



Universidad de Valladolid

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA DE LA
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

TESIS DOCTORAL:

**OFTALMIA NEONATAL- PROFILAXIS CON POVIDONA
IODADA Y AGENTES DE TRANSMISIÓN VERTICAL:
ESTUDIO INTERVENCIONAL EN DOS UNIDADES MATERNO-
INFANTILES EN LUANDA**

Presentada por:

DÑA. ISABEL ROSARIO DOS SANTOS COSTA ALEXANDRE para optar
al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. José Carlos Pastor Jimeno / Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas y instituciones han contribuido a la realización de esta tesis doctoral, en particular mis agradecimientos van dirigidos a las siguientes personas y instituciones:

Al Prof. Dr. José Carlos Pastor Jimeno por todo el apoyo dado al Instituto Nacional de Oftalmología Angola a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) (más de 15 años), lo que hizo posible la estancia final de un total de nueve residentes del Instituto Oftalmológico Nacional (IONA) en el IOBA (yo fui una de ellos). Por la posibilidad de obtener mi maestría en Master Interuniversitario en Ciencias de la Vision de la de la Universidad de Valladolid, por todo el apoyo, estímulo y orientación valiosa sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo esta tesis.

A la AECID que dio los fondos para la etapa final en IOBA así como el financiamiento para la realización de este trabajo, en un programa de fortalecimiento del IONA, lo que permitió a la institución a seguir siendo lo que es hoy: un centro de referencia terciario en Oftalmología en Angola.

Al Prof. Raúl Ortiz de Lejarau que desde el principio creyó en este estudio al que ha dedicado esfuerzos personales y del Servicio de Microbiología e Inmunología para que llegara a buen puerto. Desde que en 2009 presentara al Prof. Pastor para una sesión clínica de Servicio, primero Annia López Olivares y luego con intensa dedicación Mar Justel fueron propuestos para este trabajo. Suya fue la idea de incluir el diagnóstico de Mycolasma validando dos técnicas de detección molecular en las muestras, Aunque no le conozca personalmente debo reconocer su esfuerzo y tésón.

Al Dr. Prudencio Martínez: PhD en Microbiología - colaborador del IOBA, por el apoyo en la selección del material de los cultivos, la formación y la capacitación del equipo de trabajo para la recogida de las muestras, y por la coordinación en el envío de las muestras a Valladolid.

A la Dra. Mar Justel: por la puesta a punto y ejecución de las pruebas de diagnóstico molecular y la coordinación con los oftalmólogos para la remisión y conservación de las mismas en el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y por su valiosa participación en el trabajo, en particular en la difusión de los resultados.

Al Dr. Néstor Cortés residente de Oftalmología en Valladolid y colaborador del IOBA, por su participación en el estudio piloto previo en el Hospital General Especializado Augusto N'Gangula (HGEAG).

A la Dra. Itziar Fernández, PhD en Estadística del IOBA, por la realización de todos los aspectos estadísticos del trabajo, desde los cálculos del tamaño de la muestra hasta al tratamiento estadístico de los resultados.

A los laboratorios Thea de España y a Alcon-Cusi, en la figura de su Director General Enrique Chico por su generosa aportación al proyecto

Al Dr. Hermano David como el Director del IONA por toda la disponibilidad y apoyo en las tareas administrativas relacionadas con la preparación de la tesis.

A todos los especialistas del IONA por todo el apoyo en las exploraciones oftalmológicas de los recién nacidos de la muestra.

A la Dra. Elizabeth Pinto, MSc. en Salud Pública y profesora del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Agostinho Neto (FMUAN), por los válidos consejos en relación con los aspectos epidemiológicos del estudio.

A los Drs. Alda Rola, Amélia Wime, Alcina Copitule, Walter Brás, especialistas del IONA por el apoyo en la recogida de los datos en el estudio piloto previo a la elaboración de la tesis.

A las Dras. Celma Brás, Alzira Fernandes y Ana Ventura Domingos (en la ocasión alumnos del curso médico-quirúrgico de la FMUAN) por su apoyo en la recopilación de los datos, a menudo en períodos de más de 12 horas en el Hospital Geral Especializado Augusto N'Gangula y en el Centro de Saúde da Samba.

Al Dr. Claudino Francisco Cipriano, médico del HGEAG, por el importante apoyo en el entrenamiento de la equipo de trabajo para la recogida de las muestras cervicovaginales de las embarazadas.

A la Clínica Sagrada Esperança, en Luanda, en la persona de su Director, el Dr. Rui Pinto y de la Jefe del Laboratorio Clínico: Dr^a. Marta Isabel Epalanga, por el invaluable apoyo dado en la preservación de las muestras para la prueba de amplificación de ácido nucleico antes del envío a España.

A las Direcciones del Hospital Geral Especializado Augusto N`Gangula y del Centro de Saúde da Samba por el permiso para la recogida de datos en sus unidades

A las parteras de las unidades mencionadas anteriormente por la colaboración durante la recogida de datos.

“Algo es sólo imposible hasta que alguien lo duda y decide probar lo contrario ”.

Albert Einstein

A mi madre, a mi marido y a mis hijos

1. ÍNDICE

i.	Lista de abreviaturas	
ii.	Financiación	
iii.	Difusión científica	
2.	JUSTIFICACION	11
3.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
4.	OBJETIVOS	16
4.1.	Objetivo general.....	16
4.2.	Objetivos específicos	16
5.	INTRODUCCIÓN.....	17
5.1.	Oftalmia neonatal, oftalmia de recién nacido: concepto.....	17
5.2.	Etiología y cuadro clínico	17
5.2.1.	Conjuntivitis química	18
5.2.2.	Conjuntivitis neonatal infecciosa.....	18
5.2.3.	Cuadro clínico y tratamiento de la ON infecciosa	19
5.2.4.	Epidemiología de la ON.....	25
5.3.	Profilaxis de la oftalmia neonatal	29
5.4.	Pacientes, material y métodos.....	32
6.	RESULTADOS	43
7.	DISCUSION.....	53
8.	CONTINUACIÓN DEL TRABAJO.....	56
9.	CONCLUSIONES.....	57
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
11.	ARTÍCULOS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AAFP: *American Academy of Family Physicians*

ADN/ARN: Ácido desoxirribonucleico/ácido ribonucleico

AECID: Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo

CDC: *Centers for Disease Control*

CCS: Centro de Saúde da Samba

CT-ADN: *Chlamydia trachomatis*-ácido desoxirribonucleico

CT: *Chlamydia trachomatis*

EIA: Enzimo inmunoanálisis

ITS: Infecciones de transmisión sexual

FM-UAN: Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto

VIH: Vírus de la inmunodeficiencia humana

VHS: Vírus del Herpes Simple

HGEAN: Hospital Geral especializado Augusto N'Gangula

IOBA: Instituto Universitário de Oftalmobiología Aplicada

IONA: Instituto Oftalmológico Nacional

IPV: Infección pélvico-vaginal

MINSA: Ministério da Saúde de Angola

MG: *Mycoplasma genitalium*

MRC-5: *Medical Research Council -5*

NG: *Neisseria gonorrhoeae*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Oftalmia neonatal, oftalmia neonatorum, oftalmia del recién nacido

PCR: Reacción en cadena de la polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

P-I: Povidona iodada

RN: Recién nacido

SD: *Standard deviation*

SNC: Sistema nervioso central

FINANCIACIÓN

El presente estudio ha contado con la financiación del Gobierno de España a través de una subvención estatal concedida al Instituto Nacional de Oftalmología (IONA) por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID): Proyecto de referencia: 2618/08. Uno de los objetivos de la subvención era el de iniciar la investigación aplicada en Oftalmología en Angola.

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo dio lugar a los siguientes artículos científicos:

1-Alexandre I, Cortes N, Justel M, Fernández I, Ortiz de Lejarazu R, Pastor JC “*The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola. J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2014;4:1. doi: 10.1186/1869-5760-4-1. Impact factor: 0.603

2- Justel M, Alexandre I, Martínez P, Sanz I, Rodríguez-Fernández A, Fernández I, Pastor JC, Ortiz de Lejarazu R. “*Vertical Transmission of Bacterial Eye Infections, Angola, 2011-2012.*” *Emerging Infectious Diseases* 2015;3:471-73” impact factor: 7.327

3- Alexandre I, Justel M, Martínez P, Ortiz de Lejarazu R, Pastor JC. “*First attempt to implement Ophthalmia Neonatorum prophylaxis in Angola: Microorganisms, efficacy, and obstacles*”. “*Journal of Ophthalmology*” *Ophthalmology*<http://dx.doi.org/10.1155/2015/326526> impact factor: 0.821

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos científicos:

Pastor JC, Alexandre I. *Development of a National Prophylactic Program Against Neonatal Conjunctivitis in Angola: Pilot Study. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 5056 (ARVO poster).

Justel M. Alexandre I, Sanz I, Martínez P, Almamsa A, Bermejo JF, Pastor JC, Ortiz Lejarazu R. *Prevalence of Chlamydia trachomatis infection in African mothers and their newborns by PCR techniques Poster ECCMID 2013 Berlin – eP713.*

M.M. Justel, I. Alexandre, I. Sanz, A. Rodriguez, P. Martinez, R. Almansa, J.F. Bermejo, J.C. Pastor, R. Ortiz de Lejarazu. *Infecciones oculares en recién nacidos de madres portadoras de bacterias de transmisión sexual en una población africana.* XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Zaragoza, 29-31 de Mayo 2014.

2. JUSTIFICACION

La oftalmía neonatal (ON) o conjuntivitis aguda del recién nacido (RN) es una enfermedad aguda o subaguda de variada etiología (infecciosa y no infecciosa) y en la que están implicados con mayor frecuencia microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) y *Chlamydia trachomatis* (*C.Trachomatis*)^{1,2,3,4,5,6}. La ON es una de las causas principales de ceguera infantil en todo el mundo especialmente en los países en desarrollo. De acuerdo con los datos del programa "Visión 2020, derecho a ver", iniciativa mundial para la eliminación de la ceguera evitable de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ON es responsable de 10.000 niños ciegos por año en todo el mundo y de ellos 4.000 en el continente africano³.

En general, la incidencia y la prevalencia de esta enfermedad varían según el nivel socio-económico del país, y de factores determinantes como la presencia y calidad de la atención primaria de salud prestada a las mujeres embarazadas y a los RN^{4,5,7}. En los Estados Unidos la incidencia de ON varía de 1-2 casos por 1000 RN aunque en un estudio realizado en Kenia la incidencia fue de 23 casos/1000 RN^{5,8,9}.

Los factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad del RN a la ON están bien identificados, a saber:

- a) Las infecciones de las mujeres embarazadas por infecciones de transmisión sexual (ITS), siendo los agentes de la ON una imagen en espejo de estas infecciones⁵.
- b) La falta de detección y tratamiento de las ITS durante el cuidado prenatal de las mujeres embarazadas, que conducen a la contaminación de los ojos del RN durante el paso por el canal del parto o incluso la contaminación ascendente del feto antes del nacimiento^{10,11}.
- c) La ausencia de medidas profilácticas en neonatos para la prevención de la ON⁷.

Por otro lado las estimaciones de la OMS para el año 2008 indicaban una incidencia general de ITS de 498,9 millones, con valores más altos en los países en desarrollo en especial en los continentes de África y Asia¹². La región de África comprende 46 países (que incluyen a Angola) con una población sexualmente activa de 15-49 años de edad

estimada en 384,4 millones y con una incidencia total estimado de las ITS de 92,6 millones ¹².

Respecto a los microorganismos implicados en la etiología de las ITS en África, 8,3 millones de casos se refieren a la infección por *C. trachomatis* y 21,1 millones de casos de infección por *N. gonorrhoeae* ¹². Para agravar esta situación en los países en general y en particular en los países en desarrollo, con la excepción de VIH, las enfermedades de transmisión sexual no se tratan como un problema de salud pública y existe una gran necesidad de desarrollar programas de detección y del control de estas enfermedades ^{10,13,14,15,16}.

Por otro lado los estudios en África indican que, junto con la insuficiente cobertura en la atención primaria de salud, los factores socio-económicos se encuentran entre los principales factores que determinan la falta de programas de detección de ETS en las mujeres en edad fértil y de una supervisión adecuada durante el embarazo, que debería incluir la detección sistemática de ITS en las mujeres embarazadas en situación de riesgo, de acuerdo con las recomendaciones de los servicios de salud de los países desarrollados, según las directrices de la OMS ^{8,16,17,18,19,20}.

También es muy importante la correcta identificación de los agentes de ITS implicados en la ON, entre otras cosas, para poder instaurar un tratamiento adecuado y para la prevención de complicaciones en las madres y en sus RN afectados. Sin embargo, la identificación de estos agentes es un problema adicional en los países en desarrollo ya que las pruebas simples de laboratorio como la tinción de Gram, azul-de-metileno y Giemsa, no presentan la sensibilidad necesaria para un diagnóstico preciso principalmente para la identificación de *C. trachomatis* (en la actualidad el principal agente de ON en todas las regiones) ²¹. Sin embargo, estas son las técnicas que podrían ser fácilmente realizadas, *in situ*, por los médicos y los técnicos no expertos en Microbiología.

Actualmente, las pruebas técnicas y cultivos y especialmente las técnicas basadas en la PCR se consideran como el "*gold-estandar*" para la identificación de los agentes de la ON ^{21,22,23}.

Los microorganismos responsables principales de la ON están bien establecidos. Sin embargo por los factores de riesgo en el entorno africano, otros agentes pueden adquirir importancia en su etiología¹².

Las pruebas diagnósticas de laboratorio que pueden implantarse deben tener en cuenta los microorganismos más comunes. A este respecto *Mycoplasma genitalium*, que ha sido poco investigado, es un microorganismo cada vez más implicado en las infecciones urogenitales en los hombres y mujeres. Este microorganismo podría desempeñar un papel importante en la morbilidad ocular en el RN. *M. genitalium* es un agente emergente que se identifica mejor por técnicas de amplificación de ADN, debido a sus características fisiológicas y estructurales y la necesidad de medios especiales para su cultivo^{24,25}.

Por los factores apuntados, bebés nacidos de mujeres en los países en desarrollo están en mayor riesgo de desarrollar la oftalmia neonatal y desgraciadamente en estos países en general, no existen programas para su profilaxis rutinaria en los RN^{5,10,16}.

Aunque no hay consenso en la comunidad médica con respecto al uso rutinario de profilaxis ocular para ON, ni sobre los agentes a utilizar, el hecho de que los RN de algunos países en desarrollo (entre los que se encuentra Angola) constituyan un grupo de riesgo para la ON, hace necesario plantear la realización de una profilaxis en estas regiones donde esta enfermedad sigue siendo responsable de 4.000 niños ciegos cada año^{7,25}.

En cuanto a los agentes utilizados para la profilaxis, varios estudios han puesto de relieve a la povidona iodada (P-I) por presentar ventajas con respecto a los costos y la manipulación y por el hecho de que hasta el momento no se han producido resistencias bacterianas, junto con su acción de amplio espectro, características que hacen de esta sustancia un elemento eficaz contra la mayoría de los patógenos bacterianos y virales de la ON^{14,27,28,29,30,31}.

Angola es parte de los países en que la conjuntivitis neonatal aguda sigue desempeñando un papel importante en el mal pronóstico visual de los RN, pero después de consultar con las principales unidades materno-infantiles del Ministerio de Salud en Luanda no

encontramos, en la mayoría de estas instituciones, un plan rutinario de profilaxis de la conjuntivitis aguda de los RN. Y sin embargo, en un estudio piloto previo al presente estudio realizado por este equipo en 2010 en el HGEAG, muchos de los recién nacidos con patología ocular presentaban signos y síntomas compatibles con ON, resultados similares a los encontrados en otros los estudios en África que presentan la ON como la patología ocular con mayor frecuencia en los RN^{13,32}.

A esto se añade el hecho de que, actualmente, en Angola no hay estudios que identifiquen cuales son los agentes etiológicos más frecuentes de la ON, siendo la identificación un primer paso importante para guiar correctamente tanto las medidas terapéuticas como las profilácticas y para mejorar el pronóstico visual y también vital de los RN (ya que los agentes pueden tener diseminación sistémica y causar enfermedades sistémicas graves e incluso la muerte).

Al ser los agentes de la ON una imagen en espejo de las ITS maternas, los resultados de este trabajo podrían también proporcionar información importante para los profesionales de la salud involucrados en la salud materna, y pueden servir de orientación sobre las acciones a tomar para la detección y control de ETS en las mujeres en edad fértil y el en cuidado prenatal de las mujeres embarazadas.

A pesar del reconocimiento de la eficacia de la P-I, en la literatura revisada no se han encontrado referencias que la consideren como el “patrón” en la profilaxis de la conjuntivitis neonatal aguda^{7,33}. Sin embargo la realización de estudios para aumentar la evidencia científica de su eficacia puede contribuir a su uso como un agente profiláctico de elección^{14,33}.

La identificación de los principales microorganismos implicados en la ON en nuestro medio constituye también una necesidad por lo que se plantea como objetivo de este trabajo, el utilizar métodos microbiológicos sencillos que pudieran ser ejecutados por los oftalmólogos y otros profesionales de la salud, así como evaluar la eficacia en la utilización de los métodos basados en las técnicas de PCR para el diagnóstico etiológico de la ON.

Con todos los resultados del presente trabajo, se ha planteado el proponer al Ministerio de Salud de Angola (MINSA) un plan sistemático para la profilaxis de la ON que debería extenderse a todas las maternidades del país.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En un estudio piloto realizado en 2010 en el Hospital General Especializado Augusto N'Gangula se detectó que los RN con cuadros compatibles clínicamente con la ON representaron el 10% del total de la patología visual presentada por los bebés (prevalencia 10 veces mayor que la encontrada en los países industrializados). La falta de un plan sistemático de profilaxis puede haber contribuido significativamente a este resultado. Por otro lado, la ausencia de información sobre los agentes causales de la ON imposibilitan instaurar un tratamiento empírico basado en la evidencia científica, que pudiera ser eficaz.

Con estos elementos se planteo la siguiente hipótesis de trabajo:

Es posible identificar los microorganismos mas frecuentemente implicados en la ON en Luanda mediante técnicas de diagnóstico microbiológico sencillas, y es factible realizar una aproximacion a estos gérmenes mediante la colaboracion con el Servicio de Microbiología e Inmunologia del Hospital Clinico Universitario de Valladolid, mediante técnicas basadas en PCR.

Y por ultimo es posible reducir significativamente los casos de ON instilando sistemáticamente en todos los recién nacidos una gota de povidona yodada al 2,5%.

Los resultados de este estudio podrían proporcionar la base necesaria para la implementación de un programa nacional de prevención de la ON en Angola.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

El objetivo general ha sido comprobar mediante un estudio prospectivo, intervencional, y aleatorizado, con grupo control, la eficacia y seguridad de la instilación de una gota de un colirio de povidona iodada al 2,5% como profilaxis de la ON.

Como objetivo secundario se trató de obtener datos sobre la etiología de las ON en las maternidades de Luanda mediante procedimientos microbiológicos simples que podrían ser utilizados, *in situ* por los oftalmólogos o por personal sanitario no especialista en microbiología.

Adicionalmente con procedimientos basados en PCR determinar la frecuencia de aparición de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *M. genitalium* en las madres parturientas y en las conjuntivas de sus RN y la relación existente entre la identificación de uno o varios gérmenes y el desarrollo de cuadros clínicos.

4.2. Objetivos específicos

- 1- Describir las características de los recién nacidos en HGEAG y en Centro de Saúde da Samba y de sus madres recogiendo los factores biológicos, factores socioeconómicos maternos, factores prenatales y factores natales.
- 2- Identificar en las madres, mediante anamnesis e en los datos en sus fichas médicas prenatales, la presencia de factores de riesgo para la ON.
- 3- Describir la frecuencia de la patología oftalmológica externa en los RN de la muestra.
- 4- Comprobar que la solución de povidona iodada al 2,5% es un agente profiláctico eficaz de la ON reduciendo significativamente su prevalencia
- 5- Evaluar la eficacia de la utilización de los métodos microbiológicos simples y métodos basados en PCR para la identificación de los microorganismos principales en las muestras tanto de las madres como de los RN, con y sin signos clínicos de conjuntivitis aguda.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. Oftalmia neonatal, oftalmia de recién nacido: concepto

La ON es una conjuntivitis aguda o subaguda que ocurre en el primer mes de vida del RN, y que se presenta con secreciones oculares asociadas a quemosis y edema palpebral³. Es un problema global que ocurre en aproximadamente el 7-19% de todos los RN².

En la mayoría de los casos, la ON se adquiere durante el paso del niño por el canal del parto aunque también se puede desencadenar por la exposición del RN a los microorganismos en el período postnatal^{3,4,5}. Fue descrita por primera vez en 1.750 y a pesar de una disminución significativa en la prevalencia en el siglo XIX sigue siendo una causa importante de morbilidad ocular, especialmente en los países en desarrollo donde según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) causa la ceguera de 10.000 niños cada año^{3,5}. Es una emergencia médica y muchos casos están asociados con la afectación sistémica que puede determinar un mal pronóstico vital del RN^{2,34}.

5.2. Etiología y cuadro clínico

El globo ocular posee varios mecanismos de defensa contra infecciones externas, tales como el cierre reflejo de los párpados que permite la cobertura y la protección de la córnea por la película lagrimal y los mecanismos de la inmunidad específicos y no específicos. En el parto vaginal los mecanismos de la protección de los párpados son ineficaces para proteger la superficie externa del globo ocular que queda expuesto a la inoculación de la flora vaginal materna. Por otra parte, los mecanismos inmunes específicos están poco desarrollados en el RN jugando un papel insignificante en la protección del globo ocular contra la agresión de los organismos infecciosos^{1,3}. La etiología de la ON es variada, puede ser infecciosa (bacteriana o viral) y no infecciosa (secundaria al uso de agentes químicos, tales como nitrato de plata, antibióticos tópicos o povidona yodada)^{3,5}.

5.2.1. Conjuntivitis química

La conjuntivitis química es aún común en las zonas que continúan utilizando nitrato de plata como agente profiláctico y afecta al 90% de los niños que reciben este tipo de profilaxis. Se presenta en la primera hora después del parto como resultado de la irritación causada por el nitrato de plata al 1% ^{5,8}. Origina una conjuntivitis moderada a severa con secreción serosa, a menudo reversible sin tratamiento durante un período de 36 horas a 44 horas. Debido a la sustitución de nitrato de plata por otros agentes profilácticos (tetraciclina, eritromicina) se ha producido una reducción en los casos de conjuntivitis por este agente químico. Otro antiséptico, la povidona yodada utilizada para la profilaxis de ON también puede causar una conjuntivitis tóxica 24 horas después de la instilación y que por lo general se resuelve sin tratamiento ^{5,15,34,35}.

5.2.2. Conjuntivitis neonatal infecciosa

La etiología infecciosa de la ON varía en función de características epidemiológicas y de desarrollo de cada área geográfica, siendo en general un reflejo de la prevalencia local de las ETS ^{3,5,8}. Los microorganismos más comunes comprenden: *Chlamydia trachomatis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, y otros bacilos Gram-negativas. El agente etiológico más común de la ON 5viral es el Herpes simple (HSV) ^{1,2,3,5,13,34,36}.

Debido a la variación geográfica de los microorganismos implicados en la ON es de suma importancia la utilización de pruebas de laboratorio en el manejo inicial de estos cuadros para la identificación de los agentes etiológicos específicos, así como para instaurar el tratamiento adecuado y realizar una correcta prevención de las complicaciones ⁶.

5.2.3. Cuadro clínico y tratamiento de la ON infecciosa

5.2.3.1. Oftalmia por *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis es un parásito intracelular obligado porque a pesar de presentar las características generales de las bacterias depende del trifosfato de adenosina del anfitrión para sus necesidades de energía. *C. trachomatis* existe en dos formas: los cuerpos elementales que no son capaces de replicación mas que constiuye la forma infecciosa y los corpúsculos reticulares, forma intracelular con capacidad de replicación y que origina los cuerpos de inclusión. Entre 18 a 48 horas después de la infección los corpúsculos reticulares se reorganizan en corpúsculos elementales más pequeños, entre 48 y 72 horas después de la infección la célula infectada se rompe y libera las formas infecciosas²³.

Las células infectadas por *C. trachomatis* son limitadas. Incluyen las células epiteliales de las membranas mucosas de la uretra, endocérvix, endometrio, trompas de Falopio, el tracto respiratorio y la conjuntiva. Las *chlamydias* penetraran a través de pequeñas abrasiones y laceraciones y las manifestaciones clínicas son causados por la destrucción directa de las células durante la replicación y la respuesta de las citoquinas inflamatorias estimuladas por *C. trachomatis*. La infección no confiere inmunidad y la reinfección induce una respuesta inflamatoria de alta intensidad con lesión tisular subsiguiente. A nivel de los ojos esta respuesta produce una conjuntivitis crónica, neovascularización corneal, cicatrización corneal con pérdida de la transparencia y la consiguiente reducción de la agudeza visual^{1,2,23,34}.

Los bebés que nacen por vía vaginal de madres con infección activa tienen un 50-70% de riesgo de tener la conjuntiva, nasofaringe, el recto y la vagina colonizadas por *C. trachomatis*³⁴. La ON se desarrolla en aproximadamente 30 a 50% de los recién nacidos expuestos y de estos 15 a 20% desarrollan neumonía intersticial difusa³⁴. La ON por *C. trachomatis* se presenta por lo general entre 6 a 26 días después del parto y se caracteriza por edema palpebral, secreción serosanguinolenta y posteriormente mucocopurulenta, pudiendo estar asociada a pseudomembranas. Cuando se deja sin tratar causa una conjuntivitis crónica con neovascularización de la córnea y

cicatrización². En algunos RN por cesárea y vía vaginal la infección se presenta dentro de 24 horas después del parto lo que sugiere que la infección también se puede adquirir intrauterino^{11,34}.

Diagnóstico

La conjuntivitis por *C. trachomatis* puede ser diagnosticada a través de los hallazgos citológicos, serológicas, por cultivo y por métodos de amplificación de los ácidos nucleicos³⁷. Debido a su alta especificidad y baja probabilidad de contaminación el cultivo sigue siendo una técnica útil para el diagnóstico de *C. trachomatis* pero las pruebas de la amplificación de ácidos nucleicos están desplazando en la clínica habitual ya que tienen una alta sensibilidad (90 a 98%) y especificidad cuando se utilizan correctamente^{21,22,23}. Las pruebas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos actualmente en uso sólo permiten la detección de *C. trachomatis*, pero están ahora disponibles pruebas que detectan simultáneamente en tiempo real, tres cepas de *chlamydia* implicados en las infecciones en el hombre: *trachomatis*, *psittaci* y *pneumoniae*, aunque se necesitan ensayos clínicos para confirmar su utilidad en el diagnóstico y seguimiento terapéutico³⁸.

Tratamiento

La eritromicina oral es el tratamiento recomendado para la conjuntivitis y la neumonía causadas por la infección por *C. trachomatis* en el RN, en una pauta diaria oral de 50 mg / kg divididos en 4 tomas durante 14 días. En 20 a 30% de los casos el primer ciclo de tratamiento no erradica el microorganismo y se requiere un segundo ciclo de tratamiento^{1,2,34,39,40,41}. También se debe hacer el tratamiento a los padres con tetraciclina o eritromicina durante un período de dos semanas². La OMS y la *American Academy of Family Physicians* (AAFP) recomiendan el tratamiento con azitromicina (Zithromax) 1 gramo por vía oral en una sola dosis y Doxyciclina (Vibramicina®) en la dosis de 100mg/ dos veces /día vía oral^{10,41}. Los regímenes de tratamiento para infecciones urogenitales están bien establecidos, sin

embargo hay registros de la persistencia de *C. trachomatis* a pesar de la realización de la terapéutica apropiada con azitromicina, en contraste con los resultados obtenidos en la actividad in vitro de este fármaco. La rifampicina es un potente inhibidor de la DNA polimerasa dependiente de RNA que muestra in vitro una acción poderosa contra *C. trachomatis*, sin embargo no se recomienda su uso aislado en el tratamiento de infecciones urogenitales por *C. trachomatis*, debido al riesgo de desarrollo de resistencia. Una nueva estrategia de tratamiento es la combinación de azitromicina + rifampicina, que resultó ser más eficaz en el control de la infección que la azitromicina aislado ⁴².

La oftalmia por *C. trachomatis* puede resolver espontáneamente en un período de 8-12 meses pero en estos casos aumenta el riesgo de secuelas en la córnea con la consiguiente pérdida de su transparencia ^{2,34}.

5.2.3.2. Oftalmia por *Neisseria gonorrhoeae*

El género *Neisseria* incluye un total de 10 especies que se encuentran en el ser humano siendo *N. gonorrhoeae* uno de los patógenos de las especies que utilizan los seres humanos como único huésped natural ⁴³. Es una bacteria aerobia gram-negativa en forma de coco y dispuestos en pares (diplococos). Uno de los principales factores de la virulencia es la presencia de pili (reguladas por un complejo de genes llamado PIL), que le permite la adherencia a las células epiteliales no ciliadas de la conjuntiva y que además confiere resistencia a dichas bacterias contra los neutrófilos del huésped.

El riesgo de ON para *N. gonorrhoeae* es de 1-5% en general y 30-45% en los países en desarrollo ⁵. De los RN por vía vaginal de madres con infección activa, 30-40% pueden desarrollar ON por *N. gonorrhoeae*. Esta condición se presenta como una conjuntivitis hiperaguda con edema palpebral, quemosis, y una secreción purulenta y sanguinolenta muy abundante poco después del parto o 2-5 días después ^{2,5,35}. Sin tratamiento la oftalmia progresa a ulceración, panoftalmitis y perforación de la córnea, en un período de 24 horas. Puede tener afectación sistémica expresa como la artritis, sepsis y meningitis ^{1,2,5,35}.

Diagnóstico

Pruebas no culturais para el diagnóstico de *N.gonorrhoeae* incluyen frotis directos de tinción de Gram y la tinción con azul de metileno. No hay grandes diferencias entre los dos métodos que tienen buena sensibilidad y especificidad (97,3% y 99,6%, respectivamente, en los exámenes uretrales de pacientes sintomáticos), sin embargo la tinción de Gram distingue bacterias Gram-negativas (rosa-rojo) de Gram-positivos (azul-violeta) ⁴⁴. Así por el método de Gram, diplococos intracelulares como *N. gonorrhoea* pueden ser identificados en 70% de los casos. El cultivo se realiza en medios no selectivos (por ejemplo, agar chocolate) y medios selectivos (placas de Thayer-Martin), pero cada vez más se sustituyen por métodos de amplificación de ácidos nucleicos ⁴³.

Tratamiento

Un niño con oftalmia por *N. gonorrhoeae* debe ser hospitalizado, tratado con irrigación frecuente de la conjuntiva y la administración de ceftriaxona intravenosa o intramuscular (25 a 50 mg) una dosis máxima de 125 mg o cefotaxima intramuscular de 10 mg o 25 mg / kg por vía intramuscular o por vía intravenosa 12 / 12h durante 7 días. Los padres también deben ser investigadas y tratados ^{1,2,5,10}.

5.2.3.3. Conjuntivitis neonatal por virus herpes

El virus del herpes simple (VHS) es un virus con envoltura que contiene ADN de doble cadena y simetría del cápside icosaédrica. Codifica una gran cantidad de proteínas estructurales y no-estructurales que le permiten regular la persistencia y reactivación escapando a las defensas del huésped. El virus se libera por exocitosis, lisis celular y puentes célula-célula. Puede causar infecciones agudas, persistentes y latentes. Son virus ubicuos que causan enfermedades benignas, especialmente en los niños, pero también pueden conducir a morbi-mortalidad importante en los pacientes inmunodeprimidos ⁴⁵. El hecho de ser un virus capaz de establecer un estado de latencia con recurrencias asintomáticas en la mayoría de los casos, transforma la persona infectada en una fuente del virus durante toda su vida. Hay dos tipos de virus VHS 1 y

2, siendo el VHS 1 más frecuente. VHS 2 se transmite generalmente por contacto sexual, estableciendo la latencia en las neuronas y recidivando en situaciones de estrés o de inmunosupresión⁴⁵. Los lactantes adquieren la infección de madres con infección activa en el canal de parto. En el 50% de los niños infectados hay afectación sistémica que puede conducir a hepatitis, neumonía, encefalitis y coagulación intravascular diseminada^{2,45}.

Diagnóstico

El diagnóstico de VHS se hace por métodos directos como la cultura, la detección de antígenos mediante la prueba de fluorescencia directa, el frotis Tzank, la citología directa y las técnicas moleculares destacándose la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{44,45}. Los métodos indirectos incluyen pruebas serológicas para anticuerpos, útiles en el diagnóstico de la infección primaria y en estudios epidemiológicos. La cultura de utiliza células de diferentes cepas USIN (MRC5 fibroblastos humanos, Hep2, etc.) en los que se observa el efecto citopático que produce el virus entre las 24-72 horas de incubación del cultivo. El cultivo y las técnicas moleculares que tienen un sensibilidad de 100% con un resultado rápido, son los métodos más utilizados para el diagnóstico^{45,46}. La muestras oculares utilizadas son el frotis de conjuntiva, el raspado corneal y líquidos vesiculares o frotis de las lesiones^{45,46}.

Cuadro clínico

La afectación ocular más común de VHS 2 en el RN comienza entre 6 a 14 días después del parto con hiperemia conjuntival, blefaroconjuntivitis con vesículas en el párpado y queratitis epitelial dendrítica. En ocasiones se asocia con la afectación de retina periférica con coriorretinitis y vitritis. Puede ocurrir atrofia del nervio óptico en los niños con afectación del SNC. La infección por VHS diseminada provoca una alta tasa de mortalidad de los RN^{2,46}. En aproximadamente el 50% de los niños la oftamia viral se asocia con adenopatías². Durante la niñez las secuelas se manifiestan en forma de uveítis con catarata secundaria, incluso en casos raros se puede presentar una retinitis fulminante que afecta a toda la retina. Otra secuela es la ceguera cortical en los niños

sobrevivientes de la encefalitis VHS, generalmente asociada con diversos déficits neurológicos². La oftalmía neonatal VHS-2 se debe diagnosticar lo antes posible debido al riesgo de la enfermedad diseminada, especialmente en los niños que se presentan con ictericia progresiva, hepatoesplenomegalia, fiebre y ampollas en la piel^{2,46}.

Tratamiento

El tratamiento se debe hacer con aciclovir sistémico 60 mg / kg / día en 3 dosis durante 14 días para reducir el riesgo de propagación sistémica y tratamiento tópico antiviral con aciclovir 5x/día durante un período de 10-15 días ou ganciclovir (gel) 5x/día 7 días^{2,5,41}.

5.2.3.4. Otros agentes implicados en la etiología de la ON

En el 30 al 50% de los casos la etiología de la ON no se debe a los agentes que se transmiten por vía vaginal, sino que implican a otros microorganismos de otras localizaciones. Los más comunes entre los Gram positivos son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus pneumoniae* y Gram negativos: *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Serratia spp* están involucrados en un pequeño porcentaje de los casos^{1,2,5,8,35,36}. Los signos clínicos son variables y pueden estar presentes entre 3-19 días después del parto, y por lo general hay presencia de secreción purulenta^{5,35}. Para la confirmación diagnóstica se puede utilizar la tinción de Gram, pero para el diagnóstico definitivo se debe utilizar el cultivo. En la mayoría de los casos, el tratamiento es tópico aunque se debe considerar el tratamiento sistémico en casos severos como en el caso de oftalmía por *Pseudomonas*, agente etiológico implicado raramente en ON pero a veces responsable de una conjuntivitis aguda que puede progresar hasta endoftalmitis y perforación de la córnea e incluso la muerte en casos de diseminación sistémica^{2,8}.

Cuadro 1 Resumen del tratamiento de la oftalmia neonatal

Etiología	Tratamiento ^{2,10,34,41}
Química	Ninguno
<i>C. trachomatis</i>	Eritromicina (jarabe) 50mg/Kg/día em 4 doses durante 14 días + Eritromicina pomada 6/6h + o Azitromicina tópica Tratamiento de los padres con tetraciclina oral o eritromicina oral durante 2 semanas o 1 grama oral de Azitromicina en una solo dosis
Bacterias	
Gram +	Eritromicina 0,5% o Tetraciclina en pomada de 6/6h durante 7 días
Gram -	Gentamicina o Tobramicina pomada de 6/6h durante 7 días
<i>N. gonorrhoeae</i>	Ceftriaxona 25-50 mg/Kg IM ou IV en una solo dosis o Penicilina G acuosa 100,000 U/kg/día durante 7 días. En las en áreas con resistència a la penicilina tratar con Ceftriaxona 25/50 mg /día IM ou IV durante 7 días Tratamiento de los padres
Virus	
Herpes simple	Aciclovir pomada 5x/día- 10-15 días, Ganciclovir (gel 0,15%) 5x/día 7 días
	Aciclovir 10 mg/m ² IV o 45-60mg/kg/día (en los RN de término de) 8/8h durante 14 días o 21 días en los casos de enfermedad diseminada

5.2.4. Epidemiología de la ON

La prevalencia de la ON se redujo drásticamente del 20-79% de los RN en siglo XIX al 1-2% en los países desarrollados, hoy en día ^{5,8}. Varios factores determinan la aún elevada prevalencia de la ON en los países en desarrollo a saber:

a) De acuerdo con datos de la OMS los países con las tasas más altas en la incidencia y prevalencia de ETS se encuentran en: Asia (regiones del sur-sureste) en el

África subsahariana, América Latina y el Caribe. El mayor número de nuevos casos se ha registrado a nivel de África ¹².

- b) La insuficiente cobertura de la atención primaria de la salud incluyendo la atención prenatal ^{16,33,47}.
- c) La ausencia de programas rutinarios de profilaxis de la ON ^{5,7,33,47,48}.
- d) El bajo nivel socio-económico ^{8,34,47,48}.

De las bacterias implicadas en la etiología de ON, 67% son similares a las encontrados en el tracto genital inferior y de la placenta de las madres de los niños afectados ⁵. Los datos de la OMS señalan que cada año ocurren en Africa, 340 millones de nuevos casos de sífilis, gonorrea, infección por clamidia y tricomoniasis en los hombres y las mujeres en edad sexualmente activa (15-49 años) ¹². La prevalencia global de la contaminación del canal de parto con el virus VHS-2, estimada mediante un estudio piloto llevado a cabo en Sudáfrica en 2012, que incluyó a mujeres que asisten a consultas prenatales el Servicio Nacional de Salud en 4 provincias de Sudáfrica , fue del 55,8 % ⁴⁷.

Los factores de riesgo perinatales implicados más a menudo en la aparición de la ON en el RN incluyen factores relacionados con la madre y los factores relacionados a las condiciones bajo las cuales se desarrolla el parto ⁴⁸.

Los factores relacionados con el parto son: el parto realizado en el ambiente no estéril y la rotura prematura de la membrana amniótica (RPM). De todos ellos los mas involucrados en el aumento del riesgo de ON en el RN son: infección pélvicovaginal (IPV) materna durante el embarazo, RPM, lugar de nacimiento y nivel socio-económico ^{8,10,48}.

Vaginitis materna

Vaginitis materna se refiere a la inflamación de la vagina que ocurre a menudo en combinación con la inflamación de la vulva, una condición conocida como vulvovaginitis ⁵⁰. Vaginitis en general es el resultado de una infección con levadura, bacterias, o Trichomonas, pero también puede surgir debido a la irritación física o química de la zona. La vaginosis bacteriana es la infección más común que causa

vaginitis. Esta condición resulta de un desequilibrio de crecimiento excesivo en las bacterias normalmente presentes en la vagina. No está claro si la actividad sexual juega un papel en el desarrollo de la vaginosis bacteriana, y algunos expertos creen que puede ocurrir en mujeres que no han tenido contacto. La gonorrea y la clamidia son agentes de ITS también involucrados en la etiología bacteriana de la vaginitis materna^{37,50,51}.

La vaginitis por lo general se presenta en mujeres que no han tenido la atención prenatal de la madre y constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de conjuntivitis aguda. La infección urogenital por *C. trachomatis* es la enfermedad bacteriana de transmisión sexual más común en el mundo^{2,5,40}.

La incidencia está directamente relacionada con el grado de actividad sexual de los individuos y no a una área geográfica específica. La OMS estima que en todo el mundo se producen cada año 489,9 millón de nuevos casos y de estos 92,6 millones en la región Africana¹².

Ya que se estima que 30-80% de las mujeres con infección urogenital por *N. gonorrhoeae* y 85% con infección por *C. trachomatis* son asintomáticas, en los países desarrollados se recomiendan programas de detección anuales a los grupos de mujeres más propensos (las mujeres sexualmente activas menores de 26 años)^{12,17, 52}. Los datos indican que los RN de madres infectadas con *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* muestran tasas de transmisión conjuntivales de 42% y 31% respectivamente^{3,5}.

En muchos casos de uretritis no gonocócica y cervicitis blenorragica se ha identificado en los últimos años otro agente causal: *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*). Esta bacteria es el organismo de vida libre más pequeño que tiene la característica única de no tener pared celular, lo que lo hace resistente a los antibióticos cuyo mecanismo de acción es la interferencia de la síntesis de la pared celular (por ejemplo: penicilinas, cefalosporinas y vancomicina)^{24,54,55}. Actualmente el tratamiento de primera línea de MG son los macrólidos (azitromicina) y siendo los de segunda línea las fluoroquinolonas, sin embargo, las mutaciones presentadas por *M. genitalium* han

determinado el aumento del fracaso del tratamiento con estos antibióticos siendo necesario revisar los protocolos utilizados ⁵⁶.

Se aisló por primera vez en 1980 en 2 de un total de 13 hombres con uretritis²⁵. La alta tasa de concordancia en las parejas sexuales de las personas infectadas indica que *M. genitalium* se transmite sexualmente ^{25,53,54}. Es un anaerobio facultativo y debido a su lento crecimiento en medio de cultivo (2-6 semanas antes de dar un resultado positivo) no se utiliza el cultivo como medio de diagnóstico ²⁴. Las pruebas basadas en la PCR son actualmente el método diagnóstico de elección ²⁴. La prevalencia de la *M. genitalium* es de 6,3% en las mujeres y el 6% en los hombres en grupos de riesgo. Si bien la uretritis en los hombres por *M. genitalium* suele ser sintomática, la uretritis y cervicitis causadas por este microorganismo en la mujer suelen cursar de forma subclínica ^{25,54,55}.

M. genitalium presenta similitudes con el *C. trachomatis* sólo en relación con las vías de infección y la respuesta inflamatoria y parece ser responsable de la uretritis, endometritis, cervicitis y salpingitis con complicaciones y secuelas consiguientes en la forma de embarazo ectópico e infertilidad ^{57,58}. Existe una asociación entre la infección urogenital y la presencia de *M. genitalium* en el tracto genital de la mujer ^{57,58}.

A pesar de que la *M. genitalium* y otras bacterias anaerobias en ocasiones se aislaron de los recién nacidos con ON, su papel en esta enfermedad aún no está bien establecido ⁵⁹.

Ruptura precoz de la membrana amniótica

La RPM es la pérdida espontánea de líquido del saco amniótico a través de la ruptura de la bolsa que puede ocurrir a partir de 28 semanas de gestación hasta una hora antes del inicio del parto. En el parto a término la RPM se refiere a la ruptura de la membrana fetal antes del inicio del parto y se asocia con varias complicaciones incluyendo un mayor riesgo de infección del feto y el útero por el paso de bacterias en el canal vaginal y en el cuello uterino para el interior del útero ^{48,60,61,62}.

A nivel uterino las bacterias tienen un ambiente cálido y húmedo propicio para su rápida proliferación y diseminación sistémica que puede conducir a infecciones graves

maternas en el posparto (neumonía y sepsis) y meningitis en el feto; ambas patologías pueden conducir a la muerte de ambos ^{60,61,62}.

Bajo nivel socioeconómico materno

Las causas de la ceguera en los niños varían de región a región y son en gran parte influenciadas por el desarrollo socio-económico que determina la disponibilidad de los servicios de atención primaria de la salud, incluyendo los cuidados oculares primarios. Los estudios realizados en los países en desarrollo indican que el bajo nivel socioeconómico de las madres tiene una relación directa con la falta de atención prenatal que a su vez determina la presencia de factores de riesgo maternos para la conjuntivitis aguda en el RN: vaginitis, infección del tracto urinario, la mala asistencia al parto y el aumento de la frecuencia de RPM ^{15,10,16,20}.

En muchos casos mujeres cumplen con las visitas prenatales recomendadas por la OMS, sin embargo, en algunos casos el contenido de estas consultas de seguimiento prenatal no cumple con los requisitos recomendados por la OMS, tales como la detección de ETS ¹⁹.

5.3. Profilaxis de la oftalmia neonatal

Se han utilizado una variedad de agentes tópicos para la profilaxis de la ON, principalmente dos grupos de sustancias: soluciones antisépticas y antibióticos y no hay consenso en la comunidad médica mundial con respecto a la práctica de la profilaxis universal o en relación con el tipo de agentes profilácticos. Mientras que en el Reino Unido y Australia no se realiza profilaxis, esta practica es obligatoria por ley en Canadá y Estados Unidos ^{35,52,63}. Un estudio encontró que en un mismo país no había consenso sobre el uso de agentes profilácticos en los hospitales en dos regiones ²⁶. Una de las principales objeciones a la utilización de la profilaxis en los países desarrollados es el hecho de que en estos países el diagnóstico y tratamiento oportuno de las infecciones de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (principales factores de riesgo para ON) durante la atención prenatal de las mujeres embarazadas, eliminan la necesidad de profilaxis del RN ⁶³.

Sin embargo, la mayoría de los estudios recomiendan la profilaxis en las zonas donde la prevalencia de infecciones de las ETS es alta y no hay programas de detección sistemática y regular en las mujeres en edad fértil, así como durante la atención prenatal en las mujeres ^{14,20}. Los antibióticos y antisépticos más comúnmente utilizados en el en la profilaxis de la ON, son respectivamente: eritromicina, tetraciclina , rifampicina y la povidona iodada. Generalmente los estudios indican que estos agentes son más eficaces en la reducción del riesgo de la oftalmia por *C. trachomatis* ^{4,35,64}.

Entre los agentes profilácticos se ha impulsado cada vez mas el uso de P-I, aunque que se apunte a la necesidad de realizar más estudios para confirmar este agente como una opción eficaz para la profilaxis de la ON ^{33,47}. La molécula de yodo libre puede pasar fácilmente a través de la membrana de los microorganismos, lo que resulta en su interior una serie de reacciones (oxidación como la fracción del tiol (-SH) con la rápida formación de disulfuros (R-SS-R), el reemplazo de la molécula de hidrógeno en los sistemas aromáticos activados, tales como los que ocurren en muchas amino y mono- y di-yodación de ciertas olefinas presentes en todos los ácidos insaturados libres) que dan lugar lisis del microorganismo, contribuyendo a la acción bactericida de la P-I ²⁷.

Este antiséptico es utilizado desde hace 150 años y presenta propiedades bactericidas, fungicidas, virucidas y amebicidas ^{27,30}. El uso de la molécula de yodo se limitó inicialmente por su mala solubilidad y su inestabilidad. Actualmente las formulaciones de la P-I (Betadine®) consisten de un complejo de polímero de yodo con polivinilpirrolidona (polímero de alto peso molecular, soluble agua), lo que aumenta la actividad bactericida del yodo ^{27,30}.

En todo el mundo la P-I está disponible en forma de un polvo o una solución de 10% polivinilpirrolidina ²⁷. Fue aprobada en 1950 para su uso dermatológico y para uso oftálmico desde 1986. Las formulaciones para uso oftálmico varían de 1,25% a 0,5% (para uso dermatológico van desde 0,5% a 10%) ²⁷. Se encontró que las formulaciones menos concentradas tienen un poder bactericida superior y al mismo tiempo son menos tóxicos para la piel y las superficies mucosas ²⁷. La P-I se utiliza actualmente de forma rutinaria en la preparación preoperatoria de la cirugía oftálmica, en particular, en la

cirugía de intraocular, para la prevención de la infección post-operatoria (destruye y previene el crecimiento de bacterias, tanto en la piel y en los ojos) ^{27,28,30}.

Hay también una versión detergente de P-I que hace la combinación de la actividad antibacteriana con la acción detergente, usado comúnmente como un antiséptico para la piel pero que producen reacciones adversas en el segmento anterior del ojo ^{28,29}. Es una sustancia estable que mantiene sus propiedades bactericidas en temperaturas elevadas ⁶⁵.

Aunque el uso de P-I como profilaxis de la ON no tiene la aprobación del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, su uso se ha fomentado cada vez más en muchos países, particularmente en los países en desarrollo por las siguientes ventajas en relación con otros agentes profilácticos:

1. Es una sustancia de manejo sencillo y de fácil acceso ^{27,30}.
2. Es menos costosa en comparación con otros agentes profilácticos utilizados ^{33,47}.
3. Se trata de un potente antiséptico con efectos secundarios mínimos en la conjuntiva sana (produce sólo una ligera conjuntivitis química que resuelve espontáneamente un período de 24 horas) ^{27,28,31}.
4. Su color marrón dentro de la conjuntiva permite demostrar que su instilación ha sido correcta ²⁷.
5. Contrariamente a los antibióticos no se descrito hasta el momento casos de resistencia a los microorganismos responsables de la ON ^{33,47}.
6. Cuenta con un amplio espectro de acción incluyendo las bacterias y los virus que causan la ON ^{28,30}.

Las principales objeciones al uso de la P-I son debidas al hecho de que se puede confundir con la formulación detergente y de acuerdo con algunos autores, la conjuntivitis química causada por P-I puede facilitar la infección conjuntival por otros agentes ^{4,28,29,33}.

5.4. PACIENTES. MATERIAL Y MÉTODOS:

Metodología:

a) Del estudio piloto

Antes de iniciar el estudio principal de este trabajo, se realizó un estudio piloto en HGEAG de marzo a julio de 2010 tras obtener la aprobación del proyecto por la Comisión de Ética de la Universidad Agostinho Neto, da la Dirección del HGEAG y el consentimiento informado de las madres. Fue un estudio prospectivo que incluyó 95 RN, de los niños nacidos durante el período de estudio que cumplían los criterios de selección: nacidos de gestación de término, sin patología sistémica, peso igual o superior a 2.300 gramos y de madres que estuvieron de acuerdo en participar.

Los datos maternos fueron recogidos a través de un cuestionario que incluía: la edad, la raza, la residencia, la paridad, el número de visitas prenatales, la patología durante el embarazo. Los datos recogidos de los RN fueron: peso al nacer, puntuaciones de Apgar, tipo de parto y patología ocular

Poco después del nacimiento los RN fueron sometidos a un examen ocular básico realizado por un oftalmólogo con experiencia, que incluyó: la respuesta pupilar a la luz, examen externo con linterna, la calidad y la simetría del reflejo de la retina (test de Brückner) e inmediatamente después de la prueba se recogieron muestras conjuntivales con hisopos estériles en el fondo de saco conjuntival de los RN. Con las muestras conjuntivales se hicieron frotis en dos portaobjetos para cada RN: frotis de las muestras conjuntivales del ojo derecho en el extremo proximal del ojo izquierdo en el extremo distal (se identifico uno de los extremos de cada porta). A cada portaobjetos se le asignó un número correspondiente a la identificación del RN. Después de secar en el aire ambiente se fijó (fijador mezcla de: 7% de etanol al 96% con acetona 3%) y se almacenaron a temperatura ambiente en un período de 3 semanas y luego fueron transportados para ser procesados en el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España. En ese centro, un grupo de muestras se sometió a tinción de Gram y otro grupo de se tiñó con azul-de-metileno y

luego analizados por dos microbiólogos expertos en al menos 20 campos microscópicos. Ambos debieron estar de acuerdo con los resultados finales del examen.

La presencia de células epiteliales, leucocitos, cocos y levaduras fueron evaluados por cinco campos microscópicos. La técnica Geno Quick® (Hain Lifescience, Nerhen, Alemania) se utilizó para la CT-ADN en 10 cristales con muestras de recién nacidos con signos clínicos de ON (secreción ocular, hiperemia conjuntival y /o edema de párpados).

Metodología del estudio principal

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de intervención aleatorizado ciego con grupo control. El fue realizado en el Hospital Geral Especializado Augusto N'Gangula (HGEAG) un hospital terciario y en el Centro de Saúde da Samba, centro de salud materno-infantil de nivel primario, en el periodo del 7 de Diciembre de 2011 hasta el 22 de Noviembre 2012.

El HGEAG anteriormente llamado " Maternidade Augusto N´Gangula" es la segunda maternidad más grande dentro de la trama urbana de la ciudad de Luanda, en el municipio de Ingombota. Tiene una doble responsabilidad: a la administración del municipio y a el Ministerio de Salud. Su población objetivo: las mujeres con patología ginecológica, las mujeres embarazadas y los niños.

Actividad del centro (datos del año 2012): un total de 21 000 partos con un promedio de 1.750 partos/ mes.

Centro de Saúde da Samba

El Centro de Salud de Samba se encuentra en la Rua da Samba, en el distrito urbano de la Samba de la provincia de Luanda. Existe desde el 15 de noviembre de 2001, es un centro de atención primaria. Está subordinado al Ministerio de Salud, y se compone de dos áreas principales: Práctica General y Materno – Infantil.

Durante el año de 2012 se realizaron 6.727 partos, con un promedio de 561 nacimientos por mes.

Profilaxis de la ON

En ambas unidades no había un programa regular de profilaxis de la ON hasta el momento de la finalización de este estudio.

Cálculo del tamaño muestral y randomización

La hipótesis que se planteo es que se puede reducir de forma significativa la proporción de casos con ON aplicando la profilaxis con P-I. Para determinar el tamaño muestral se necesita conocer:

- a) Magnitud de la diferencia a detectar, se han tenido en cuenta los resultados obtenidos en un estudio previo que muestra que la proporción de casos con ON sin este tratamiento es 12.4%. Se calculan diferentes tamaños muestrales variando la proporción de ON después del tratamiento entre el 1% y el 11% en intervalos de 1%.
- b) Error de tipo I que se esta dispuesto a cometer o riesgo del estudio (α), y consiste en afirmar que existen diferencias cuando en realidad no existen.
- c) Error de tipo II que se esta dispuesto a cometer o potencia del estudio (β), y consiste , en afirmar que no existen diferencias cuando en realidad existen..
- d) Tipo de alternativa:

Unilateral: se indica una dirección en las diferencias.

Bilateral: no se indica una dirección en las diferencias. Esta opción es más conservadora y disminuye el riesgo de cometer un error de tipo I. Se establece que los dos grupos de tratamiento son del mismo tamaño. Como parámetros estadísticos se fiaron un riesgo $\alpha = 0.05$, un riesgo $\beta = 0.2$ y tipo de alternativa bilateral. Se obtuvieron los siguientes tamaños muestrales mínimos,

Tabla 1 Cálculo del tamaño muestral y randomización

Proporción de casos ON con el tratamiento	Diferencia a detectar	Tamaño muestral total	Tamaño muestral por grupo de tratamiento
1%	11.4%	150	75
2%	10.4%	192	96
3%	9.4%	252	126
4%	8.4%	334	167
5%	7.4%	454	227
6%	6.4%	638	319
7%	5.4%	942	471
8%	4.4%	1484	742
9%	3.4%	2594	1297
10%	2.4%	5420	2710
11%	1.4%	16548	8274

Randomización

Asignación aleatoria por bloques de tamaño 4. A partir de una tabla de número aleatorios se obtiene una secuencia de bloques. Considerando A el grupo sin tratamiento y B el grupo con tratamiento, los bloques posibles son:

1: AABB; 2: BBAA; 3: ABAB; 4: BABA; 5: ABBA; 6: BAAB

La asignación de cada paciente a cada uno de los tratamientos fue secuencial

Reajuste del tamaño muestral

Se reajustaron los tamaños muestrales mínimos obtenidos anteriormente para adaptarlos al número de bloques y además se le añadieron un 15% de posibles pérdidas.

Tabla 2 Reajuste del tamaño muestral

Proporción de casos ON con el tratamiento	Diferencia a detectar	Número de bloques	15% pérdidas (pacientes)	Tamaño muestral final	Tamaño muestral por grupo final
1%	11.4%	38	23	176	88
2%	10.4%	48	29	222	111
3%	9.4%	63	38	290	145
4%	8.4%	84	51	388	194
5%	7.4%	114	69	526	263
6%	6.4%	160	96	736	368
7%	5.4%	236	142	1086	543
8%	4.4%	371	223	1708	854
9%	3.4%	649	390	2986	1493
10%	2.4%	1355	813	6234	3117
11%	1.4%	4137	2483	19032	9516

Pacientes: La población objeto de estudio estuvo constituida por 322 madres y sus RN (en CSS 175 y en HGEAG 147).

Criterios de inclusión: RN sanos con peso igual o superior a 2,300 kg, edad gestacional igual o superior a 37 semanas y de madres que hubieran dado previamente su consentimiento informado para participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron los RN:

- a) Cuyas madres se negaron a participar en el estudio.
- b) Con bajo peso al nacer (menos de 2.300 kgs) o prematuros (con menos de 37 semanas de gestación).
- c) Que presentaran dificultades respiratorias al nacer.
- d) De madres diagnosticadas con patología tiroidea de acuerdo con sus datos clínicos que constaban en el registro médico personal

Aspectos éticos

Para realizar el estudio, se obtuvo el consentimiento informado de la Comisión de Ética de Faculade de Medicina de la Universidad Agostinho Neto, de la Dirección del HGEAG y del Departamento Provincial de Salud para llevar a cabo el estudio en el CSS. Las madres tuvieron que dar su consentimiento informado antes de la recogida de datos. El estudio siguió los principios Principios Éticos de de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para la Investigación Médica en seres humanos de 1964 y posterior adenda.

Los datos maternos fueron recogidos a través de un cuestionario que incluía: la edad, la raza, la educación, la paridad, el número de visitas prenatales, la patología durante la duración de la gestación, duracion de la RPM. Los datos recogidos de los RN fueron: peso al nacer, puntuaciones de Apgar, tipo de parto. Los RN fueron distribuidos de forma secuencial en dos grupos en función de bloque de asignación al azar: el grupo A, que incluyó los RN en los que no se hizo ninguna intervención, grupo B: los RN que fueron objeto de intervención: la instilación de una gota de povidona iodada al 2,5% poco después de nacer y después de la finalización del examen ocular básico y de la toma de mues



Fig 1 Examen del segmento anterior



Fig 2 Instilación del colirio de P-I



Fig 3 Equipo del trabajo en el HGEAG



Fig 4 Realizando el test de Bruckner



Fig 5 Instrucción de las parteras – CSS



Fig 6 Sala de espera en el CSS

Se obtuvieron muestras del endocérvix de las embarazadas después de la eliminación de las secreciones vaginales. Las muestras oculares de ambos ojos de los RN se obtuvieron inmediatamente después del nacimiento, por legrado vigoroso de la parte inferior de la bolsa inferior con un hisopo de algodón estéril y sin el uso previo de la anestesia tópica. Todas las muestras fueron recogidas por el personal médico después del entrenamiento realizado por un microbiólogo (del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid (IOBA)) y por un médico obstetra (del HGEAG).

Las muestras también se obtuvieron del endocérvix de mujeres embarazadas antes del parto y del fondo de saco de la conjuntiva de los RN con hisopos estériles sumergidos en un medio universal de transporte (Copan@Italia SpA, Brescia, Italia), y después se almacenaron a -70°C. Posteriormente fueron transportados al Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España para el procesamiento y análisis. La extracción de ADN se realizó de acuerdo a la rutina de laboratorio estándar con ADN GXT reactivos / ARN GenoXtract un extractor (HainLifescience, Nehren, Alemania). Se realizó una detección por PCR multiplex que co-amplifica las secuencias de ADN de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y un control interno usando el kit de Bio-Rad Dx *C. trachomatis/ N. gonorrhoeae/ M. genitalium* (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

Después de recogidas las muestras todos los RN fueron sometidos a un examen ocular básico que incluyó: la respuesta pupilar a la luz, la posición y los movimientos de los párpados y los ojos, el examen de la conjuntiva, el tamaño y la transparencia de la córnea, el tamaño y la apariencia de simetría del iris, la transparencia del cristalino y la calidad del reflejo de la retina (test de Brückner).

Tras el examen y recogida de muestras conjuntivales a los RN aleatorizados en el grupo de intervención, y en un período inferior a 1 hora después del parto, se instiló una gota de P-I en el fondo de saco inferior de ambos ojos, intervención realizada por un oftalmólogo.

A las madres se les proporcionó una hoja de información con la explicación de los signos de conjuntivitis aguda del RN (presencia de inyección conjuntival y / o secreción conjuntival y / o edema de párpados), y con las instrucciones para volver con su RN después del alta si presentase estos signos, para ser evaluado en la sala de maternidad, donde había ocurrido el nacimiento (HGEAG o CCS). Se anotó el número de teléfono de las madres. Entre el quinto y el séptimo día después del parto se telefoneo a las madres invitandolas a llevar a sus bebés en observación si tenían signos de oftalmía u otra enfermedad ocular. Los RN que regresaron fueron vistos por el oftalmólogo responsable del estudio.

Análisis estadístico:

Se expresaron las variables cuantitativas como medio desviación estándar (SD). Para las variables cualitativas se consideraron frecuencias, porcentajes e intervalos de confianza. Los análisis estadísticos fueron realizads con *R Stastitical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)*.

6. RESULTADOS

Limitaciones: Como puede entenderse por la condiciones locales y por otros factores, existen varias limitaciones en este trabajo: Sin embargo solo se mencionaran las que tuvieron un mayor impacto en el resultado final:

1. La ausencia de un personal permanente para la recogida de datos ha sido una de las causas de perdidas de información. Una vez obtenidas las muestras maternas había que esperar el período de trabajo de parto para proceder a la recogida de los datos y muestras de los RN. Dado que la mayoría de las veces estaba sólo la responsable del trabajo para recopilar los datos, en los momentos de partos simultáneos no fue posible recoger todos los datos adecuadamente lo que ha determinado la ausencia de algunos. Esta limitación también impidió la obtención de una muestra más grande de los RN y sus madres.
2. El hecho de no haber realizado el cultivo de las muestras de los RN lo que impidió una evaluación de otros agentes etiológicos de transmisión no sexual involucrados en la ON.
3. La necesidad de transporte de muestras para procesamiento y análisis en el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, sobre todo debido a la falta de laboratorios locales para llevar a cabo los métodos de la PCR, con pérdidas de algunas muestras por mal acondicionamiento de los tubos de transporte.
4. La débil respuesta de las madres en volver a la segunda observación lo que impidió la recogida de muestras en los RN que hubieran desarrollado oftalmía después del alta hospitalaria, un aspecto importante del estudio que resultaría en la obtención de datos acerca de la frecuencia de ON en ambos grupos de randomización para demostrar la eficacia de la profilaxis con el colirio de P-I (objetivo primario del estudio).

RESULTADOS

Para la materialización de los objetivos propuestos se llevaron a cabo tres estudios:

- 1- Alexandre I, Cortes N, Justel M, Fernandez I, Ortiz de Lejarazu R, Pastor JC
“The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola”
- 2- Justel M, Alexandre I, Martinez P, Sanz I, Rodríguez-Fernández A, Fernández I, Pastor JC, Ortiz de Lejarazu R. *“Vertical Transmission of Bacterial Eye Infections, Angola, 2011-2012.”*
- 3- Alexandre I, Justel M, Martinez P, Ortiz de Lejarazu R, Pastor JC. *“First attempt to implement Ophthalmia Neonatorum prophylaxis in Angola: Microorganisms, efficacy, and obstacles”*

El estudio piloto y el primer y segundo estudios se centraron en el cumplimiento de los objetivos específicos del 1 al 4 y el segundo en el objetivo específico 5.

1- Resultados del estudio piloto

Se incluyeron 95 RN y sus madres en el HGEAN de marzo a junio de 2010. Las madres tuvieron una edad media de $24,39 \pm 6.29$ años y procedían en su mayoría (55,7%) de los barrios de bajo nivel socioeconómico en Luanda. De la muestra un total de 14 madres (14,7%) no habían tenido ninguna consulta prenatal y el resto tuvo un promedio de visitas prenatales de 5.15 ± 2.5 . Las madres tenían una paridad promedio de 1.7 ± 1.7 partos. El 23.83% de las mujeres, 14 (14,7%) tenían signos y síntomas de IPV y 27 (28,4%) de infecciones del tracto urinario durante el embarazo. En la exploración oftalmológica de los RN, 5 mostraron signos clínicos de ON. La tinción de Gram reveló la presencia de células epiteliales y leucocitos en 87,6% del 15% de los raspados conjuntivales. Estos valores fueron significativamente mayores que los mostrados por la tinción con azul-de-metileno. Con ninguno de los métodos de tinción se identificaron bacilos, cocos o levaduras. No hubo correlación entre la presencia de ON, con los datos maternos y factores perinatales.

2- Resultados del estudio principal

La muestra incluyó a 316 madres de entre 14 y 52 años, con un grupo de edad predominante entre los 14 y los 24 años, edad media 25 años (tabla 3), siendo la mayoría (28%) de un nivel básico de educación, con 2.2 % de madres analfabetas. La paridad osciló 0-9 nacimientos con predominio de mujeres con tres nacimientos (82%). En cuatro casos no se registró la paridad. El número de consultas prenatales maternas varió de 0-9, con un promedio de cuatro visitas. En 19 casos no había registro de las consultas prenatales. Un total de 96 madres (30,4%) presentó patología durante el embarazo, con una prevalencia de infección del tracto urinario en 81 madres (25,6%) y vulvovaginitis en 13 madres (4,1%) (Tabla 4). Un total de 80 madres (25,2%) tuvo RPM y la mitad de ellas en un tiempo de más de seis horas (tabla 5).

Tabla 3 Muestra materna en el HGEAG y CCS – Distribución etaria

Grupo etario	N	%
14-24	160	50,6
25-35	138	43,7
36-46	17	5,4%
≥ 47	1	0,3%
Total	316	100

Tabla 4. Sospecha clínica de infección materna

	N	%
Infección urinaria	81	25,6
Vulvovaginitis	13	4,1
Infección urinaria + vulvovaginitis	2	0,6
Sin infección	220	69,6
Total	316	100

Muestra materna en el HGEAG y CCS – patología durante la gestación

Tabla 5 Tiempo de la ruptura del saco amniótico

Tiempo de la ruptura del saco amniótico	N	%
Íntegra	126	39,9
Ruptura $\leq 6h$	40	12,6
Ruptura $\geq 6h$	40	12,6
Sin datos	110	34,8
Total	316	100

Un total de 318 niños, constituyeron la muestra de los RN. Se excluyeron del estudio 72 RN (22,6%) por tener dificultad respiratoria, por muerte o por transferencia de la madre a otro hospital antes del parto.

Los RN tuvieron una edad gestacional entre 36 y 40 semanas, un peso promedio de 3.260 gramos (tabla 6), 123 eran del sexo femenino y 118 del sexo masculino (en 5 RN no se registró el sexo) (Tabla 7). El tipo de parto predominante fue el parto vaginal (218 de 246 casos, 88,6%). De acuerdo al grupo de aleatorización en 129 RN se hizo la instilación de P-I (tabla 8). Un total de 44 niños presentaron patología ocular al nacer, de estos 31 (12,6%) tenían hiperemia conjuntival y 11 (4,4%) mostraron signos compatibles con ON (hiperemia conjuntival, edema de párpados y o secreción) (Tabla 9). Todo los RN con sospecha clínica de ON tuvieron parto por vía vaginal, con tres nacidos de madres que reportaron infección del tracto urinario durante el embarazo, cinco de madres sin RPM en el momento de la observación. En 6 no había datos acerca del momento de la RPM.

Tabla 6 Distribución de los recién-nacidos por el peso

Peso (gr)	N	%
2300-3000	88	35,8
3050-4000	139	56,5
>4000	18	7,3
Sin datos	1	0,4
Total	246	100

Tabla 7 Distribución de los recién nacidos por género

Sexo	N	%
Masculino	118	48,0
Femenino	123	50,0
Sin datos	5	2,0
Total	246	100

Tabla 8 Distribución de los recién-nacidos segundo la intervención (instilación del colirio de povidona-iodada)

Instilación de colirio de povidona-iodada	n	%
Si (B)	129	40,6
No (A)	115	36,2
Sin datos	73	23,0
Total	317	100

Tabla 9 Distribución de los recién nacidos según la patología ocular

Patología Ocular	N	%
Hiposfagma	2	0,8
Hiperemia conjuntival	31	12,6
Oftalmia neonatal	11	4,4
Sin patología	202	82,1
Total	246	100

Se incluyeron un total de 567 muestras clínicas que fueron analizadas por PCR multiplex para la detección y estimación de la prevalencia de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* (Tabla 10).

Tabla 10 Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* detectada por PCR multiplex en las muestras endocervicales maternas y conjuntivales de los recién nacidos.

Microorganismo	Muestra	n	Positivos	Prevalencia (%)	[95% CI]
<i>C. trachomatis</i>	Endocervical	312	8	2,6	[1,3-4,9]
	Conjuntival	255	5	2	[0,8-4,5]
	Total	567	12	2,1	[1,2-3,6]
<i>N. gonorrhoeae</i>	Endocervical	312	2	0,6	[0,2-2,3]
	Conjuntival	255	1	0,4	[<0,1-2,2]
	Total	567	3	0,5	[0,2-1,5]
<i>M. genitalium</i>	Endocervical	312	19	6,1	[3,9-9,3]
	Conjuntival	255	2	0,8	[0,2-2,8]
	Total	567	21	3,7	[2,4-5,6]
Total	Endocervical	312	28*	9,0	[6,2-12,6]
	Conjuntival	255	8	2,7	[1,3-5,5]
	Total	567	35	6,2	[4,5-8,5]

*Una madre presentó coinfección con *C. trachomatis* y *M. genitalium*.

Las tasas de transmisión de microorganismos fueron del 50% para la *C. trachomatis* y el 10,5% para el *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*. En cinco recién nacidos se ha observado el “efecto espejo” es decir, los microorganismos de sus muestras conjuntivales fueron positivos para los mismos gérmenes identificados en muestras cervicales de sus madres: la muestra cervical (madre) y conjuntival (hijo) n° 81M, 81H

(HGEAG), 23M, 23H y 100M, 100H (CCS) ambas positivas para *C. trachomatis*, la muestra cervical (madre) y conjuntival (hijo) n° 122 M, 122H (HGEAG), ambas positivas para *M. genitalium* y la muestra cervical (madre) y conjuntival (hijo) n° 85M, 85 H (CCS) ambas positivas para *N.gonorrhoeae*.

En 62 niños (19,2%) no hubo información sobre la muestras conjuntivales y 6 madres no tenían datos de las muestras endocervicales, en 7 madres infectadas (2 infectadas con *C. trachomatis* 2 y 5 infectadas con *M. genitalium*), no hubo muestras de sus RN.

El agente etiológico más común en los recién nacidos fue *C. trachomatis* en 5 casos, seguido de *M. genitalium* con 2 casos y un caso fue positivo para el *N. gonorrhoeae*. La PCR fue positiva en 28 madres, con un predominio de la *M. genitalium* (19 casos), seguido de *C. trachomatis* (8 casos) y 2 casos fueron positivos para el *N. Gonorrhoeae*. Uno de los casos tenía una co-infección de *C. trachomatis* y *M. genitalium*. Sobre el total de las madres con resultados positivos, diez presentaron factores de riesgo: RPM todos positivos para la *M. genitalium*, seis madres tenían un tiempo de más de 6 horas de la ruptura, y tres madres tenían vulvovaginitis, en una había infección urinaria asociada con IPV y un caso con infección del tracto urinario. Todas las madres con RPM tuvieron infección vaginal. Todas las madres con RPM tenían *C. trachomatis* positivo, y una madre positiva a *N. gonorrhoeae* tenía una RPM por encima de 6 horas.

Tabla 11 Resumen de los casos y muestras del estudio

Maternidad	Muestra del RN	Muestras endocervicales maternas	Muestras conjuntivales	RN con signos de conjuntivitis al nacer	RN tratado con P-I	RN que volvieron para 2° observación
HGEAG	157	171	132	20	69	14*
CCS	122	140	100	22	60	2
Total	279	311	232	42	129	16

*Cuatro de los RN que volvieron presentaron signos de conjuntivitis con secreciones

Tabla 12 Resultados del PCR en la muestras endocervicales maternas y muestras conjuntivales de los recién nacidos. Co-infección: una muestra materna presentó positividad para GT y MG

	n	Casos con madres y RN infectados por el mismo microorganismo	Co-infecciones
Total de muestras endocervicales válidas (mães)	311		
<i>C. trachomatis</i>	8	3	1
<i>N. gonorrhoeae</i>	2	1	
<i>M. genitalium</i>	19	1	1
Sin muestras	6		
Total de muestras conjuntivales (RN)	232		
<i>C. trachomatis</i>	5		
<i>N. gonorrhoeae</i>	1		
<i>M. genitalium</i>	2		
Sin muestra	63		

A pesar de los esfuerzos para explicar a las madres la importancia de volver a la visita de seguimiento de 5-7 días después del parto, sólo 16 niños regresaron para una evaluación adicional, 10 de ellos no mostraron signos de patología ocular, dos mostraron signos de ON bilateral en el día 3 después del parto, de acuerdo con las madres; uno tenía hiposfagma unilateral y tinción ictérica conjuntival en ambos ojos. No hubo relación en estos casos con la presencia de la infección del tracto urinario o infección vaginal de la madre.

7. DISCUSION

A pesar de los grandes progresos obtenidos por la Oftalmología en el siglo actual, existen todavía varios retos que los expertos tienen que hacer frente en muchas partes del mundo, para la erradicación total o el adecuado control de las enfermedades prevenibles y responsables de la ceguera o baja la visión. Esto es particularmente difícil para los oftalmólogos de los países en el desarrollo, como es el caso de Angola, ya que para el control de estas enfermedades deben considerarse primero, como problemas de salud pública y deben incluir profesionales de diversas especialidades, para el control no sólo de la patologías responsables por las deficiências visuales sino principalmente de sus factores de riesgo. Sin embargo, esta no es la situación actual en determinados lugares del planeta.

Este trabajo es el primero de su tipo en Angola, y proporciona datos sobre la frecuencia de la ON en los RN y también acerca de las enfermedades de transmisión sexual en las mujeres embarazadas en dos unidades de salud materno-infantil en la ciudad de Luanda, una unidad terciaria y el segundo mayor centro materno-infantil de Luanda: el HGEAN y el Centro de Saúde da Samba: unidad materno-infantil de nivel primario.

En ambas unidades los registros de los datos clínicos de las embarazadas no mostraron diferencias con respecto a las medidas profilácticas para reducir la ON, es decir, la detección de enfermedades de transmisión sexual durante el embarazo. En ninguna de las dos unidades existía un plan rutinario de profilaxis de la ON.

Esta situación es similar a lo que ocurre en los países más subdesarrollados muchos de los cuales se encuentran en África^{13,15,16,47,48}.

A pesar de las limitaciones que presenta el trabajo, se observa que los microorganismos identificados en esta muestra son los más frecuentemente implicados en la etiología de la ON: *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, de acuerdo con los datos reportados en trabajos similares^{13,66,67,68,69,70}.

Excepto la ON por *N. gonorrhoeae* que se ha establecido que puede afectar al feto por infección ascendente durante el período intrauterino a partir del cuello del útero de la

madre infectada, y la infección por *C. trachomatis* en que hay también informes de infección intrauterina ^(11,34) otros agentes implicados en la etiología de la ON entre los Gram positivo: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus pneumoniae*, tienen períodos de incubación generalmente entre 3-19 días después del parto, y sólo después de ese período se podrían tener resultados positivos microbiológicos en las muestras ^{1,2,5,6,36}. En este estudio no se han obtenido datos de estos agentes etiológicos por las limitaciones ya apuntadas, en especial por la débil respuesta de las madres en volver para la segunda observación de sus RN entre 5-7 días después del parto. Del total de la muestra solo volvieron 16 (5,7%).

En el 12% de las madres de nuestra muestra se identificaron los agentes de las ETS más frecuentes, de acuerdo con los reportados en la literatura, con especial énfasis a la infección materna por *M. genitalium*, en el 9% de las madres ^{12,20,25}. Este es un dato nuevo en Angola, ya que en ningún estudio previo publicado se ha identificado este agente en la etiología de la ETS en mujeres embarazadas o en mujeres en edad fértil. La literatura ha reportado a *M. genitalium* como agente emergente de la ETS, con una prevalencia tres veces mayor en las poblaciones de nivel socioeconómico bajo (7,3%) lo que indica que es probable que este microorganismo participe en muchos casos de infección genitourinaria persistente de etiología no gonocócica en mujeres y hombres pero sin diagnóstico específico, ya que la identificación de este agente sólo es posible con técnicas de PCR, que no se utilizan en el examen de laboratorio de rutina en la evaluación de las ETS en África ^{24,53,54}.

En las muestras conjuntivales de los RN, dos fueron positivos para la *M. genitalium*, un caso con coinfección con *C. trachomatis*, sin embargo la bibliografía no informa la existencia de casos de ON por este agente, que tiene probabilidades de convertirse en un agente importante en la morbilidad ocular de los RN debido a la alta prevalencia en las mujeres embarazadas en los países subdesarrollados, un hecho confirmado por los presentes datos ^{57,58}.

Los resultados de este estudio también indican que las pruebas microbiológicas simples como las pruebas de tinción de Gram y Azul de metileno no son las más adecuadas para

la identificación de los agentes de ON en los RN al menos en el entorno de las maternidades de Luanda.

C. trachomatis es el agente mas frecuente de ON (en la muestra: en 8 de los RN con muestras positivas 4 lo fueron para *C. trachomatis*). A pesar de que el cultivo sigue siendo el estandar, cada vez más se utilizan otras pruebas como la fluorescencia directa, o las puebas de EIA y pruebas moleculares basadas en PCR, que tienen la ventaja de una fácil accesibilidad y de no requerir personal especializado, además de la reducción de los requisitos necesarios par el transporte de muestras y de normalización de las técnicas²².

La confirmación de laboratorio de la infección por CT y otros agentes de ON tiene implicaciones muy importantes para el tratamiento y el seguimiento a largo plazo de los RN infectados y sus padres²².

Aunque la mayor parte de las muestras en nuestro estudio se han obtenido en HGEAG, centro de salud maternoinfantil a nivel terciario (175 madres y 175 recién nacidos correspondientes a 54,3% de la muestra total), no habia en esta unidad un plan hospitalario de profilaxis para los RN, situación similar a la reportada en otros países en desarrollo.^{13,15,33}

La falta de datos en relación con la morbilidad ocular y la mortalidad del RN es una de las principales razones de esta situación y por tanto, los datos de este estudio pueden ser una importante contribución a la modificación de la situación actual y la mejora local del pronóstico visual de los RN.

8. CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Después de la presentación del trabajo, tenemos la intención de continuar con las siguientes acciones:

1- Continuar con la investigación para aumentar la evidencia que apoye el uso de povidona iodada como agente profiláctico en los niños en Angola y para completar el perfil etiológico de gérmenes de transmisión no sexual involucrados a nivel local en la oftalmía neonatal.

2- Presentar los resultados del estudio al Ministerio de Salud de Angola (MINSA) destacando los datos obtenidos por primera vez en Angola en relación a la etiología de los microorganismos de transmisión sexual involucrados en la oftalmía y el efecto de imagen especular de los agentes de enfermedades de transmisión sexual maternas.

3- Presentación también al Ministerio de Salud de una propuesta de un programa nacional de profilaxis de la oftalmía del recién nacido en las unidades materno infantiles, con el uso de povidona iodada.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos de este estudio y en base a los resultados obtenidos, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Que las madres evaluadas en el último periodo (del 7 de Diciembre de 2011 hasta el 22 de Noviembre 2012) han cumplido en la mayoría de los casos el plan de visitas prenatales recomendadas por la OMS con una mejora significativa en la atención prenatal, en comparación con los datos obtenidos en el estudio piloto en 2010.
2. Que aún que la mayoría de las madres han completado el número de visitas prenatales recomendadas por la OMS, la alta incidencia de *M. genitalium* identificado en exudado vulvovaginal indica la necesidad de mejorar este seguimiento con la inclusión de *M. genitalium* en la detección sistemática de enfermedades de transmisión sexual y que debe considerarse este agente en la etiología de las infecciones urogenitales maternas.
3. Que se han identificado y cuantificado por primera vez en Angola agentes etiológicos de transmisión sexual de la oftalmía neonatal: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, así como una evaluación preliminar de las tasas de transmisión de madre / hijo.
4. Que se identificó por primera vez *M. genitalium* como agente de infección vulvovaginal en mujeres embarazadas en Angola, así como su tasa de transmisión madre/hijo.
5. Que las pruebas microbiológicas sencillas basadas en métodos de tinción no son adecuadas para el diagnóstico de ON en los recién nacidos en el entorno de Luanda.

6. Que para el correcto diagnóstico de oftalmía neonatal y enfermedades de transmisión sexual a nivel local se deben utilizar técnicas de diagnóstico molecular basadas en PCR teniendo en cuenta los principales microorganismos implicados

7. Que la pobre participación de las madres en relación al seguimiento oftalmológico de de sus recién nacidos después del alta hospitalaria impidió la comprobación de la eficacia de la povidona iodada.

8. El poco interés demostrado de las madres en la salud visual de sus niños demuestra que a nivel local se deben implementar programas regulares de educación para la salud de la población en general y las madres en particular, para su mejor participación en proyectos cuyo objetivo principal es la mejora de la salud de la comunidad.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology: A Systematic approach*, 6th edition, Edinbugh: Butterworth Heinemann Elsevier, 2007; p223-225.
- 2- Taylor D, Hoyt G D. *Pediatric ophthalmology and strabismus*, third edition, London: Elsevier Saunders, 2005; p139-48.
- 3- Malika PS, Asok T, Faisal HA, Aziz S, Tan AK , Intan G. Neonatal conjunctivitis: a review. *Malaysian Fam Physicians* 2008; 3:77-81.
- 4- Darling EK, McDonald H. A Meta-analysis of the Efficacy of Ocular Prophylatic Agents Used for the Prevention of Gonococcal and Chlamydial Ophthalmia Neonatorum. *J Womens Health*, 2010; 55:319-27.
- 5- Palafox SKV, Jasper S, Tauber, Allison D, Foster SC. Ophthalmia neonatorum. *J Clinic Experiment Ophthalmol* 2010; 1:119.doi:10/2155-9570.1000119.
- 6- Afjeiee SA, Tabatabaei SR, Fallah F, Shiva F, Zanjani NT, Fard TF et al. A Microbiological Study of Neonatal Conjunctivitis in Two Hospitals in Tehran, Iran *Asian Pacific J Trop Dis* 2013; 3: 429-33.
- 7- Simon JW. Povidone-iodine prophylaxis of ophthalmia neonatorum. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1437.
- 8- Gul SG, Jamad M, Khan N. Ophthalmia Neonatorum. *J Coll Physicians Surg Pak* 2010; 20:595-98.
- 9- Ghahramani M, Ghahramani AA. Epidemiological study of ophthalmia neonatorum and impact of prophylaxis on its incidence. *Acta Medica Iranica* 2007; 45:361-4.
- 10- Mullik S, Watson-Jones D, Beksinska M, Mabey D. Sexually Transmitted Infections in Pregnancy: Prevalence, Impact and Pregnancy Outcomes, and Approach to Treatment in Developing Countries. *Sex Transm Infect* 2005; 81:294-302.
- 11- Mundia DG, Ilako DR, Masinde MS. Risk of developing neonatal conjunctivitis of mothers of with prolonged labour. *East Afr j of Ophthalmol* 2008; 5-12

- 12-World Health Organization. Global Prevalence and Incidence Of Selected Curable Sexually Transmitted Infections 2008: Overview and Estimates. Geneva, 2012. Disponible en: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008_STI_estimates.pdf (aceso em 27/09/2014).
- 13-Schaller UC, Trivedy AJ, Revathi G, Ilako DR. Infective Spectrum of Ophthalmia Neonatorum in Nairobi, Kenya. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46: E-Abstract 5056.
- 14-Camero J S. Mandatory Ocular Prophylaxis on Newborn Babies, Lawmakers Urged. Global Post, Asianet 2013; 4:46. Disponible en: <http://www.globalpost.com/dispatch/news/asianet/130405/mandatory-ocular-prophylaxis-newborn-babies-lawmakers-urged> .. Aceso en 27/9/2014
- 15-Ramirez-Ortiz MA, Rodriguez-Almaraz M, Ochoa-DiazLopes H, DiazPrieto P, Rodriguez-Suárez RS. Randomised Equivalency Trial Comparing 2,5% Povidone-iodine Eye drops and Ophthalmic Chloramphenicol for Preventing Neonatal Conjunctivitis in a Trachoma Endemic Area in Southern Mexico. Br J Ophthalmol 2007; 91:1430-34.
- 16-Hanson C, Ronsmans C, Penfold S, Maokola W, Manzi F, Jaribu J et al. Health System for Childbirth Care in Southern Tanzania: Results From Health Facility Census. BMC Research Notes 2013; 6:435. Disponible en: <http://www.blomedcentral.com/1756-0500/6/435> Aceso en 27/09/14.
- 17-Centers for Disease Control and Prevention.MMWR 2005; 51:RR15.
- 18-US Preventive Services Task Force. Screening for gonorrhea 2005. Disponible en: <http://www.ahrq.gov/clinic/uspstf/uspstf-uspsgono.htm> Aceso en 20/06/2008
- 19- WHO, Department of Making Pregnancy Safe and Department of Reproductive Health Care. Standards for Maternal and Neonatal Care 2007. Disponible en: www.who.int/reproductivehealth/.../maternal.../en/ . Aceso em 20/9/14.
- 20-Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, Recommendations and Report. 2010 / 59(RR12);1 World Health Organization. Global Prevalence and Incidence Of Selected Curable Sexually Transmitted.

- 21- Tabatabaei SR, Afjeiee SA, Falla F, Zanjani NT, Shiva F, Fard AT et al. The Use of Polymerase Chain Reaction assay versus Cell Culture in Detecting Chlamydial Conjunctivitis. Arch of Iranian Med., 2012; 15: 171-175.
- 22- Seadi CF, Oravec R, von Poser B, Cantarelli VV, Rossetti ML. Diagnóstico laboratorial da infecção por Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas: artigo de revisão. J Bras Patol Med Lab 2002;19:125-33.
- 23- Murray RM, Rosenthal KS, Pfaller MA, Microbiologia Médica; [tradução da 6ª Ed].- Rio de Janeiro: Elsevier, 2009; p 430-38.
- 24- Murray RM, Rosenthal KS, Pfaller MA, Microbiologia Médica; [tradução da 6ª Ed].- Rio de Janeiro: Elsevier, 2009; p 412-16.
- 25- Haggerty CL, Taylor BD. Mycoplasma genitalium: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. Infect Dis Gynecol 2011 :959816.doi:10.1155/2011/959816
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3253449>. Acesso em 29/09/2014
- 26- Guala A, Guarino R, Zaffaroni M, Martano C, Fabris C, Pastore G et al. The Impact of National and International Guidelines on Newborn Care in the Nurseries of Piedmont and Aosta valley, Italy. BMC Pediatrics 2005; 5:45
Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/5/45>. Acesso em 30/09/2014.
- 27- Chakrabarti A, John SR, Stephen V, Chakrabarti M. Povidone-iodine in Ophthalmology. Kerala J of Ophthalmol 2007; 3: 282-286.
- 28- Isenberg SJ, AptL. The Ocular Application of Povidone Iodine. Community Eye Health 2003; 46:30,31.
- 29- State of Alaska Epidemiology Bulletin. Emergency Change Regarding Prophylactic Treatment of Newborn's Eyes. Bulletin nº 25, 2009. Disponível em <http://www.epi.alaska.gov> . Acesso em 27/09/14.
- 30- Abelson MB. The Most Efficient Ways to Eradicate Microorganisms from the Surgical Field and the Patient's Eye. Review of Ophthalmology Online 2008. Disponível em: http://www.reviewofophthalmology.com/content/d/therapeutic_topics/i/1222/c/22999/ . Acesso em 22/09/14.

- 31-Matinzadeh ZK, Beiragdar F, KavemaneshZ,AbolgasemiH, Amirsalari S. Efficacy of Topical Ophthalmic Prophylaxis in Preventioin of Ophthalmia Neonatorum. Trop Doc 2007;37:47-9.
- 32-Pastor JC, Alexandre I. Development of a National Prophylactic Program Against Neonatal Conjunctivitis in Angola: Pilot Study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; 5056 (ARVO poster).
- 33-Passos AF, Agostini FS. Conjuntivite neonatal com ênfase na sua prevenção. Rev Bras Oftalmol 2011 1:57-62
- 34-Zar HJ. Neonatal Chlamidial Infection Prevention and Treatment. Paediatr Drugs 2005;7:103-10.
- 35-Matejcek A, Goldman R. Treatment and Prevention of Ophthalmia Neonatorum. Can Fam Physician 2013; 59:1187-90.
- 36-Al-Atrushi AM, Salih AM, Salih AM. Ophthalmia Neonatorum in Duhok, North of Iraq: Bacterial Causative Agents and heir Antibiotic Sensivity Pattern. Isra Med J 2012; 4:209-12.
- 37- Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Polt B. Recommendations for laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Centers for Disease Control and Prevention.Morbidity and Mortality Weekly report (MMWR) 2014, 63 (RRo2) 1-19
- 38-Goldscmidt P, Rostane H, Sow M,Goépogui A, Chaumeil C. Detection by broad-range real.time PCR assay of *Chlamydia* species infecting human and animals.Br J Ophthalmol 2006; 11:1425-29.
- 39-Hammerschlag MR. Chlamydial and Gonococcal Infections in Infants and Children. Clin Infect Dis 2011; 53:S99-102.
- 40-Miller KE. Diagnosis and Treatment of Chlamydia trachomatis Infection. Am Fam Physician 2006, 73:1411-16.
- 41-Valdés CC, Puente AA, Martín JL, Feijoó JG. Farmacologia Ocular. LXXXIII Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmologia; 2007. p109-36.
- 42-Dreses-Werringloer U, Padubrin I, Zeider H, Köhler L. Effects of azithromycin and rifampin on *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 11:3001-8.

- 43- Murray RM, Rosenthal KS, Pfaller MA, Microbiologia Médica; [tradução da 6ª Ed, Taborda CP et al].- Rio de Janeiro: Elsevier, 2009; p 289-98.
- 44- Taylor SN, DiCarlo RP, Martin DH. Comparison of methylene blue/gentian violet stain to Gram's stain for the rapid diagnosis of gonococcal urethritis in men. *Sex Transm Dis* 2011; 11:995-6.
- 45- Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 2:92-98
- 46- Murray RM, Rosenthal KS, Pfaller MA, Microbiologia Médica; [tradução da 6ª Ed].- Rio de Janeiro: Elsevier, 2009; p 502-24.
- 47- Meyer D. Ophthalmia Neonatorum Prophylaxis and the 21 (st) Century Antimicrobial Resistance Challenge. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2014; 21:203-204.
- 48- Ranjit R , Menezes L, Drucker M, Msukwa G, Batumba N. Maternal and Neonatal Risk Factors Associated with Vertical Transmission of Ophthalmia Neonatorum in Neonates Receiving Health Care in Blantyre, Malawi. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2014; 21: 240-43.
- 49- Olantunji FO. Ophthalmia Neonatorum in Kaduna: a Case-Control Study. *Nigerian J of Ophthalmol* 2003; 11:63-69
- 50- Introduction to vaginites, cervicitis and pelvic inflammatory disease . The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Disponível em http://www.merckmanuals.com/professional/gynecology_and_obstetrics/vaginitis_cer... Acesso em 23/02/2015,
- 51- Centers for disease Control and prevention (CDC). Diseases characterized by vaginal discharge. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/vaginal-discharge.htm>. Acesso em 23/02/15.
- 52- Calonge N. Screening for Gonorrhoea: Recommendation Statement, *Ann Fam Med* 2005; 3:263-67.
- 53- Mabry-Hernandez I, Oliverio-Hoffman R. Ocular Prophylaxis for Gonococcal Ophthalmia Neonatorum: Evidence Update for the U.S. Preventive Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *AHRQ Publication* 2010; 10-05146.

- 54-McGowan CL, Anderson-Smiths C. Mycoplasma Genitalium: An Emerging Cause of Sexually Transmitted Disease in Women. *Plos Pathog* 2011;7:e1001324.10.1371/journal.ppat.1001324.
- 55-Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, et al. Mycoplasma genitalium as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 2009;36:598-606.
- 56-Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Gilbert GL. Fluorquinolone and macrolide resistance-associated mutations in mycoplasma genitalium. *J of Clin Microbiol* 2013; 7: 2245-49
- 57-Anagnius C, Loré B, Jensen JS. Mycoplasma Genitalium; Prevalence, Clinical Significance and Transmission. *Sex Transm Infect* 2005; 81:458-62.
- 58-Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Signs and Symptoms of Urethritis and Cervicitis Among Women With or Without Mycoplasma Genitalium or Chlamydia Trachomatis Infection. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 73-78.
- 59-Eschenbach DA. Chlamydia Trachomatis and Genital Mycoplasmas. In *Gynecology and Obstetrics CD.ROM Lippincott & Wilkins 2004 edition vol 3:48.*
- 60-Desai SV, Tank P. Preterm Prelabour Rupture of membranes: An Introduction. In *Handbook on Preterm Prelabour Rupture of Membranes in a Low Resource Setting. 1st edition Asia & Oceania Federation of Obstetrics & Gynecology; 2012. p3-7.*
- 61-Duff P. Management of Premature Rupture of the Membranes in Term Patients. In *In Gynecology and Obstetrics CD.ROM Lippincott & Wilkins 2004 Ed. Vol 2:46.*
- 62- Halilbasic M, Skokic F, Musanovic Z, Halilbasic A. Ophthalmia Neonatorum: Obstetric Risk Factors for Disease Occurrence. *Acta Medica Saliniana* 2013; 42: DOI:10.5457/ams.321.14. Disponible en: <http://saliniana.com.ba/index.php?journal=ams&page=article&op=viewArticle&path>. Acceso en 29/12/14
- 63-Darling EK. Is Mandatory Neonatal Eye Prophylaxis Ethically Justified? A Case Study from Canada. *Public Health Ethics* 2011; 2:185-191.

- 64- Profilaxis of conjunctival infections in newborn infants update. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps) 2010. Disponible www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/... Acceso en 02/03/.
- 65- Leung MP1, Bishop KD, Monga M. The effect of temperature on bactericidal properties of 10% povidone-iodine solution. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 5:869-71.
- 66- Monebenimp F, Lokolo MS, Zoung KBA, Tetanye. Efficacité de la Polyvidone Iodée à 2,5% Dans la Prévention de L'Ophthalmie Néonatale à Yaoundé, Cameroun. *Health Sci Dis* 2013; 14:4-9.
- 67- Mohile M, Deorari AK, Satpathy G, Sharma A, Singh M. Microbiological study of neonatal conjunctivitis with special reference to chlamydia trachomatis. *Indian J Ophthalmol* 2002; 50:295-99.
- 68- Yi TPP, Chan WH, Yip KT, Que TL, Lee MM, Kwong NS et al. Incidence of neonatal chlamydial conjunctivitis and its association with nasopharyngeal colonisation in a Hong Kong hospital, assessed by polymerase chain reaction. *Hong Kong Med J* 2007; 13:22-6.
- 69- Soltanzadeh MH, Shirvani F, Rajavi Z, Behzadifar A, Arbabi H, Badami N et al. The Prevalence and Etiology of Ophthalmia Neonatorum Among Hospital-born babies in Tehran, Iran. *Iran J of Pediatric Society* 2007; 1:49-53.
- 70- Whadwhani M, D'souza P, Jain R, Dutta R, Sali A, Singh A. Conjunctivitis in newborn – A Comparative Study. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54:254-7.

11. ARTÍCULOS

1-Alexandre I, Cortes N, Justel M, Fernández I, Ortiz de Lejarazu R, Pastor JC “**The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola**”. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2014;4:1. doi: 10.1186/1869-5760-4-1. Impact factor: 0.603

2- Justel M, Alexandre I, Martinez P, Sanz I, Rodríguez-Fernández A, Fernández I, Pastor JC, Ortiz de Lejarazu R. “**Vertical Transmission of Bacterial Eye Infections, Angola, 2011-2012.**” *Emerging Infectious Diseases* 2015;3:471-73” impact factor: 7.327

3- Alexandre I, Justel M, Martinez P, Ortíz de Lejarazu R, Pastor JC. “**First attempt to implement Ophthalmia Neonatorum prophylaxis in Angola: Microorganisms, efficacy, and obstacles**”. *Journal of Ophthalmology*”
Ophthalmology <http://dx.doi.org/10.1155/2015/326526> impact factor: 0.821

BRIEF REPORT

Open Access

The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola

Isabel Alexandre^{1,2}, Nestor Cortes³, Mar Justel⁴, Itziar Fernández^{5,6}, Raul Ortíz de Lejarazu⁴ and J Carlos Pastor^{3,5*}

Abstract

Background: Neonatal conjunctivitis or ophthalmia neonatorum (ON) is an acute bacterial conjunctivitis contracted by newborns during delivery. In non-industrialized countries, detection of the etiological agent is difficult due to the unavailability of modern diagnostic resources. Therefore, we analyzed the effectiveness of Gram and methylene blue staining techniques, which are simple microbiological methods in suspecting the aetiology of ON in a maternity ward in Luanda, Angola.

Findings: Neonatal conjunctival smears ($n = 95$), maternal data, and perinatal factors were collected. Slides were air-dried and sent to the Microbiology Department of the Hospital Clinico Universitario, Valladolid, Spain, where trained personnel performed Gram and methylene blue staining methods. Findings were interpreted by two expert microbiologists. Ophthalmological examination of all children showed five newborns with clinical signs of ON. Fourteen mothers reported were suspected with vulvo-vaginitis, and 27 had a urinary infection during pregnancy. Gram staining revealed the presence of epithelial cells in 87.6% and leukocytes in 15% of the conjunctival smears. These values were significantly higher than those shown by methylene blue staining. No rods, cocci, or yeasts were identified by either staining method. *Chlamydia trachomatis* DNA was also undetected in a small sub-sample with clinical suspicion of ON. There was no correlation among the presence of ON, ON microbes, maternal data, or perinatal factors.

Conclusions: Basic microbiological techniques did not provide enough information for screening cases of ON in Angola. Therefore, the use of molecular biology or other techniques is warranted for this purpose.

Keywords: Conjunctival smears; Gram stain; Methylene blue stain; Ophthalmia neonatorum screening; Angola

Findings

Neonatal conjunctivitis, or ophthalmia neonatorum (ON), has been a major health problem for many centuries [1]. ON develops during the first month of life, and it was originally referred as conjunctivitis caused by *Neisseria gonorrhoeae*. Now this term refers to any acute conjunctivitis (AC) developed in this age group, irrespective of the causative agent [2]. ON produced by sexually transmitted pathogens have declined as a result of the decreased prevalence of these infections as well as routine prenatal

screenings [3]. ON occurred in 1% to 12% of newborns and it is a mild disease with the exception of *N. gonorrhoeae* [3]. Without prevention, ON occurs in 30% to 42% of infants exposed to *N. gonorrhoeae* and may progress to corneal ulceration [4]. Today, blindness from ON is rare in industrialized countries [1], although it is still a problem in many areas of developing countries [5].

In Angola, after 30 years of civil war, the health care system has serious deficiencies including the lack of systematic prophylaxis for ON. In 2009, Pastor and Alexandre reported that in one maternity ward in Luanda, Angola, 12.3% of the children presented with clinically diagnosed bilateral AC [6]. Microbiological examinations were not available and there was no information on the causative agents.

* Correspondence: pastor@ioba.med.uva.es

³Department of Ophthalmology, Hospital Clinico Universitario, Valladolid 47005, Spain

⁵Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), University of Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belen 17, Valladolid 47011, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

Today, agents for ON include *Chlamydia trachomatis* (CT), *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, and others in addition to *N. gonorrhoea* [2,3]. Thus, effective treatment requires determining the causative agent.

In 2009, we started in Angola a project with the aim of developing a national programme for ON prophylaxis. Because access to microbiology techniques is complicated, we tried to provide the ophthalmologists the simplest tools to screen the pathogenesis of AC. Two simple and inexpensive staining techniques (ST), Gram and methylene blue (MB), were selected. Although they are unable to detect CT, they provide basic information about other potential ON agents. Thus, the purpose of this study was to analyze the clinical usefulness of the Gram and MB on conjunctival smears collected from newborns in a maternity ward in Luanda.

Patients, materials, and methods

The project was approved by Ethical Commission (Agostinho Neto University, Luanda). It was a prospective, non-interventional study including healthy newborns delivered at the Augusto N' Gangula Hospital from March to June 2010. It was conducted according to the Declaration of Helsinki.

Inclusion criteria were limited to those newborns having a gestational time of 37 to 40 weeks and birth weight of ≥ 2.300 kg whose mothers signed the informed consent.

Neonatal weight, Apgar score, delivery method, mother's age, ethnicity, residency, parity, prenatal care, and suspected or confirmed vaginal or urinary infections during pregnancy were recorded.

Samples were taken by the ophthalmologist, immediately after delivery, without using eyelid speculum and topical anaesthetics, with sterile swabs from the lower palpebral-conjunctival surface of both eyes. Each sample was smeared onto glass slides. Each slide was air-dried, fixed, and placed at room temperature. The slides were stored for a maximum of 3 weeks before shipping to the Department of Microbiology, Hospital Clinico Universitario, Valladolid, Spain, where they were stained with Gram and MB and analyzed by two microbiologists who examined at least 20 microscope fields per stain at $\times 1,000$ and agree on the final result.

The presence of epithelial cells (EC), leukocytes, rods, cocci, and yeasts was assessed and rated per five microscope fields. Geno Quick® technique (Hain Lifescience, Nerhen, Germany) was used for CT-DNA in ten slides from newborns with clinical signs of AC (discharge, redness, conjunctiva, and eyelid swelling).

After taking the samples, all newborns were given an examination including pupil and light responses, eyelid, conjunctiva, cornea, iris, and lens transparency, and retinal red reflex (Brückner test).

Statistical analyses

Normality was checked (Lilliefords' approximation to Kolmogorov-Smirnov test). Weighted kappa coefficient was used to evaluate the agreement between eyes and ST. Differences between eyes and ST were analyzed by the equality of two-proportions test. The relationship between microbiological and neonatal-maternal characteristics was evaluated by Spearman's correlation coefficient and Kruskal-Wallis analysis of variance. Statistical analyses were performed using R software [7] and package vcd [8]. The p values ≤ 0.05 were considered as significant.

Results

The data from 95 newborns and mothers were analyzed. Mother's age was 24.39 ± 6.29 years (range 15 to 42). Most of them, 55.7%, came from low socioeconomic neighbourhoods. Prenatal visits were 5.14 ± 2.5 (range 0 to 9), but 14 mothers had no medical attention before labour. Mean parity was 1.74 ± 1.78 . Most births were vaginal (84.2%) and 15 cases were by caesarean delivery (15.7%). Fourteen mothers (14.7%) reported suspected or confirmed vulvovaginitis during pregnancy and 27 (28.4%) with urinary infection. Forty-eight newborns were male (54.6%) and 40 (45.5%) were females. In the seven cases, the sex of the newborns was not noted.

All newborns had normal pupil reflexes and Brückner test. Eleven (11.6%) had pathologic findings and five with signs of AC.

All Geno Quick® results were negative. Rods, cocci, and yeast cells were absent in all slides. Cases without EC (36.8%) were significantly higher with MB ($p = 0.0002$, Table 1). The percentage with at least ten EC was significantly higher with Gram ($p < 0.0001$, Table 1). There were no significant differences in the other EC groups. Leukocytes were rarely seen by either ST (Table 1), and there were no significant differences by any method. There was low to moderate agreement on the presence of EC and leukocytes between eyes and between ST (Table 2). Because no microbes were detected, there were no correlations with neonatal-maternal characteristics.

Discussion

This is the first time that simple and affordable microbiological methods for ON screening have been assayed in a population of newborns in Luanda. This work has some limitations derived mainly from the lack of experience of the local ophthalmologists in performing clinical studies and collecting data in an appropriate form, but it can be considered as the first attempt to develop ophthalmic clinical research in Angola. Results are not tried to be generalized but to contribute to convince the health authorities to adopt some prophylactic measures to reduce the burden of ON.

Table 1 Presence of epithelial cells and leukocytes in the cytological examination

Cell presence			Methylene blue stain				Gram stain				p value*
			N	%	95% CI (%)		N	%	95% CI (%)		
					Lower limit	Upper limit			Lower limit	Upper limit	
Epithelial cells	LE	None	35	36.8	27.35	47.41	12	12.6	6.98	21.41	0.0002
		≤ 5	41	43.2	33.16	53.71	43	45.3	35.14	55.78	0.8839
		6-9	14	14.7	8.58	23.83	12	12.6	6.98	21.41	0.8328
		≥ 10	5	5.3	1.95	12.42	28	29.5	20.79	39.84	< 0.0001
	RE	None	35	36.8	27.35	47.41	11	11.6	6.2	20.18	0.0001
		≤ 5	39	41.1	31.21	51.63	28	29.5	20.79	39.84	0.1289
		6-9	15	15.8	9.4	25.03	27	28.4	19.87	38.74	0.0545
		≥ 10	6	6.3	2.59	13.77	29	30.5	21.71	40.94	< 0.0001
Leukocytes	LE	None	88	92.6	84.91	96.73	81	85.3	76.17	91.42	0.1651
		≤ 5	5	5.3	1.95	12.42	11	11.6	6.2	20.18	0.1915
		6-9	2	2.1	0.37	8.13	3	3.2	0.82	9.61	1.0000
		≥ 10	0	0	0	4.84	0	0	0	4.84	
	RE	None	92	96.8	90.39	99.18	87	91.6	83.61	96.03	0.2140
		≤ 5	2	2.1	0.37	8.13	3	3.2	0.82	9.61	1.0000
		6-9	1	1.1	0.05	6.56	2	2.1	0.37	8.13	1.0000
		≥ 10	0	0	0	4.84	3	3.2	0.82	9.61	0.2445

RE right eye; LE left eye; *Equality proportions test.

Culture and real time-PCR techniques are currently considered the most accurate, but routine use of these technologies in Angola is not yet possible and the goal of this work was to determine if was possible to provide the on-site ophthalmologists with some easy-to-perform screening tools that are able to reveal the possible aetiology of ON. Gram and MB staining techniques were considered as appropriate options [9] to exclude most of the ON microorganisms. Although Giemsa is the first method used for CT infection, MB and Gram stains are technically less complicated and Giemsa lacks sensitivity in detecting sexually transmitted infections [10].

Gram and MB stainings are starting techniques for almost any microbiological study, although not all bacteria can be definitively classified due to the existence of Gram-variable and Gram-indeterminate groups. These include CT which is neither stained by Gram nor MB. Nevertheless, Gram stain has proven to be as effective as PCR, particularly with regards to gonorrhoea, at least for urethritis [11]. Negative results found in this study are probably derived from the different bio-burden of these two diseases.

MB, one of the simplest ST, lacks on differentiation among bacteria but helps microbiologists discern among

Table 2 Agreement between eyes and staining techniques

			Concordance rate				Weighted kappa coefficient			
			N	%	95% CI of concordance rate		Kappa	95% CI of kappa		
					Lower limit	Upper limit		Lower limit	Upper limit	
Methylene blue stain vs. Gram stain	Epithelial cells	LE	33	34.7	25.5	45.3	0.128	-0.0961	0.3516	
		RE	38	40.0	30.2	50.6	0.243	-0.0029	0.4882	
	Leukocytes	LE	83	87.4	78.6	93.0	0.412	0.3074	0.5167	
		RE	89	93.7	86.2	97.4	0.381	0.3097	0.4525	
RE vs. LE	Epithelial cells	Methylene blue stain	61	64.2	53.7	73.7	0.524	0.2990	0.7495	
		Gram stain	36	37.9	28.3	48.5	0.174	-0.0543	0.4024	
	Leukocytes	Methylene blue stain	88	92.6	85	96.7	0.281	0.2104	0.3514	
		Gram stain	80	84.2	75	90.6	0.373	0.2673	0.4796	

RE right eye; LE left eye. Concordance values can vary between 0 (no concordance) and 1 (perfect concordance). Moderate concordance was considered to be 0.4 to 0.5, and good concordance was considered to be ≥ 0.6.

rod-, spherical-, and spiral-shaped bacteria [12]. Results for both techniques, in this study, have been discouraging.

The presence of EC was used for comparing efficacy of both ST and to rule out the existence of technical problems when smears were taken [13]. Conjunctival leukocytes can be interpreted as an indirect sign of bacterial conjunctivitis, although they can be present in normal eyes [13,14]. In our series 10% of cases showed leukocytes, although there was no clear relationship with clinical signs. Five cases showed clinical signs of AC, and only one case had leukocytes.

Conjunctival scraping is useful for AC diagnosis in children [15,16] but it was not considered in this study because of its aggressiveness for the ocular surface. Nevertheless, it is possible that scraping was more efficient.

There was no correlation between clinical cases of AC and clinical parameters from the mother, although they are considered as risk factors [17]. Although the scarce number of samples was analyzed by PCR, no cases of CT were identified. While the incidence of ON due to CT in Angola is not known, the prevalence in Africa of ON due to *N. gonorrhoea* and CT is 50 per 1,000 newborns [18-20]. Angola could be one of the countries with lowest prevalence of CT and it may be necessary to develop culture techniques suitable for Angolan environment for some of the causative agents of ON, although CT is a fastidious microorganism who needs sophisticated cell culture medium.

There are few recent papers on this topic. In one, from Togo [21], the authors found that 8% of AC cases are more frequent in newborns delivered via vagina and mostly associated to sexually transmitted infections. *Staphylococcus aureus* was present in 25% of cases. Authors suggested that educational efforts should be made in neonatal centres. The other was made in India [22], where the prevalence of ON was low (2,6%), although authors refer that rates varies from 0.5% to 33%. The commonest organism was coagulase-negative *Staphylococcus*.

In summary, although it is feasible for ophthalmologists to perform Gram and MB staining techniques on conjunctival smears, they do not provide etiological information; thus; the use of more sophisticated techniques is warranted.

Abbreviations

AC: Acute conjunctivitis; CT: *Chlamydia trachomatis*; EC: Epithelial cells; MB: Methylene blue stain; ON: Ophthalmia neonatorum; PCR: Polymerase chain reaction; ST: Staining techniques: Gram and methylene blue.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IA carried out the preparation in Luanda including obtaining the ethical approval, organized the ophthalmologist team in Luanda, examined the newborns, took the smear samples, and drafted the manuscript. NC contributed in training the involved personnel in Luanda, took the samples,

and revised the manuscript. MJ made the microbiological examinations and drafted the manuscript. IF participated in the design of the study and performed the statistical analysis. ROL made the microbiological examinations, organized the technicians in performing the staining, and drafted the manuscript. JCP conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

IA is an ophthalmologist and professor of Ophthalmology department at the Agostinho Neto University Medical School, Luanda, Angola. She is also the academy director of the Instituto Oftalmológico Nacional de Angola, Luanda, Angola. NC is an ophthalmologist. During the project he was a resident in Ophthalmology department at the Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain. MJ is a resident in Microbiology Department at the Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain. IF is a statistician and member of the CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain and the IOBA (Eye Institute) University of Valladolid, Valladolid, Spain. RO is a microbiologist and the head of the Microbiology Department at the Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain. JCP is a full professor of Ophthalmology and the chairman at the Hospital Universitario de Valladolid, Spain. He is also the director of the IOBA (Eye Institute), University of Valladolid, Valladolid, Spain.

Acknowledgements

The authors would express their gratitude to Alda Rola, Alcina Copitule, and Walter Diogo Brás, ophthalmologists of the IONA (Instituto Oftalmológico Nacional de Angola), Luanda, Angola, for their contribution in the acquisition of data. We would also like to thank the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID) of the Foreign Office Ministry for funding the project and the Ministry of Health of Angola for its cooperation.

Author details

¹Instituto Oftalmológico Nacional de Angola, Ministerio de Saúde, Luanda 2177, Angola. ²Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Agostinho Neto, Luanda 2177, Angola. ³Department of Ophthalmology, Hospital Clínico Universitario, Valladolid 47005, Spain. ⁴Department of Microbiology and Immunology, Hospital Clínico Universitario, Valladolid 47005, Spain. ⁵Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), University of Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belen 17, Valladolid 47011, Spain. ⁶CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28029, Spain.

Received: 27 October 2013 Accepted: 7 January 2014

Published: 25 January 2014

References

- Schaller UC, Klauss V (2001) Is Credé's prophylaxis for ophthalmia neonatorum still valid? *Bull World Health Organ* 79:262-263
- Gul SS, Jamal M, Khan N (2010) Ophthalmia neonatorum. *J Coll Physicians Surg Pak* 20:595-598
- (2002) Recommendations for the prevention of neonatal ophthalmia. *Paediatr Child Health* 7:480-488
- Forbes GB, Forbes GM (1971) Silver nitrate and the eye of the newborn. Credé's contribution to preventive medicine. *Am J Dis Child* 121:1-3
- Ali Z, Khadije D, Elahe A, Mohammad M, Fateme Z, Narges Z (2007) Prophylaxis of ophthalmia neonatorum comparison of betadine, erythromycin and no prophylaxis. *J Trop Pediatr* 53:388-392
- Pastor JC, Alexandre I (2009) Development of a national prophylactic program against neonatal conjunctivitis in Angola: pilot study. In: ARVO 2009 Annual Meeting. Fort Lauderdale, 3-7 May 2009
- R Core Team. R (2012) A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org/>. ISBN 3-900051-07-0 Accessed 2 July 2013
- Meyer D, Zeileis A, Hornik K (2012) VCD: visualizing categorical data. R Package Version 1, pp 2-13, <http://cran.r-project.org/web/packages/vcd/vcd.pdf> Accessed 2 July 2013
- Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH et al (2013) Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis* 13:26, doi:10.1186/1471-2334-13-26

10. Rafiei Tabatabaei S, Afjeiee SA, Fallah F, Tahami Zanjani N, Shiva F, Tavakkoly Fard A, Shamshiri AR, Karimi A (2012) The use of polymerase chain reaction assay versus cell culture in detecting neonatal chlamydial conjunctivitis. *Arch Iran Med* 15:171–175
11. El-Gamal AH, Al-Otaibi SR, Alshamali A, Abdulrazzaq A, Najem N, Fouzan AA (2009) Polymerase chain reaction is no better than Gram stain for diagnosis of gonococcal urethritis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 75:101
12. Abbott J (1995) Clinical and microscopic diagnosis of vaginal yeast infection: a prospective analysis. *Ann Emerg Med* 25:587–591
13. Baron EJ, Thomson RB Jr (2011) Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds) *Manual of clinical microbiology*, vol 1, 10th edn. ASM, Washington DC, p 242
14. Hingorani M, Metz D, Lightman SL (1997) Characterisation of the normal conjunctival leukocyte population. *Exp Eye Res* 64:905–912
15. Batellier L, Liotet S (1985) Comparative cytological study of conjunctival secretions and smears. *J Fr Ophtalmol* 8:653–657
16. Weiss A, Brinser JH, Nazar-Stewart V (1993) Acute conjunctivitis in childhood. *J Pediatr* 122:10–14
17. MacDonald N, Mailman T, Desai S (2008) Gonococcal infections in newborns and in adolescents. *Adv Exp Med Biol* 609:108–130
18. Foster A, Klaus V (1995) Ophthalmia neonatorum in developing countries. *N Engl J Med* 332:600–601
19. Isenberg SJ, Apt L, Wood M (1996) The influence of perinatal infective factors on ophthalmia neonatorum. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 33:185–188
20. Laga M, Nzanze H, Brunham RC, Ndinya-Achola JO, Maita G, Ronald AR, D'Costa LJ, Bhullar VB *et al* (1986) Epidemiology of ophthalmia neonatorum in Kenya. *Lancet* 328:114–119
21. Ayena KD, Amedome KM, Diallo JW, Dzidzinyo KB, Azoumah KD, Aboubakari AS, Salou M, Koffi SK, Tchassi N, Balo KP (2012) What remains today of neonatal conjunctivitis in prefecture of Kozah in Togo? *J Fr Ophtalmol* 35:432–436
22. Wadhvani M, D'souza P, Jain R, Dutta R, Saili A, Singh A (2011) Conjunctivitis in the newborn - a comparative study. *Indian J Pathol Microbiol* 54:254–257

doi:10.1186/1869-5760-4-1

Cite this article as: Alexandre *et al.*: The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 2014 4:1.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

Vertical Transmission of Bacterial Eye Infections, Angola, 2011–2012

Mar Justel, Isabel Alexandre, Prudencio Martínez, Iván Sanz, Ana Rodríguez-Fernández, Itziar Fernández, Jose Carlos Pastor, Raúl Ortiz de Lejarazu

To determine transmission rates for neonatal conjunctivitis causative microorganisms in Angola, we analyzed 312 endocervical and 255 conjunctival samples from mothers and newborns, respectively, during 2011–2012. Transmission rates were 50% for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* and 10.5% for *Mycoplasma genitalium*. Possible pathogenic effects of *M. genitalium* in children's eyes are unknown.

Ophthalmia neonatorum (neonatal conjunctivitis) can be easily prevented with prophylactic administration of topical antimicrobial drugs, as recommended by global guidelines for the management of sexually transmitted infections (1). However, in Angola, routine prenatal and prophylactic care to prevent this disease in newborns is lacking. In 2009, a project aimed at developing a national program for ophthalmia neonatorum prophylaxis in all maternity wards of Angola was started through the Spanish Agency for International Cooperation and Development and with the collaboration of the Angolan Ministry of Health. A previous pilot study in Luanda, Angola, showed that clinical cases of acute conjunctivitis among newborns were frequent; ≈12% of infants were born with bilateral acute conjunctivitis (2). However, the absence of microbiology laboratory resources at the study site resulted in the inability to determine the causative pathogens. One of the phases of the program was to analyze the usefulness of molecular biology tests to detect 2 of the most common sexually transmitted pathogens associated with transmission

from the mother to the eye of the child—*Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* (3)—and an emerging third pathogen (4), *Mycoplasma genitalium*. Our aim with this study was to assess the frequency of these 3 infections in a sample of mothers and their newborns in Angola and to determine the rate of vertical transmission.

The Study

In this prospective, observational study, from December 2011 through February 2012, pregnant women and their newborns were recruited from 2 obstetric clinical wards at the Augusto N'Gangula Hospital and the Health Center of Samba in Angola. Study participation was voluntary. Specific informed consent was obtained from all participants before specimens were collected. Approval of the study protocol for scientific and ethical aspects was obtained from the Ethical Commission of the School of Medicine of the Agostinho Neto University (Luanda, Angola). The study was performed in accordance with the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and later amendments.

Included in the study were mothers who were healthy (with the possible exception of genitourinary disease) and their newborns with a gestational time of 37–40 weeks and a weight of ≥2.3 kg. Endocervical samples were obtained consecutively from pregnant women who agreed to participate in the study and were collected after removal of postpartum secretions from the endocervical os. Ocular samples were obtained from both eyes of the newborns by vigorous swabbing across the inferior tarsal conjunctiva. Samples from each eye were then pooled for analysis. After sampling, the newborns were prophylactically given 5% povidone iodine eyedrops.

Samples were collected with flocked swabs in Universal Transport Medium (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italy), stored at –70°C, and shipped to the Department of Microbiology at the Hospital Clínico Universitario of Valladolid, Valladolid, Spain. DNA extraction was performed according to routine laboratory standards with the GXT DNA/RNA reagents in a GenoXtract extractor (Hain-Lifescience, Nehren, Germany). A multiplex PCR that co-amplified DNA sequences of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, and an internal control was performed by using the Bio-Rad Dx CT/NG/MG assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (5). The primers and probe for *C. trachomatis* targeted a sequence of the cryptic plasmid located outside the region deleted in the new variant strain

Author affiliations: Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain (M. Justel, A. Rodríguez-Fernández, J.C. Pastor, R. Ortiz de Lejarazu); Agostinho Neto University Medical School, Luanda, Angola (I. Alexandre); Instituto Oftalmológico Nacional, Luanda (I. Alexandre); Redigal, Oviedo, Spain (P. Martínez); Centro Nacional de Gripe, Valladolid (I. Sanz, R. Ortiz de Lejarazu); Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (I. Fernández); Instituto Oftalmobiología Aplicada, Valladolid (I. Fernández, J.C. Pastor); Universidad de Valladolid, Valladolid (J.C. Pastor, R. Ortiz de Lejarazu)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.140312>

of *C. trachomatis* (6). For *N. gonorrhoeae*, the target was a sequence in the *pilE* gene that rarely yields false-positive results. For *M. genitalium*, the target was a sequence in the *MgPa* gene. To avoid laboratory or sampling errors, we processed the samples from the mothers and newborns separately and included positive and negative controls in the PCRs. Amplification and detection were performed in a 7500Fast Real-Time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Statistical analyses were performed by using R Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

A total of 567 samples were analyzed (Table 1). Results of detection by multiplex PCR were considered for prevalence estimates of the 3 infections (Table 2). Transmission rates were 50% for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* and 10.5% for *M. genitalium*. For 7 infected mothers (2 *C. trachomatis*-infected and 5 *M. genitalium*-infected), no samples could be obtained from their newborns.

Conclusions

The microorganism most frequently found among mothers was *M. genitalium*, and the microorganism most frequently found among newborns was *C. trachomatis*. Despite the association of *M. genitalium* with sexually transmitted infections in men and women (4), we are aware of only 1 other case of conjunctivitis associated with *M. genitalium* (7).

Only 1 mother was co-infected by 2 microorganisms, *C. trachomatis* and *M. genitalium*, consistent with the low rate of this co-infection found in other studies (8). This mother gave birth to 1 of the 4 *C. trachomatis*-infected newborns. Not answered by this study is the hypothetical role of *M. genitalium* as a co-factor for transmission of other major sexually transmitted pathogens. *M. genitalium* has also been studied as a possible contributor to the pathogenesis of trachoma in a trachoma-endemic area of Tanzania, but no evidence was found regarding its contribution (9). Our findings regarding *M. genitalium* infections in this sample need further study because the relatively small number of infected mothers and children can be a confounding factor and because the real prevalence of *M. genitalium* needs to be assessed by larger studies.

The frequency of *C. trachomatis* infection among the study sample (mothers and newborns), 2.1%, was lower than that found in previous studies in different populations in Africa (10). The frequency of *N. gonorrhoeae* infection among the study sample, 0.5%, was also lower than that found in other African countries, such as the Central African Republic (3.1%) and South Africa (7.8%) (11). The frequency of *M. genitalium* infection among the study mothers, 6.1%, was slightly higher than that found in other studies of asymptomatic women (8).

Table 1. Samples collected for analysis of vertical transmission of eye infections, Angola, 2011–2012

Sample type	Augusto N'Gangula	Health Center of Samba	Total
Endocervical	169	143	312
Conjunctival*	130	125	255
Total	299	268	567

*For reasons other than exclusion criteria, samples from 57 newborns were not obtained.

Rates of transmission from the mother to the eye of the child differed markedly for each of the 3 microorganisms studied. The rate of *M. genitalium* transmission was much lower than that for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. Vertical transmission of *M. genitalium* is uncommon; we are aware of only 1 reported case (12). Although *M. genitalium* is among the most prevalent pathogens in this sample of mothers in Africa, vertical transmission of this microorganism was less frequent than that of other classical sexually transmitted pathogens like *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. However, high prevalence in any maternal population, even with a relative low rate of transmission, could lead to a large number of neonatal infections.

All infected children were from mothers who were also infected. It can be assumed that, as with HIV infection, detection of any of the assayed microorganisms in conjunctival samples of newborns predicts diagnosis in their mothers (13). This so-called mirror effect is clinically useful in view of cultural behaviors that would complicate detection of sexually transmitted pathogens in adult women, especially in geographic settings of Muslim practices (14).

The major limitation of this study was the difficulty of correctly preserving samples in the hot and humid environment of Angola. To prevent DNA denaturation, samples were frozen immediately after collection and shipped as soon as possible. Unfortunately, those precautions precluded the culturing of samples, so PCR results could not

Table 2. Prevalence of microorganisms among mothers and newborns from Augusto N'Gangula Hospital and Health Center of Samba in Luanda, Angola, 2011–2012

Microorganism, sample type	No. positive/ no. collected	Prevalence, % (95% CI)
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
Endocervical	8/312	2.6 (1.3–4.9)
Conjunctival	4/255	1.6 (0.6–3.9)
Total	12/567	2.1 (1.2–3.6)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
Endocervical	2/312	0.6 (0.2–2.3)
Conjunctival	1/255	0.4 (<0.1–2.2)
Total	3/567	0.5 (0.2–1.5)
<i>Mycoplasma genitalium</i>		
Endocervical	19/312	6.1 (3.9–9.3)
Conjunctival	2/255	0.8 (0.2–2.8)
Total	21/567	3.7 (2.4–5.6)
All 3 microorganisms		
Endocervical	28/312*	9.0 (6.3–12.6)
Conjunctival	7/255	2.7 (1.3–5.5)
Total	35/567*	6.2 (4.5–8.5)

*One mother was co-infected with *C. trachomatis* and *M. genitalium*.

be compared with culture results. Another disadvantage was the lack of more precise clinical information from participants because of the absence of antenatal care for most.

Our study findings indicate that new molecular techniques will help microbiological diagnosis of neonatal conjunctivitis in Africa. They also show the need for a national program for neonatal conjunctivitis prophylaxis in Angola, taking into account the most frequent causative microorganism.

This work was sponsored in part by financial support from the Spanish Agency for International Cooperation and Development, Ministry of Foreign Affairs, Spain; and the Angola Ministry of Health.

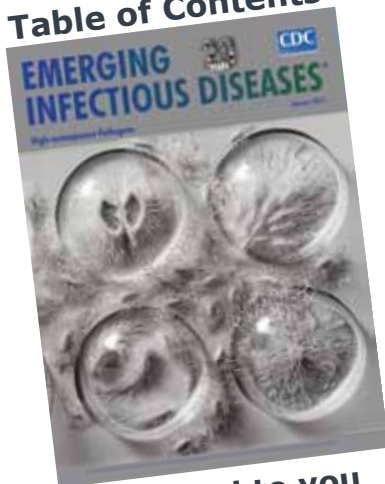
Ms. Justel is a pharmacist specialized in microbiology who works in the Microbiology and Immunology Department at the Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Her primary research interests are molecular and microbiological diagnosis of sexually transmitted infections and ocular infections.

References

1. World Health Organization. Guidelines for the management of sexually transmitted infections [cited 2014 Apr 14]. <http://www.who.int/hiv/pub/sti/pub6/en/>
2. Pastor JC, Alexandre I. Development of a national prophylactic program against neonatal conjunctivitis in Angola: pilot study. Poster presented at: Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2009 May 3–5; Fort Lauderdale, Florida, USA. Abstract no. 5056.
3. Hammerschlag MR. Chlamydial and gonococcal infections in infants and children. *Clin Infect Dis*. 2011;53:S99–102. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir699>
4. McGowin CL, Anderson-Smits C. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1001324. doi: 10.1371/journal.ppat.1001324
5. Le Roy C, Le Hen I, Clerc M, Arfel V, Normandin F, Bébéar C, et al. The first performance report for the Bio-Rad Dx CT/NG/MG assay for simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in urogenital samples. *J Microbiol Methods*. 2012;89:193–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.009>
6. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006;11:E061109.2.
7. Björnelius E, Jensen JS, Lidbrink P. Conjunctivitis associated with *Mycoplasma genitalium* infection. *Clin Infect Dis*. 2004;39:e67–9. <http://dx.doi.org/10.1086/423809>
8. Andersen B, Sokolowski I, Østergaard L, Kjøseth Møller J, Olesen F, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. *Sex Transm Infect*. 2006;83:237–41. <http://dx.doi.org/10.1136/sti.2006.022970>
9. Pepin J, Deslandes S, Frost E, Andreassen AA, Solomon AW, Bailey R, et al. Absence of *Mycoplasma genitalium* in eye samples from a trachoma-endemic area of Tanzania. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:435. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.2007.121954>
10. Cappuccinelli P, Gomes E, Rubino S, Zanetti S, Lemos C, Calundungo R, et al. *Chlamydia trachomatis* in gynaecological infections in Luanda, Angola. *Genitourin Med*. 1995;71:326–7.
11. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates [cited 2014 Jan 31]. http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf
12. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG*. 2011;118:164–74. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02766.x>
13. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA*. 2000;283:1175–82. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.283.9.1175>
14. Underwood SM, Shaikha L, Bakr D. Veiled yet vulnerable. Breast cancer screening and the Muslim way of life. *Cancer Pract*. 1999;7:285–90. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-5394.1999.76004.x>

Address for correspondence: Mar Justel, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Departamento de Microbiología e Inmunología, C/Ramón y Cajal Valladolid 47005, Spain; email: marjustel@hotmail.com

Table of Contents



Emailed to you

GovDelivery

Manage your email alerts
so you only receive content
of interest to you.

Sign up for an Online Subscription:
wwwnc.cdc.gov/eid/subscribe.htm

Clinical Study

First Attempt to Implement Ophthalmia Neonatorum Prophylaxis in Angola: Microorganisms, Efficacy, and Obstacles

Isabel Alexandre,¹ Mar Justel,² Prudencio Martinez,³
Raul Ortiz de Lejarazu,² and J. Carlos Pastor³

¹IONA, Eye Institute, Rua de Olivença, Luanda, Angola

²Department of Microbiology and Immunology, Hospital Clinico Universitario, Avenida Ramon y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

³IOBA, Eye Institute, University of Valladolid, Paseo de Belen 17, 47011 Valladolid, Spain

Correspondence should be addressed to J. Carlos Pastor; pastor@ioba.med.uva.es

Received 18 December 2014; Accepted 1 February 2015

Academic Editor: Terri L. Young

Copyright © 2015 Isabel Alexandre et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. To determine the efficacy of povidone-iodine (P-I) prophylaxis for ophthalmia neonatorum (ON) in Angola and to document maternal prevalence and mother-to-child transmission rates. **Methods.** Endocervical samples from mothers ($n = 317$) and newborn conjunctival smears ($n = 245$) were analysed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) for *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), and *Mycoplasma genitalium* (MG). Newborns were randomized into a noninterventive group and an interventional group that received a drop of P-I 2.5% bilaterally after conjunctival smear collection. Mothers were trained to identify signs of ON and attend a follow-up visit. **Results.** Forty-two newborns had ocular pathology, and 11 (4.4%) had clinical signs of ON at the time of delivery. Maternal PCR was positive for MG ($n = 19$), CT ($n = 8$), and NG ($n = 2$). Six newborns were positive for CT ($n = 4$), MG ($n = 2$), and NG ($n = 1$). Mother-to-child transmission rates were 50% for CT and NG and 10.5% for MG. Only 16 newborns returned for follow-up. **Conclusions.** Lack of maternal compliance prevented successful testing of prophylactic P-I efficacy in ON prevention. Nevertheless, we documented the prevalence and mother-to-child transmission rates for CT, NG, and MG. These results emphasize the need to develop an effective Angolan educational and prophylactic ON program.

1. Introduction

Acute ophthalmia neonatorum (ON) continues to play an important role in causing severe ocular problems of newborns in countries where primary health care coverage is insufficient, as in the case of Angola [1]. Unfortunately, in most clinical obstetric wards of Luanda, the nation's capital, there is no regular plan of ON prophylaxis, nor is there any capacity for determining the microorganisms involved in the etiology of this entity. Therefore, most of the acute conjunctivitis cases in the newborns are empirically diagnosed as ON and treated without having information on the causative agent.

Although prenatal screening and treatment of pregnant women are very effective for the prevention of ON [2], this approach can be difficult to implement in developing countries. In some African countries, at the time of delivery, a large percentage of expectant mothers have had little or no prenatal care.

In industrialized countries, ON prophylaxis was performed by silver nitrate eyedrops and currently by topical erythromycin, tetracycline ointment, and others [2]. In other developed countries, emphasis is placed on maternal surveillance, and there is no systematic prophylaxis of ON.

The use of povidone-iodine (P-I) has been advocated for the less developed countries [3], but few well-designed prospective, randomized, and controlled clinical studies have been performed with this agent [2]. Even while doubts remain regarding the real efficacy of P-I for prevention of ON caused by either *Chlamydia trachomatis* (CT) or *Neisseria gonorrhoeae* (NG) [4, 5], this substance is well tolerated, has a broader spectrum than other anti-infectious agents, does not induce resistance, and is more effective than some antibiotics that are more expensive for prophylaxis [6, 7].

After the civil war in Angola (1974–2002), the public health system was almost completely devastated. In 2009,

we conducted a pilot study structured as a maternity ward prospective series and found that 12% of the newborns had signs of acute bilateral conjunctivitis [8]. The problem was considered very serious because there was no program for ON prophylaxis. An additional problem was the inability to determine the microorganisms involved [9–11] because microbiological studies were not routinely performed at either maternity wards or eye centers.

Based upon these existing conditions, we decided to evaluate different tests that could provide necessary microbiological information to the ophthalmologists and then select the best one for implementation in a nationwide ON prophylaxis program. Our initial attempt was to use the simplest available diagnostic tool, standard staining of conjunctival swabs by Giemsa and Gram stains [12]. However, this provided little useful information regarding the active ON agent(s). Following this, we attempted to use multiplex polymerase chain reaction (PCR) of maternal endocervical and neonatal conjunctival specimens for microorganism identification. The PCR assay has been previously validated with conjunctival and endocervical samples collected from this study (manuscript accepted). In brief, we demonstrated that this technique could be used to identify the three major microorganisms, for example, CT, NG, and *Mycoplasma genitalium* (MG), involved in sexually transmitted infections (STIs). This was successful not only in endocervical samples, but also in conjunctival smears, where it never had been used. Therefore, our recommendation for Angola's health authorities was to provide this kind of microbiological identification technique. The primary purpose of this work was to analyze the efficacy, limitations, and obstacles of 2.5% P-I eyedrops for the prophylaxis of ON in Angola. These data are intended to provide the local health authorities with enough information to develop a national prophylactic campaign against ON based on the routine use of P-I eyedrops for every newborn. A secondary objective was to provide additional data on the etiological agents both in conjunctival smears from newborns and in endocervical samples from their mothers and the possible relationship of these agents with clinical risk factors.

2. Material and Methods

An interventional, randomized, and prospective study with a blinded, randomized control group was designed. The study was conducted at the General Augusto N'Gangula Specialized Hospital (HGEAG) and the Health Center of Samba (CSS), both in Luanda, Angola. Approval was provided by the Ethical Commission of the Faculty of Medicine of the Agostinho Neto University (Luanda, Angola). After the explanation of the objectives and methodology of the investigation, informed consent was obtained from the mothers. The study was performed in accordance with the ethical standards from the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

2.1. Patients. The target population for this study consisted of 317 mothers and their newborns from the HGEAG (173) and the CSS (144), recruited from 7 December 2011 to 22

November 2012. The inclusion criteria consisted of healthy children weighing at least 2.3 kg and a gestation period of at least 37 weeks. Newborns not meeting the inclusion criteria and those with respiratory distress at birth were excluded. Additionally, because of the possible deleterious effect of iodine, newborns were excluded if their mothers were diagnosed with thyroid disease according to clinical data contained in her medical record.

2.2. Procedure. Maternal data were collected through a questionnaire that included age, race, education, parity, number of prenatal visits, pathology during pregnancy, and duration of rupture of the amniotic sac. Newborn data included weight, Apgar rate, and delivery procedure. Neonates were randomly distributed into two groups, A and B, by blocked randomization with a fixed block size of 4. Newborns in Group A received no intervention. Newborns in Group B received instillation of a drop of P-I 2.5% in the bottom of the lower sac of both eyes immediately after a basic eye examination and the collection of conjunctival smears within 3 hours of birth. Custom 2.5% P-I eyedrops were prepared by a certified Spanish pharmacy (Carreras, Barcelona, Spain) following the standards of good manufacturing practices. For each newborn, a new bottle of P-I was used. Maternal endocervical samples were obtained after removing postpartum secretions from the endocervical os. Ocular samples were obtained from both eyes of the newborns by vigorous swabbing across the inferior tarsal conjunctiva. The collected samples from each eye were then pooled for analysis. All samples were taken by ophthalmologists and medical personnel previously trained in these procedures by an expert microbiologist from Spain (PM).

Samples were collected with flocked swabs in Universal Transport Medium (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italy), stored at -70°C , and shipped to the Department of Microbiology and Immunology at the Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain. DNA extraction was performed according to routine laboratory standards with the GXT DNA/RNA reagents in a GenoXtract extractor (Hain Lifescience, Nehren, Germany). A multiplex PCR assay that coamplified DNA sequences of CT, NG, MG, and an internal control was performed using the Bio-Rad Dx CT/NG/MG Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The ophthalmologist responsible for the study (IA) administered the P-I eyedrops. The basic eye examination given to all newborns included pupil light responses, eyelid position and movement, appearance of the conjunctiva, corneal size and transparency, iris appearance and symmetry, lens transparency, quality and symmetry of retinal red reflex (Brückner test), and the size, position, and shape of the pupil. An information sheet with explanations about the signs of ophthalmia/acute conjunctivitis (red eye and ocular secretions and/or eyelid edema) was given to all participating mothers. They were also given instructions to return with their children for observation after discharge from the maternity ward in any case, even if their baby did not show these signs. The mobile phone number of each mother was noted (only two mothers gave no indication of telephone contact). Between the 5th day and 7th day postpartum, phone

TABLE 1: Summary of the cases and samples.

Maternity	Mothers included	Newborns included	Endocervical samples analysed	Conjunctival samples analysed	Newborns with signs of acute conjunctivitis at the delivery	Newborns treated with povidone-iodine	Follow-up examination
Augusto N'Gangula	173	140	171	108	20	57	14*
Samba	144	105	140	75	22	58	2
Total	317	245	311	183	42	115	16

* Four children had signs of acute conjunctivitis with discharge at the follow-up visit.

calls were made to the mothers to bring their infants for observation, especially if they presented ocular signs of ON or any other ocular alterations.

The minimum sample size was calculated taking in consideration the suspected prevalence of ON detected in our previous study [8] and with an expected reduction of ON in at least 30% in the prophylaxis group (Group B). To detect a 8% difference between treatment groups with a significance level of 5% and power of 80%, a sample size of 334 newborns was estimated, 167 per group. Infection rates of the different ON bacteria in the endocervical samples of the mothers and in the conjunctival samples of their newborns and the presence of clinical risk factors were compared by χ^2 test.

3. Results

The mean age of the 317 participating mothers was 25 years (range: 14–52 years), with the majority between 14 and 24 years. Some of the mothers, 28%, had a basic level of education and 2.2% were illiterate and the remainders have good reading skill. Parity varied from 0 to 9 births, with 82% of the mothers having had 3 previous deliveries. There was no parity data for 4 cases. The number of prenatal consultations of the mothers ranged from 0 to 9, with an average of 4 consultations. Thirty-eight cases (1.2%) did not have any prenatal consultation, and 112 cases (35%) had less than four. There was no data for prenatal consultations from 19 cases. A total of 96 mothers (30.4%) referred some pathology during pregnancy, predominately urinary infection in 81 mothers (25.6%) and vulvovaginitis in 13 others (4.1%). A total of 70 mothers (22%) presented with premature rupture of membrane (PROM). Thirty-one of them had more than 6 hours before delivery, and 39 had less than 6 hours. Data were collected from 317 children, but a total of 72 newborns were excluded (22.6%) from the study for low weight, respiratory distress, death, or transfer of the mother to a more specialized center for dystocic delivery (Table 1). Newborns, 123 females and 118 males, had a gestational age of 36 to 40 weeks, and an average weight of 3.260 kg. The sex of four newborns was not registered. The predominant mode of delivery was vaginal (88.6%). A total of 42 (17.1%) had ocular pathology at the time of delivery, including 31 (12.6%) with conjunctival hyperemia and 11 (4.4%) with ON signs, including conjunctival hyperemia plus eyelid edema and/or purulent secretion. All newborns with suspected ON were delivered vaginally. Three out of the 11 suspected ON cases were born from mothers with urinary infections during

TABLE 2: PCR-based diagnosis of infectious agents.

	<i>n</i>	Cases with mother and newborn infected by same microorganism	Coinfections
Total valid newborn conjunctival samples	232		
CT	4		
NG	1		
MG	2		
Missing samples	13		
Total valid maternal endocervical samples	311		
CT	8	2	1
NG	2	1	
MG	19	1	1
Missing samples	6		

CT: *Chlamydia trachomatis*. NG: *Neisseria gonorrhoeae*. MG: *Mycoplasma genitalium*. Missing data were due to the inability to run PCR samples. Coinfections: one mother had CT and MG at the same sample.

pregnancy. For five of the newborns with signs of ON, the amniotic sac did not rupture prematurely. For the other six, there was no data on the time of sac rupture.

Due to technical difficulties in the preparation of the samples for transport to Spain for PCR analysis, there was no information available regarding the presence or absence of CT, MG, and NG for 6 maternal endocervical samples and 13 newborn conjunctival smears. A total of 543 valid samples were analyzed, 232 from conjunctival smears and 311 from endocervical samples (Table 2). The most common etiologic agent in newborns was CT ($n = 4$), followed by MG ($n = 2$) and then NG ($n = 1$). PCR gave positive results in 28 mothers, with a predominance of MG ($n = 19$, 6.1%), followed by CT ($n = 8$, 2.1%) and NG ($n = 2$, 0.5%). One endocervical sample was coinfecting with CT and MG. Eleven of the 28 mothers (39.3%) who were infected with CT, MG, or NG presented risk factors for mother-to-child transmission. The factors included PROM at delivery time ($n = 6$, all positive for MG), vulvovaginitis ($n = 3$), urinary tract infection ($n = 1$), and urinary tract infection plus vaginitis ($n = 1$). Of the cases with PROM with >6 hours of labor, one had NG and 3 had MG. Four mothers with PROM < 6 hours were positive for MG. The mother-to-child transmission rates were 50% for both CT and NG and

10.5% for MG (manuscript accepted). Chi-square analysis showed no significant correlation between cases with external signs of acute conjunctivitis and the presence of urinary or vaginal infections in the mother at the time of delivery. The newborns were randomly distributed into Group A, in which the newborns received no ocular prophylactic treatment ($n = 130$), and Group B, in which the newborns received P-I prophylaxis in both eyes ($n = 115$). Despite the efforts made with every mother to perform a follow-up visit within 7 to 10 days after delivery, only 16 children were evaluated, nine from Group A and seven from Group B. Ten children, 7 from Group A (controls) and 3 from Group B (P-I treated), did not show any ocular pathology. Two children from Group B had a bilateral acute conjunctivitis since birth. Two (one from each group) had acute bilateral conjunctivitis after the third day postpartum. One from Group A had a small conjunctival hemorrhage in one eye, and another, from Group B, had jaundice of both conjunctivas.

4. Discussion

The nearly complete disappearance of ON in developed countries has been the result of a combination of factors, including prophylactic measures and, above all, better prenatal care [1–3, 11, 13]. However, currently in Angola and other West African nations, no prophylactic measures are used, and it is routinely very difficult to identify the pathogenic agents. Thus, diagnosis of ON is based on clinical signs [8], and systematic follow-up of children after birth is almost impossible.

NG and CT are currently the most common ON etiologic agents, accounting for 60% of all cases in countries without neonatal prophylaxis [14–16]. Although gonococcal infection is less common in developed countries, it continues to be a problem in developing countries such as Kenya where ON has an incidence as high as 4% of live births for NG and 8% for CT [13, 16].

ON due to NG can infect the fetus by ascending from the vagina to the uterus and can be present in the newborn at birth as an acute conjunctivitis; however, other agents usually have an incubation period of 4–14 days before clinical signs [13]. Therefore, clinical conjunctivitis often develops after children are discharged from the maternity ward.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of intervening at birth by providing P-I as a prophylactic agent for ON. The weak response of mothers returning for a second ophthalmic examination for their newborns prevented the achievement of this goal. Maternal ignorance about the implications of ON and cultural factors resulted in poor cooperation of mothers in the follow-up evaluations. Even after careful oral and written explanations were given to mothers about the signs and symptoms of ON and the ocular and systemic risk for the affected children, and even after most of the mothers were personally contacted by mobile phone, only a very small number of children, 5.7% of the global sample, returned for a second examination. These kinds of problems have been recognized by other authors [6, 7, 14].

Since 1990, P-I has been considered as a potential prophylactic agent of ON [15]. Several studies have established that P-I has broad spectrum of action and is effective against most agents of ON, unlike other prophylactic agents previously used [16–21]. P-I does not induce bacterial resistance, has low toxicity, is of very low cost, and is stable for several months after opening. Even more, the transient brownish staining of the ocular surface after instillation could be useful as an indicator of its effective application. In 2002, Isenberg reported that 2.5% P-I was not irritating to the eye [19]. Overall, the studies showed that when trained personnel applied P-I after hygienic and general care of the newborn, the results are superior to the other prophylactic agents [16, 19]. Nevertheless, a number of arguments have been raised against its use as a prophylactic agent, including the possibility that it could be confused with a detergent, the lack of effect of P-I against viruses, and lack of studies proving that it is safe in newborns [15, 19].

Our study also shows for the first time the frequency of MG infection and some associated clinical findings in a cohort of Angolan mothers and their newborns (manuscript accepted). MG is an emerging cause of STIs and has been implicated in urogenital infections of men and women worldwide [22]. MG has a prevalence of 7.3% and 2% in high- and low-risk populations, respectively [23]. It is considered as an etiologic agent of pelvic inflammatory diseases and infertility. There is also evidence that this microorganism has the potential to cause ascending infection and may play an important role in the ON [22, 23].

Besides the fact that ON is a potential cause of blindness, it can also result in serious systemic complications when nasopharyngeal colonization during vaginal delivery evolves to otitis, pneumonitis arthritis, sepsis, and meningitis [13, 15, 24]. Risk factors associated with ON are genitourinary infection and PROM [10, 13, 15]. In this study, a total of 108 mothers (34.1%) presented some of these risk factors. According to World Health Organization recommendations, prenatal care of mothers should include identification and management of infections including HIV, syphilis, and other STIs. Regular screening for STIs is not routine in prenatal care in Angola although the majority of mothers included in this study did have the prenatal appointments recommended by WHO [25]. Most of them had 4 or more prenatal visits, and the percentage of mothers without prenatal care was considerably lower than the one obtained by our group in the same maternity ward three years before (1.2% versus 14.7%) [12], showing an improvement of the health system of the country.

Prenatal studies in mothers of similar age as in this study are very important because the age group between 15 and 25 years of age is considered to be at risk of STIs. Actually, genital CT (serotype D-K) and NG infections are especially common in this age group of African women; therefore, their neonates are also a risk group for ON and systemic complications [10, 13, 15]. Our data show that the prevalence of CT in our population was relatively low when compared to previous studies in Angola and other African populations [26]. Other studies of pregnant women have shown prevalence rates from about 6% in Tanzania to 13% in Cape Verde [27]. The

prevalence in our study was much lower, which confirms the relatively low presence of CT in Angola.

NG and CT infections have common clinical features in women. Both produce silent clinical infections, are transmitted efficiently to newborns, and can lead to sterility or chronic infection. Both generate silent carriers, causing severe clinical consequences over time [28]. According to historical data, around 3% of newborns with NG ophthalmia will develop complete blindness if untreated, and 20% will have some degree of corneal damage [27]. In Africa, the prevalence rate of NG among pregnant women ranges from 0.02% in Gabon to 7.8% in South Africa [29]. Our results showed a lower prevalence of NG, 0.5%, among mothers, confirming our previous results (manuscript accepted). The results of the present study also allow us to estimate the rates of mother-to-child transmission which were 50% for CT and NG and 10.5% for MG. To our knowledge, this is the first study that estimates the rate of MG transmission in Angola.

In our cohort, the majority of newborns were born vaginally, a risk factor for ON [9]. A total of 12 newborns presented signs of acute conjunctivitis at the first ophthalmic evaluation, although laboratory tests were positive for MG only in one case. On the other hand, there were six cases that did not show signs of acute conjunctivitis at the first observation but were nevertheless positive for CT, MG, or NG.

Neonatal infections are of great epidemiological importance, so focused screening efforts should be made to reduce the number of infected pregnant women and thereby the rate of vertical transmission. To a similar extent as seen for other major STIs in Africa [30], our work clearly shows a mirror effect when considering matches between infected newborns and their mothers. This result also indicates the need to locally improve public information about primary health care particularly that oriented to eye care. Without this knowledge, the participation of community members in studies like ours will not be effective.

In summary, we determined the prevalence and incidence of CT, NG, and MG, which are all implicated in Angolan cases of newborn ON. We also determined that the mother-to-child transmission rates of CT and NG were 50% and 10.5% for MG, which was identified for the first time in Angolan newborns. Unfortunately, due to low compliance in follow-up clinical assessments, we were unable to achieve the original goal of testing the efficacy and safety of P-I systematic prophylaxis for preventing ON.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

This project has been made under the financial support of AECID (Spanish Agency for International Cooperation and Development).

References

- [1] K. D. Ayena, K. M. Amedome, J. W. Diallo et al., "What remains today of neonatal conjunctivitis in prefecture of Kozah in Togo?" *Journal Francais d'Ophthalmologie*, vol. 35, no. 6, pp. 432–436, 2012.
- [2] M. R. Hammerschlag, "Chlamydial and gonococcal infections in infants and children," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 53, supplement 3, pp. S99–S102, 2011.
- [3] W. J. Benevento, P. Murray, C. A. Reed, and J. S. Pepose, "The sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and herpes simplex type II to disinfection with povidone-iodine," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 109, no. 3, pp. 329–333, 1990.
- [4] M. A. Ramirez-Ortiz, M. Rodriguez-Almaraz, H. Ochoa-DiazLopez, P. Diaz-Prieto, and R. S. Rodriguez-Suárez, "Randomised equivalency trial comparing 2.5% povidone-iodine eye drops and ophthalmic chloramphenicol for preventing neonatal conjunctivitis in a trachoma endemic area in Southern Mexico," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 91, no. 11, pp. 1430–1434, 2007.
- [5] M. David, S. Rumelt, and Z. Weintraub, "Efficacy comparison between povidone iodine 2.5% and tetracycline 1% in prevention of ophthalmia neonatorum," *Ophthalmology*, vol. 118, no. 7, pp. 1454–1458, 2011.
- [6] J. W. Simon, "Povidone-iodine prophylaxis of ophthalmia neonatorum," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 87, no. 12, p. 1437, 2003.
- [7] S. J. Isenberg, L. Apt, and M. Wood, "A controlled trial of povidone-iodine as prophylaxis against ophthalmia neonatorum," *New England Journal of Medicine*, vol. 332, no. 9, pp. 562–566, 1995.
- [8] J. C. Pastor and I. Alexandre, "Development of a national prophylactic program against neonatal conjunctivitis in Angola: pilot study," in *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting*, pp. 50–56, Fort Lauderdale, Fla, USA, 2009.
- [9] U. C. Schaller and V. Klaus, "Is Credé's prophylaxis for ophthalmia neonatorum still valid?" *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 79, no. 3, pp. 262–263, 2001.
- [10] E. Amini, M. Ghasemi, and K. Daneshjou, "A five-year study of ophthalmia neonatorum in Iran: prevalence and etiology," *Medical Science Monitor*, vol. 14, no. 2, pp. CR90–CR96, 2008.
- [11] M. Ghahramani and A. A. Ghahramani, "Epidemiologic study of ophthalmia neonatorum and impact of prophylaxis on its incidence," *Acta Medica Iranica*, vol. 45, no. 5, pp. 361–364, 2007.
- [12] I. Alexandre, N. Cortes, M. Justel, I. Fernández, R. Ortíz de Lejarazu, and J. C. Pastor, "The value of simple microbiological studies for on-site screening of acute neonatal conjunctivitis in Angola," *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, vol. 4, no. 1, article 1, 2014.
- [13] M. Hammerschlag and P. Rapoza, "Neonatal conjunctivitis," in *Ocular Infection Immunity*, pp. 831–842, Mosby Year Book, 1996.
- [14] S. J. Isenberg, L. Apt, M. del Signore, S. Gichuhi, and N. G. Berman, "A double application approach to ophthalmia neonatorum prophylaxis," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 87, no. 12, pp. 1449–1452, 2003.
- [15] A. Passos and F. Agostini, "Conjuntivite neonatal com ênfase na sua prevenção," *Revista Brasileira de Oftalmologia*, vol. 70, no. 1, pp. 57–67, 2011.
- [16] A. Kramer, C. Aspöck, O. Assadian et al., "Prophylactic indications for eye antiseptics. Prophylaxis against ophthalmia

- neonatorum,” *Developments in Ophthalmology*, vol. 33, pp. 223–232, 2002.
- [17] T. A. Bell, J. T. Grayston, M. A. Krohn et al., “Randomized trial of silver nitrate, erythromycin, and no eye prophylaxis for the prevention of conjunctivitis among newborns not at risk for gonococcal ophthalmitis. Eye Prophylaxis Study Group,” *Pediatrics*, vol. 92, no. 6, pp. 755–760, 1993.
- [18] T. A. Bell, K. I. Sandstrom, M. G. Gravett et al., “Comparison of ophthalmic silver nitrate solution and erythromycin ointment for prevention of natively acquired chlamydia trachomatis,” *Sexually Transmitted Diseases*, vol. 14, no. 4, pp. 195–200, 1987.
- [19] S. J. Isenberg, L. Apt, M. Valenton et al., “A controlled trial of povidone-iodine to treat infectious conjunctivitis in children,” *American Journal of Ophthalmology*, vol. 134, no. 5, pp. 681–688, 2002.
- [20] S. J. Isenberg, L. Apt, R. Yoshimori, R. D. Leake, and R. Rich, “Povidone-iodine for ophthalmia neonatorum prophylaxis,” *The American Journal of Ophthalmology*, vol. 118, no. 6, pp. 701–706, 1994.
- [21] V. Vedantham, “Prophylaxis of ophthalmia neonatorum,” *British Journal of Ophthalmology*, vol. 88, no. 10, p. 1352, 2004.
- [22] S. Sethi, G. Singh, P. Samanta, and M. Sharma, “Mycoplasma genitalium: an emerging sexually transmitted pathogen,” *Indian Journal of Medical Research*, vol. 136, no. 6, pp. 942–955, 2012.
- [23] C. L. McGowin and C. Anderson-Smits, “Mycoplasma genitalium: an Emerging Cause of Sexually Transmitted Disease in Women,” *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 5, Article ID e1001324, 2011.
- [24] U. Allen, H. D. Davies, J. Embree et al., “Recommendations for the prevention of neonatal ophthalmia,” *Paediatrics and Child Health*, vol. 7, no. 7, pp. 480–488, 2002.
- [25] O. Lincetto, S. Mothebesoane-Anoh, P. Gomez, and S. Munjanja, “Antenatal care,” in *Opportunities for Africa’s Newborns: Practical Data, Policy and Programmatic Support for Newborn Care in Africa*, L. Joy and K. Kate, Eds., Antenatal Care WHO, Cape Town, South Africa, 2006.
- [26] P. Cappuccinelli, E. Gomes, S. Rubino et al., “Chlamydia trachomatis in gynaecological infections in Luanda, Angola,” *Genitourinary Medicine*, vol. 71, no. 5, pp. 326–327, 1995.
- [27] WHO, *Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.
- [28] S. G. McNeeley Jr., “Gonococcal infections in women,” *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, vol. 16, no. 3, pp. 467–478, 1989.
- [29] C. Gilbert and A. Foster, “Childhood blindness in the context of VISION 2020—the right to sight,” *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 79, no. 3, pp. 227–232, 2001.
- [30] K. M. de Cock, M. G. Fowler, E. Mercier et al., “Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice,” *The Journal of the American Medical Association*, vol. 283, no. 9, pp. 1175–1182, 2000.