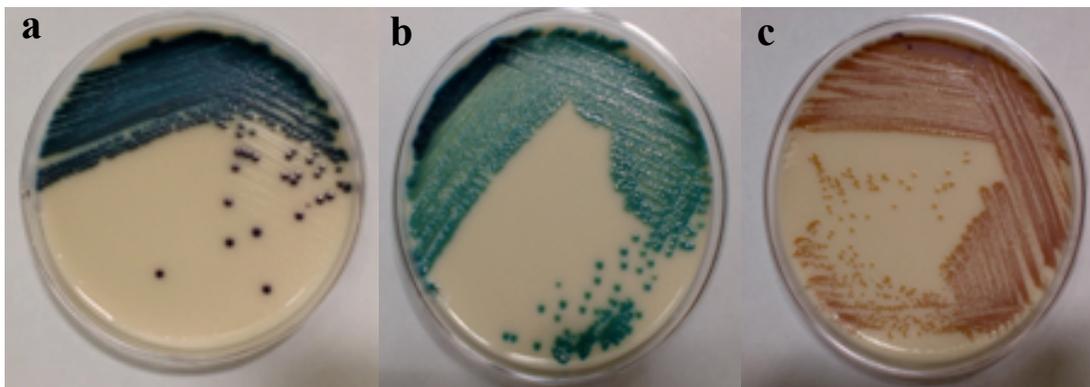


Figura 6. Morfología colonial de las diferentes especies de *Candida* utilizando el medio de cultivo cromogénico. **a)** *C. tropicalis* **b)** *C. albicans* **c)** *C. glabrata*. Modificado García-Mundo, 2011.

10. Detección de infecciones genitales de tipo parasitario.

10.1 Detección de vaginitis por *Trichomonas vaginalis* (NOM-039-SSA2-2002)

La detección de la tricomonosis se llevó a cabo mediante el examen en fresco, el cual se realizó a partir del segundo hisopo colocado en SSF. Con éste se procede a hacer una preparación en fresco, leyendo inmediatamente después de la toma de la muestra (debido a que el protozooario es demasiado sensible a temperatura ambiente, de preferencia leer el fresco en menos de 30 minutos) en el microscopio óptico a 10x y 40x (Figura 7).

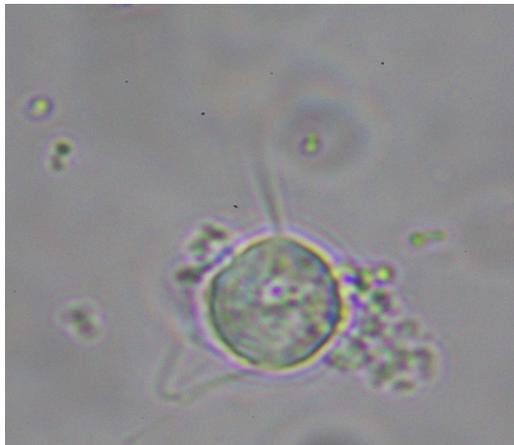


Figura 7. Trofozoito de *Trichomonas vaginalis* en una preparación en fresco (Foto tomada para propósitos de este trabajo).

11. Análisis de datos sociodemográficos (Vertaramo *et al.*, 2009).

El análisis de frecuencias de los resultados obtenidos se realizó con el software PASW-18. Se hizo una minería de datos que contenía la información recopilada en el

cuestionario previamente llenado por las mujeres participantes, así como, los resultados de diagnóstico obtenidos con las diferentes técnicas empleadas en este trabajo.

La prueba de χ^2 se usó para determinar si existía o no relación entre dos variables categóricas, dicha prueba no indica el grado o el tipo de relación, es decir no indica el porcentaje de influencia de una variable sobre la otra o la variable que causa la influencia.

El nivel de confianza que se fijó para determinar la significancia en la relación de dos variables fue del 95% por lo que p tiene un valor de 0.05. Si $p > 0.05$ entonces las variables no tienen relación estadísticamente significativa y si $p < 0.05$, entonces las variables bajo análisis si tienen una relación estadísticamente significativa.

12. Resultados

En el periodo de muestreo que comprende de Octubre 2010 a Agosto 2011, se tomaron 207 muestras de exudados cervicovaginales a participantes voluntarias quienes dieron por escrito su consentimiento para: la toma de la muestra, que los microorganismos y el material genético obtenidos de las muestras se usen para investigación; y por último completaron un cuestionario. Los resultados se muestran en las siguientes secciones.

12.1 Infecciones determinadas en la población.

La búsqueda de los agentes etiológicos bacterianos se realizó en las 207 muestras, a diferencia de la infección con HPV que sólo se realizó en aquellas participantes que tuvieron alteraciones citológicas en el resultado de Papanicolaou (n=34).

Los resultados muestran que 127 de las 207 participantes (61.3%) presentaban, al menos una infección o agente etiológico. El resto de las participantes (80/207=38.7%) no presentaron alteraciones citológicas o alguna patología, considerándolas así como participantes sanas, al menos desde el punto de vista microbiológico. El cuadro 9 muestra el detalle de la prevalencia de infección en la población bajo análisis.

Cuadro 9. Agentes etiológicos y/o patologías detectados en las participantes.

Total de muestras colectadas	207 (100%)
Personas con algún microorganismo (infectadas)	127 (61.3%)
Personas sin ningún microorganismo (sanas)	80 (38.7%)
En las personas que se realizó algún aislamiento (127):	
Monoinfecciones	77 (60.6%)
Poliinfecciones	50 (39.4%)
Microorganismos detectados*	
<i>C. trachomatis</i>	2
<i>N. gonorrhoeae</i>	0
<i>T. vaginalis</i>	1
Total de Cervicitis	3
Total de vaginosis bacteriana	30
<i>U. urealyticum</i>	88
<i>M. hominis</i>	15
Total de micoplasmas y ureaplasmas $\geq 10^4$ UFC/mL	103
<i>C. albicans</i>	28
Candida no albicans	2
Total de candidosis	30
Virus de papiloma humano	34**

*El número de infecciones rebasa al de las pacientes debido a que hubo varios casos de infección mixta.

** Sólo se realizó la búsqueda en este número de pacientes.

Entre las 127 participantes en las que se detectó alguna infección se encontraron 77 ($77/127 = 60.6\%$) casos de monoinfección y 50 casos de infección mixta o poliinfección ($50/127 = 39.4\%$) (Figura 8).

En el resto de las participantes ($80/207 = 38.7\%$) no se encontró patología alguna. Entre los casos de monoinfección *U. urealyticum* se detectó con mayor frecuencia ($41/127 = 32.8\%$), seguido por la infección de HPV ($23/127 = 18.1\%$).

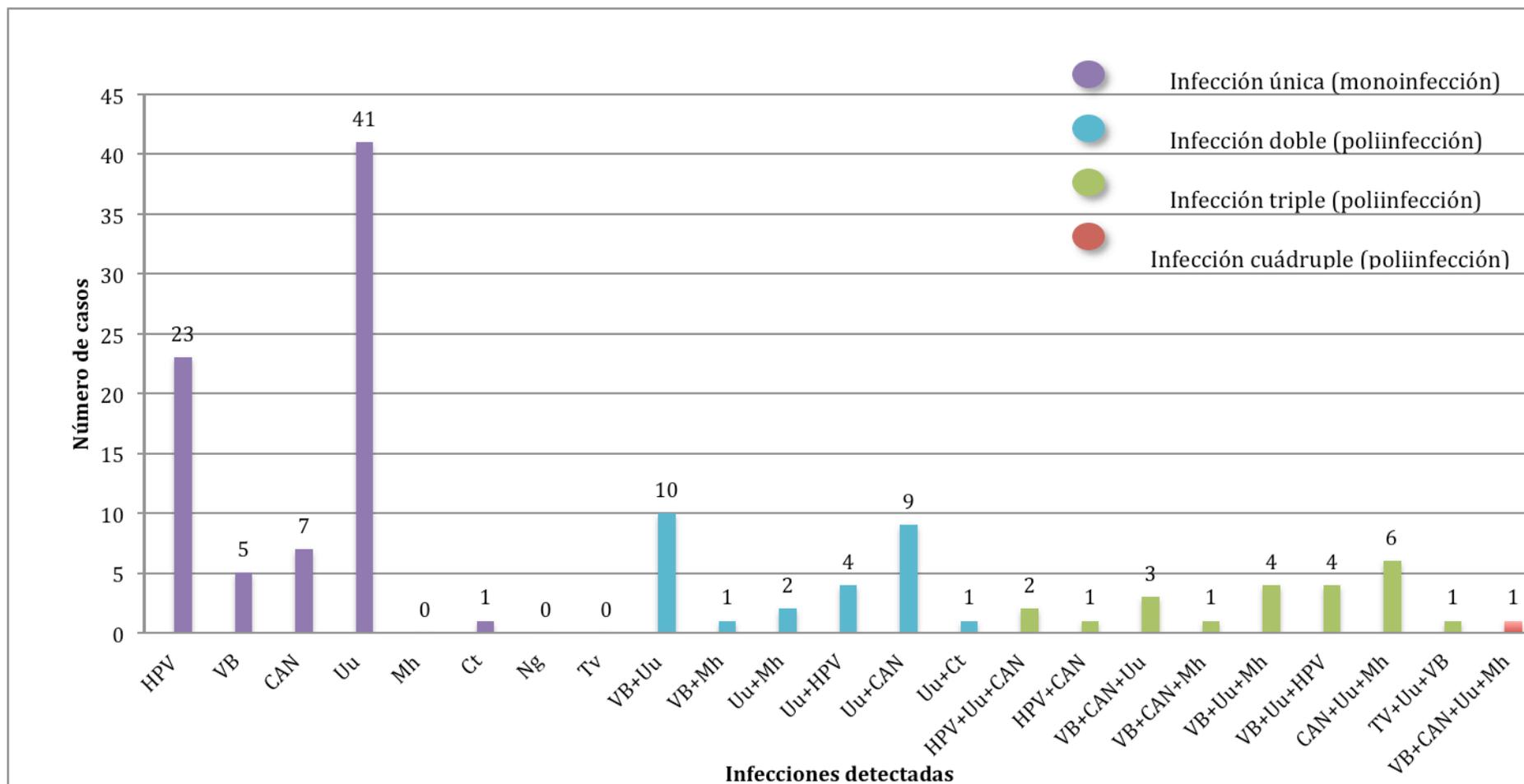


Figura 8. Frecuencia de las infecciones detectadas en la población de estudio. HPV = Virus del papiloma humano; VB= vaginosis bacteriana; CAN = candidosis; Uu = *U. urealyticum*; Mh = *M. hominis*; Ct = *C. trachomatis*; Ng= *N. gonorrhoeae*, Tv = *T. vaginalis*.

Los casos de poliinfección de VB + *U. urealyticum* se encontraron en mayor frecuencia (10/127=7.87%), continuaron los casos con *U. urealyticum* + candidosis (9/127 = 7.0%).

12.2 Análisis de la infección con el virus del papiloma humano en las participantes.

Como ya se mencionó, la presencia de infección con el HPV se determinó solamente en aquellas participantes en las que, por medio del estudio citológico (Papanicolaou) se evidenció alguna alteración (32/207), así como en las que la revisión del cuestionario arrojó algún hallazgo que pudiera estar relacionado con la infección de HPV (2/207). En un caso la participante reportó haber presentado verrugas genitales años atrás y en el otro la participante reportó tener una pareja con HPV. El cuadro 10 muestra el detalle de estos resultados, sin embargo es importante resaltar que:

i. los genotipos de HPV considerados de alto riesgo (AR) fueron los más frecuentes, se encontraron en 33 de las 34 muestras positivas (97.1%), los genotipos más frecuentemente detectados en las participantes fueron de AR el 52, 16, 58 y 39 y de PAR el 66.

ii. entre las 34 participantes se detectaron 19 genotipos diferentes y iii. la co-infección de varios genotipos virales se encontró en 30 de los 34 casos; se detectaron 2 ó más genotipos, llegando a detectarse hasta 11 genotipos diferentes en una sola participante (Figura 9).

Cuadro 10. Alteraciones citológicas e infección del virus de papiloma humano encontradas en las participantes.

Participante n=34	Alteración citológica (Pap)	AR	BR	RND	PAR
233	ND*	16, 51, 52, 58			
291	ND*	16, 39, 52, 82	44, 54		
130	N LIE CB INFL	52			53
261	N LIE CB INFL	18, 51, 39			
121	ASCUS	16, 52, 58			
122	ASCUS	16, 52, 58	6		53
154	ASCUS	16, 58			
200	ASCUS	52, 58			
215	ASCUS	52, 58			
220	ASCUS	16, 52, 58			
221	ASCUS	16, 51, 52, 58			
224	ASCUS	52, 58			
236	ASCUS	39, 52	6, 44		
243	ASCUS	31, 33, 52	54		
245	ASCUS	39, 52			
247	ASCUS	39			
295	ASCUS	16, 39, 58	54		
298	ASCUS	16, 39, 52	54		
239	ASCUS	16			53, 66
317	ASCUS	31, 39, 52	44, 54		
126	LIE-BG	16			
137	LIE-BG	16			53
229	LIE-BG	16, 52			
235	LIE-BG	52			66
237	LIE-BG	16, 31, 33, 52, 58	44, 54		53, 66
303	LIE-BG	52	44		66
288	LIE-BG	16	6		
320	LIE-BG	16, 31, 33, 39, 52, 58	44, 54	69, 71	66
167	LIE-AG	56		74	
226	LIE-AG				66
240	LIE-AG	52, 58			66
289	LIE-AG	16			
305	LIE-AG	39, 52, 82			66
319	LIE-AG	16, 52, 58	44		
Totales=34	n=32*	33	12	2	11

AR: Alto Riesgo; BR: Bajo Riesgo; RND: Riesgo Indeterminado; PAR: Probable alto riesgo; ASCUS: Atipia celular de significado incierto; LIEG-AG: Lesión intraepitelial de alto grado; ND: No determinado; LIE-BG: Lesión intraepitelial de bajo grado; N LIE CB INFL: Negativo a Lesión intraepitelial, cambios benignos por inflamación.*Dos participantes reportaron hallazgos relacionados con la infección por HPV.

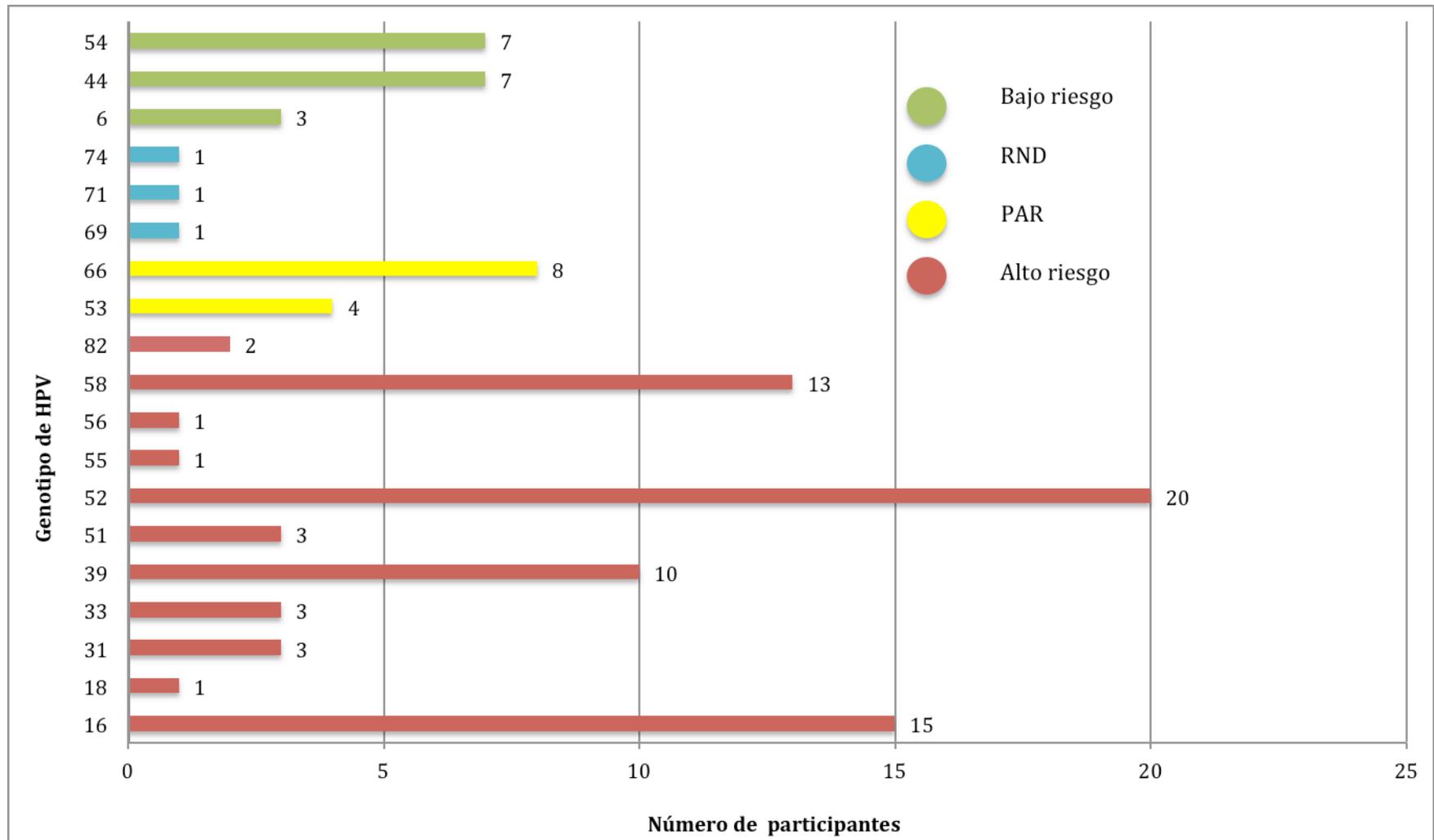


Figura 9. Frecuencia de los genotipos de HPV detectados en las participantes. RND: riesgo no determinado; PAR: probable alto riesgo.

12.3 Variables sociodemográficas y de conducta de la población estudiada.

La mayoría de las participantes tenían una edad entre los 18 y los 25 años (93/207=44.9%). La media de edad en la población fue de 29.9 años. La media de edad de las pacientes infectadas fue de: 28.8 años, mientras que la media de edad en las participantes sanas fue de 29.9 años. El estado civil más frecuentemente referido fue el de soltera (138/207= 66.7%).

El análisis del cuestionario se realizó comparando dos grupos: el de participantes sanas (n=80) y el de participantes infectadas (n=127). La información más relevante se muestra en el cuadro 11. Se observa una relación estadísticamente significativa en el número de parejas sexuales totales entre los dos grupos ($p=0.047$), esta relación indica que el tener múltiples parejas sexuales es un condicionante para adquirir al menos una de las infecciones estudiadas, mientras que en el resto de las variables no hay relación de significancia.

El análisis estadístico que se hizo indicó que no existe relación significativa entre la presencia de alguna infección con: la preferencia sexual ($p=1.00$), fumar ($p=0.910$), el número de embarazos ($p=0.249$), el número de abortos ($p=0.599$), y el uso de duchas vaginales ($p=0.227$).

Cuadro 11. Frecuencia y análisis estadístico de las variables y su relación con los hallazgos microbiológicos.

VARIABLE	INFECTADAS				
	Sanas (n=80)	Infectadas (n=127)	HPV + (n=23)	HPV y otra infección (n=11)	Otras infecciones (n=93)
Edad χ	29.9	28.8	30.6	28.7	28.5
Estado civil (p=0.185)*					
Soltera	47	91	16	8	69
Casada	25	23	2	1	19
Otro	8	13	5	2	5
Uso de condón (p=0.803)					
Si	43	95	10	5	49
No	37	32	13	6	44
Inicio de vida sexual (p=0.526)					
≤ 15 años	13	14	3	1	10
16-18 años	36	51	8	5	37
19-25 años	30	59	11	4	45
>26 años	15	3	1	1	1
No. de parejas sexuales actuales (p=0.910)					
0	1	2	0	0	1
1	69	114	20	10	84
≥ 2	10	11	3	1	8
No. de pareja sexuales totales (p=0.047)					
1 ó 2	35	46	7	3	38
3 ó 4	30	37	6	1	29
≥5	15	44	10	7	26
Motivo de visita (p=0.191)					
Revisión general	54	77	17	5	56
Molestias	21	44	4	6	33
otro	5	6	2	0	4

*el resultado de p es la comparación entre los grupos: sanas e infectadas.

El uso de condón es la medida de prevención por excelencia descrita para evitar la adquisición de una ITS e inclusive una IE como la VB. De la población participante de este estudio (n=207) sólo 138 mujeres reportaron usar el condón,

esta variable se analizó en relación con los hallazgos microbiológicos de infección (estado de salud) es decir si la participante esta infectada o sana. El uso del condón resultó ser una variable independiente del estado de salud de las participantes ya que no se encontró relación estadísticamente significativa ($p=0.803$) (cuadro 12).

Cuadro 12. Relación entre el estado de salud con el uso del condón.

			Uso de condón		Total
			No	Sí	
Estado de la participante	Sanas	Número de casos %	37 46.3	43 53.8	80 100.0
	Infectadas	Número de casos %	61 48.0	66 52.0	127 100.0
Total		Número de casos	98	109	207
		%	47.3	52.7	100.0

$p=0.803$

Tampoco se encontró relación estadísticamente significativa entre las participantes sanas que usan condón (43/80) y la edad de inicio de vida sexual ($p=0.573$), el número de parejas sexuales totales ($p=0.783$) y el número de parejas sexuales actuales ($p=0.456$). Los resultados en las mismas participantes, es decir ($n=80$), pero que no usaron condón (37/80) fueron los siguientes: en relación a la edad inicio de vida sexual el valor de p fue $p=0.632$, con el número de parejas sexuales actuales $p=0.356$ y en relación a el número de parejas sexuales totales $p=0.228$, resultando que lo anterior no tiene relación estadísticamente significativa.

13. Discusión.

El respeto por la autonomía y la libertad de las personas participantes en protocolos de investigación es un derecho fundamental que en la investigación clínica está garantizado por el proceso del consentimiento informado. La información que se proporcione al potencial participante debe contener todos los elementos y requisitos establecidos por la Conferencia Internacional de Armonización (URL-3) y no debe existir inducción a la participación, coacción o amenazas. La firma del documento de consentimiento informado, decidida libremente tras haber comprendido la información transmitida por el investigador, constituye el paso obligado previo a la inclusión de un paciente en un ensayo clínico o en un proyecto de investigación y es garante de la autonomía del paciente y del respeto de los principios fundamentales de la bioética.

El consentimiento informado que se proporcionó a las participantes fue revisado y autorizado por los miembros del comité de bioética de la ENCB-IPN, con lo cual se cubrió este importante requisito para la investigación clínica (URL-2).

13.1 Análisis de la infección con el virus del papiloma humano en las participantes.

La introducción de programas efectivos de selección rigurosa de poblaciones con la prueba de Papanicolaou (Pap) para detectar lesiones precancerosas ha reducido significativamente el número de casos de CaCu en los países desarrollados. Sin embargo, en los países en vía de desarrollo, a pesar de la existencia de programas nacionales de detección desde 1974, esta reducción no ha

dato los mismos frutos. En México se estima que sólo el 13% de los casos de CaCu se están detectando y que esto se debe a la calidad del sistema de diagnóstico. De hecho, las tasas de mortalidad atribuida al CaCu en México se han mantenido estables durante las últimas tres décadas, en torno a 17 muertes por cada 100,000 mujeres (Gutiérrez-Xicotencatl *et al.*, 2009).

La presencia de una lesión cervical no es indicativa de una infección por HPV, sin embargo las lesiones clínicas y las alteraciones citológicas son los métodos más frecuentemente utilizados para identificar las lesiones precancerosas, algunas de las cuales pueden estar asociadas con la presencia de infección por HPV. Las técnicas moleculares para detectar el DNA del HPV en muestras de cuello uterino han sido recientemente introducidas en combinación con las pruebas de Pap y la colposcopia con la esperanza de que se identifique a las mujeres infectadas en riesgo de desarrollar CaCu por el HPV a las que se les pueda otorgar un tratamiento oportuno que impida el desarrollo del mismo (Gutiérrez-Xicotencatl *et al.*, 2009).

En las participantes de este proyecto la detección del DNA de HPV se realizó sólo en aquellas participantes en que se encontró alguna alteración citológica sugerente de infección durante la lectura e interpretación del Papanicolaou (NOM-014-SSA2-1994) hecho que seguramente influyó en la relativa baja frecuencia de HPV que se está reportando en esta población, ya que es posible que una paciente esté infectada y que no se detecten alteraciones citológicas. Para una mejor estimación de la prevalencia de la enfermedad cervical, deben llevarse a cabo estudios más amplios en la población que incluyan las tres pruebas como lo sugiere Gutiérrez-Xicotencatl *et al.*, 2009. En todos los casos en los que la tinción de

Papanicolaou evidenció algún tipo de anormalidad (n=34) se encontró al virus presente esto significa una correlación del 100% entre los resultados obtenidos por Papanicolaou y PCR e hibridación reversa. Estos resultados concuerdan con lo que se reporta en la literatura sobre el Papanicolaou en donde se explica que se trata de una técnica muy específica (aprox. 0.98 con 95% intervalo de confianza) (Wright y Goldie 2008; Gutiérrez-Xicotencatl *et al.*, 2009). Tomando en cuenta que la toma de muestra sólo se realizó en el endocervix y que el virus puede infectar también células del ectocervix es factible deducir en que los resultados obtenidos solo representan una fracción de la frecuencia real de la infección.

La interpretación de la citología cervical se realizó de acuerdo a la nomenclatura de Bethesda (desde ASCUS hasta LEIAG o carcinoma "*in situ*") (NOM-014-SSA2-1994; Wright y Goldie 2008). Bajo esta clasificación se diagnosticaron 16/34 casos de ASCUS, entre los cuales se detectó al menos un genotipo de HPV de alto riesgo. Como se sabe los genotipos de alto riesgo tienden a integrarse en el DNA de las células hospederas, la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 causan transformación, inmortalización, promueven la carcinogénesis, se unen al supresor de tumores p53 y desregulan los puntos de control del ciclo celular, lo cual se traduce en ASCUS, si este estadio avanza puede diferenciarse hacia lesiones intraepiteliales de bajo grado, alto grado o carcinoma *in situ*. Sin embargo, es importante señalar que en ocasiones estas lesiones pueden revertirse dependiendo de dos aspectos importantes: el genotipo infectante y la respuesta inmune del hospedero (Ajay *et al.*, 2012).

En estudios realizados por diferentes autores se reporta que los genotipos de

alto riesgo detectados con mayor frecuencia a nivel mundial son el 16, 18, 31 y 33. Contrario a lo que sucede en esas regiones geográficas en la población mexicana analizada en la presente tesis, el genotipo de alto riesgo más frecuentemente detectado fue el 52, seguido de los genotipos 16 y 58. Es relevante mencionar que el genotipo 18, considerado como uno de los más frecuentes después del genotipo 16, se encontró en tan sólo una de las 34 participantes, lo cual concuerda con lo reportado en la OMS (2011) (pon la referencia) en población mexicana, en donde se reporta que en 409 pacientes sólo se encontró el genotipo 18 en 24 casos de los 409 (6%) analizados.

Los casos de co-infección de diferentes genotipos de HPV se reportan también en la literatura internacional y mexicana (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001, Illades-Aguilar *et al.*, 2009; Parada *et al.*, 2010). En este estudio esta circunstancia fue muy frecuente (en 31 de 34 participantes) y sólo se detectaron 3 mujeres infectadas con un solo genotipo. La co-infección viral de genotipos de alto riesgo llama la atención, ya que depende de la técnica que se utilice para lograr discernir entre estos, la técnica que se manejó en este estudio fue PCR e hibridación reversa, que es más sensible y específica (sensibilidad=98.4%, especificidad=79.4%) que la técnica aprobada por la FDA. También se encontraron co-infecciones con genotipos de bajo riesgo, riesgo indeterminado y probable alto riesgo. Este hallazgo señala la importancia que pudiera tener la genotipificación de este virus ya que: i. no todas las pacientes están colonizadas con virus de alto riesgo por lo que el tratamiento y el pronóstico de la infección no es igual al de una participante infectada con un virus de alto riesgo y ii. a que es deseable conocer desde el punto de vista epidemiológico

qué genotipos virales circulan en la población mexicana. En general ante un resultado de ASCUS no se considera la búsqueda de virus, sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo se decidió realizar la búsqueda en este estadio de alteración; encontramos que en todos los casos de ASCUS había por lo menos un genotipo viral, y entre éstos predominaron los genotipos de alto riesgo. Este hecho resulta relevante y debería estudiarse en un mayor número de muestras ya que de repetirse este resultado quizá se debería realizar la genotipificación viral al encontrar también ASCUS, esto permitiría disminuir la tasa de mortalidad por CaCu en nuestro país.

Los genotipos 16, 18, 6 y 11 se reportan a nivel mundial con una frecuencia muy elevada, tanto que se han realizado 2 vacunas dirigidas hacia la proteína L1 de estos 4 genotipos virales, dichas vacunas, en la actualidad, se están aplicando en México. Sin embargo, la frecuencia de los genotipos 6, 11 y 18 resultó muy baja en este estudio, esto subraya nuevamente la pertinencia de realizar estudios más amplios, antes de aplicar las inmunizaciones contra genotipos que aparentemente según estos resultados y los de otros autores nacionales no son tan frecuentes en la población Mexicana como lo son en otras poblaciones del mundo (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001; Illades-Aguilar *et al.*, 2009; Parada *et al.*, 2010).

Además de la co-infección entre los diferentes genotipos virales, en la población analizada se detectó también infección mixta con otros microorganismos, definida como la presencia de HPV (uno o varios) acompañada de un microorganismo causante de patología genital. Esto último ocurrió en 11 casos, la infección con HPV se acompañó de candidosis, de VB y de la presencia de *U. urealyticum* $\geq 10^4$

UFC/mL. Algunos autores han reportado que patologías como la candidosis o la VB así como la infección con *C. trachomatis* son factores de riesgo para la adquisición, establecimiento de HPV y también para el desarrollo de neoplasias cervicales (Calil *et al.*, 2011). Este antecedente tiene eco en los resultados de esta tesis donde la VB y la presencia de *U. urealyticum* estuvieron muy relacionadas con la presencia del virus. La VB es una infección polimicrobiana, las bacterias implicadas en esta patología sustituyen a la biota normal protectora; fundamentalmente lactobacilos productores de H₂O₂. Ésta circunstancia favorece el desarrollo de un gran número de bacterias anaerobias estrictas y facultativas, entre ellas *U. urealyticum*, estas bacterias son altamente bioproductoras de aminas como parte de su metabolismo, las aminas aumentan la exfoliación de células epiteliales en la cavidad vaginal, hecho que predispone a que el HPV penetre a estratos más profundos o a epitelios basales en el cérvix, lo que permite que el virus evada el sistema inmunológico. Este evento aumenta significativamente la posibilidad de desarrollar lesiones compatibles a la infección de este virus, lesiones sugerentes de infección por HPV e inclusive CaCu (Candido-Murta *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2005; Shim *et al.*, 2010; Gillet *et al.*, 2011). Dada la importancia que tiene el estado inmunológico de la paciente para poder eliminar al virus infectante es que para los inmunólogos resulta valioso evaluar la respuesta inmune de pacientes infectadas con HPV.

Entre las infecciones causadas por microorganismos el más frecuentemente detectado como único agente etiológico fue *U. urealyticum* >10⁴ UFC/mL, este resultado coincide con lo previamente reportado en nuestro grupo de trabajo (Muñiz-Becerril, 2010; Muñiz-Becerril *et al.*, 2010) así como por otros autores (Verteramo *et*

al., 2009). El empleo de las galerías IST2 y *AF Genital System* permitió, además de detectar y cuantificar a los micoplasmas presentes en la muestras, conocer el perfil de resistencia de estas bacterias a un grupo de antimicrobianos. Recientemente, los estudios sobre la epidemiología de *U. urealyticum* muestran que la frecuencia de colonización en la población en general es elevada, por tal motivo se debe poner mayor atención en esta bacteria, ya que como se sabe puede transmitirse horizontalmente vía las relaciones sexuales empero también vía vertical durante el parto vaginal. Los neonatos prematuros son extremadamente susceptibles a infección respiratoria causada por esta bacteria. Un neonato infectado con una cepa resistente o multiresistente tiene muy mal pronóstico. Por lo anterior, la detección oportuna en las gestantes, el monitoreo de cepas resistentes y la prescripción del tratamiento de elección durante la gestación y antes del parto son fundamentales (Muñiz-Becerril *et al.*, 2010; Taylor-Robinson y Skov, 2011)

Las infecciones endógenas incluidas en el panel de diagnóstico fueron la VB y la candidosis, éstas suelen representar la primera causa de visita al médico (NOM-039-SSA2-2002; Marrazzo, 2011) mientras que en este estudio se situaron en el tercer sitio de frecuencia (30 de 207 participantes). La detección se realizó con base a lo descrito en la NOM-039-SSA2-2002, sin embargo en el caso de la VB se añadió metodología considerada en otros países como el estándar a seguir; el criterio de Nugent, además en trabajos previos (Hernández-García, 2009; García-Mundo, 2011) se demostró que éste método es más sensible y específico que los (Criterio de Amsel y Cultivo de *G. vaginalis*) recomendados por la NOM-039-SSA2-200 (Tamrakar *et al.*, 2007; Nagaraja, 2008; Persson *et al.*, 2009; Menard *et al.*, 2010;

Rathod *et al.*, 2011). De hecho Martínez *et al.*, 2011 mencionan que no se debe realizar el diagnóstico de la VB a través del cultivo o detección genética de *G. vaginalis* porque existe evidencia de que ésta bacteria puede formar parte de la microbiota vaginal normal de algunas mujeres, lo cual sería causa de falsos positivos y por lo anterior, éstos autores consideran y recomiendan al criterio de Nugent como el método que proporciona los mejores resultados con respecto a otros métodos. Los resultados del presente estudio y los de un trabajo previo en el grupo de trabajo aportan información en este mismo sentido (Hernández-García *et al.*, 2010).

En el caso de la candidosis se usó además del método mencionado en la NOM-039-SSA2-2002, es decir el examen microscópico en fresco, el cultivo en medio cromogénico. Éste es uno de los métodos que ha sido ampliamente validado ya que resulta muy atractivo por su sencillez, además de que provee una identificación presuntiva de manera rápida con la que según los fabricantes, se obtiene el resultado de las principales especies de importancia médica incluyendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* (Sobel, 1997; Achkar y Fries, 2010).

En México, el diagnóstico de gonorrea está regulado también por la NOM-039-SSA2-2002, la cual establece que el diagnóstico de infecciones gonocócicas puede realizarse mediante el uso de métodos genéticos; sin embargo, algunos autores aún siguen considerando el cultivo como el estándar de oro para la detección de esta infecciones. Dado que se conocen los problemas de sensibilidad del cultivo según el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento, la autólisis que sufren las cepas de *N. gonorrhoeae* o los requerimientos nutricionales de la misma, en este trabajo se tomaron medidas que evitaron en todo lo posible estos fenómenos, iniciando con la adecuada toma de muestra y su procesamiento

inmediato para evitar la autólisis, así como, la validación de los lotes de medio con la cepa tipo *N. gonorrhoeae* ATCC 53420. A pesar de estos cuidados y precauciones no se detectó ningún crecimiento en el cultivo de las muestras cervicales (Hebeler y Young, 1976; García y Dillard, 2006). El resultado coincide con lo reportado por Flores-Paz *et al.*, (2003) y otros autores. Esto puede deberse al tipo de población, ya que esos trabajos no estudiaban una población considerada de alto riesgo. Por el contrario, Conde-González (2000), en una revisión acerca de ITS, comenta los resultados de búsqueda de *N. gonorrhoeae* de dos estudios en los que se encontraron casos positivos, el primero con una prevalencia del 3.7% en 326 muestras mientras que en el segundo caso de 762 muestras, el 10% fueron positivas para este microorganismo, en ambos casos el diagnóstico se realizó únicamente por cultivo. En este estudio se comprobó el cultivo negativo por PCR dirigida al gen *16S rRNA* coincidiendo los resultados por ambos métodos.

El diagnóstico de la tricomonosis, se realizó mediante el examen microscópico en fresco encontrándose solo un caso de infección. Esta baja prevalencia de infección coincide con lo reportado por diferentes autores (Brown *et al.*, 2001; Hernández-García, 2009; García-Mundo, 2011; Andrea y Chapin, 2011; Levi *et al.*, 2011). Aunque debe mencionarse que la microscopía óptica utilizando el examen microscópico en fresco es una técnica descrita como poco sensible ya que por un lado requiere de un personal experimentado que no confunda al parásito con células epiteliales u otros elementos que pudieran estar presentes en la secreción (Mayta *et al.*, 2000; Maciques y Alonso, 2002; Sayed *et al.*, 2010) y por el otro, las laminillas deben leerse antes de que pasen 10 minutos desde la toma de la muestra. La baja

sensibilidad de esta técnica (aprobada en la NOM-039-SSA2-2002) tiene como consecuencia que se reporten falsos negativos, por lo tanto las mujeres infectadas se quedan sin tratamiento, se aumentan la posibilidad de contagio y la cronicidad de la infección (Moodley *et al.*, 2002; Perazzi *et al.*, 2007). Dado que existen diversas técnicas para la identificación de *T. vaginalis* (Madico *et al.*, 1998) en este trabajo se hizo dentro de la galería *AF genital system* el microcultivo de *T. vaginalis*, los resultados obtenidos por ambas pruebas fue el mismo. Las principales ventajas del examen en fresco y muy probablemente por lo que hasta nuestros días es la prueba más utilizada es que es rápida y barata.

La presencia de infecciones mixtas es ampliamente reportada en la literatura de infecciones de tracto reproductivo (Verteramo *et al.*, 2009). La asociación de *U. urealyticum* con VB resultó ser la más frecuente, este dato coincide con lo reportado por Hernández-García en el 2009 en población mexicana. Como se ha mencionado en otros estudios, la VB es una infección polimicrobiana en la que el sobrecrecimiento de bacterias anaerobias favorece el desarrollo de los micoplasmas genitales. Un claro ejemplo son los estudios de diversidad microbiana en vagina que se han realizado últimamente, aplicando técnicas de Biología Molecular, en los cuales se reporta que *U. urealyticum*, se encuentra en todos los casos de VB (Sobel 1997; Fredricks *et al.*, 2005; Oakley *et al.*, 2008; Marrazzo, 2011;).

13.2 Variables sociodemográficas y de conducta de la población estudiada.

El cuestionario aplicado a las participantes tuvo por objeto: a) identificar factores de riesgo, de protección o de comportamiento involucrados en la presencia de infecciones de transmisión sexual, b) evaluar la presencia de signos, síntomas y

conductas previas relacionadas con el desarrollo de una infección endógena.

Las prácticas sexuales son una variable directa del riesgo para adquirir una ITS que incluye entre otros: edad de inicio de vida sexual, cambios frecuentes y repetidos de compañeros sexuales, tener sexo sin protección y el sexo comercial.

Dentro de las repercusiones que resultan de las prácticas sexuales sin protección se encuentran los embarazos no deseados y el incremento de las ITS, por lo que es de suma importancia mejorar la educación sexual, así como el conocimiento y uso de métodos anticonceptivos en la población que es sexualmente activa.

La población femenina analizada en este estudio fue de tipo abierto con predominio de edad entre 18 y 25 años, estado civil solteras. Se pueden detectar algunas prácticas de riesgo para la adquisición de una infección cérvico-vaginal como: número de embarazos, uso de anticonceptivos hormonales, duchas vaginales, la edad del inicio de la actividad sexual, la cual fue menor a los 18 años en la mitad 55.2% (n=114) de la población. Dado que el coito sin protección aumenta considerablemente la posibilidad de adquirir alguna infección de transmisión sexual o una IE (básicamente en VB recurrente) también se indagó sobre el uso de condón (Gonzalez-Pedraza *et al.*, 2004; Marrazzo *et al.*, 2010). Sin embargo, en los resultados de esta investigación sólo se observó una relación estadísticamente significativa con el número de parejas sexuales totales con un valor de $p=0.047$.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), reporta que el 29% de la población no utiliza algún método anticonceptivo, porcentaje muy similar a lo

registrado en este trabajo, ya que el 26.1% (n=55) de las participantes dijo no utilizar ningún método anticonceptivo, es decir que el método de barrera (condón) a pesar de ser el método más ampliamente utilizado como método anticonceptivo, no presentó relación estadísticamente significativa ($p=0.803$) con la condición de las pacientes (estar o no infectadas).

El inicio de vida sexual a una temprana edad ($p=0.526$) tampoco tuvo relación estadísticamente significativa, lo cual llama la atención porque es considerada por algunos autores como un factor de riesgo fundamental para aumentar la posibilidad de infectarse con HPV, debido a que el epitelio de la zona de transición queda expuesto al ser hormonalmente inmaduro se infectan células epiteliales de estratos más profundos y por lo tanto se puede generar una lesión epitelial a corta edad, ésta puede ser asintomática hasta llegar a un carcinoma *in-situ* (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001; Bosh *et al.*, 2002).

Está muy claro que los condones son eficaces contra el HIV y las ITS, cuando se usan correcta y sistemáticamente (Gonzalez-Pedraza *et al.*, 2004; Marrazzo *et al.*, 2010). No obstante, está claro que muchos jóvenes-adultos no usan preservativos, aunque los datos existentes no pueden decirnos con qué consistencia. El uso del preservativo ha aumentado en este grupo de edad, presumiblemente en respuesta a los programas de prevención de HIV/ITS y se cree que es responsable de la disminución de algunas ITS como la gonorrea. Para medir la consistencia con que los condones se usan, es importante para evaluar el uso específico con los distintas poblaciones, sin embargo, el uso constante no parece ser óptimo (O'leary, 2011). Por ejemplo, un estudio encontró que sólo el 45% de los adolescentes usaban

condones con cada acto sexual y posiblemente esta sea una de las causas de el por que se encuentra en más de la mitad de la población analizada al menos un agente etiológico 127 (61.3%) (O`leary, 2011).

En cuanto al número de parejas sexuales totales en la vida de las mujeres participantes, el 60% (n=126) manifestó tener hasta 4 parejas sexuales durante toda su vida de actividad sexual, siendo ésta y el inicio de actividad sexual a temprana edad algunas de las prácticas de riesgo que llaman más la atención; ya que algunos autores han encontrado relación significativa entre la edad de inicio de vida sexual, el número de parejas sexuales a lo largo de su vida y la adquisición de una ITS. Al contrario con lo reportado por estos autores, el análisis estadístico de los resultados presentados aquí reveló que no hubo relación significativa entre los “factores de riesgo medidos con el cuestionario” y la adquisición de una ITS, posiblemente por el bajo número de muestras (n = 207). Existen también otros estudios en los que no se ha demostrado esta relación y más bien se asocia con la falta de uso de protección, incluso con parejas “estables” (Fonck *et al*, 2000; Vaccarella *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2008; Verteramo *et al.*, 2009).

Existen algunas ITS que cursan de manera asintomática, por lo que fue importante conocer el motivo de visita de las participantes, considerándose como asintomática aquella mujer que presentó algún microorganismo y reportó haber asistido por revisión medica general. Encontramos que el motivo de participación en el estudio, y estar o no infectada no tiene una relación estadísticamente significativa (0.191), la mayor parte de las mujeres decidió participar únicamente para realizarse una revisión médica general (N=131), sin embargo, al momento de toma de muestra

se observó sintomatología y signos que suelen asociarse a la presencia de una infección, entre las que predominó la secreción. Lo anterior refleja dos factores de suma importancia; en primer lugar, el amplio desconocimiento acerca de la sintomatología de las infecciones cervicovaginales, ya que muchas mujeres desconocen qué es normal y qué no; en segundo, muestra que también existen numerosos casos de mujeres con infecciones que se presentan de manera asintomática, siendo esto último un punto ampliamente reportado anteriormente en el grupo de trabajo y en la literatura internacional, por ejemplo un estudio en 2005, reportó que de los 3.5 millones de norteamericanos infectados con *C. trachomatis* anualmente, entre el 85 y el 90% no presentó síntomas, al igual que la infección inicial por HPV (Ojcius *et al.*, 2005; Hernández-Martínez, 2009; Martínez-Peña, 2009; Gillet *et al.*, 2011). Otros autores han reportado anteriormente que la principal molestia presentada en una infección es la descarga vaginal anormal, lo cual se observó también en el presente estudio (Araujo *et al.*, 2008).

14. Conclusiones

El agente etiológico más frecuentemente detectado como único agente etiológico y en asociación a otras patologías como la vaginosis bacteriana y la candidosis fue *U. urealyticum*.

Las infecciones por virus de papiloma humano fueron encontradas en alto porcentaje y con mayor frecuencia en asociación a otros genotipos de virus de papiloma humano y a otras patologías, principalmente la VB, la candidosis y la infección por *U. urealyticum*.

El genotipo de virus de papiloma humano más frecuentemente detectado fue el 52, considerado de alto riesgo, seguido de los genotipos 16 y 58.

En esta población se detectó sólo un caso del genotipo 18 de alto riesgo, y no se detectó al genotipo 11, de bajo riesgo.

Todos los casos de ASCUS presentan al menos un genotipo de alto riesgo.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las infecciones mixtas buscadas en esta investigación.

15. Perspectivas de desarrollo

1. Ampliar el número de participantes y llegar a diferentes poblaciones consideradas hasta el momento como de alto riesgo, por ejemplo hombres que tienen sexo con hombres.

2. Aumentar el panel de diagnóstico de ITS, principalmente con aquellas que cursan con ulceraciones, e infecciones virales.

3. Analizar los sueros de las participantes en este proyecto para la búsqueda de anticuerpos contra otras infecciones de transmisión sexual, específicamente: virus de inmunodeficiencia humana, virus de herpes y sífilis.

16. Referencias bibliográficas.

Achkar JM, Fries BC (2010). *Candida* infections of the genitourinary tract. Clin Microbiol Rev. 23(2): 253-273.

Ajay AK, Meena AS, Bath MJ (2012). Human papillomavirus18 E6 inhibits phosphorylation of p53 expressed in HeLa cells. Cell Biosci. 13;2(1): 2.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK (1983). Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med. 74(1): 14-22.

Andrea SB, Chapin KC (2011). Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. J Clin Microbiol. 49(3): 866-869.

Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC Jr (2003). The 2001 Bethesda System Terminology. Am Fam Physician. 68(10): 1992-1998.

Aral SO, Ward H (2005). Modern day influences on sexual behavior. Infect Dis Clin North Am. 19(2): 297-309.

Araújo F, Lang K, Ehrig V, Heukelbach J, Fraga F, Stoffer-Meilicke M, Ignatius R, Kerr LR, Feldmeir H (2008). Factors associated with STI in rural Brazil. J Infect Dev Ctries. 2(3): 211-217.

Baixench MT, Taillandier A, Paugam A (2006). Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. Mycoses. 49(4): 311-315.

Black CM (1997). Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. Clin Microbiol Rev. 10(1): 160-184.

Bañuelos PCA, Deleón RI, Hernández MJT, Martínez GLA, Akle FD, Miranda MJ (2000). Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by Papanicolaou technique, Enzyme Immunoassay and Polymerase Chain Reaction. Acta Cytol. 44(2): 114-123.

Boletín Epidemiológico (2011). Cuadro 6.0, 6.1 y 6.2. Infecciones de Transmisión Sexual.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cáncer. J Clin Pathol. 55: 244–265.

Brown HL, Fuller DA, Davis TE, Schwebke JR, Hillier SL (2001). Evaluation of the Affirm Ambient Temperature Transport System for the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species from vaginal fluid specimens. J Clin Microbiol. 39(9): 3197-3199.

Burd EM (2003). Human Papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 16(1): 1-17.

Calderón JE (2002). Diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones de transmisión sexual. Rev Fac Med UNAM. 45(3): 110-117.

Calil LN, Igansi CN, Meurer L, Edelweiss MI, Bozzetti MC (2011). *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus coinfection: association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with pre-neoplastic and neoplastic lesions. Braz J Infect Dis. 15(2): 126-31.

Candido-Murta EF, Hazarabedian de Souza MA, Araujo-Junior E, Jorge-Adad S (2000). Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp. and Human papillomavirus in cytological

smears. Rev Paul Med. 118(4): 105-108.

Carr LP, Felsenstein D, Friedman HR (1998). Evaluation and management of vaginitis. J Gen Intern Med. 13: 335-346.

Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías MM, Solorza G, Lizano M (2003). Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Salud Pública Mex. 46(7): 7-14.

CDC. 2010. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Recommendations and Reports.

CENAVECE, 2011. Boletín de Epidemiología. DGEPI-SALUD.

CENAVECE, 2012. Boletín de Epidemiología. DGEPI-SALUD.

Clifford GM, Smiths JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Can. 88(1): 63-73.

Conde-González C (2000). Perspectiva del estudio de la Infecciones de Transmisión Sexual en la República Mexicana. Enf Infec Microbiol. 20(3): 96-101.

Cox T (2006). Epidemiología e historia natural del VPH. J Family Practice 2(1) 3-9.

Da Ros CT, Schmitt CS (2008). Global epidemiology of sexually transmitted diseases. Asian J Androl. 10(1): 110-114.

Dunne LR, Dunn AL, Upcroft P, O'donoghue JP, Upcroft AJ (2003). Drug resistance in sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell research. 13(4): 239-249.

ENSANUT 2006. Encuesta Nacional de Salud. SSA. México.

Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, Rowe M, Jones M, Gileadi U, Cerundolo V, Man

S (2001). Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol.* 167(9): 5420-5428.

Fagundo-Reynero D (2000). Actualización en entidades patológicas y pruebas diagnósticas: *Chlamydia*. *Rev Mex Patol Clín.* 47(4): 242-244.

Flores-Paz R, Rivera SR, García JE, Arriaga AM (2003). Etiology of cervical vaginal infections among patients of the Juarez hospital of Mexico. *Salud Pública Mex.* 45: S694-7.

Fonck K, Kidula N, Kirui P, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Claeys P, Temmerman M (2000). Pattern of sexually transmitted diseases and risk factors among women attending an STD Kenya. *Sex Transm Dis.* 27: 417-423.

Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefevre P, Kaufman L, Garbar C (2007). Evaluation of Combined General Primer-Mediated-PCR Sequencing and Type-Specific PCR Strategies for determination of Human papillomavirus Genotypes in Cervical cell specimens. *J Clin Microbiol.* 45(3): 928-934.

Franco EL, Duarte-Franco EL, Ferenczy A (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention, and role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J.* 164: 1017-1025.

Fredricks DN, Fiedler TN, Marrazzo JM (2005). Molecular identification of Bacterial associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 353(18): 1899-1911.

Garcia D, Dillard JP (2006). AmiC functions as an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase necessary for Cell Separation and can promote autolysin in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 188(20): 7211-7221.

García-Mundo VE (2011). Evaluación de diferentes métodos para el diagnóstico de vaginosis bacteriana, candidosis y tricomonosis. Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México D.F.

Gaydos CA (2005). Nucleic Acid Amplification Tests for *Gonorrhea* and *Chlamydia*: Practice and Applications. *Infect Dis Clin North Am.* 19(2): 367-386.

Ghanem KG, Giles JA, Zenilman JM. (2005). Fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: The inevitable epidemic. *Infect Dis Clin North Am.* 19(2): 351-365.

Gillet E, Meys JFA, Herstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Vandenberg D (2011). Bacterial vaginosis is associated with uterinecervical human papillomavirus infection. *BMC Infec Dis.* 11: 10-19.

Gissman L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80(2): 560-563.

Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Mohan VP, Mittal A, Das BC (2000). *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect.* 6(2): 88-93.

González-Cardel AM (2010). Estandarización de una PCR múltiple para la detección de patógenos bacterianos causantes de cervicitis. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México D.F.

Gonzalez-Pedraza Avilés A, Mota-Vazquez R, Ortiz-Zaragoza C, Ponce-Rosas RE (2004). Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Aten Primaria.* 34(7): 360-365.

Grosskurth H, Moshe F, Todd J, Mwijarubi E, Klokke A, Senkoro K, Mayaud P, Changalucha J, Nicoll A, ka-Gina G (1995). Impact of improved treatment of sexually transmitted disease on HIV infection in rural Tanzania: randomised controlled trial. *Lancet* 346(8974): 530-536.

Gutierrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V (2009). Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Pública de México*. 51(3): S480-S488.

Hatch T (1996). Disulfide Croos-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in *Chlamidiae*?. *ASM*. 178(1): 1-5.

Hebeler BH, Young FE (1976). Mechanism of autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 126(3): 1186-1193.

Heilman V, Kreienberg R (2002). Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors. *Current Women's Health Reports*. 2: 27-33.

Hernández-Cortez C (2005). Investigación de *Chlamydia trachomatis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en población que asiste a un laboratorio particular. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN. México, D.F

Hernández-García JA (2009). Aislamiento y biotipificación de *Gardnerella vaginalis* a partir de exudados vaginales de mujeres sanas y con leucorrea. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN. México D.F.

Hernández-García JA, Castro-Escarpulli G, Hernández-Méndez JT, Aguilera-Arreola MG (2010). La importancia del diagnóstico oportuno de infecciones bacterianas del aparato sexual femenino que cursan con exudado: *Gardnerella vaginalis*. *Med Lab*. 2(3): 4-12.

Hernández-Martínez F (2009). Frecuencia de aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudados cervicales. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN. México, D.F.

Illades-Aguilar B, Alarcón-Romero LC, Antonio-Vejar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Veneces-Velázquez A, Muñoz-Valle JF,

Leyva-Vazquez MA (2009). Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women Southern Mexico. *Gynecol Oncol.* 117(2): 291-296.

King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, Shah KV, Sobel JD (2011). Bacterial Vaginosis and the Natural history of human papillomavirus. *Infec Dis Obstetr Gynecol.* 319460: 1-8.

Kroupis C, Vourlidis N (2011). Human papiloma virus (HPV) molecular diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 49(11): 1783-1799.

Larsen B, Hwang J (2010). *Mycoplasma, Ureaplasma* and adverse Pregnancy outcomes: A fresh Look. *Infec Dis Obstetr Gynecol.* 521921: 1-7.

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz S, Cruz A, Sha KV, Alonso P, Salmeron J, Hernández M (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 91: 412–420

Lee HS, Boulton IC, Reddin K, Wong H, Halliwell D, Mandelboim O, Gorringer AR, Gray-Owen SD (2007). Neisserial outer membrane vesicles bind the coinhibitory receptor carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 and suppress CD4+ lymphocyte function. *Infect Immun.* 75(9): 4449-4455.

Levi AW, Harigopal M, Hui P, Schofield K, Chhieng DC (2011). Comparison of Affirm VP18 and Papanicolaou tests in the detection of infectious vaginitis. *J Clin Pathol.* 135(3): 442-447.

Lewis MJ (2004). Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe, OPS.

Maciques R, Alonso C (2002). Diagnóstico y síntomas clínicos de la tricomoniasis vaginal. *Rev Ginecol Obstet.* 28(2): 93-9.

Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol.*36(11): 3205-10.

Marrazzo JM, Martin DH, Watts DH, Schulte J, Sobel JD, Hillier SL, Deal C, Fredricks DN (2010). Bacterial vaginosis: identifying research gaps proceedings of a workshop sponsored by DHHS/NIH/NIAID. *Sex Transm Dis.* 37(12): 732-44.

Marrazzo JM (2011). Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: Are we still confused?. *Anaerobe.* 17(4): 186-190.

Martínez MA, Ovalle A, Gaete AM, Lillo E, De la Fuente F, Araneda F, Villaseca R, Salinas H (2011). Comparación de los criterios de Nugent y Spiegel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana y análisis de los resultados discordantes por el método de Ison y Hay. *Rev Med.* 139(1): 66-71.

Martínez-Peña MD (2009). Aislamiento e identificación de cepas de lactobacilos de exudados cervicovaginales. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN. México D.F.

Mateo de Acosta-Andino DA, Marín-Rentería NM, Moreno-Salazar LE, Andino-Valdés NA, Hernández-Arenas LA (2002). Factores de riesgo y estrategias de prevención de la transmisión vertical del HIV/SIDA en países en vías de desarrollo. *Rev Esp Médico-Quirúrgicas.* 7(1): 10-22.

Mantovani F, Banks L (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 20, 7874-7887.

Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, Gottlieb A, Soto G, Iskra T (2000). 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol. 38(7): 2683-2687.

Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F (2010). Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol Infect Dis. 29(12): 1547-1552.

Moodley P, Wilkson D, Connolly C, Moodley J, Sturn AW (2002). *Trichomonas vaginalis* in associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. Clin Infec Dis. 34(4): 519-522.

Muñiz-Becerril BL (2010). Detección de micoplasmas genitales en exudados cervicovaginales en mujeres mexicanas. Tesis Licenciatura. ENCB-IPN. México D.F.

Muñiz-Becerril BL, Hernández-García JA, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG (2010). Detección y resistencia antimicrobiana en muestras de exudado vaginal de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. NOTICONAQUIC. 18(49): 26-28, 37-39.

Muñoz N, Bosch FX, Desanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". N Engl J Med. 348: 518-27.

Murray P, David R, Murdoch MD (2003). Manual of clinical microbiology. ASM Press. USA. 585-599.

Nagaraja P (2008). Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. J Medical Microbiol. 26(2): 155-157.

Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.

Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino de las infecciones de transmisión sexual.

Novoa-Vargas A (2001). Cáncer del cérvix uterino, revisión epidemiológica en latinoamérica. Salud Dgo. 2(2): 21-27.

Nugent R, Krohn MA, Hillier SL (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 29(2): 297–301.

O'Leary A (2011). Are dual-method messages undermining STI/HIV prevention?. Infect Dis Obstet Gynecol. 2011: 691210.

Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN (2008). Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis. Appl. Environ. Microbiol. 4898-4909.

Ojcius MD, Darville T, Bavoil PM (2005). Can *Chlamydia* be stopped?. Scientific American. 72-79.

OMS (2005). Infecciones de transmisión sexual y otras infecciones del tracto reproductivo: una guía para la práctica básica. Salud Reproductiva e Investigaciones Conexas.

OMS (2011). Nota descriptiva N°110. Infecciones de transmisión sexual.

Parada R, Morales R, Guilliano A, Cruz A, Castellsague X, Lazcano-Ponce E (2010). Prevalence, concordance and determinants of human papillomavirus infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico. BMC Infect Dis.10: 223.

Perazzi B, Menghi C, Coppolillo E, Gatta C, Cora M, Méndez O, Vay C, Malamud H, Torres R, Famiglietti A (2007). Investigación de *Trichomonas vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías. Rev Microbiol. 39(2): 99-104.

Persson R, Hitti J, Verhelst R, Vaneechoutte M, Persson R, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, Temmerman M, Paul K, Eschenbach D (2009). The vaginal microflora in relation to gingivitis. BMC Infec Dis. 9(6): 1-8.

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev. 11(2): 300-317.

Rathod SD, Krupp K, Klausner JD, Arun A, Reingold AL, Madhivanan P (2011). Bacterial vaginosis and risk for *Trichomonas vaginalis* infection: a longitudinal análisis. Sex Transm Dis. 38(9): 882-886.

Rivera-Méndez M(2002). Detección de *Chlamydia trachomatis* por la técnica de PCR dirigida al gen *omp1* y al plásmido pCT. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México D.F.

Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, Nardon E, Amirante GA, Patriarca A (1990). Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 58(11): 3751–3758.

Ryu JS, Min DY (2006). *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the republic of Korea. Korean J Parasitol. 44(2): 101-116.

Safaeian M, Herreo R, Hildesheim A, Quint W, Freer E, Van Door LJ, Porras C, Silva S, Gonzalez P, Bratti MC, Rodriguez CA, Philip C (2007). Compararison of the SPF₁₀-LiPA system to the Hybrid Capture 2 Assay for Detectionof Carcinogenic human papillomavirus Genotypes among 5,683 women in Wanacaste, Costa Rica. J Clin Microbiol. 45(5): 1447-1454.

Sánchez-Hernández JA, Muñoz-Zurita G, Mendoza-López E, Coyotecatl-García LL, Enríquez-Guerra MA (2008). Incidencia de *Trichomonas vaginalis* en muestras vaginales del 2001 al 2006 en el Departamento de Biología celular. Sociedad científica de Medicina de La UCV. 6(2): 45-52.

Sayed Zaki M, Raafat D, El Emshaty W, Azab MS, Goda H (2010). Correlation of *Trichomonas vaginalis* to bacterial vaginosis: a laboratory-based study. J Infect Dev Ctries. 29;4(3) :156-63.

Schwebke JR, Hobbs MR, Taylor SN, Sena AC, Catania MG, Weinbaum BS, Johnson AD, Getman DK, Gaydos CA (2011). Molecular Testing for *Trichomonas vaginalis* in Women: Results from a Prospective U.S. Clinical Trial. J Clin Microbiol. 49(12): 4106-4111.

Shim HS, Noh S, Park AR, Lee YN, Kim JK, Chung HJ, Kang KS, Cho NH (2010). Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. BMC Infect Dis 10: 284-291.

Shukla S, Barthi AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, Das BC (2010). Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. Indian J Med Res. 130: 222-233.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) (1996). Surgimiento de la *Chlamydia trachomatis*. Epidemiología. Dr. Benjamín Acosta Cazares. Semana 9. 13(9).

Spiegel CA (1991). Bacterial Vaginosis. Clin Microbiol Rev. 4(4): 485-502.

Solís MR, Vasquez CT, Celis S, Hernández CL (2006). Susceptibilidad de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* ante diferentes antibióticos. Rev Med UV. 6(2): 11-17.

Sobel JD (1997). Vaginitis. N Engl Med. 337(26): 1896-903.

Srinivasan S, Fredricks D (2008). The Human Vaginal Bacterial Biota and Vaginosis Bacteriana. *Interdiscip Perspectet Infec Dis*. 750479. Epub 2009 Feb 16.

Subtil A, Dautry VA (2004). *Chlamydia*; five years A.G. (after genome). *Curr Opin Microbiol*. 7(1): 85-92.

Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H (2007). Association between Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BCM Infect Dis*. 7(128): 1-8.

Taylor-Robinson D (1983). The Role of Mycoplasmas in Non-Gonococcal urethritis: A review. *J Biol Med*. 56: 537-543.

Taylor-Robinson D, Skov J (2011). *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored Butterfly. *Clin Microbiol Rev*. 24(3): 498-514.

Ullmann U, Schubert S, Krause R (1999). Comparative *in-vitro* activity of levofloxacin, other fluoroquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *J Antimicrobial Chemoteraphy*. 43, Suppl. C, 33-36.

Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Clifford GM, Smith JS, Lazcano-Ponce E, Sukvirach S, Shin HR, de Sanjosé S, Molano M, Matos E, Ferreccio C, Anh PT, Thomas JO, Meijer CJ; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2006). Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15: 326-333.

Valassina M, Cusi MG, Corsaro D, Buffi C, Pizzesi G, Valesin PE (1995). Detection by multiplex polymerase chain reaction and typing of *Chlamydia trachomatis* isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 130(2-3): 205-209.

Van Der Pol B (2007). *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. Clin Infect Dis. 1;44(1): 23-5.

Vázquez F, Lepeb JA, Oteroc L, Blancod MA, Aznarb J (2007). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual. Enfer Infecc Microbiol Clin. 26(1): 32-37.

Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, Nicosia R, Chiarini F, Antonelli G, Degener AM (2009). Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. BMC Infect Dis. 12; 9:16.

Waites KB, Katz B, Schelonka RL (2005). *Mycoplasmas* and *Ureplasmas* as Neonatal Pathogenes. Clin Microbiol Rev. 18(4): 757-789.

Watts HD, Fazarri M, Minkoff H, Hillier S, Sha B, Glesby M, Levine AM, Burk R, Palefsky JM, Moxley M, Ahdieh-Grant L, Strickler HD (2005). Effects of Bacterial Vaginosis and other genital infections on the natural history of Human Papillomavirus Infection in HIV-1 infected and high-risk HIV-1 uninfected woman. JID. 191: 1129-1139.

Wen-Jin X, Sikon A, Yen-Lieberman (2011). Cervical cancer screening: Less testing, smarter testing. Cleveland Clin J Med. 78: 737-747.

Wesley C (1991). *Gardnerella vaginalis*: clinical considerations, and controversies. Clin Mmicrobiol Rev. 5: 213-237.

Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP (2001). Mucinasas and Sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infection in the female genital tract. Sex Transm Infect. 77 (6): 402

Wolker CK, Sweet RL (2011). Gonorrhoea infection in women: prevalence, effects,

screening and management. Int J Womens Health. 3: 197-206.

Wright T, Goldie SJ (2008). Screening for cervical cancer. Science. 290: 1651.

16.1 URLs

1. http://www.papillomavirus.cz/eng/diagnosis_kits_innolipa.html
2. <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>
3. <http://www.gruposolti.org/upfiles%5Cnormativa%5Cfitxers/A300.pdf>

17. Anexos

17.1 Reclutamiento (Anexo 1).

¡No pierdas la oportunidad!



Tu participación no sólo podría traer beneficios para ti en el corto plazo, si no también podría beneficiar a más mujeres en el futuro!!!

¿Hace cuánto tiempo no te realizas el Papanicolaou?
 Recuerda que el CÁNCER CERVICOUTERINO es curable si se detecta a tiempo.

¿A dónde acudir?

El laboratorio de Bacteriología Médica de la ENCB-IPN te invita a formar parte de un proyecto de investigación a favor de la salud femenina.

¿Proyecto de investigación? ...

¡Sí!, en este proyecto se investigan nuevos métodos de diagnóstico para infecciones causadas por microbios que habitan la vagina y el útero que te pueden causar daño a veces, ¡sin que te des cuenta!



Estos microbios no sólo causan una simple infección, pueden llegar a Enfermedad pélvica inflamatoria, cáncer e inclusive esterilidad.

Por esta razón es muy importante un diagnóstico oportuno, para así evitar estas terribles consecuencias que afectan tu calidad

¿Me dan resultados?

¡Claro! Los resultados se te entregarán en el mismo lugar, a la misma hora 10 días hábiles después de que se te toma la muestra. O si lo prefieres via correo electrónico.

Lab. Bacteriología Médica
 Depto. Microbiología, ENCB-IPN
 Prof. Carpio y Plan de Ayala s/n
 Col. Plutarco Elías Calles
 Del. Miguel Hidalgo, CP. 11340
 México, D.F.

www.ipn.mx



Este estudio es de **completa seriedad** y todos tus datos se manejan con total **confidencialidad**.



¿En qué consiste?

Se te realizará una toma de exudado cervicovaginal y una muestra sanguínea el cual permitirá poner de manifiesto algunas enfermedades que padezcas.

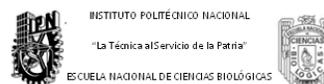
Todo el material que se utilizará en la toma de muestra es nuevo y estéril; se usará una sola vez y será destruido y desechado apropiadamente



¿Quién me tomará la muestra?



La muestra será tomada por Químicas capacitadas y muy profesionales.



¿Molestias vaginales?



¿Para qué esperar?

revisate ahora de manera

!!!GRATUITA!!!

¿Qué debo hacer?

Para participar en este proyecto debes cumplir los siguientes requisitos:

- tener entre 18 y 45 años.
- No estar en tu periodo menstrual.
- No tener histerectomía.
- No estar tomando antibióticos ni que hayas utilizado duchas vaginales al menos 15 días antes.
- Que no hayas tenido relaciones sexuales por lo menos 3 días antes de que acudas a tu revisión.



Si cumples estos requisitos pide una cita de lunes a jueves de 8:00 a 16:00 hrs. llamando al teléfono: 57296000 ext. 62374 a partir del 5 de agosto de 2010 o al 0445525005797 con la Dra. Guadalupe Aguilera o Q.B.P. Alfredo Hernández. Si lo prefieres también puedes escribirnos al correo electrónico:

17.2 Criterios de inclusión (Anexo 2)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN			Protocolo MICROBIOTA FACTOR ENCB-IPN
N° Centro	N° Sujeto	Iniciales	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
1. Mujer entre 18 y 45 años de edad			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
2. La paciente ha tenido actividad sexual intravaginal alguna vez			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
3. La paciente está dispuesta a firmar el Consentimiento Informado			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
4. La paciente está dispuesta a completar una encuesta relacionada con su vida sexual y/o posible sintomatología			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
5. La paciente está dispuesta a cumplir con los requisitos establecidos por el laboratorio (previos a la toma de muestras vaginal y cervical)			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
6. La paciente NO está tomando antibióticos o antimicóticos orales o aplicando tópicos en el área vaginal			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
7. La paciente NO ha tomado antibióticos o antimicóticos en los últimos 30 días.			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
8. La paciente NO está embarazada			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
9. La paciente NO tiene sospecha de estar embarazada			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
10. La paciente NO tiene histerectomía			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
11. La paciente NO participa en ningún otro protocolo de investigación			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
12. La paciente NO toma retinol o ácido fólico			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
13. La paciente NO ha tenido tratamiento colposcópico			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
14. La paciente NO toma algún tratamiento hormonal diferente al método anticonceptivo			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
15. La paciente NO tiene alguna enfermedad crónico degenerativa			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No
16. La paciente utiliza algún método anticonceptivo diferente al "ritmo" ¿Cuál?			<input type="text"/> Si <input type="text"/> No

NOTA: Las respuestas a las preguntas 1 a 15 deben ser SI para que la paciente pueda ser incluida en el PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

17.3 Consentimiento informado (Anexo 3)

Descripción.

Usted está siendo invitada a participar en una investigación sobre los microorganismos que viven en la vagina y el útero, ya sea de manera normal o causándole alguna molestia o enfermedad. Esta investigación es realizada en el laboratorio de Bacteriología Médica del departamento de Microbiología y en el Laboratorio II de Graduados del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y será dirigida y supervisada por de las profesoras Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola y la M. en C. Azucena Aguirre y sus equipos de trabajo.

El propósito final de esta investigación es: ofrecer un diagnóstico oportuno a la población femenina afectada con infecciones microbianas a nivel de vagina y cérvix, aportar información actual epidemiológica sobre la incidencia de las infecciones que frecuentemente aquejan a las mujeres en edad reproductiva.

Usted fue seleccionada para participar en esta investigación debido a que presenta síntomas de infección cervical y/o vaginal o requiere realizarse un chequeo preventivo, tiene entre 18 y 45 años de edad, tiene vida sexual activa, no está embarazada, no está en tratamiento hormonal, no está hysterectomizada y no está tomando o ha tomado antibiótico o antimicótico en el último mes.

Si acepta participar en esta investigación se le tomará una muestra de exudado vaginal-cervical y una muestra de sangre periférica por punción venosa, completar un cuestionario y firmar el presente consentimiento informado.

La información del presente formato y las muestras deberán ser proporcionadas voluntariamente. El participar en este estudio le tomará el tiempo necesario para realizar las actividades antes mencionadas. La muestra se analizará y los resultados obtenidos serán entregados al centro, laboratorio o institución a la que acudió usted en un plazo no mayor a 15 días hábiles. La paciente en ningún momento deberá pagar por este servicio.

Riesgos y beneficios.

La presente investigación tiene riesgo mínimo para la paciente y se circunscribe a aquel relacionado con las molestias que se le ocasionan durante y después de la toma de muestra. Para prevenir las molestias la toma de muestra la realizará un médico, enfermera o química experimentada quien le explicará brevemente el procedimiento antes de comenzar la toma de muestra. No obstante, Usted podría sentir incomodidad al momento en que se le introduce el espejo vaginal. Posterior a la toma de muestra Usted podría sentir irritación y dolor abdominal. Si tiene en el área de la toma de muestras tejido frágil o friable se le puede provocar un ligero sangrado al momento de la toma de muestra; en cuanto a la toma de sangre le podría causar un hematoma (moretón) en el sitio de la punción.

Usted no tendrá en el corto plazo ningún beneficio extra a la obtención de un diagnóstico oportuno (y en su caso acceder a una consulta médica gratuita); en caso de ser una paciente con anomalías en su resultado de Papanicolaou y/o resultar con el virus del papiloma humano, usted será invitada a participar en una segunda etapa de la investigación en la cual se le ofrecerá un tratamiento de rutina apropiado para su enfermedad complementado con factor de transferencia con un seguimiento a su evolución médica durante un año, tiempo durante el cual tendrá que acudir a las tomas de muestras cervical y sanguínea a los 3, 6, 12 y 18 meses de tratamiento. También se le puede ofrecer examen de colposcopia y biopsia en caso de ser necesario.

Confidencialidad.

Su identidad será protegida en todo momento por lo realizadores del estudio. Toda la información o datos que puedan identificar a la participante serán manejados confidencialmente por medio del uso de iniciales y una clave numérica. Los datos de la paciente, incluyendo esta hoja de consentimiento, solo serán conocidos por los investigadores, el personal de laboratorio que le toma la muestra y le realiza la encuesta. La documentación se archivará en expedientes bajo llave durante al menos 5 años de tal manera que la información proporcionada en la encuesta y el resultado de laboratorio obtenido sean confidenciales y sólo serán empleados para propósitos de enseñanza e investigación y en ningún momento se revelará el nombre de la paciente. Los datos que se obtengan de la encuesta podrían ser publicados en revistas de divulgación y/o investigación sin mencionar el nombre o iniciales de la paciente.

Al contestar la encuesta, usted aporta datos que son de utilidad para correlacionar factores de riesgo o predisponentes con la enfermedad que tiene. En el caso de pacientes aparentemente sanas que aceptan el estudio para control médico el resultado del estudio es preventivo y la información proporcionada resulta de vital importancia para dar veracidad a los factores de riesgo o predisponentes encontrados en las pacientes con algún tipo de infección.

Incentivos.

Usted no recibirá ningún tipo de incentivo monetario por participar en el estudio.

Derechos.

Si tiene alguna pregunta o desea más información sobre esta investigación por favor siéntase en la libertad de hacerla en cualquier momento.

Si ha leído este documento y ha decidido participar, por favor entienda que su participación es completamente voluntaria y que usted tiene derecho a abstenerse de participar o retirar su consentimiento en cualquier momento, sin ninguna penalidad. Además tiene derecho a recibir una copia de este documento.

Al firmar este documento la paciente manifiesta que voluntariamente: proporcionó la información vertida en este formato, permite que las bacterias obtenidas de sus muestras y sus muestras sean conservadas y utilizadas en estudios posteriores de investigación realizados en los laboratorios de Bacteriología Médica y de graduados II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y que los datos obtenidos sean publicados siempre y cuando no se revele su identidad.

Su firma en este documento significa que ha decidido participar después de haber leído y discutido la información presentada en esta hoja de consentimiento. Los testigos con su firma confirman que la paciente leyó y discutió con el personal que la atiende la información presentada en esta hoja de consentimiento, firmó voluntariamente este formato y que se le aclararon sus dudas con respecto a esta investigación.

Nombre completo del paciente	3 Iniciales	Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
Nombre e iniciales del testigo 1		Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
Nombre e iniciales del testigo 2		Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
Nombre e iniciales de la persona que tomó la muestra		Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
Nombre e iniciales de la persona que explicó consentimiento		Firma	Fecha dd/mmm/aaaa

17. 4 CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO (ANEXO 4).

Fecha de toma de muestra:		_____		Número de muestra:		_____	
		día / mes / año				Registro	
Iniciales del paciente:		_____		_____		_____	
		Inicial primer nombre		inicial segundo nombre (si lo tiene)		inicial apellido paterno	
						inicial apellido materno	
Edad: _____ años		Fecha de nacimiento:		_____		_____	
				día		mes	
						año	
Estado civil:		Soltera		Casada		Divorciada	
						Viuda	
						Otro: _____	
¿A qué edad inició su vida sexual? _____ años		No. de parejas sexuales desde el inicio de su vida sexual: _____		Actualmente tiene vida sexual activa		SI	
						NO	
No. de parejas sexuales actuales:		Una ?		Dos ?		De 3 a 5 ?	
						Más de 5 ?	
Hábito sexual actual:		Heterosexual ?		Homosexual ?		Bisexual ?	
Fecha de última regla:		_____		No. de embrazos: _____ No. de abortos: _____		Fuma _____ ¿Con qué frecuencia? _____	
		día mes año					
¿Usa algún método anticonceptivo?		A continuación indique con una cruz ¿qué método usa:					
SI NO		Hormonal (pastillas, inyección):				?	
		Dispositivo (DIU, vainilla):				?	
		Método de barrera (condón):				?	
		Menopausia, esterilidad:				?	
		Otros (óvulos con espermicida):				?	
Usa duchas vaginales: ??		SI		NO			
¿Con qué frecuencia usa las duchas vaginales?		Diario		Semanal		Mensual	
						Ocasionalmente	
¿Cuáles es el nombre del producto (s) que usa?		Antecedentes de cáncer cervicouterino o diagnóstico de VPH _____ ¿Que tiempo tiene? _____ ¿Ha recibido vacuna contra VPH? _____					
La paciente acude porque: ?		siente molestias ?		requiere de revisión médica general			
		estuvo en tratamiento recientemente		otro (especifique): _____			
¿Tiene Usted alguna de las siguientes molestias?:							
secreción ?		ardor ?		comezón ?		dolor al orinar ?	
						dolor al tener relación sexual?	
La secreción tiene mal olor:		siempre		nunca		algunas veces	
						frecuentemente	
Podría decir a que le recuerda el olor de la secreción:				?		SI	
						NO	
a pescado ?		ácido		afutado		Otro: _____	
Otras molestias, especifique cuales a continuación:							
Ocupación:							