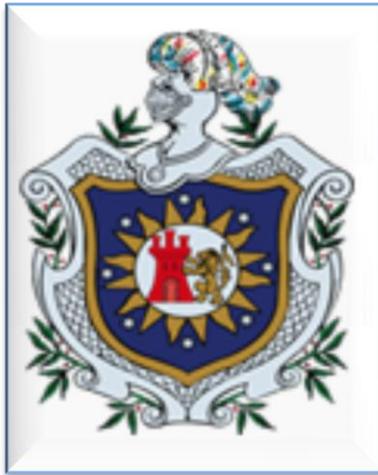


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TRABAJO DE TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Frecuencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en mujeres en edad reproductiva que asisten a la consulta ginecológica en 3 Centros de Salud y HEODRA León Agosto a Octubre del 2011.

Autor: Lic. Nadia Lariza Flores Quiroz

Tutor: PhD. Félix Espinoza
Director de investigación UNAN-León
Profesor titular UNAN - León

Asesora: PhD. Annabelle Ferrera
Profesora titular UNAH

León, *Julio 2013*

Agradecimientos

“Muchas gracias” a las personas que durante el proceso de realización de mi trabajo de investigación estuvieron dándome ánimos y no permitieron que el estrés ni los obstáculos, que siempre te encuentras en el camino, me apartaran de mis objetivos.

Esos objetivos se ven cumplidos con mi trabajo de tesis y es un gran placer para mí dedicárselos a: **Mi Familia:** Mis padres **Dr. Héctor Flores** y **Lic. Gioconda Quiroz**, A mi esposo **Ing. Julio Velázquez** y a mi hermano: **Karlenin Flores**.

Agradezco a mis amigos incondicionales que me apoyaron dándome palabras de ánimo: **Antonia Obando, Cándida Hernández, Edwin Herrera, Yaneth Reyes, MSc. Patricia Blandón, MSc. Yaoska Reyes** y a mi gran amigo **Reymundo Velásquez**.

Agradezco a mis profesores por haber aportado un granito de arena por enriquecer mi conocimiento **¡Muchas Gracias! Lic. Margarita Paniagua, Dr. Erick Amaya, Dr. Filemón Bucardo, Dr. Bayron Leiva, MSc. William Morales, MSc Orlando Mayorga y Dr. Felix Espinoza**.

Agradezco a directores y personal de salud quienes fueron piezas fundamentales para la elaboración de este trabajo. Por lo que de manera muy especial gracias a: **Dra. Claudia Alonso Cuevas, Dr. Auxiliadora Baca, Lic. María Ismara Padilla, Lic. Danelia Medina del HEODRA, a: Lic. María Félix Giménez, Lic. Kimara Sánchez** del centro de salud **Perla María Norori**. Muchas gracias **Dr. Humberto Ramírez y Lic. Josefa Antón** del centro de salud **Sutiava**.

Infinitas gracias a: **Dr. Annabelle Ferrera** por haber aceptado ser mi Asesora, colaborar con nosotros en el estudio, aportando todo lo que estuvo a su alcance para la culminación exitosa de éste y además rodearme de gente linda que me apoyó tanto.

Gracias a: **Yuliana Sorto y su familia** quienes me recibieron de una manera muy cordial, y me brindaron su amistad y apoyo incondicional, llenando mi corazón de alegría cuando estaba tan lejos de mi familia.

Agradezco a **Jafet, Yessi y Ada** por haber sido los mejores colaboradores en el Laboratorio de Honduras, por brindarme todo su apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

Por último, pero no menos importante, agradezco a todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio permitiéndonos mejorar y fortalecer el conocimiento de *Chlamydia trachomatis* en León, Nicaragua.

INDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	3

Capítulo 2. OBJETIVOS

Planteamiento del problema.....	4
Objetivos.....	5

Capítulo 3. MARCO TEÓRICO

Marco teórico.....	6
--------------------	---

Capítulo 4. METODOLOGÍA

Material y Método.....	24
------------------------	----

Capítulo 5. RESULTADOS

Resultados	31
------------------	----

Capítulo 6. DISCUSIÓN

Discusión.....	36
----------------	----

Capítulo 7. CONCLUSIONES

Conclusiones.....	42
-------------------	----

Capítulo 8. RECOMENDACIONES

Recomendaciones	43
-----------------------	----

Capítulo 9. REFERENCIAS

Referencias Bibliográficas.....	44
---------------------------------	----

ANEXOS.....	48
--------------------	-----------

Resumen

Introducción: Entre Agosto a Octubre del 2011, se llevó a cabo un estudio descriptivo, con el objetivo de determinar la frecuencia de infección de *Chlamydia trachomatis* en el cuello uterino de mujeres, entre las edades de 15 a 49 años, que asistieron a la consulta ginecológica en tres centros de salud y el Hospital Escuela de la ciudad de León.

Método: Para tamizar a *Chlamydia trachomatis* se utilizó una prueba inmunocromatográfica (Cypress Diagnostic), con la que se analizaron 299 muestras cervicales. De éstas, 200 muestras fueron analizadas con el kit comercial de PCR (Amplification kit *Chlamydia trachomatis* Labo Medical-Products, Netherlands). Las muestras positivas por PCR fueron analizadas con PCR tiempo real y posteriormente caracterizadas en sus diferentes serovares, para la caracterización de serovares, se utilizó el método in vitro de hibridación reversa (Genotyping RHA kit (Ct-DT) de Labo Medical-Products, Netherlands).

Resultados: Con la prueba inmunocromatográfica resultaron 10 positivas para un 3.3% y con el método de PCR solo cuatro resultaron positivas para un 2%, estas cuatro muestras fueron confirmadas por el método de PCR tiempo real para *C. trachomatis*. Según las edades estudiadas se encontró que de 4 muestras dos correspondían al grupo de 40-49 años, para un 4.8%, una del grupo de 15 a 19 años, para un 3.6% y una del grupo de 20-29 años 1.3%. Ninguna de las variables analizadas tuvo diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Las cuatro muestras positivas por PCR y confirmadas por serotipificación, se observaron 10 serovares de *C. trachomatis*, siendo estos serotipos B/Ba, C, H, I/Ia, J, K y la serovariante J*/L3. En dos muestras se observaron infecciones mixtas y en una muestra no se logró identificar ninguno.

Conclusiones: La frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* encontrada fue baja, Ninguna de las variables estudiadas presentó diferencia estadística entre grupos. La Serotipificación de las muestras mostró que los serotipos C, H, I/Ia fueron los más comunes.

Introducción

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligada de distribución mundial, que causa diferentes enfermedades en hombres, mujeres y niños ^[1].

Es una causa de infecciones de transmisión sexual con alta prevalencia. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 89 millones de mujeres contraen la infección por *C. trachomatis* cada año en el mundo, presentando una importante proporción de infectados asintomáticos del 70% ^[2].

Si la infección en mujeres no es tratada, ésta puede progresar, propagarse al útero y trompas de Falopio, provocando enfermedad inflamatoria pélvica crónica (EIP) hasta en el 70% de los casos. La EIP puede causar daño permanente en las trompas de Falopio, que puede llevar a infertilidad de un 30 a 40% de los casos y a embarazos ectópicos (embarazo implantado fuera del útero) hasta en un 10% ^[1,2,3]. Esta bacteria también afecta a mujeres embarazadas, quienes transmiten la infección al bebé durante el parto, por vía vertical; provocando al bebé: conjuntivitis neonatal, neumonía, rinitis, otitis y vulvitis ^[1].

En Nicaragua, son pocos los estudios que aportan información actualizada sobre prevalencia, características epidemiológicas y serotipos circulantes de *C. trachomatis*, que afectan la población femenina de nuestro país; sin embargo, estudios previos muestran una frecuencia en las infecciones por esta bacteria como agente único en mujeres embarazadas de 16.2% a 25% ^[4,5] y una frecuencia de aparición en infecciones mixtas en este mismo grupo de 16.24% a 25.9% ^[5,6], y en mujeres atendidas en la consulta ginecológica de rutina se ha reportado el 2% ^[7].

Tratando de unir esfuerzos por mejorar el tratamiento y conocimiento de las infecciones causadas por esta bacteria en Nicaragua, se decidió estudiar la frecuencia de la infección, características epidemiológicas y serovares circulantes de este agente, que afectan la salud reproductiva de mujeres con vida sexual activa entre los 15 a 49 años de edad que asisten a tres centros de salud y hospital de León.

Antecedentes

En Nicaragua en 1996, Herrman y cols, realizaron un estudio en 926 mujeres de León, Corinto, Bluefields y Matagalpa, para validar la prueba de inmunofluorescencia directa, conocer prevalencia, factores de riesgo y manifestaciones clínicas de *Chlamydia trachomatis*, teniendo como resultado; que la positividad de infección por *C. trachomatis* en mujeres entre 35 años fue del 2%, en adolescentes entre 15 a 19 años fue de 8 % y las trabajadoras del sexo el 14% [7].

Entre Abril de 1999 a Mayo del 2000, Claeys y cols. Estudiaron a 1185 mujeres de Managua, Rivas y Matagalpa, que asistieron a clínicas del Ministerio de Salud, para determinar prevalencia y factores de riesgos a la infección por *Chlamydia trachomatis*. Los autores encontraron una prevalencia de 4.1% [8].

En el año 2002, Porras F, llevó a cabo un estudio en mujeres embarazadas, en la sala de emergencias del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales, donde se estudió la infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en 100 pacientes, haciendo uso de una prueba inmunocromatográfica, teniendo como resultado una prevalencia de infección cervical de 25% [4].

De Octubre a Noviembre del 2003, López C. realizó un estudio en 135 mujeres embarazadas atendidas en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales, sobre los agentes etiológicos más frecuentes de infección cervico-vaginal. Encontrando el 16.2% de infecciones puras y el 25.9% de infecciones mixtas [5].

Entre el 2007 y 2008, Benavides M y cols. Llevaron a cabo un estudio en 125 mujeres embarazadas que asistieron a la sala de ARO del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales, para determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* como agente causal único o en asociación con otros agentes causales de leucorrea. Se observó una prevalencia de *C. trachomatis* en asociación con otros agentes del 16.24%. [6].

Justificación

Chlamydia trachomatis, es una infección de transmisión sexual que afecta 89 millones de mujeres en el mundo, es asintomática en el 70% de los casos. Si no es tratada; la infección puede progresar, causando enfermedad inflamatoria pélvica, embarazos ectópicos e Infertilidad en las mujeres que la padecen.

En Nicaragua son pocos los estudios realizados que brindan información actualizada sobre prevalencia y factores de riesgo. Actualmente no hay estudios que nos revelen los serotipos de *Chlamydia trachomatis* más frecuentes que afectan la población femenina de nuestro medio.

Por lo antes mencionado, con este estudio se pretende aportar mayor conocimiento e información actualizada, sobre la frecuencia de infección de *Chlamydia trachomatis*. Además, conocer los serotipos que podrían estar afectando a las mujeres en edad fértil de nuestro medio. De manera que sirva de apoyo para la posible implementación de programas de prevención e intervención de salud reproductiva, para las mujeres de nuestro país.

Planteamiento del problema

¿Cuál es la frecuencia de infección cervical y serotipos más frecuentes de *Chlamydia trachomatis* de mujeres en edad reproductiva que asisten a tres Centros de Salud y Hospital Oscar Danilo Rosales de León entre Agosto a Octubre del 2011?

Objetivos

General:

Investigar la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* presente en mujeres en edad reproductiva que asisten a la consulta ginecológica de tres centros de salud y Hospital de León.

Específicos:

- Determinar la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en muestras cervicales.

- Describir las características socio-demográficas y gineco-obstetras de la población de estudio.

- Identificar los serotipos de *Chlamydia trachomatis* presentes en muestras del estudio.

Marco Teórico

Hasta el 2002 la familia *Chlamydiaceae* se consideraba con cuatro especies reconocidas *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* y *C. pecorum* pertenecientes al género *Chlamydia*. En el cuarto encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones de *Chlamydia* en Helsinki, Finlandia, Kerin Everret, Bush y Anderson; presentaron una nueva clasificación del orden *Chlamydia*. *Chlamydia trachomatis* fue incluida al género *Chlamydia*. *C. Psittaci* y *C. Pneumoniae*, *C. pecorum* y otras mas se incluyeron en el género *Chlamydophila* [1, 9,10].

***Chlamydia trachomatis*:**

Es una bacteria; no móvil, de vida intracelular obligada, tamaño pequeño y forma esferoidal por lo que se observan como cocos, no ciliados Gram Negativos, muestran tropismo por las células de la conjuntiva y del cérvix uterino [1,10].

(Figura 1)

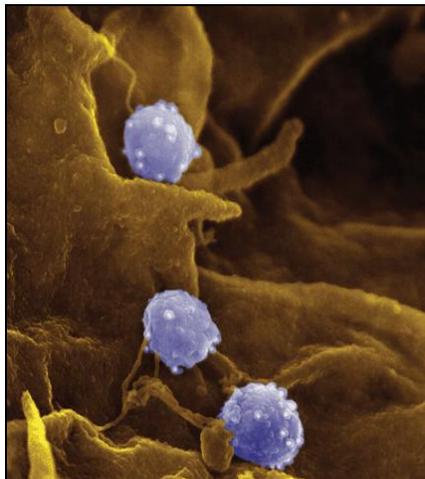


Figura 1. *Chlamydia trachomatis*

Fuente: Imagen cortesía de Deborah D. Crane

Fisiología y Estructura de *Chlamydia trachomatis*.

La membrana de *C. trachomatis* propuesta por microscopia electrónica muestra una membrana externa y otra interna carente de capa de peptidoglicano [1].

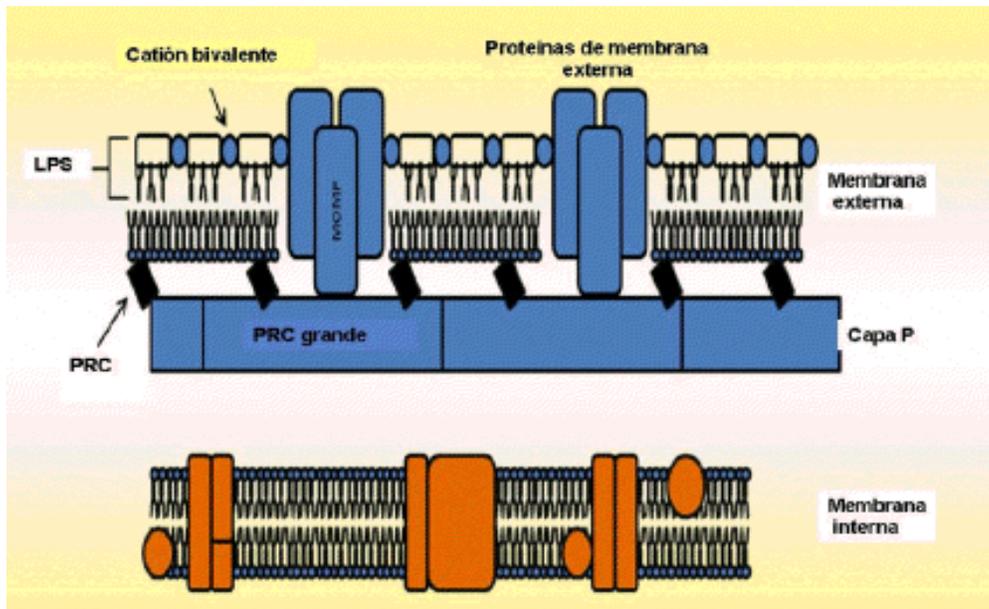


Figura 2. Membrana externa propuesta para *Chlamydia trachomatis*

Fuente: Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela, versión impresa ISSN 0048-7732, Rev Obstet Ginecol Venezuela v.68 n.3 Caracas sep. 2008

La membrana externa presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales se unen por puentes disulfuro para dar rigidez a la estructura. (Figura 2)

Las proteínas de la envoltura ricas en cisteína incluyen:

1. La proteína mayor de membrana externa o en sus siglas en inglés (MOMP, major outer membrane protein): La conformación nativa de ésta, es un trímero con estructura de hoja β predominantemente. Pesa 40Kda, constituye casi el 60% del total de proteínas, está codificada por el gen *omp1*. Se ha visto que tienen función de porina, con un tamaño estimado del poro de 2 nm de diámetro. Contiene epítopes antigénicos de superficie [11]

La MOMP posee 4 dominios variables (DVs) tres de cuatro dominios VSI, VS2 y VS4 se encuentran en la superficie y están interespaciados por 5 dominios constantes. Los (DVs) tienen variedad antigénica entre serotipos. La variabilidad de (DVs) ha sido considerada un mecanismo de escape de supervivencia para que las bacterias escapen de la vigilancia inmunológica del huésped. Contienen epítopes antigénicos que son sitios blancos para la serotipificación [1,11].

2. Proteína de 60 Kda: está codificada por el gen omp2. Se encuentra en el espacio periplasmático, dando a las *Chlamydias* una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Los Cuerpos reticulados no contienen esta proteína ^[1].
3. Proteína de 12-15 Kda: codificada por el gen omp3, es una proteína hidrofílica. Los cuerpos reticulados carecen de ella ^[1].

Recientemente se han confirmado la presencia de proteínas o chaperonas denominadas de proteínas de choque térmico, que son la hsp 60 y la hsp 7. Estas aparecen antes de la síntesis de la MOMP durante la transición del cuerpo elemental a cuerpo reticulado ^[1,11]

A las *Chlamydias* las podemos encontrar en dos formas estructurales diferentes. Una forma infecciosa que es el cuerpo elemental y una no infecciosa el cuerpo reticulado ^[1].

Cuerpos Elementales (CE): son partículas redondeadas de un tamaño entre 300 y 400 nm, infecciosas, rígidas, resistentes; como consecuencia de los puentes disulfuro de las proteínas de la capa externa ^[1].

Estudios sugieren que CE está envuelto por una capa intermolecular de cisteína llamada complejo de membrana externa COMC (outer membrane complex).

Esta le brinda integridad a la partícula y las proteínas encontradas interactúan con la célula del huésped durante la infección. No todas las proteínas del COMC están expuestas en la superficie del CE ^[12,13].

En los CE se encuentra el ADN y ARN. La mayor parte de ADN se encuentra en el nucleóide electrodenso central y la mayor parte de RNA está en los ribosomas, el CE no tiene actividad metabólica y representa la forma infectante ^[1]. (Figura 3)

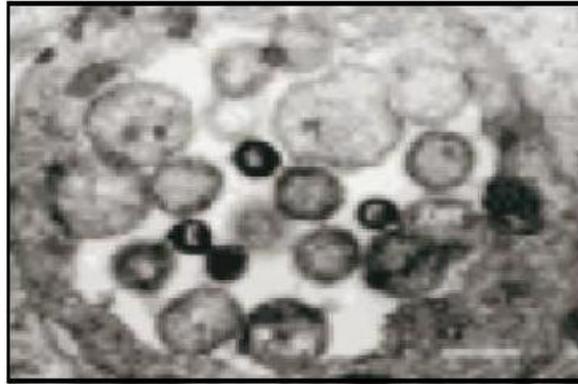


Figura 3. Cuerpo Elemental

Fuente: *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas,
nova publicación científica

Cuerpos Reticulados (CR): tienen mayor tamaño que el CE, entre 800 a 1000 nm, son formas no infectantes, metabólicamente activos, están adaptados a la vida intracelular y son capaces de reproducirse. La reproducción se da por fisión binaria, están protegidos por su localización intracelular.

Estos son el resultado de la diferenciación de CE al ser fagocitados por la célula huésped y el ADN está disperso. Estos son frágiles en comparación a los CE ^[1]. (Figura 4)

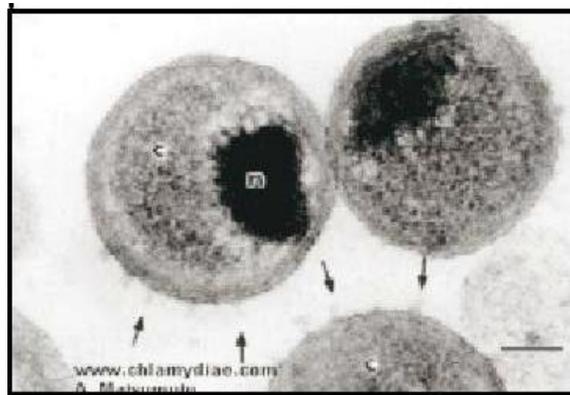


Figura 4. Cuerpo Reticulado

Fuente: *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas
nova - publicación científica

Ciclo biológico de Chlamydia

El ciclo Inicia cuando el CE partícula infectante se fija a la superficie o microvellosidades de célula susceptible ^[12].

La adhesión la realiza a través de receptores que aún no están totalmente definidos; sin embargo, hay evidencias que el CE se adhiere a la célula huésped a través del Heparansulfato glucosaaminoglicano (GAGs) ^[12]. (Figura No. 5)

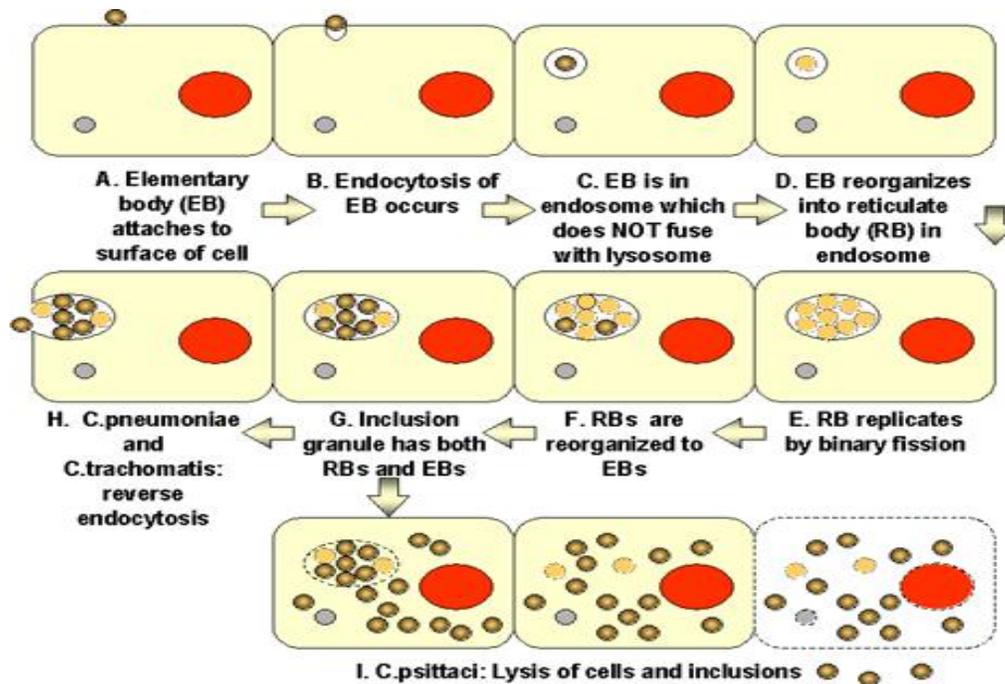


Figura 5. Ciclo biológico de *Chlamydia*

Fuente: Pathmicro.med.sc.edu, capítulo 20.

Una vez que se adhiere a la membrana citoplasmática, penetra la célula por endocitosis, luego de 6-8 horas de su entrada a la célula, El CE es rodeado de una membrana endosomal que forma un fagosoma llamado cuerpo de inclusión, este evade la fusión con el Lisosoma, el CE se reorganiza a CR dotados de actividad metabólica y de mayor tamaño; estando dentro de la vacuola o inclusión el CR luego de 18-24 horas, se reorganiza y dividen varias veces por fisión binaria en CE. De manera que dentro del cuerpo de inclusión quedan CE y CR.

Éstos se liberan de la célula huésped provocando muerte celular, capaces de infectar las células. Este es el caso de la *C. psittaci*, que libera los CE, al final del ciclo hay una buena cantidad de CE, CR y formas intermedias de éstos, capaces de infectar las células huéspedes circundantes luego de las 48-72 horas. ^[1,10,12]

Serotipos de *Chlamydia trachomatis*: Las cepas de *C. trachomatis* se diferencian en serotipos basados en la sero-especificidad de la MOMP, que a su vez está determinada por la especificidad del gen OmpA ^[10, 12]

Los serotipos se han clasificado en tres serogrupos denominados normalmente variantes serológicas o serovariantes por sus diferencias antigénicas a nivel de la membrana (MOMP). Ciertas serovariantes se asocian a una enfermedad determinada, puede dividirse en 19 serotipos en función de las características antigénicas del antígeno de tipo proteico ^[11,12].

Existe una relación directa entre el serotipo y la enfermedad (forma clínica) que producen las diferentes cepas de esta especie. Los serotipos y respectivas serovariantes hallados son: A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K, L, L1, L2a, L3. ^[10,12, 13, 14]

Algunos esquemas realizados, se basaron en el uso de anticuerpo monoclonales y policlonales de la MOMP, diferenciando los serotipos en clases de los cuales tenemos: Complejo del serogrupo B comprende (clase B): contienen a los serotipos (B, Ba, D, Da, E, L, L₂, L_{2a}, L₃), Complejo del serogrupo C (Clase C) contiene a los serotipos (A, C, H, I, Ia, J, Ja, K, L1, L3) y una Clase intermedia o grupo intermedio (F, G/Ga) ^[1,14,15].

Las tres ramas de análisis filogenéticos con el gen omp1, los clasifican en tres grupos, serotipos que comprenden diferentes actividades biológicas por lo que se les agrupan diferente: Cepas de Linfogramuloma venéreo invasivo LGV los serotipos L1 a L3, Estos son transmitidos sexualmente siendo invasivos, resultando en infección diseminada de la región de drenado de los nódulos linfáticos.

Cepas de ITS no invasivas de prevalencia global los serotipos D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J y K, son comunes del tracto urogenital y algunas ocasiones se detectan en el tracto respiratorio de niños, son asociados con las infecciones transmitidas sexualmente, conjuntivitis o neumonitis neonatal así como las infecciones neonatales en recién nacidos de madres infectadas.

Cepas de ITS no prevalentes con grupos de tracoma los serotipos A, B/Ba y C son comúnmente asociados con infecciones oculares, están asociados al tracoma endémico una de las mayores causas de ceguera en la población [10, 12, 14,15]. Estudios realizados sobre el serotipo E en muestras urogenitales encontraron 6% de variantes las cuales contienen 16 (53%) aminoácidos no conservados [16].

Genoma de *Chlamydia trachomatis*:

El genoma de un considerable número de *Chlamydias* ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, el conocimiento completo acerca de las características genéticas de esta bacteria son todavía desconocidos, y esto se debe a la impermeabilidad del CE y a la protección que ofrece la célula huésped a este agente [10].

El genoma de *C. trachomatis* es de 1,044.459 bp. Diferentes análisis del genoma *Chlamydial* han mostrado que codifica para 875 proteínas aproximadamente que no son expresadas, 70 de las cuales son exclusivas de *C. trachomatis*. Es importante notar que en la región cercana al origen del cromosoma *Chlamydial* es donde existe mayor diversidad genética [1,10,12]. La mayoría de los genes están ubicados en el plásmido críptico [14]. La figura 6. Muestra el genoma completo: Los 1,044, 459 pb de *Chlamydia trachomatis* (A/HAR 13).

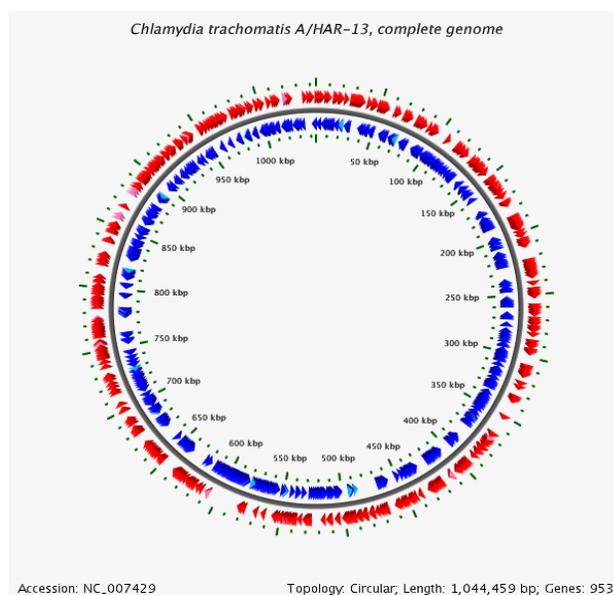


Figura 6. Genoma *Chlamydia trachomatis* A/HAR-13.
Fuente: BacMap versión 1.0, NC_007429

Chlamydia trachomatis posee un plásmido críptico de 7.500bp dsADN. Encoda 8 marcos abiertos de lectura (ORFs, Open Reading Frames). No tiene movilidad y es un factor de virulencia [1].

Todos los plásmidos *Chlamydiales* tienen 22 pares de bases purínicas repetidas en tándem en la región intergenica entre ORF1 y ORF2, este grado de conservación sugiere que esta región es extremadamente importante por ser análogo con el origen de replicación de algunos plásmidos de *E. coli* [1]. La figura No 7. Muestra 8 ORFs, conjuntamente muestra sitios de corte para endonucleasas de restricción.

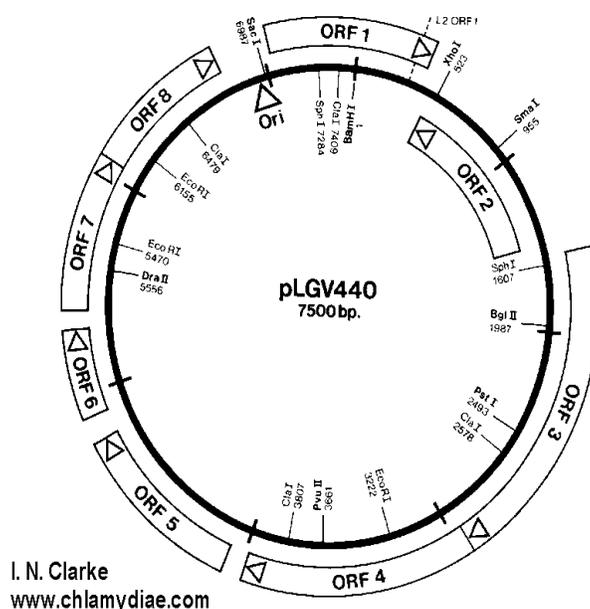


Figura 7. Plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*

Fuente: *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas, Nova – Publicación Científica,

Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*

Es la causa de infecciones de transmisión sexual de mayor prevalencia en el mundo, afectando mujeres y hombres. Es además la causa más importante de tracoma y linfogranuloma venéreo [10].

Vía de transmisión: *C. trachomatis* puede ser transmitida de persona a persona durante el sexo vaginal, oral o anal con una pareja infectada. La gestante puede transmitir la infección a su recién nacido durante el parto.

Las infecciones por *C. trachomatis* afectan a mujeres, hombres y niños. Su importancia radica en la magnitud de la diseminación, las características peculiares de su presentación clínica y las complicaciones que pueden surgir a causa de una falta de diagnóstico o tratamiento ^[1]. Generalmente la infección es silente, asintomática, en dos tercios de las mujeres 70% y en un cuarto a la mitad de los hombres 30% ^[2].

Infección en la mujer: La cervicitis es la infección más frecuente. Es raro el sangrado vaginal o poscoital. Las evidencias clínicas son inespecíficas como: flujo vaginal blanquecino, dolor abdominal o pélvico (EIP), sangrado, y disuria (dificultad dolorosa para expulsar la orina). La disuria puede indicar una uretritis solo la uretra está comprometida ^[1,10].

Síntomas de *C. trachomatis* en mujeres:

- * Flujo vaginal espeso y amarillento (pus)
- * Ardor al orinar.
- * Secreciones por la uretra (orificio por donde sale la orina)
- * Manchas o sangrado fuera de la menstruación.
- * Sangrado durante o después de las relaciones sexuales.
- * Dolor durante las relaciones sexuales.
- * Dolor en el abdomen o la pelvis.

Cuando el contagio es por **vía anal**: Dolor o ardor anales, Secreciones por el ano y dolor al defecar.

Contagio de *Chlamydia* por **sexo oral**: Ardor en boca y lengua, dolor de garganta, Ulceras en la boca ^[1,10].

Si la infección en mujeres no es tratada, puede propagarse al útero y trompas de Falopio, causando enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) hasta en un 40%. La EIP puede causar daño permanente a las trompas de Falopio, llegando a causar dolor pélvico crónico; lo cual es la mayor causa de infertilidad y embarazos ectópicos (embarazo implantado fuera del útero) ^[1,2]. (Figura 9)

Complicaciones:

1. Infección vaginal, inicio el contacto, portadora asintomática.
2. Cervicitis: inflamación del cuello de la matriz por la infección.
3. Salpingitis: inflamación de las trompas de Falopio.
4. EIP: infección de la cavidad peritoneal y estructuras anexas.
5. En las mujeres embarazadas, la clamidia no tratada ha sido asociada con partos prematuros y puede transmitirse al recién nacido.

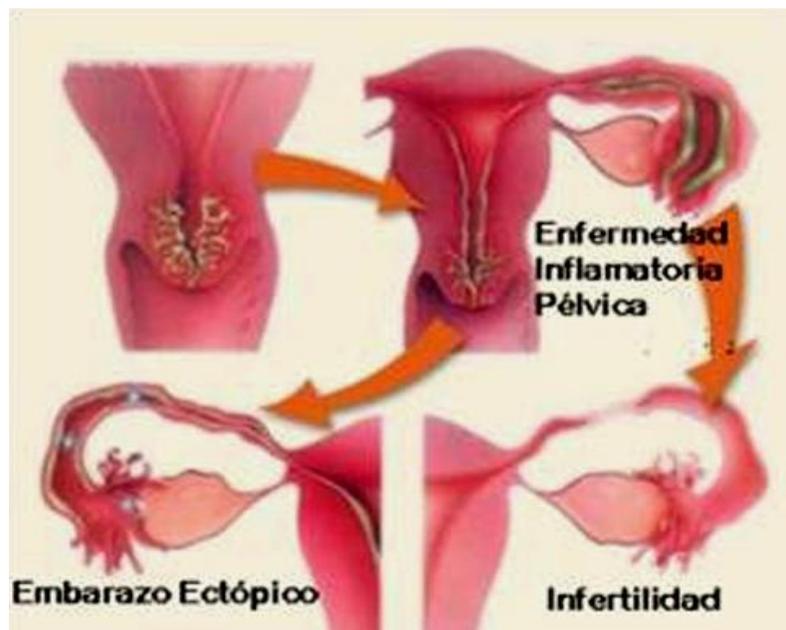


Figura 8. Infección de *Chlamydia trachomatis* en la mujer

Tracoma: Es una conjuntivitis crónica con una marcada reacción folicular y una hipertrofia papilar de la conjuntiva, como resultado de la necrosis de los folículos, la conjuntiva puede desarrollar cicatrices.

Estas lesiones, llamadas trichiasis y ectropión, son las lesiones responsables de la ceguera por tracoma. La cornea es dañada por daño mecánico al abrir y cerrar los ojos y por infección secundaria. El periodo de incubación es de una a dos semanas [2,10].

Linfogranuloma venéreo: Es enfermedad sistémica, que se inicia por la aparición de una pápula o vesícula en la piel de la región genital. La cual se transforma en una úlcera indolora que evoluciona hacia la curación.

La infección difunde por vía linfática, de modo que desde el primer mes se produce una adenitis inguinal, que se reblandece y forma un absceso que posteriormente se fistuliza y abre hacia el exterior. Le sigue una fase de esclerosis, con formación de estenosis en el recto o vagina ^[10].

Infección en Hombre: La uretritis no gonocócica es una de las más comunes, resulta de una descarga mucoide, es reconocido un espectro que va desde la ausencia de descarga a una descarga purulenta. Las infecciones uretrales son las más comunes en hombres heterosexuales con 50 % de asintomáticos.

Cuando los síntomas ocurren, usualmente después de una a tres semanas de la exposición, los síntomas son indistinguibles a los de la gonorrea.

Complicaciones: Ependidimitis: infección de los conductos espermáticos de los testículos e Infertilidad ^[1,2].

Infecciones en niños: *C. trachomatis* es la causa más común de conjuntivitis neonatal y neumonía en la infancia temprana. Puede producir rinitis, rinofaringitis, otitis y vulvitis.

De los cinco a catorce días se puede presentar una conjuntivitis purulenta; la infección generalmente no afecta la cornea y evoluciona lentamente hacia la curación. Sin embargo, en algunos casos puede volverse crónica y producir lesiones corneales irreversibles. Además se puede presentar la neumonía, que se caracteriza por una tos persistente y polipnea, que a veces se hace paroxística ^[1].

Inmunología de *Chlamydia trachomatis*

El CE de *C. trachomatis* infecta las células del epitelio columnar del cérvix, a menudo puede causar o no sintomatología. La bacteria puede ascender infectar el endometrio y las trompas de Falopio, causando enfermedades inflamatorias, inflamación de trompas (salpingitis) cicatrices y obstrucción; lo que puede llevar a infertilidad o embarazos ectópicos^[17].

Las células epiteliales son la primera barrera de defensa, iniciando y propagando la respuesta inmune. Ellas secretan citocinas que recluta interleucinas inflamatorias al sitio de la infección, también inducen el aumento de respuesta inflamatoria celular^[18].

La reacción inflamatoria se caracteriza por una afluencia de macrófagos y neutrófilos y la formación de sitios inmunes inductivos en la sub-mucosa. Estos estados inductivos, contiene células B, T, células dendríticas y macrófagos. Coordinados con la iniciación de la respuesta adquirida que además incluye secreción de IgA^[18].

Estos mediadores producen daño directo del tejido Las células del huésped liberan citocinas que llevan al reclutamiento de células inmunes específicas que amplían la respuesta rápidamente^[18]. Las células T CD4 y CD8, llegan más rápido al sitio de la infección que los neutrófilos durante la infección en los oviductos y esta reacción inflamatoria recurrente culmina en fibrosis y cicatrices^[18].

La Replicación de *C. trachomatis* es inhibida por la dioxigenasa indolamida puesto que reduce la disponibilidad de triptófano, es altamente regulada por interleucina 1(IL1) y factor de necrosis tumoral (TFN- β). El mecanismo por el cual se da esto, es por aumento en la síntesis del factor regulador de interferon -1, así como del factor nuclear-KB^[21]. (Figura 9).

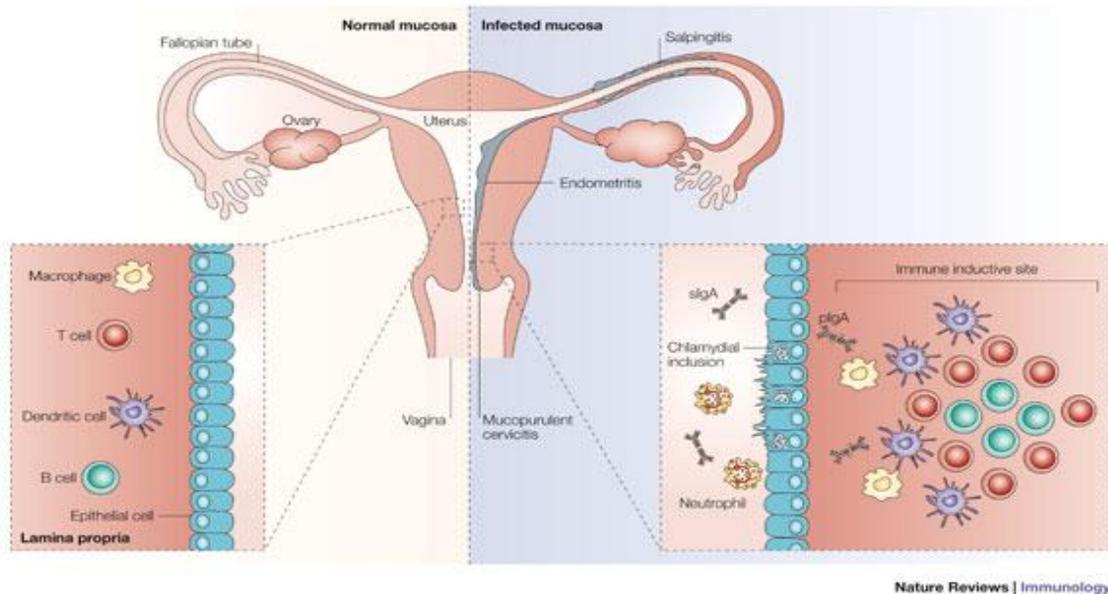


Figura 9. Acción del Sistema Inmune

Fuente: Nature Reviews Immunology 5, 149-161 (2005).

Epidemiología

La infección por *Chlamydia trachomatis* se corresponde con la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más frecuente en la población de 14 a 39 años de Estados Unidos. Los adolescentes sexualmente activos, en especial las mujeres, son el grupo más infectado, Las tasas de infección por *Chlamydia* aumentaron 32% y las tasas de gonorrea aumentaron un 8%. La infección por *Chlamydia* fue la más común de estas tres infecciones de transmisión sexual, con tasas de 254 casos por 100.000 en 1999; la gonorrea ocupó el segundo lugar. ^[2,3]

Sólo en Estados Unidos se registran cuatro millones de casos anualmente, con un costo de 2,4 billones de dólares, a causa de las complicaciones muy frecuentemente irreversibles, que genera esta ITS especialmente en las mujeres. De no tratarse, la bacteria puede dañar gravemente el aparato reproductivo. Según la OMS, cada año en el mundo 90 millones de personas la contraen. ^[1,2]

La infección por *Chlamydia trachomatis* es considerada de gran importancia epidemiológica, porque representa del 70% a 90% de infecciones endo-cervicales

en las mujeres, siendo éstas, asintomáticas provocando una infección persistente por meses o años.

La infección por *C. trachomatis* está asociada a la convivencia con una pareja sexual, al estado civil y al uso de dispositivos intrauterino como método de control natal, la presencia de ectropión y friabilidad a la exploración obstétrica de cérvix deberán ser consideradas como predictores en la búsqueda de *C. trachomatis* ^[3].

La EIP por *Chlamydia* es la causa prevenible más importante de la infertilidad y los resultados adversos del embarazo. Las infecciones por *Chlamydia*, como infecciones de transmisión sexual en general, son principalmente un problema de salud de la mujer desde las manifestaciones y las consecuencias son más perjudiciales para la salud reproductiva en mujeres que en hombres ^[2].

Sobre la base de las pruebas disponibles, aproximadamente el 20% de las mujeres con infección por *Chlamydia* del aparato genital inferior presentará esta enfermedad. Casi de 4%; presenta dolor pélvico crónico, infertilidad 3% y 2% de resultados adversos del embarazo ^[2,3]. Sin embargo, estas estimaciones se basan en la evidencia relativamente débil. La investigación sobre el vínculo entre *C. trachomatis* y aspectos masculinos de la infertilidad ha sido mucho más limitada ^[10]

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección se apoya en un adecuado examen físico de la persona sospechosa que porta la enfermedad, pero la confirmación del diagnóstico se da principalmente por pruebas de laboratorio.

Las *C. trachomatis* son bacterias intracelulares obligatorias, las muestras se deben obtener del lugar afectado, las *C. trachomatis* infecta a las células cilíndricas o escamocilíndricas, por lo tanto se debe recoger muestras endocervicales, pero no vaginales, no se adecua pus o exudado uretral en mujeres.

La sensibilidad de cada método depende de la población de pacientes examinadas, el lugar que se obtiene la muestra y la naturaleza de la enfermedad

[1,10]

- Examen Microscópico: Examen directo de las inclusiones, consiste en observar la presencia de los cuerpos de inclusión, que se encuentran dentro del citoplasma de la célula huésped, utilizando tinciones, como: Giemsa, Macchiavello, Papanicolaou, yodo y tinción de rojo Congo. Estas se tiñen por el glucógeno que poseen los cuerpos de inclusión *Chlamydiales* y las células infectadas.

Estas son muy útiles para reconocer la presencia o no de *Chlamydia* por color de reacción, dependiendo de la tinción utilizada. Sin embargo, su eficacia y practicidad no es adecuada como método de diagnóstico en grandes poblaciones por que se necesita de gran número de *Chlamydias* para establecer el diagnóstico. [1,10]

- Cultivo celular: Es una técnica con excelentes resultados es utilizada como estándar de oro, tiene muy buena especificidad (90-97%) y regular sensibilidad (60-80%).

Las líneas celulares más utilizadas son las McCoy (fibroblastos de ratón) HeLa99 (carcinoma Humano), BHK-21 (células de ovario de hámster), por lo que no es práctica ya que requiere condiciones muy rigurosas de preparación del cultivo que sólo están disponibles en laboratorios de alto nivel de complejidad, la sensibilidad se ve afectada por la utilización de muestras inadecuadas, además no muestra diferencia entre infecciones actuales de las previas [1].

- Inmunofluorescencia Directa (IFD): Los anticuerpos monoclonales van dirigidos contra el antígeno específico de especie o polisacáridos (LPS) de membrana y sobre la proteína principal MOMP.

Estas pruebas son muy útiles porque presentan una sensibilidad de 80 -90% y una especificidad del 98 – 99%, son rápidas, tiene la desventaja que necesita de oscuridad como parte de su proceso de elaboración, de no ocurrir puede causar muchas interferencias con el diagnóstico [1].

- Fijación del complemento (FC): Esta prueba es muy utilizada para detectar anticuerpos contra *C. trachomatis*, para medir anticuerpos de Psitacosis y LGV. pero posee la desventaja que no distingue entre especies e inmunotipo.
- Técnicas de ELISA: Esta técnica se basa en la detección de antígenos o anticuerpos ligados a enzimas específicas. Actualmente hay muchos en el mercado son fáciles de desarrollar, baratas y de resultados confiables. Tienen la desventaja que no indica infección actual produciendo falsos positivos y falsos negativos.^[1]
- Pruebas inmunocromatográficas: Esta prueba posee una membrana cubierta con antígenos específicos de lipopolisacarido (LPS), la banda de región T (región del paciente) está cubierta con anticuerpos monoclonales y la banda de la región C (control de la prueba) está cubierta con anticuerpos de ratón.

La muestra reacciona con partículas de oro coloidal que han sido impregnados con anti- anticuerpos monoclonales de *Chlamydia*. Luego se da una migración de la muestra por capilaridad a través de toda la membrana; teniendo como resultado coloración o no de las bandas respectivamente.

Tienen como desventaja que se necesita de un gran número de células para dar una reacción de color fuerte. Estas son ampliamente usadas por su bajo costo, rapidez y buenos resultados ^[1,10].

- Técnicas moleculares: Ensayos de amplificación de material genético, que utilizan las pruebas PCR (reacción en cadena de polimerasa) o LCR (reacción en cadena de ligasa), para ampliar el material genético de la bacteria obtenido a partir de muestras de orina y/o de secreciones.

Es altamente específico y sensible, detectando hasta el 90-95% de las infecciones, es considerado el método de elección para el diagnóstico de la infección. Un método disponible es el test AMPLICOR CT PCR (Roche Molecular System) ensayo disponible comercialmente, automatizado que proporciona control interno y una mezcla maestra de PCR, lo que la hace fácil, rápida y confiable. Otro es el test Amplification kit *C. trachomatis* (LBP BV) kit comercial^[14, 15].

- Pruebas de Serotipificación: Serotipificación de especies de *Chlamydias* por análisis de restricción del gen OMP1, este método es rápido fácil y una gran herramienta para estudios epidemiológicos.

Este método permite la diferenciación no solo de todos los serotipos y serovariante. Primero se amplifica el gen Omp1 por PCR, y luego se procede a dirigir el producto mediante enzimas de restricción. Actualmente existen varios test como el *Ct* Genotyping RHA kit del (Labo Bio-medical products) Kit disponible de manera comercial, útil en estudios epidemiológicos y brotes por *C. t* *rachomatis*^[15].

Tratamiento

Mujer no embarazada: Azitromicina 1 gr oral, dosis única o bien Doxiciclina 100 mg oral, dos veces al día por siete días.

Mujer embarazada: En el embarazo están contraindicadas la Doxiciclina y la ofloxacina. No obstante; la Eritromicina 500 mg, cuatro veces al día por siete días, la Amoxicilina 500 mg, tres veces al día por siete días y la Azitromicina 1 gr oral, dosis única son seguros y efectivos.

Recién nacido: Los macrólidos son los antimicrobianos de elección en niños. Se recomienda tetraciclina al 1% ungüento oftálmico dos veces al día en ambos ojos por 6 semanas. La profilaxis ocular con Eritromicina no previene la conjuntivitis ni la neumonía.

Hombre: La Doxiciclina, 2 veces al día durante 7 días o Azitromicina en dosis única.^[1,2, 3]

Medidas de Prevención

1. Tener una relación de pareja estable.
2. Uso de condones de látex.
3. Tardar en comienzo de la vida sexual activa.
4. Todas las mujeres sexualmente activas y embarazadas con factores de riesgo de infecciones *Chlamydiales*, se deben realizar anualmente pruebas para detectar esta enfermedad.
5. Si la mujer tiene alguno de los síntomas antes mencionados, debe dejar de tener relaciones sexuales y consultar con un médico de inmediato, para el tratamiento temprano.
6. El control de las enfermedades transmitidas sexualmente depende de prácticas seguras y del diagnóstico y tratamiento oportunos de las personas infectadas ^[1, 2,10].

Material y Método

Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal

Periodo de estudio

Agosto a Octubre del 2011.

Área de estudio

Este estudio fue realizado en tres centros de salud (Perla María Norori, Mántica Berio y centro de salud de Sutiava), que cubren diferentes barrios de León y el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA).

Población de estudio

Todas las pacientes entre 15 a 49 años de edad, que asistieron a la consulta de las salas de ginecología en los tres Centros de Salud y HEODRA de la ciudad de León, ya sea por presentar algún tipo de síntoma clínico o para realizarse una prueba de rutina como: La prueba de Papanicolaou.

Muestra

El tamaño de la muestra se calculó tomando en cuenta una prevalencia del 25% encontrada en estudios realizados en Nicaragua en mujeres embarazadas en años anteriores, con un nivel de confianza del 95%, precisión del 5%, efecto de diseño de 1. Las muestras fueron 300 mujeres en edad reproductiva. El tipo de muestreo fue por conveniencia.

Criterios de inclusión

- 1) Firma voluntaria del consentimiento informado.
- 2) Mujeres entre 15 a 49 años de edad que están o no embarazadas, que se presentan a la consulta ginecológica.
- 3) Vivir en el municipio de León.
- 4) No haber tenido tratamiento con antibiótico en los últimos 10 días.
- 5) No haber recibido tratamiento con asa térmica o Crioterapia en los últimos 10 días.

Recolección de la información

A los padres de pacientes menores de 18 años y mujeres de 19 a 49 años de edad con vida sexual activa, se les explicó los objetivos del estudio y se les solicitó su participación en el mismo, mediante la lectura del consentimiento informado. Una vez que aceptaron participar. Se procedió a llenar el formulario con datos demográficos y gineco-obstetricos con posterior firma de la paciente.

Consideraciones éticas

Se consideraron como condiciones éticas:

- La participación voluntaria mediante la lectura de un consentimiento informado, debidamente aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina.
- Libertad de salir del estudio en el momento en que la participante lo decidiera.
- Para la recolección para la toma de la muestra y entrevista, se utilizó un ambiente privado acorde a las posibilidades de los centros asistenciales.
- La confidencialidad en el manejo de los resultados.

Condiciones de Bioseguridad

- La recolección de muestras biológicas siguió medidas rigurosas de asepsia de acuerdo a lo requerido para el estudio.
- Descarte e Incineración de las muestras biológicas al final del estudio para evitar contaminación del medio ambiente y del personal de laboratorio.

Beneficios a las pacientes:

- Entrega de diagnóstico gratuito inmediato de la prueba rápida inmunocromatográfica.
- Toda paciente que resultara positiva a la prueba rápida inmunocromatográfica recibió tratamiento por parte del centro de salud y hospital de la ciudad.
- Notificación de resultados de PCR a las pacientes positivas.

Manejo de Muestras:

Se colectaron 300 muestras cervicales. A 299 se les realizó la prueba inmunocromatográfica porque una de las muestras fue insuficiente. Por razones económicas, 200 fueron analizadas con PCR. Se analizaron 200 con PCR, se incluyeron las 10 positivas por prueba rápida y luego se agregaron las demás hasta completar las 200. De modo que para el cálculo de la frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* y el análisis estadístico de las variables socio-demográficas y gineco-obstetras sólo se tomaron en cuenta las 200 muestras analizadas con PCR.

Se obtuvieron dos muestras en una misma paciente, debido a que los diferentes métodos utilizados así lo requerían, Primera muestra: Prueba Inmunocromatográfica (ICT): Para la identificación de *Chlamydia trachomatis*, se utilizó una prueba basada en un principio inmunocromatográfico de (Cypress Diagnostics, Bélgica. (ver anexos). Segunda muestra: Pruebas Moleculares: Esta fue introducida en un tubo eppendorf, conteniendo 1 ml de PBS para la extracción de ADN y el posterior análisis de las pruebas moleculares en el laboratorio de biología molecular de la facultad de Microbiología de la Universidad Nacional de Honduras.

Transporte de las muestras al Campus Medico: Las muestras fueron trasladadas en un contenedor debidamente provisto de bolsas de hielo, éstas fueron trasportadas al laboratorio del Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAN-León y guardadas a -20°C , hasta el momento de su análisis.

Extracción de ADN: La extracción del ADN fue llevado a cabo en 2 grupos : En Nicaragua y Honduras se purificó una parte de las muestras, usando el protocolo de **BOOM, et al 1990** ^[20] y el kit comercial de **QIAGEN** en ambos países. (Ver anexos)

Transporte de las muestras a Honduras:

El transporte de las muestras y el ADN previamente extraído, fue cuidadosamente transportado en un termo provisto de bolsas de hielo, debidamente etiquetadas

para evitar contaminación y la pérdida de éstas, una vez arribaron a Honduras, fueron transportadas de manera inmediata al laboratorio de la universidad y almacenadas a -20°C para su posterior análisis.

Detección de *Chlamydia trachomatis* por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Se utilizó el kit comercial Ct-DT assay (Labo Medical Products BV, Riswijk, The Netherlands). El kit proporciona la Mescla maestra cuyas cantidades son desconocidas, por ser de uso restringido.

La mescla maestra contiene iniciadores biotinilados que están focalizados en amplicones que delimitan y detectan una región de **89pb** del **plásmido críptico** y **165pb del gen Omp1** de *Chlamydia trachomatis*. Además, proporciona el control positivo, un tubo con 1.4ml de ADN del serovar L2. A cada vial, se agregó 40ul de Mescla maestra y se añadió 10 ul de muestra a cada tubo, para obtener un volumen final de 50ul; estos se colocaron en el termociclador marca comercial Applied, previamente programado (Ver anexos).

Posteriormente los productos amplificados se les realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, a 100 vol por 60 minutos, sobre lámpara de UV, previo teñido con bromuro de etidio.

PCR en Tiempo Real: Con el propósito de verificar a las cuatro muestras positivas analizadas con PCR convencional, también se realizó un PCR en Tiempo Real (RT-PCR), se utilizó un kit (DIA-CT-O50) de venta comercial de la casa Diagenode's *C. trachomatis* Real Time PCR. El blanco de *C. trachomatis* fue detectado por fluorescencia de 520nm haciendo uso de un ligthcicler Tagman master 2.0.

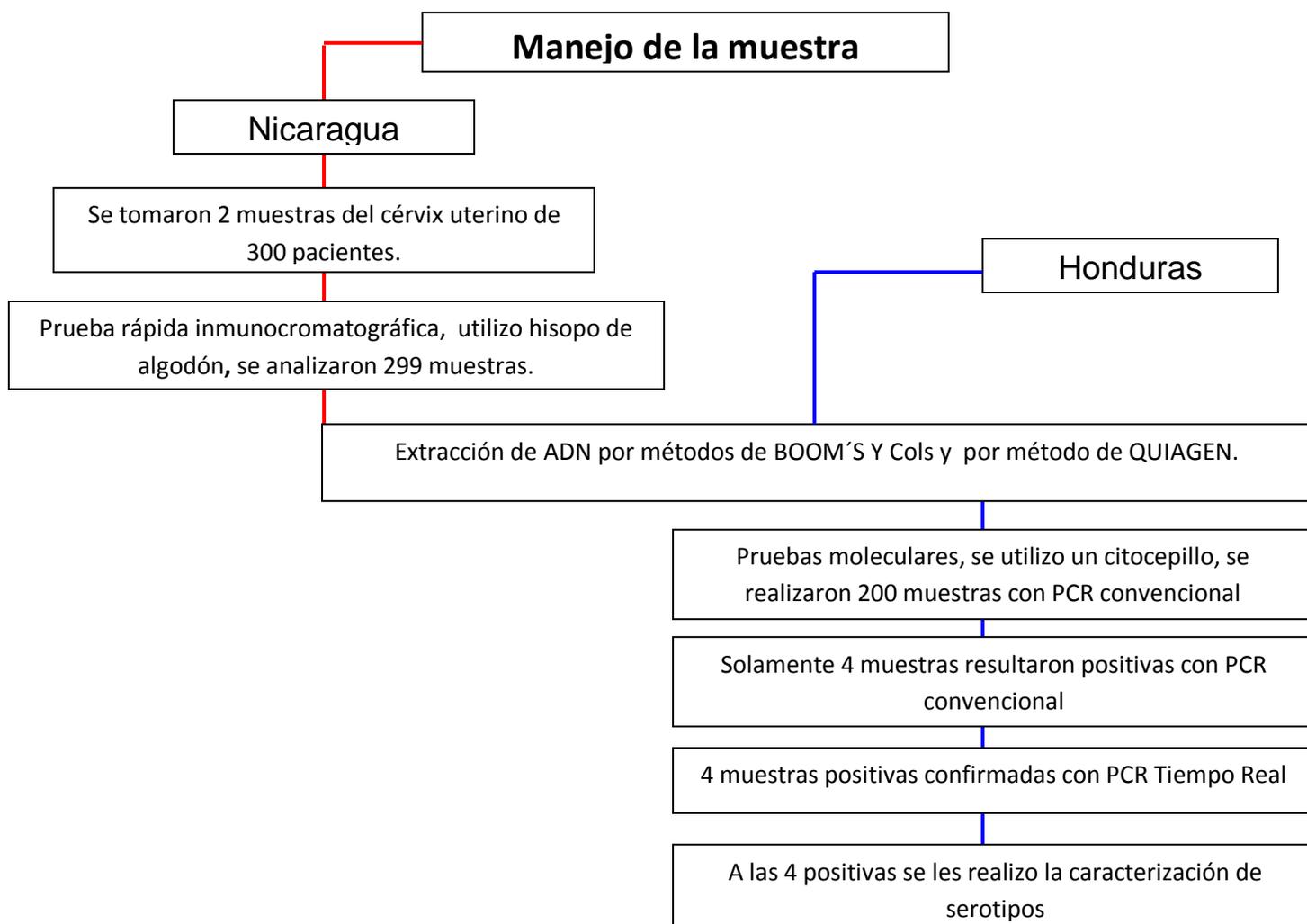
Caracterización de serotipos de *Chlamydia trachomatis*:

Se utilizó el kit comercial para la caracterización de *Chlamydia trachomatis*, Ct Genotyping RHA kit (Ct-DT) (Labo Bio-medical products, Rijswijk, Netherlands), con el principio de la hibridización reversa (RHA). Desnaturaliza amplicones biotinilados, como resultado de la amplificación y detección de regiones del

plásmido críptico y del gen *Omp1* con un amplio espectro de iniciadores, que son hibridados con sondas de oligonucleótidos específicos, los que son inmovilizados sobre tiras de membrana en líneas paralelas.

La presencia o ausencia de color en las tiras del kit, significa positividad o negatividad de serotipo, el desarrollo de color en el plásmido críptico confirma la presencia de *C. trachomatis*, la tira muestra una línea de conjugado que sirve como un control para la prueba, si ésta aparece sin color significa que la muestra queda inválida. (Ver anexos)

Análisis de los datos: Los datos recolectados fueron procesados con el programa estadístico SPSS versión 18, se hizo análisis descriptivo simple de las diferentes variables y se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar diferencias significativas entre las categorías de las variables. (Ver anexos)



Operalización de las Variables

Variables	Concepto	Escala
Infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	Presencia de la bacteria en el cérvix uterino.	Positivo Negativo
Prueba Rápida	Detección de anticuerpos contra <i>Chlamydia trachomatis</i> . que emplea tiras inmunocromatográficas	Positivo: presencia de color en la banda T Negativo: ausencia de la banda.
Prueba de PCR:	(Reacción en cadena de la Polimerasa)	Positiva: si presenta bandas de igual peso molecular que el control positivo. Negativa: la ausencia de ésta.
Edad	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta el día de la encuesta.	15 a 19 20 a 29 30 a 39 40 a 49
Procedencia	Lugar donde viven las pacientes.	Urbano Rural
Estado civil	Estado que describe a la paciente en su condición civil.	Casada Soltera Acompañada

		Otros
Escolaridad	Años de estudios aprobados al momento de acudir a la consulta.	Primaria Secundaria Técnica Profesional Otros
Ocupación	Labor que desempeña regularmente y obtiene un ingreso monetario.	Estudiante Ama de casa Trabajadora sexual Otros
No. de Embarazos	Número de veces del proceso en el que crece y se desarrolla el feto en el interior del útero.	0 a 2 3 a 5 6 a más
Aborto	Pérdida espontánea del feto.	Ninguno 1 o más
IVSA	Edad en que dio inicio a su vida sexual activa.	11 a 19 años Más de 19 años
Número de compañeros sexuales	Cantidad de compañeros sexuales tanto parejas formales como informales.	1 a 2 Más de 2
ITS	Haber padecido o padecer de alguna infección de transmisión sexual.	Sí No
Uso de condón	Barrera de protección durante el acto sexual.	Sí No

Resultados

Entre Agosto y Octubre del 2011 se colectaron 300 muestras cervicales de mujeres en edad reproductiva. De las 299 muestras analizadas con la prueba rápida inmunocromatográfica 10 fueron positivas para *C. trachomatis* correspondiendo al 3.3% y de 200 muestras analizadas por la PCR cuatro resultaron positivas, para un 2 %. Las cuatro muestras positivas por PCR fueron confirmadas con la técnica de PCR en Tiempo Real. (Tabla 1)

Tabla 1. Frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* según el diagnóstico utilizado, en mujeres atendidas en el Hospital y Centros de Salud de León.

Método	Positivo		Negativo		Total
	Frec	%	Frec	%	
Prueba rápida	10	3.3	289	96.7	299
PCR	4	2.0	196	98.0	200

Al analizar la distribución de la infección por *C. trachomatis* según las variables epidemiológicas estudiadas, se encontró que del total de cuatro muestras positivas dos correspondían al grupo de 40-49 años, con un porcentaje de 4.8%, una del grupo de 15 a 19 años, con un porcentaje de 3.6% y una al grupo de 20-29 años, con un porcentaje de 1.3%. De 29 pacientes de procedencia rural una fue positiva lo que representa un porcentaje de 3.4% y en 171 pacientes de procedencia urbana habían tres positivas, con un porcentaje de 1.8%.

Del mismo modo, tres positivas eran de estado civil acompañadas, con un porcentaje de 3.3% y una positiva con el 100.0% que correspondía a la categoría de otros, en esta categoría sólo había una paciente. En cuanto a la escolaridad, tres muestras positivas correspondían a secundaria, con un 3.2% y una para la de primaria con 1.7%. En la prueba exacta de Fisher no se encontraron diferencias significativas entre las categorías de las variables socio-demográficas. (Tabla 2)

Tabla 2. Frecuencia de infección por *C. trachomatis*, detectada por PCR, según diferentes variables socio-demográficas de mujeres atendidas en el Hospital y Centros de Salud de León.

	PCR (n=200)				Total	Valor P
	Negativo		Positivo			
	frec	%	frec	%		
Edad						
15-19	17	94.4	1	3.6	18	
20-29	76	98.7	1	1.3	77	
30-39	63	100.0	0	.0	63	
40-49	40	95.2	2	4.8	42	
Total			4		200	.125
Procedencia						
Rural	28	96.6	1	3.4	29	
Urbana	168	98.2	3	1.8	171	
Total			4		200	.468
Estado civil						
Acompañada	87	96.7	3	3.3	90	
Casada	64	100.0	0	.0	64	
Soltera	45	100.0	0	.0	45	
Otros	0	.0	1	100.0	1	
Total			4		200	.013
Escolaridad						
Primaria	59	98.3	1	1.7	60	
Secundaria	91	96.8	3	3.2	94	
Universitaria	25	100.0	0	.0	25	
Técnica	12	100.0	0	.0	12	
Otros	9	100.0	0	.0	9	

En cuanto a la distribución de la infección por *C. trachomatis* de acuerdo a la historia sexual de las pacientes se encontró que tres de las cuatro pacientes positivas tenían un inicio de vida sexual activa entre 11 a 19 años, con un porcentaje de 1.9%. Todas las muestras positivas habían tenido uno a dos compañeros sexuales, con un porcentaje de 2.5%. En relación al uso del condón tres de las positivas afirmaron no usarlo, lo que representa un porcentaje de 1.8% y la totalidad de las positivas no tenían otra enfermedad de transmisión sexual,

con un porcentaje de 2.3%. La prueba de Fisher mostró que no había diferencia significativa entre las categorías de cada variable. (Tabla 3)

Tabla 3. Frecuencia de infección por *C. trachomatis* de acuerdo a la historia sexual de las pacientes atendidas en el Hospital y en centros de Salud de León.

	PCR (n=200)				Total	Valor p
	Negativo		Positivo			
	frec	%	frec	%		
IVSA						
11 a 19	154	98.1	3	1.9	157	1.000
más 19	42	96.7	1	2.3	43	
Total					200	
n de compañeros sexuales						
1 a 2	156	97.5	4	2.5	160	.551
más de 2	40	100.0	0	.0	40	
Total					200	
Uso se condón						
Sí	35	97.2	1	2.8	36	.551
No	161	98.2	3	1.8	164	
Total					200	
Presencia de ITS						
Sí	25	100.0	0	.0	25	
No	171	97.7	4	2.3	175	

De acuerdo a la distribución de la infección por *C. trachomatis* según las características gineco-obstétricas, de 12 embarazadas sólo una resultó positiva 8.3% y de 188 no embarazadas; tres, eran positivas, lo que representa un 1.6%. De 71 pacientes que tuvieron de tres a cinco embarazos, tres, eran positivas para un porcentaje de 4.2% y de 48 pacientes con uno o más abortos dos, eran positivas lo que representa un porcentaje de 4.2%. Al efectuar la prueba exacta de Fisher no se encontraron diferencias significativas entre las categorías de cada variable. (Tabla 4)

Tabla 4. Frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* de acuerdo a las características gineco-obstétricas de las pacientes atendidas en el Hospital y Centros de Salud de León.

	PCR (n=200)				Total	Valor P
	Negativo		Positivo			
	frec	%	frec	%		
Embarazo						
Sí	11	91.7	1	8.3	12	.221
No	185	98.4	3	1.6	188	
Total					200	
N de embarazos						
0 a 2	117	99.2	1	.8	118	.323
3 a 5	68	95.8	3	4.2	71	
6 a más	11	100.0	0	.0	11	
Total					200	
Abortos						
Ninguno	150	98.7	2	1.3	152	
1 a más	46	95.8	2	4.2	48	

Caracterización de las muestras positivas para *Chlamydia trachomatis*

En la caracterización de serotipos, la muestra (56PS) presentó el serotipo B/Ba, la (187MB) presentó mezcla de los serotipos C, H, I/la, J, K y serovariante J*/L3), la muestra (230PMN) tuvo mezcla de los serotipos C, H I/la y en la cuarta (221HEODRA) no se identificó ningún serotipo. (Tabla 5)

Tabla 5. Serotipos encontrados en 4 muestras PCR positivas.

Serotipos	Códigos de las muestras analizadas			
	56 PS	187 MB	221 HEODRA	230 PMN
Plásmido críptico	●	●		●
Serogrupo B	●			
Serotipo B/Ba	●			
Serogrupo C		●		●
Serotipo C		●		
Serotipo H		●		●
Serotipo I/Ia		●		●
Serotipo J		●		
Serovariante J*/L3		●		
Serotipo K		●		
Ninguno			●	

Discusión

Chlamydia trachomatis es una bacteria considerada en la actualidad como la causa más frecuente de infecciones de transmisión sexual a nivel mundial [2,3].

En Nicaragua es muy poco lo que se conoce sobre la frecuencia de las infecciones causadas por este agente en la población en general; el diagnóstico actual es meramente clínico, por lo que no hay información actualizada sobre: frecuencia, serotipos y factores asociados con la infección. El presente estudio es el primero en reportar los serotipos circulantes de *Chlamydia trachomatis* en el grupo de mujeres estudiadas.

En el presente estudio se encontró una prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* del 2%, esta prevalencia es mucho menor que la encontrada en otros estudios realizados en países como: Finlandia con 90% [21], Costa Rica con el 14.2% [22] y 14,7% [23], Brasil con el 31% [24] y 10% [25], Ámsterdam con 21.5% [26], Centro América con el 20.1% [27], Iran con prevalencia del 17% [28], India con 15.85% [29], México con 15% [30], Venezuela con 10.4% [31] Estados Unidos con el 16.7% [32], Honduras presentó el 6% [33] y en otros países de Europa la prevalencia varía entre 8% a 6% [3].

Por otra parte, estudios realizados en otros países la prevalencia es similar a la encontrada en este estudio. Estas prevalencias han sido consideradas por algunos autores como prevalencias bajas, siendo estos países: Colombia con 5.0% [34], Brasil en 2005 y 2006 con prevalencia de 4.0% [35], Chile con prevalencia de 4.7% [36], Italia 2.7% [3], Perú con 2.78% [37] y Barcelona, España con 0.98% [38].

En comparación con otros estudios nacionales, la prevalencia encontrada en el presente estudio es igual a la reportada por Hermann et al. [7], en 1993, en mujeres de varios departamentos atendidas en la rutina. Pero es menor que la prevalencia de 4.1% encontrada en otro estudio efectuado en el año 2000 en mujeres en edad reproductiva, que asistían a la consulta de clínicas para la detección de infecciones de transmisión sexual [8]. En este caso se tiene que tomar

en cuenta que el grupo de mujeres participantes en dicho estudio asistieron a clínicas para la detección de ITS, por lo tanto; son un grupo considerado de alto riesgo.

La técnica de referencia para el diagnóstico de *C. trachomatis* sigue siendo el cultivo. Pero su alto costo y la necesidad de laboratorios altamente especializados, no permitieron su utilización en este estudio. Sin embargo en los últimos años se han desarrollado técnicas tanto de pruebas inmunocromatográfica como de PCR, que conservan altos porcentajes de sensibilidad y especificidad.

La PCR utilizada en éste estudio tiene una sensibilidad y especificidad alta, es de venta comercial, fácil de realizar puesto que está compuesta de una mezcla maestra y un control interno que proporciona el Kit, pero tiene un alto costo, lo que la hace poco accesible para países como Nicaragua. En nuestro medio puede ser utilizado para estudios epidemiológicos o para evaluar programas de intervención.

En cuanto a la distribución de la infección por grupo de edad, en el grupo más joven se presentó solo un caso mientras que en el grupo de mayor edad se presentaron dos casos de un total de cuatro positivos. El poco número de casos positivos hace difícil conocer la distribución real de la infección en los grupos de edad. En Nicaragua Herrmann et al. ^[7] encontraron una prevalencia de *C. trachomatis* de 8% en mujeres adolescentes y según Claeys P, et al. ^[9] que las edades más jóvenes eran un factor de riesgo para la infección. De modo similar en Venezuela, Arraiz N et al. ^[31] encontró que la mayor prevalencia de infección ocurrió en el grupo de 20 a 30 años de edad.

Las cuatro pacientes positivas en este estudio habían iniciado su vida sexual entre de los 11 y 19 años de edad, estaban acompañadas, habían tenido más de un compañero sexual, no utilizaban condón y tenían al menos la primaria cursada. Sin embargo no se encontró diferencia significativa con los grupos de características diferentes. Según la literatura revisada ^[1,2, 3,10] las pacientes que

presentan las características antes mencionadas, tienen alto riesgo de contraer una infección por *Chlamydia trachomatis*.

En el presente estudio se nota que hay esta tendencia pero no se puede confirmar estadísticamente por lo reducido de muestras positivas. Por lo tanto, se debe tener precaución de no extrapolar sus resultados a otras poblaciones. Un estudio similar con una muestra mayor y más representativa del país puede resolver esto.

De 12 mujeres embarazadas incluidas en el estudio, una resultó positiva 8.3%. En comparación, en estudios anteriores efectuados en Nicaragua con embarazadas, se reportaron prevalencias de infección por *C. trachomatis* de 16 a 25.9% [4,5]. De modo similar, en un estudio realizado en Chile la prevalencia fue de 19% [39]. Esta disparidad puede deberse al pequeño número de embarazadas incluidas en el presente estudio y a que en los estudios mencionados se emplearon métodos de diagnósticos de menor especificidad que el PCR.

El estudio realizado también tuvo como objetivo conocer los serotipos que circulan en nuestro medio, puesto que actualmente en Nicaragua no se conoce la epidemiología de éstos.

Actualmente las cepas de *C. trachomatis* se encuentran agrupadas en tres grandes sero-grupos o bio-grupos que su vez se dividen en 19 serotipos. Estos incluyen el serogrupo B, que contiene a los serotipos: B/Ba, D/Da, E, L₁, L₂ y L_{2a} serogrupo C contiene los serotipos: A, C, H, I/Ia, J, K y L₃. El serogrupo indeterminado contiene los serotipos F, G/Ga [1,14,15]. Los serotipos comúnmente asociados con tracoma incluyen: A, B/Ba y C. Los serotipos B y C raramente son detectados en el tracto urogenital [12, 14,15].

Los serotipos de las infecciones de transmisión sexual no invasiva, comúnmente se encuentran en el tracto urogenital e incluso pueden ser detectados en el tracto respiratorio de niños son: D/Da, E, F, G/Ga H, I/Ia, J, y K [15]. Los serotipos invasivos causantes de linfogranuloma venéreo también de transmisión sexual como son el serogrupo L₁, L₂/L_{2a} y L₃, son detectados en el recto y nódulos

linfáticos inguinales, y son asociados a linfadenitis supurativa, Linfogranuloma venéreo y proctitis hemorrágica ^[1,10,12,14,15]

Los serotipos encontrados en el presente estudio fueron los serotipos B/Ba, C, H, I/la, J, K y serovariante J*/L3, que son propios del tracto genitourinario, de transmisión sexual y serovares poco frecuentes en el mundo. Estos presentaron características de frecuencia, poco común. Es decir, Los serovares de mayor prevalencia en el mundo son los serotipos D, E, y F. Entre los países latinoamericanos como, Costa Rica, Quit K, et al ^[40] encontraron que el serotipo E fue el más común (31%) seguido por los serotipos F y D (21% en ambos) y el serotipo I (15%). Y en otro estudio, en el mismo país Porraz C, et al ^[22] observó que el serotipo E fue el más común 4.3% seguido por el serotipo F 3.0%, serotipo D/Da 2.9% y serotipo I/la 2.1%.

De modo similar, en Australia, Bandea C, et al ^[41] encontraron que el serotipo E (48.9%), seguido del F (22.2), J/Ja (11.1%), D/Da (8.9%), G (6.7%), y el k con (2.2%). Y en Colombia, et al los serotipos más comunes fueron el D (22.2%), F (18.5%) y G (13.6%) ^[34]. En un estudio ^[15] se sugiere que estos serotipos se detectan con más frecuencia porque las infecciones que causan son más persistentes.

Sobre los serotipos encontrados en el presente estudio no se pueden hacer comparaciones por el reducido número de muestras positivas.

Una segunda característica que presentaron los serotipos encontrados en nuestro estudio, es que dos de cuatro muestras positivas presentaron múltiples serotipos, llegando a contarse hasta seis en una sola muestra, siendo todos serotipos de transmisión sexual, no invasivos, poco frecuentes en el mundo pero, propios del tracto genitourinario.

En diversos estudios se han reportado mezclas de serotipos, en una pequeña proporción de las muestras. Estudios en Costa Rica ^[40] encontraron múltiples

serotipos de *C. trachomatis*, sin ningún patrón evidente en 14 de un total de 806 muestras positivas. En Holanda y en Uganda la frecuencia de serotipos mixtos fue de (4%) ^[15]. No hay una explicación definitiva sobre las mezclas de serotipos. En un estudio ^[42] los autores, sugieren que la multiplicidad de serotipos en las muestras se debe a exposición a múltiples parejas sexuales.

Por otra parte, otros autores ^[15] sugieren que la diferencia en detectar infecciones múltiples, podría deberse a una sobreestimación de la presencia de múltiples tipos como resultado de la ausencia de sondas específicas para nuevos variantes. Además, señalan que en las muestras clínicas pueden estar presentes otros sero-variantes de los serotipos incluidos en la prueba que no se han caracterizado y que esto podría dar origen a resultados aberrantes en la tira de hibridación reversa. A este respecto, los autores sugieren que las infecciones mixtas de serotipos que pertenecen al mismo serogrupo sean verificadas por análisis de secuencia.

En una de las muestras positivas, no se detectó ningún serotipo, a pesar de que el control del conjugado dio reacción positiva, indicando que el procedimiento fue correcto. Ésto podría deberse a una muestra de ADN insuficiente o bien , como sugieren otros autores ^[40] por una variación de secuencia en la región del blanco del primer o por inhibición de la amplificación del gen *omp1* en la PCR.

Es decir; cada célula de *C. trachomatis* contiene 10 a 20 copias del plásmido críptico, pero sólo una del gen *omp1*. Si el ADN aislado contiene una concentración muy baja del AND del microorganismo, es posible que solo este incluido el DNA del plásmido pero no el ADN genómico. Y por lo tanto el PCR dará positivo solo la porción del plásmido. Otra explicación de estos autores está relacionada con una variación del muestreo. Por lo que cuando las muestras contienen un número muy bajo de moléculas de ADN o cuando se usan muestras de materiales clínicos heterogéneos como hisopados cervicales, muestras de la conjuntiva o biopsias podrían tenerse este tipo de resultados.

Los datos presentados en el presente estudio son representativos únicamente de la población estudiada, es decir, de las mujeres que acudieron a realizarse la prueba de Papanicolaou y por tanto, no son extrapolables a la población general. Acerca de las variantes serológicas de *C. trachomatis*, en Nicaragua es muy poco lo que se conoce. Por lo que el presente trabajo cumple con los objetivos planteados revelando las primeras pistas sobre la diversidad de serovares en las infecciones genitales y constituye un punto de referencia para futuros estudios.

Conclusiones

1. Se encontró una frecuencia del 2% de infección por *Chlamydia trachomatis*.
2. La infección por *C. trachomatis* se observó en los grupos de 15 a 19, y 40 a 49 años de edad, en pacientes con nivel de educación secundaria, inicio temprano de vida sexual activa, con uno a dos compañeros sexuales y que no usaban condón.
3. En cuanto a las características gineco-obstétricas, la mayor frecuencia de infección se encontró en las mujeres no embarazadas, con historia de tres a cinco embarazos y con uno o más abortos.
4. Se identificaron siete serotipos causantes de ITS no invasiva. Dos de las muestras, mostraron la presencia de los serotipos: C, H, I/la, J, K y serovariante J*/L3. El serotipo B/Ba fue encontrado como infección simple y una muestra no fue positiva a ningún serotipo.
5. Se encontró diferencia diagnóstica entre la prueba inmunocromatográfica y la prueba de PCR.

Recomendaciones

- 1) Se recomienda realizar estudios epidemiológicos, para determinar si las tendencias de los hallazgos observados en el presente estudio, tienen efecto en la incidencia de la infección por *C. trachomatis*.
- 2) Considerar la utilidad práctica de las pruebas inmunocromatográfica en el manejo clínico de las pacientes con infecciones urogenitales.

Referencias Bibliográficas

- 1) Ostos O y Sánchez R. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas, NOVA-publicación científica. 2003; 1(1): 81-93
- 2) Organización Mundial de la Salud (WHO), Media Center, Sexually transmitted infections. (Accesado 3 junio 2012) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>
- 3) WHO, Global Prevalence and Incidence of Selected Sexually Transmitted Diseases: Overviews and Estimates, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1996. (Accesado 3 Junio 2012). Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf
- 4) Porras F. Infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en mujeres embarazadas HEODRA. León, Noviembre-Diciembre 2002. Tesis UNAN - León 2002.
- 5) López C. Agentes etiológicos más frecuentes de infección cérvico vaginal en mujeres embarazadas atendidas en el HEODRA, León de Octubre a Diciembre del 2003. Tesis UNAN- León 2003.
- 6) Benavides M, Téllez A, Matus G, Baltodano Y, Centeno N. Prevalencia de *Chlamydia Trachomatis* como agente causal de Leucorrea único o en asociación con otros agentes en Mujeres Embarazadas. Tesis UNAN-León 2008.
- 7) Herrmann B, Espinoza F, Villegas R, et al. Genital Chlamydial Infection among women in Nicaragua: Validity of fluorescent antibody testing, prevalence, risk factors and clinical manifestations. *Genitourin Med.* 1996; 72:20-26.
- 8) Claeys P, Gonzalez C, et al. Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women's health clinics in Nicaragua. *Sex Trans infect.* 2002; 78: 204-207.
- 9) Clarke I. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2011; DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06194.X
- 10) Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología Médica.* 6ta. Edición. Elsevier, Madrid, España. 2007; p. 463-475.
- 11) Sun G, Pal S, Sarcon A. et al. Structural and Functional Analyses of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis*, *Journal of Bacteriology,* 2007; 189(17):6222–6235.

- 12) Cevenini R, Donati M, Vittorio S. *Chlamydia trachomatis* - the agent. 2002. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and gynecology. 2002; 16(6):761- 773.
- 13) Liu X, Afrane M, Clemmer D, et al. Identification of *Chlamydia trachomatis* Outer Membrane Complex Proteins by Differential Proteomics. Journal of Bacteriology. 2010; 192(11):2852–2860.
- 14) Dean D, Bruno W, Wan R, et al. Predicting phenotype and Emerging Strains among *Chlamydia trachomatis* Infection. Emerging infectious Diseases. 2009; 15(9):1385-1394.
- 15) Quint K, Van Doorn L, Kleter B, et al. A Highly Sensitive, Multiplex Broad-Spectrum PCR-DNA-Enzyme Immunoassay and Reverse Hybridization Assay for Rapid Detection and Identification of *Chlamydia trachomatis* Serovars. Journal of molecular diagnostics. 2007; 9(5):631-638.
- 16) Dean D y Millman K. Molecular and Mutation Trends Analyses of omp1 Alleles for Serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Journal of Clinical Investigation. 1997; 99(3):475-483.
- 17) Darville T y Hiltke T. Pathogenesis of Genital Tract Disease due to *Chlamydia Trachomatis*. J Infect Dis. 2010; 201(Supl.2) S114-S125.
- 18) Brunham R, Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. Nature Reviews Immunology. 2005; 5:149-161.
- 19) Shirey K, Jung J, Carlin J. Up-Regulation of Gamma Interferon Receptor Expression Due to *Chlamydia*–Toll-Like Receptor Interaction Does Not Enhance Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Signaling. Infection and Immunity. 2006; 74(12):6877–6884.
- 20) Boom R, Sol J, M Salimans, Jansen C, P M Wertheim-van Dillen, and J van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3) 495-503.
- 21) Niemi S, Hiltunen-Back E, Puolakkainen M. *Chlamydia trachomatis* Genotypes and the swedish new variant among urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in Finland. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2011; ID 481890
- 22) Porraz C, Safaeian M, Gonzalez P, Hildesheim A. et al. Epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection among Young Women in Costa Rica, Sexually transmitted Diseases. 2008; 35(5):461-468.
- 23) García Z, Arauz P, Taylor L, Moraga M, Herrera G. Infección por *Chlamydia trachomatis* en un grupo de mujeres de alto riesgo, trabajadoras del sexo en Costa Rica. Rev Costarric Cienc Med. 2005; 26(3-4)

- 24) Machado C, Da Costa B, Gomes I, Santana I, Grassi M. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. The Braz J of Infec Dis. 2012; 16(2):188-191.
- 25) Piazzetta R, Carvalho N, Pereira R, Piazzetta G, Piazzetta R, Carneiro R. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in sexually active Young women at a Southern Brazilian city. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011; 33(11):328-33.
- 26) Van de Laar M, Lan J, Fennema J. et al. Differences in clinical manifestations of genital Chlamydia infections related to serovares. Genitourin Med. 1996; 72: 261-265.
- 27) Soto R, Ghee A, Nunez C, Mayorga R, et al. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections/HIV and risk behaviors in vulnerable populations in 5 Central American countries. J Acquir Immune Defic Syndr. 2007; 46(1):101-111.
- 28) Hashemi F, Pourakbari B, Yazdi J. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in women with cervicitis in Tehran, Iran. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2007; ID:67014.
- 29) Gita S, Suneeta M, Anjana S, et al. *C. trachomatis* in female reproductive tract infections and RFLP- based genotyping: a 16-years study from a tertiary care Hospital. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2011; ID:548219.
- 30) De Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra M et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens of infertile Mexican women. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29(2):102-108.
- 31) Arráiz N, Ginestre M, Perozo A, et al. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población de estado de Zulia, Venezuela. Rev Chil Infect. 2005; 24(1):48-52.
- 32) Deblina S, Sternberg M, Johnson R, Berman S, et al. Gonorrhea and *Chlamydia* in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. Annals of Internal Medicine. 2007; 147:89-96.
- 33) Táborá N, Zelaya A, Bakkers J, et al. *Chlamydia trachomatis* and genital human papillomavirus infections female University students in Honduras. Am.j.Trop. Med. Hyg. 2005; 73(1):50-53.
- 34) Molano M, Weiderpass E, Posso H, et al. Prevalence and determinants of *Chlamydia trachomatis* in women from Bogota, Colombia. Sex Transm Infect. 2003; 79:474-478.
- 35) Rodrigues M, Fernandes P, Haddad J, et al. Frequency of *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma*

Hominis and Ureaplasma species in cervical samples. *Journal of Obstetric and Gynecology*. 2011; 31(3):237-241.

- 36) Martínez A, Reid I, Arias C. et al. Prevalencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en mujeres de la Región Metropolitana. *Rev. Méd. Chile*. 2008. Vol: 136, No.10.
- 37) Bonifaz K, Castro P, Zambrano L. Frecuencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes que acudieron a control de papanicolaou en el hospital general de ICA, 2011. *Rev, med, panacea*. 2012; 2(1); 20-23.
- 38) Domingo A, Suñe T, Colomo B. et al. Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* determinada mediante métodos de biología molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20(5):205-7.
- 39) Huneus A, Pumarino M, Schilling A. et al. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes chilenas. *Rev Méd Chile* 2009; 137:1569-1574
- 40) Quint K, Porras C, Safaeian M, Gonzalez P, et al. Evaluation of a novel PCR-Based Assay for Detection and Identification of *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45(12): 3986-3991.
- 41) Bandea C, Debattista J, Kahaliah J, et al. *Chlamydia trachomatis* Serovares Among Strains Isolated from Members of Rural Indigenous Communities and Urban Populations in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(1):355-356.
- 42) Barnes R, Suchlan R, Wang S, et al. Detection of Multiple Serovars of *Chlamydia trachomatis* in Genital Infections. *Journal of infectious diseases*. 1985; 152(5):985-989. . (Accesado 25 de Agosto 2012). Disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/152/5/985.short>

ANEXOS

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON**

Facultad de Ciencias Medicas Departamento de Microbiología
Maestría de Microbiología Médica
Centros de Salud y Hospital Oscar Danilo Rosales



Consentimiento Informado, voluntario para la participante

Frecuencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en mujeres en edad reproductiva que asisten a la consulta ginecológica en centros de salud y el hospital Oscar Danilo Rosales de la ciudad de León.

La Clamidia es una infección de transmisión sexual (ITS) de origen bacteriano, Su agente causal es la *Chlamydia trachomatis*, germen que vive en forma obligada dentro de las células (parásito intracelular) y afecta específicamente al ser humano, requiriendo células vivas para su supervivencia. Existen factores asociados que incrementan el riesgo de infección como: Adolescencia, juventud, múltiples parejas sexuales y uso de medidas contraceptivas.

En la mujer el sitio más comúnmente colonizado es el cuello uterino, causando un proceso inflamatorio que se manifiesta por secreción muco-purulenta (flujo) o sangrado y dolor después de las relaciones sexuales.

La Enfermedad Inflamatoria Pélvica (EIP) puede causar daño permanente a las trompas de Falopio, al útero y a los tejidos circundantes. El daño puede llegar a causar dolor pélvico crónico, infertilidad y embarazo ectópico (embarazo implantado fuera del útero), el cual puede causar la muerte.

De antemano le agradecemos por tomarse su tiempo y leer la información

Usted, Está siendo invitada a participar en un estudio para determinar de infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. Se le pide por favor lea con mucho cuidado la hoja de información, tiene derecho a hacer cualquier pregunta si no le entiende o si desea más información. Esta información es valiosa para mejorar la salud sexual y ginecológica de las mujeres en nuestro país. Por lo que este estudio pretende aportar información actualizada de la situación epidemiológica de esta enfermedad en nuestra medio.

Objetivo principal del estudio: Determinar la Frecuencia de las infecciones cervicales por *Chlamydia trachomatis* en mujeres en edad reproductiva que asisten a la consulta ginecológica de centros de salud y hospital Oscar Danilo Rosales de la ciudad de León.

Participación:

Su participación es completamente voluntaria, una vez que reciba la información sobre el estudio, y decida no participar, es libre de hacerlo, simplemente no firme el documento y se puede retirar sin darnos ninguna justificación.

Es importante que conozca que este estudio ha sido aprobado por la dirección de la Facultad de Medicina de la UNAN- León y aceptado por el comité de ética de dicha institución, se llevara a cabo conforme leyes Nicaragüenses y normas internacionales para la realización de estudios en seres humanos.

Si decide ser parte de nuestro estudio, le pedimos contestar un formulario clínico el cual contiene preguntas sencillas, pero básicas para el estudio y firmar su consentimiento voluntario.

Confidencialidad de los resultados.

Todos los datos e información serán estrictamente confidenciales respetando su privacidad. Estos serán guardados en papel y computadora. Además archivados y revisados solo para la evaluación de los mismos. Estarán a cargo del investigador principal y se archivarán por el tiempo que sea necesario para el estudio, no serán de acceso a nadie ajeno al estudio.

Con su firma está aceptando participar en el estudio, nos autoriza de manera voluntaria al uso de sus datos. Además declara que fue informada de la naturaleza del estudio y de los objetivos de este.

Beneficios. Las pruebas de laboratorio serán completamente gratis, recibirá el resultado rápido de laboratorio una vez analizada la muestra, estas pruebas nos brindaran información de su condición de salud y diagnóstico de la enfermedad.

Donde Localizarnos:

Para cualquier problema o información adicional que requiera acerca del estudio, puede contactarnos en el Campus Médico con el encargado del estudio Dr. Félix Espinoza a el teléfono: 2311 4646. ó bien con la Lic. Nadia Lariza Flores al teléfono: 86444293.

Participante No. _____

Nombre del Centro de salud _____

Nombre de la participante	Fecha	Firma
Nombre de la persona que llena el consentimiento	Fecha	Firma
Investigador principal	Fecha	Firma



Encuesta

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON

Facultad de Ciencias Medicas Departamento de Microbiología
Maestría de Microbiología Médica
Centros de Salud y Hospital Oscar Danilo Rosales

Frecuencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en mujeres en edad reproductiva.

Fecha: ____/____/2011

Ficha #: _____

Puesto Médico que refiere: _____

Nombre y Apellidos: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Celular: _____

Fecha de nacimiento: _____

Edad: _____

Procedencia: Urbano _____

Rural: _____

Estado civil: Cuál _____

Escolaridad: Primaria _____ Secundaria _____ Técnica _____

Universitaria _____ Otros _____

Historia Reproductiva

IVSA: _____

No de Embarazos. _____

Embarazo: Sí: _____ No: _____

Aborto _____

Historia sexual de las pacientes

Número de compañeros sexuales: _____ Uso de Condón: Sí ____ No _____

Ha padecido de infecciones de transmisión sexual:

Sí _____ No _____

Resultado del test de *Chlamydia*

Positivo: _____ Negativo: _____

Observaciones: _____

Suspensión tubo falcon (PBS): Sí _____ No _____

PCR : _____

Firma del encargado: _____

Procedimiento de Prueba inmunocromatográfica

Procesamiento la muestra:

Introducir el espéculo y revisar el aspecto físico del cérvix, con un hisopo de algodón limpiar el exceso de moco cervical y proceder a extraer la muestra cervical.

2) Tomar el aplicador de carbón proporcionado por el kit de *Chlamydia* Ag (Cypress Diagnostics) introducirlo un 1cm en el endocervix y extraer células del epitelio endocervical, rotando el aplicador suavemente por 15 a 20 segundos.

3) Dentro de un pequeño tubo de extracción debidamente etiquetado que es proporcionado por el kit de *Chlamydia*, agregar 6 gotas del reactivo de extracción A.

4) Extraer por 2 minutos a temperatura ambiente, moviendo gentilmente el hisopo en círculos contra las paredes del tubo de extracción.

5) Una vez pasaron los 2 minutos de extracción, agregar 6 gotas del reactivo B.

6) Presionar el hisopo contra las paredes del tubo de extracción procurando eliminar el mayor líquido posible de este, Descartar el hisopo según lo estipulado para el manejo de agentes infecciosos y colocarle un tapón al tubo de extracción.

8) Luego de seguir cuidadosamente las instrucciones para la extracción. Quitar la cubierta de aluminio que protege la prueba inmunocromatográfica y rotularlo debidamente.

9) Mover gentilmente el tubo de extracción y verter 3 gotas (aproximadamente 150ul) en el pocillo marcado con S de la prueba.

10) Esperar 10 minutos antes de leer la prueba. Una vez pasado el tiempo, observar la presencia o no de bandas de colores, dentro del pocillo marcado con T y C respectivamente.

11) Escribir el resultado de la prueba inmunocromatográfica en la hoja de datos clínicos de cada paciente.

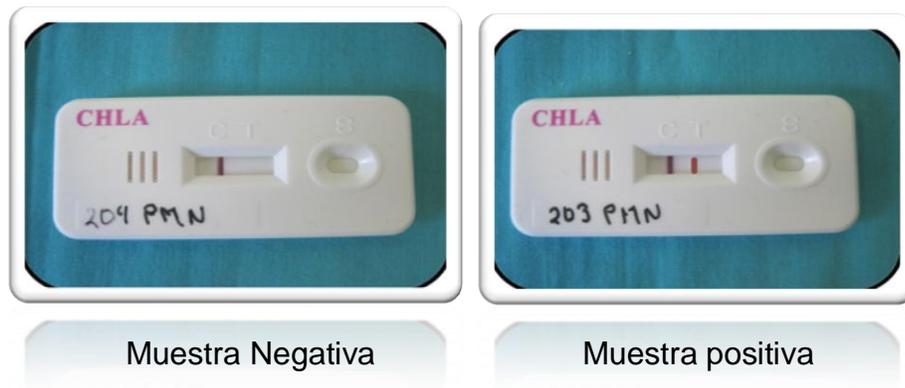
12) Entregar el resultado a la paciente.

Interpretación de resultados:

Los resultados tanto positivos como negativos dependerán de la cantidad de antígenos de *Chlamydia* recolectados; por lo que los resultados pueden ser visibles pasado 1 minuto. Sin embargo se deberán esperar 15 minutos para descartar un resultado negativo.

Interpretación positiva: se interpretara como paciente positivo para *Chlamydia*, aquella prueba donde las bandas T y C resulten coloreadas, el color de la línea T puede ser o no intenso será considerado positivo.

Interpretación negativa: Sera negativo si únicamente aparece coloreada la banda C y no la nada T.



*Departamento de Microbiología y Parasitología
Faculta de Ciencias Médicas, UNAN-León*



Resultado de *Chlamydia trachomatis*

Puesto medico: _____

Fecha: / /2011

Nombre: _____

Resultado:

Prueba inmunocromatografica para *Chlamydia trachomatis*: _____

Lic. Nadia Flores

Extracción de ADN para PCR: Método de BOOM'S y Col 1990

1. Agregar 900 ul de buffer L6 en un tubo eppendorf de 1.5ml.
2. Agregar 40 ul de cuarzo de silica.
3. Agregar 140 ul de la muestra cervical.
4. Mezclar todos los componentes con el vortex e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar por 15 seg a 13 000 rpm y extraer el sobrenadante por succión; procurando dejar el pellet de ácidos Nucleicos (NA)-silica.
6. Agregar 500 ul de buffer de lavado "L2", suspender el pellet y centrifugar por 15 seg a 13 000 rpm y extraer el sobrenadante por succión.
7. Repetir el paso 6.
8. Agregar 500 ul de etanol al 70% (vol-vol), suspender el pellet y centrifugar por 15seg a 13000 rpm y extraer el sobrenadante por succión.
9. Repetir el paso 8.
10. Agregar 500 ul de acetona, suspender el pellet y centrifugar por 15 a 13000 rpm y extraer el sobrenadante por succión.
11. Secar el pellet a 56⁰ C por 10 min en un bloque térmico, con tapa abierta.
12. Agregar 60 ul de buffer de elución (agua) y agitar vigorosamente con vortex e incubar por 56⁰ C por 10 min.
13. Centrifugar por 2 min a 13000 rpm.
14. Guardar el sobrenadante que contiene el ADN bacterial a -70⁰ C.

Nota: En cada uno de los lavados el pellet de silica debe estar completamente suspendido en la solución.

Protocolo de extracción de ADN método de QIAGEN

- 1) Colocar los reactivos a temperatura ambiente.
- 2) Colocar las Muestras a temperatura ambiente.
- 3) En un tubo eppendorf agregar 25 ul de protein kinasa + 180 ul de lisis buffer y 200 ul de muestra.
- 4) Incubar la muestra a 56 °C por 10 minutos.
- 5) Agregar 200 ul de etanol al 100 % de vortex y 1 spin por 15 segundos.
- 6) En una columna debidamente rotulada agregue 500 ul de la mezcla y centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto.
- 7) Descarte el tubo de colección y coloque uno nuevo.
- 8) Agregue 500 ul de buffer AW1 centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto.
- 9) Descarte el tubo de colección y coloque uno nuevo.
- 10) Agregue 500 ul de buffer AW2 y centrifugue a 14000 rpm por 3 minutos.
- 11) Coloque la columna en un tubo eppendorf y agregue 150 ul de buffer de elución (AE).
- 12) Deje reposar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 13) Centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto y guarde el ADN a -70 °C para su análisis posterior.

**Programación para el termociclador implementado por el Kit comercial
de amplificación de *Chlamydia trachomatis***

<i>procedimiento</i>	<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Tiempo</i>	<i># de ciclos</i>
Activación ampliTagGol	94	9 minutos	1
PCR Ciclos			
Desnaturalización	94	30 segundos	40
Hibridación	60	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	1
Temperatura final	10	10 segundos	∞

En la **figura No. 10** Se muestra el resultado de uno de los análisis realizados a un grupo de muestras, donde se puede visualizar los 2 productos de la prueba de PCR. Uno de 86pb siendo este el plásmido críptico y el segundo que es de 165pb gen Omp1. Estas bandas fueron encontradas en cuatro muestras ensayadas revelando la presencia de *Chlamydia trachomatis*.

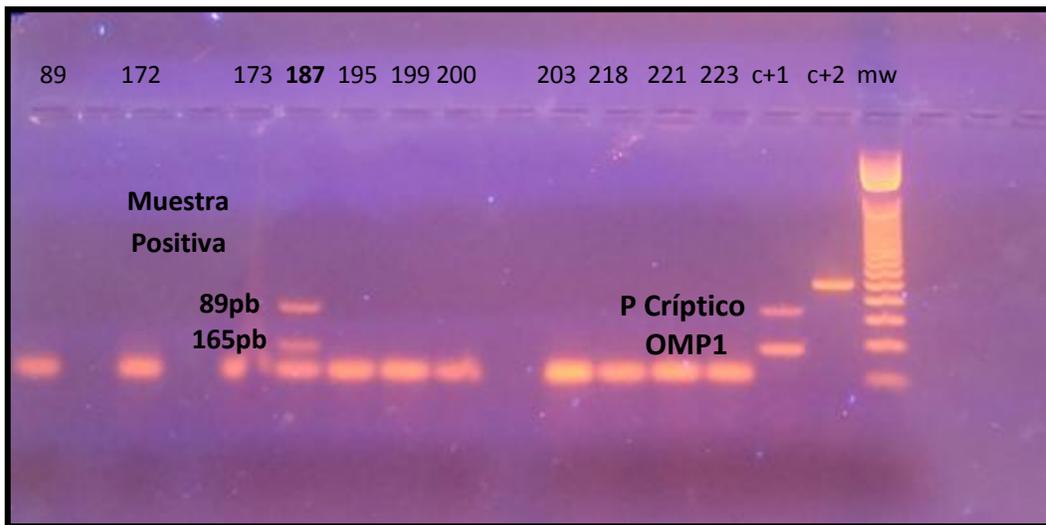
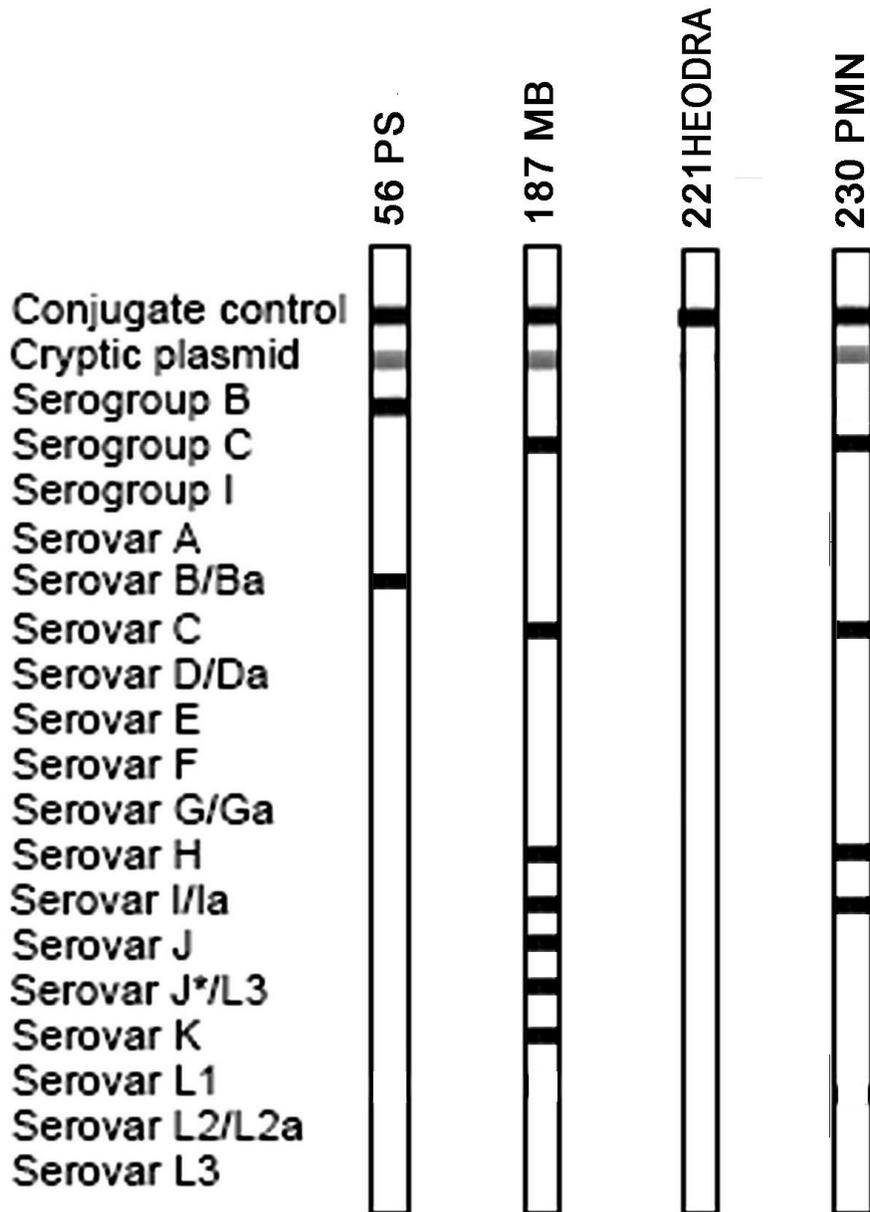


Figura No. 10. Análisis de PCR, mostrando una muestra positiva revelando los amplicones de 89pb y 165pb, los que nos muestran la presencia y positividad de *Chlamydia trachomatis* en dicha muestra.

Resultados de prueba de Caracterización de serotipos de *Chlamydia trachomatis*.



Lista de Abreviaturas

- **Ct:** *Chlamydia trachomatis*.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **EIP:** Enfermedad Inflamatoria pélvica.
- **FC:** Fijación del complemento.
- **MOMP:** Siglas en Inglés (Mayor outer membrane protein) Proteína mayor de membrana externa.
- **DVs:** Siglas en Inglés (variable domains) Dominios variables
- **COMC:** Siglas en Inglés (*Chlamydial* outer Membrane Complex) Complejo de Membrana Externa de *Chlamydia*.
- **CE:** Cuerpo Elemental.
- **CR;** Cuerpo Reticulado
- **IFD:** Inmunofluorescencia Directa.
- **LPS:** Lipopolisacaridos.
- **HEODRA:** Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales.
- **ICT:** Siglas en Inglés (Immunochromatographic test) Prueba Inmunocromatográfica.
- **PCR:** siglas en Inglés (Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la Polimerasa.

