http://www.biblioteca.fcm.unc.edu.ar/ rdu@fcm.unc.edu.ar

Prevalencia de chlamydia trachomatis en embarazadas asistidas en centros de salud municipales de la Ciudad de Córdoba

Marcela Marramá.

Tesis- Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2016.

Aprobada: 2016

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio https://rdu.unc.edu.ar/
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaria de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio http://oca.unc.edu.ar/

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional

Prevalencia de chlamydia trachomatis en embarazadas asistidas en centros de salud municipales de la Ciudad de Córdoba by Marcela Marramá is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

PREVALENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EN EMBARAZADAS ASISTIDAS EN CENTROS DE SALUD MUNICIPALES DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA.

MARCELA MARRAMÁ

MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

PREVALENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EN EMBARAZADAS ASISTIDAS EN CENTROS DE SALUD MUNICIPALES DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA.

MARCELA MARRAMÁ

TRIBUNAL DE TESIS

Dr. Eduardo Cuestas

Mgter. Beatriz Ciuffolini

Mgter. Andrea Mariana Aimino

DEDICATORIA

A mis padres, por tanto amor, por brindarme una infancia feliz y una familia unida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi esposo Claudio y a mis hijos, Julieta, Agustina e Ignacio, gracias por el apoyo diario, prometo reponer con creces el tiempo robado.

A mis hermanas y sobrinos por estar incondicionalmente, con ustedes a mi lado siempre todo es más fácil.

A mi directora de tesis, Dra. Cecilia Cuffini por su tiempo, objetividad, confianza y motivación, y por sobre todo por su infinita paciencia. Gracias inmensas.

A todo el Equipo de trabajo del Laboratorio de *Chlamydia trachomatis* y Papiloma Virus Humano. Instituto de Virología Dr. José María Vanella. Facultad de Cs Médicas. UNC.

A mis compañeros de trabajo, muy especialmente al Bioq. Fernando Venezuela y Bioq. Chavero Gabriela, por su tiempo, su apoyo y sobre todo por su amistad.

A mis amigas de la vida, gracias por los momentos compartidos, siempre son una bocanada de energía para seguir adelante.

Art. 23 – Ordenanza Rectoral 03/77

“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta tesis”

INDICE

	PÁGINA
INDICE	8
RESUMEN	9
SUMMARY	11
1.- INTRODUCCIÓN	13
2.- HIPÓTESIS	44
3.- OBJETIVOS	45
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	46
5.- RESULTADOS	53
6.- DISCUSIÓN	65
7.- CONCLUSIONES	70
8.- BIBLIOGRAFÍA	73
9.- ANEXOS	85

RESUMEN

Chlamydia trachomatis (C.trachomatis) produce una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes en el mundo. Esta bacteria se asocia a abortos, endometritis posterior al parto y ruptura prematura de membranas. Cuando la infección se transmite al recién nacido puede ocasionar bronquitis, neumonía, conjuntivitis y bajo peso.

Objetivo: Determinar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en mujeres que cursan el tercer trimestre de embarazo evaluando los factores de riesgo asociados, caracterizando a nivel molecular los genotipos presentes y analizando el costo/beneficio de la implementación del tamizaje de esta infección bacteriana.

Materiales: Se procesaron 279 muestras clínicas cervico-vaginales de mujeres (16 a 42 años) embarazadas (de 35-37 semanas de gestación), que concurrían al Laboratorio de la Dirección de Especialidades Médicas a realizarse el estudio de portación de *Streptococcus agalactiae*, entre septiembre y diciembre de 2013.

Métodos: La detección de *C. trachomatis* fue realizada por biología molecular aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR anidada (nested PCR) dirigidas a las secuencias genéticas que codifican para el plásmido críptico y la proteína mayor de membrana externa, respectivamente. La genotipificación se realizó por el análisis filogenético de las secuencias obtenidas de la PCR genérica y las secuencias patrones del GenBank.

Resultados: Se detectó *C. trachomatis* en 29 (10,4%) mujeres. La distribución por grupo etario fue: 24 (82,8%) menores de 25 años; 4 (13,8%) entre 26-35 años y 1 (3,4%) mayor de 35 años. Se evidenció asociación significativa entre la infección de *C. trachomatis* y las menores de 25 años (p=0,018, X2=4,2262: OR=2,7472 1,0133-7,4480); cabe destacar que el 98% de ellas recibían asignación universal por hijo. Los genotipos encontrados fueron: B, D, E y F; siendo este último el más frecuente. El costo de la implementación del tamizaje por biología molecular de *C.trachomatis* para las embarazadas; asistidas en centros de salud municipales de la Ciudad de Córdoba, corresponde a la cuarta parte del costo anual ocasionado sólo por conjuntivitis y neumonías de los recién nacidos infectados.

Discusión: Este es el primer reporte de prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en mujeres embarazadas (10,4%) en nuestra región. La misma resultó ser superior a la informada en USA y Australia; 3,5% y 6,4% respectivamente. En estos países se han implementado rigurosos programas de control de esta infección. Nuestro trabajo revela que las pacientes embarazadas menores de 25 años y con bajo nivel socioeconómico son un grupo de alto riesgo para la infección por *C.trachomatis.*

Conclusiones: La detección de *C.trachomatis* y el tratamiento específico de las embarazadas y sus recién nacidos produciría una mejor calidad de vida de ellos y un descenso del costo de las complicaciones producidas.

Palabras Claves: *Chlamydia trachomatis,* embarazadas, genotipos, costo/beneficio, tamizaje.

SUMMARY

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) causes one of the most common sexually transmitted infections (STIs) in the world. This bacterium is associated with abortions, endometritis postpartum, and premature rupture of membranes. When the infection is transmitted to newborns, it may cause bronchitis, pneumonia, conjunctivitis and low weight.

Objective: Determinate the prevalence of *C. trachomatis* infection in women on their third trimester of pregnancy, evaluating associated risk factors, characterizing the genotypes at the molecular level, analyzing the cost / benefit rate of implementing the screening of the bacterial infection.

Materials: In 2013, between September and December, two hundred and seventy nine cervico-vaginal clinical women samples were taken at Laboratorio de la Dirección de Especialidades Médicas. The pregnancy women had between 35 and 37 gestation weeks and about 16 up to 42 years old.

Methods: Detection of *C. trachomatis* was performed by molecular biology applying the polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR (nested PCR) directed to genetic sequences encoding the cryptic plasmid and most outer membrane protein, respectively. Genotyping was performed by phylogenetic analysis resulting from the sequences obtained of generic PCR and patterns GenBank.

Results: *C. trachomatis* was detected in 29 (10.4%) women. The distribution by age group was 24 (82.8%) under age 25; 4 (13.8%) between 26-35 years and 1 (3.4%) over 35 years. Significant association was observed between the *C. trachomatis* infection and patients under 25 years ($p = 0.018$, $X2 = 4.2262$: 2.7472 OR = 1.0133 to 7.4480). The 98% of them received universal child allowance. The genotypes that were found are: B, D, E and F, being F, the most common genotype value found.

The cost of implementing screening for molecular biology *C.trachomatis* for pregnant women, assisted in municipal health centers of the City of Córdoba, corresponds to a quarter of the annual cost caused only by conjunctivitis and pneumonia of newborns infected.

Discussion: In our region, this is the first report on the prevalence of *C. trachomatis* infection in pregnant women (10.4%). It was superior to USA`s report and Australia`s report; 3.5% and 6.4% respectively. Those countries have been implemented rigorous programs to control this infection. Our work shows that pregnant patients under 25 years with low socioeconomic status are a group at high risk for infection with *C. trachomatis.*

Conclusions: The detection of *C. trachomatis* and specific treatment of pregnant women and their newborns would produce a better quality of life for them and a decrease in the cost of its complications.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, pregnant women, genotypes, cost / benefit rate, screening.

1.- INTRODUCCION

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un importante problema de salud pública en todo el mundo, según estimaciones de la Organización Mundial para la Salud (OMS) se producen más de 448 millones de nuevos casos curables por año. Los costos socioeconómicos de estas ITS y de sus complicaciones son considerables, puesto que figuran entre las diez razones principales de las visitas a centros de atención de salud en la mayoría de los países en desarrollo y consumen importantes recursos tanto de los presupuestos sanitarios nacionales como de los ingresos familiares. (85)La atención de las secuelas supone una parte importante de los costos de atención terciaria, por ej.: servicios de atención de la morbilidad perinatal, ceguera infantil, enfermedades pulmonares en niños, dolor pélvico crónico en mujeres y de investigación de la infertilidad en ambos integrantes de la pareja. Los costos sociales incluyen conflictos entre parejas sexuales y violencia doméstica. (85)

Chlamydia trachomatis (C. trachomatis) es una bacteria que produce una de las ITS más frecuentes en el mundo, estimándose alrededor de 100 millones de casos nuevos cada año (67). *C. trachomatis* pertenece a la familia *Chlamydiacea*, son bacterias Gram negativas, intracelulares, que causan un amplio rango de enfermedades en aves y mamíferos donde está incluido el humano. Constituyen uno de los grupos de microorganismos más difundidos y prevalentes como causa de infecciones diversas, particularmente del tracto genital, respiratorio y ocular (64). Son microorganismos que aunque son capaces de sintetizar compuestos de alta energía, como ATP, esenciales para el metabolismo y la respiración, actúan como parásitos intracelulares y utilizan células vivas para su desarrollo (87).

En la actualidad, la especie *C. trachomatis* está comprendida en el género *Chlamydia*, junto a 8 especies clamidiales: *C. muridarum, C. suis, C. psittaci, C. pecorum, C. pneumoniae, C. abortus, C. felis y C. caviae*. De acuerdo a las diferencias moleculares del gen *ompA* de *C. trachomatis*, se divide en 18 genotipos que son responsables de las distintas patologías (41,60)

Biodiversidad y evolución taxonómica de la especie *C. trachomatis*

C. trachomatis, como se mencionó anteriormente, pertenece a la familia *Chlamydiaceae*. Inicialmente se la clasificó en tres biotipos: el biotipo de la neumonía murina (cepa MoPn), hoy separado como especie diferente (*C. muridarum*) y los biotipos LGV (linfogranuloma venéreo) y TRIC (tracoma, conjuntivitis de inclusión) exclusivamente en humanos. Las características típicas de *C. trachomatis* dentro del género *Chlamydia* son la síntesis y acumulación de glucógeno en las inclusiones durante el ciclo de desarrollo y la sensibilidad a sulfamidas. (40)

Clasificación genotípica de *C. trachomatis*

En la década de 1980, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos contra los epitopes variables de la proteína principal de la membrana externa (MOMP), los biotipos LGV y TRIC fueron separados en 18 serotipos a los que se denominó con letras (79,114). Posteriormente, en la década de 1990 se estableció la clasificación en genotipos que concuerda con los serotipos previamente establecidos. Esta clasificación se basa en la diversidad de la secuencia del gen *ompA* que codifica la MOMP. La determinación del genotipo se puede realizar por secuenciación o por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior análisis del tamaño de los fragmentos obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción (RFLP) (61). *C. trachomatis* se ha clasificado en 18 genotipos: A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3. Esta clasificación está basada en el análisis del gen que codifica para la MOMP. (87). La tabla 1 muestra la clasificación de *C. trachomatis* en biotipos/serotipos/genotipos, y la patología asociada a cada uno de ellos.

Tabla 1: Clasificación de *C. trachomatis* en biotipos/serotipos/genotipos y la patología asociada.

BIOTIPOS/SEROTIPOS GENOTIPOS	**PATOLOGIAS ASOCIADAS**
A, B, Ba y C	**Tracoma**
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J y K	**Conjuntivitis de inclusión (adultos y neonatos), infecciones de genitales (uretritis no gonocóccica, epididimitis, cervicitis, salpingitis) y neumonía neonatal**
L1, L2, L2a y L3	**Linfogranuloma venéreo**

Fuente: Modificado de Ostos Ortiz y col. (87).

Ciclo de desarrollo

C. trachomatis, al igual que todas las especies de clamidias, tiene un ciclo vital bifásico que incluye una forma infectiva, cuerpo elemental (CE) y una forma metabólicamente activa, cuerpo reticular (CR) cuyo único reservorio es la especie humana. (70,87,102)

Los CE son estructuras redondeadas diminutas, infecciosas, rígidas, resistentes a la ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas de la capa externa de la membrana; se liberan cuando la célula hospedera infectada se lisa. Tienen un tamaño de 200 a 400 nm y son electrodensos al microscopio electrónico. Contienen RNA y DNA en relación 1:1. No tienen actividad metabólica y no se pueden replicar.

Los CR en cambio, son frágiles, polimórficos y resultan de la diferenciación de los CE al ser fagocitados. Tienen aspecto granular al microscopio electrónico y mayor tamaño, de 500 a 800 nm. Su relación RNA: DNA es 3:1. No son infecciosos, tienen actividad metabólica y son capaces de replicarse.

Los nombres de cuerpo elemental y cuerpo reticulado asignados a estas dos formas polares están relacionados con el aspecto que presentan cuando se los visualiza con microscopía electrónica (Figura 1).

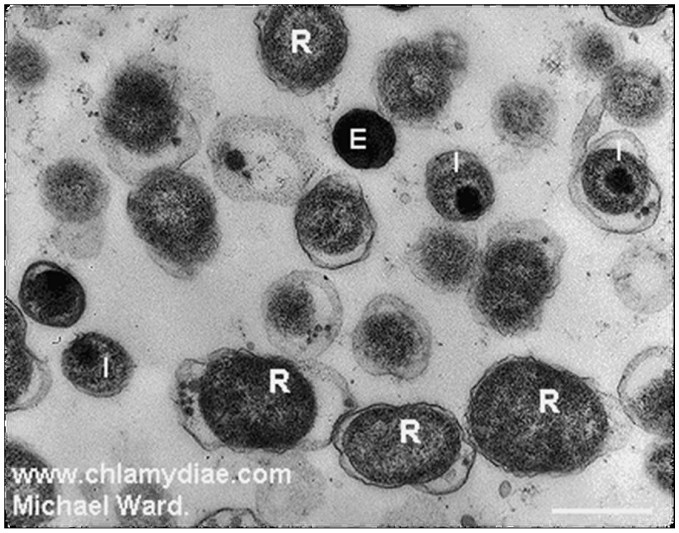


Figura 1. Contenido de una inclusión madura *de C. trachomatis*, 40 horas después de la infección de una célula HeLa 229.La imagen muestra los cuerpos reticulares (R) grandes y frágiles, los cuerpos intermedios (I) más pequeños y los cuerpos elementales (E) ligeramente menores. La barra representa 1 micrón. Microfotografía electrónica de Michael Ward, extraída de www.chlamydiae.com.

Existe clásicamente un proceso de adherencia del cuerpo elemental (CE) o infectante, endocitosis , diferenciación del CE en CR, replicación del CR, formación del cuerpo de inclusión (CI), diferenciación inversa del CR a CE, lisis de la membrana del CI, exocitosis de los CE o bien lisis de la membrana citoplasmática con liberación de los CE. Luego, cada uno de los mismos puede reiniciar el ciclo descrito en células sensibles. En la figura 2 se representa el ciclo completo, que tiene una duración de 72 hs. (87,112)

Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*.

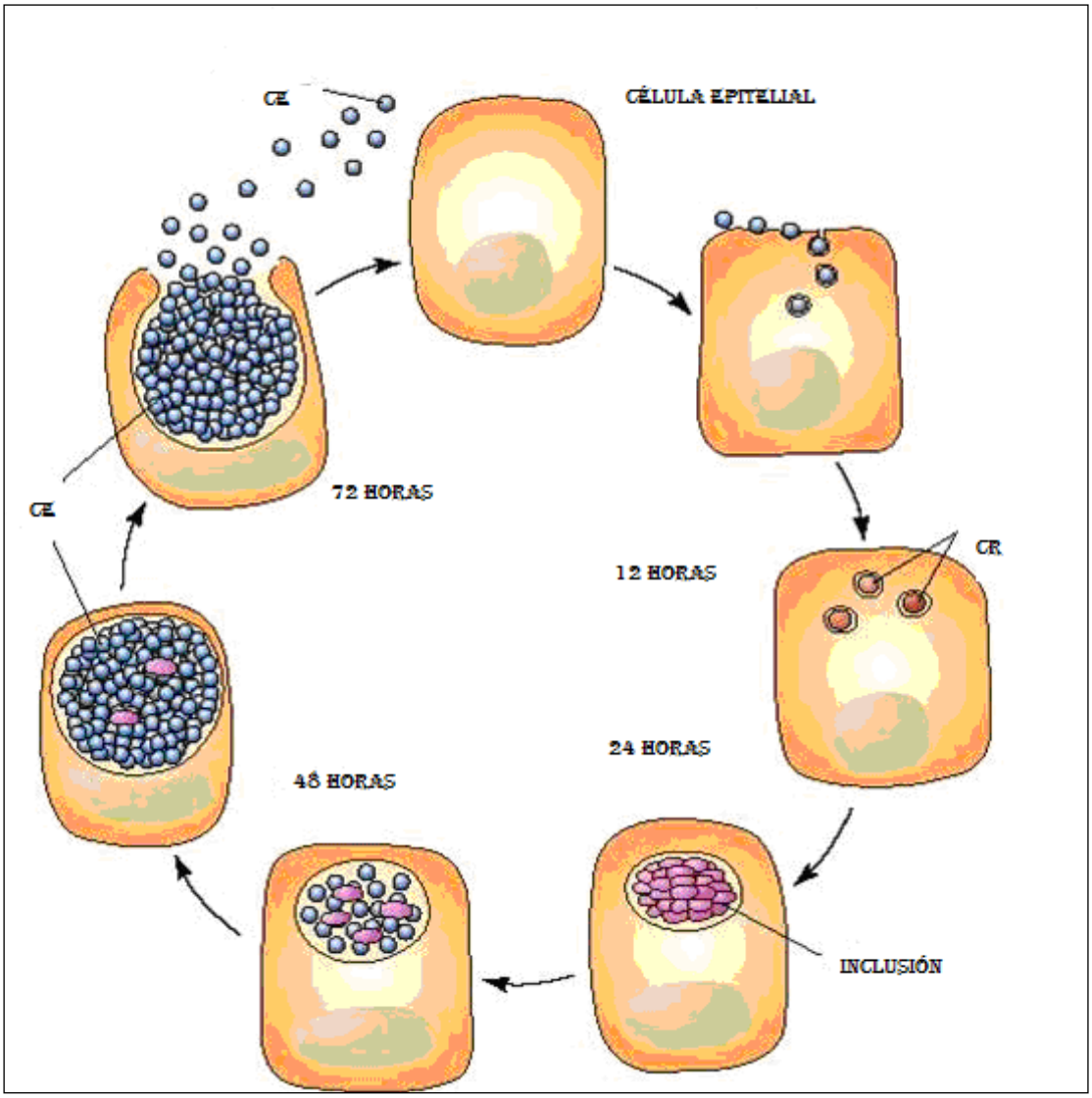


Figura Nº2: Ciclo de Vida de *Chlamydia* (Modificado de California STD/HIV Prevention Training Center (20)

Cuerpos persistentes

Por determinadas condiciones ambientales, o dependiendo del estado del agente infeccioso o de la célula hospedadora, el ciclo se puede detener, permanente o temporalmente, en la fase de CR, que se denomina ahora cuerpo persistente. (112)

Estos cuerpos persistentes son cuerpos reticulares más grandes que, por el menor número de porinas, se dividen lentamente. Este estado críptico conlleva la reducción en la expresión de antígenos, cambios de la morfología y la pérdida de la infectividad. Se piensa que estas formas podrían tener un papel importante en la patogénesis de la infección crónica. (48)

Esta fase puede ser temporal y luego continuarse el ciclo, como antes se ha comentado. Los cuerpos persistentes podrían ser una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico, reducir una virulencia innecesaria o mantenerse viable en condiciones adversas (112)

Componentes estructurales

Las clamidias poseen una membrana interna y otra externa (Figura 3), la cual se asemeja a la pared celular de las bacterias Gram negativas, ya que carece de ácido murámico. La membrana externa está constituida por: el Lipopolisacárido (LPS), específico de género; las proteínas de superficie, codificadas por familias de genes Omp, las adhesinas (n-octil β-D-glucopiranósido), y el heparán sulfato, involucrado en la unión a la célula huésped.(64,87)

Estructura de la membrana

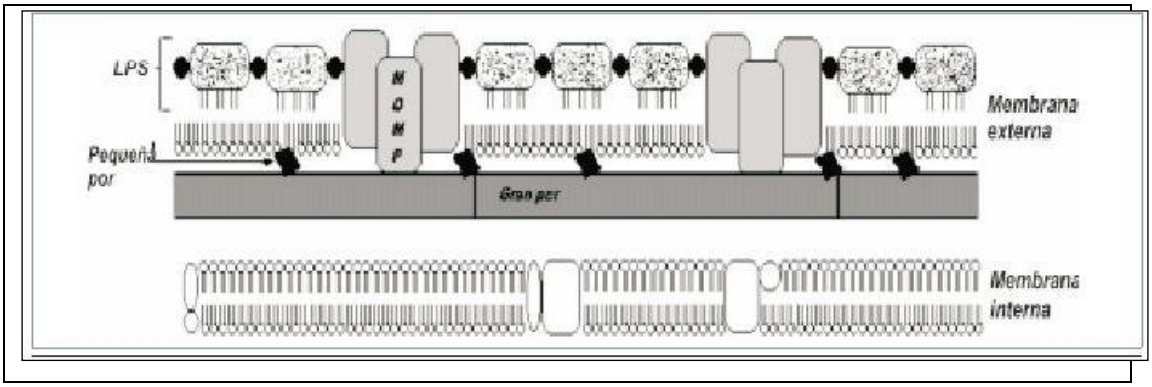


Figura 3: Fuente Modificado de Ostos Ortiz y col. (87).

Proteínas

Las proteínas codificadas por la familia de genes omp, son proteínas extracelulares ricas en cisteína que se encuentran en la membrana, están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los CE para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Los CR carecen de ellas por lo que son mas frágiles en comparación con los CE (87)

Las proteínas de superficie de las clamidias ricas en cisteína incluyen:

- **MOMP** (proteína mayor de membrana externa), expresada en la envoltura del CE, pesa 40 Kda, constituye casi el 60% del total de las proteínas de la membrana externa, está codificada por el gen omp 1; muestra diferentes funciones, entre las que se encuentran la integridad estructural de la membrana, la acción de porina (con límite de exclusión de 850 a 2,250 Da) y la adherencia electrostática. Además, esta proteína es inmunogénica, ya que presenta epitopes antigénicos de superficie (específicos de especie), por lo que se ha considerado como una proteína útil para el desarrollo de vacunas.(64,87)
- **Proteína de 60Kda**: esta proteína está codificada por el gen omp2, se encuentra en el espacio periplásmico, dando a las clamidias una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Los CR no contienen esta proteína (11,109). La proteína de 60 kDa ha sido considerada como el sitio de unión por el cual se une el heparán sulfato, sintetizado por el microorganismo y que está involucrado en la unión a la célula huésped (64)
- **Proteína de 12-15 Kda**: codificada por el gen omp3, es una lipoproteína hidrofílica. Los CR no contienen esta proteína (87)

Antígenos

- **LPS:** es un antígeno presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Su presencia se ha demostrado mediante fijación del complemento, inmunofluorescencia y "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA) y es una causa importante de las reacciones cruzadas que, con frecuencia, se observan en la serología de *Chlamydiaceae* .(112)

- **MOMP:** Uno de los antígenos mejor caracterizados en las especies del género. Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies. Tiene cuatro dominios variables (DVs) que son flanqueados e interespaciados por cinco dominios constantes. Tres de los cuatro DV (DV1, DV2 y DV4) se encuentran en la superficie y contienen epitopes antigénicos que son sitio blanco para la serotipificación. (87,112)

Diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*

La búsqueda de *C. trachomatis* debe realizarse en todos los casos de uretritis, de cervicitis con o sin presencia de uretritis, de "ophtalmia neonatorum", de conjuntivitis de inclusión y ante la sospecha de linfogranuloma venéreo o tracoma. También se recomienda la investigación de *C. trachomatis* en pacientes con epididimitis, prostatitis, proctitis o infertilidad obstructiva, tanto masculina como femenina.

La obtención de la muestra es el factor más importante para el diagnóstico de este microorganismo, más allá de la técnica elegida. Dado que *C. trachomatis* infecta específicamente a las células columnares y la infección es intracelular, las muestras deben ser obtenidas por raspado del sitio apropiado, asegurando un alto contenido de células, luego de haber retirado cuidadosamente las secreciones mucopurulentas que cubren la mucosa.

Las muestras de la primera fracción de orina resultan de utilidad por ser menos invasivas y más apropiadas para el tamizaje en poblaciones asintomáticas.

La recolección de la muestra deberá realizarse según el manual de procedimientos del laboratorio, en el medio apropiado para la técnica a utilizar y ser conservada de acuerdo al protocolo establecido.

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *C. trachomatis* puede realizarse por:

a) Aislamiento en cultivos celulares. Originariamente, el aislamiento de *C. trachomatis* se realizó por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollo embrionados de 6 a 8 días de edad (117). Posteriormente, se descubrieron líneas de cultivos celulares susceptibles, de las cuales las más utilizadas son McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa 229 (carcinoma humano), BHK-21 (células de ovario de hámster), BGMK y LLCMK2 entre otras.

Las muestras indicadas para la realización del aislamiento de la bacteria en cultivos celulares son hisopados uretrales, cervicales, oculares, rectales y vaginales, en los casos de niñas prepúberes y de abuso sexual (23)

La muestra debe colocarse en el medio de transporte adecuado y ser conservada en refrigerador, sin congelar, para ser procesada dentro de las primeras 24 horas. En caso contrario deberá ser conservada a -70ºC hasta su procesamiento.

Las líneas celulares se tratan con irradiación, dextran o cicloheximida para aumentar la sensibilidad del aislamiento. Antes de inocular la muestra se puede sonificar para romper las células huésped y permitir que los cuerpos elementales se liberen. (8)

Luego de 48-72 horas de la infección se puede visualizar la presencia de típicas inclusiones mediante el uso de distintas tinciones. La tinción de Lugol modificada puede utilizarse para revelar el acumulo de glucógeno en las inclusiones, típico de *C. trachomatis*. También puede emplearse anticuerpos específicos, marcados con fluoresceína, que se ligan al LPS o a la proteína de membrana MOMP.

El cultivo en líneas celulares presenta una especificidad del 100 % y una sensibilidad que varía entre el 70 y 85 %, hecho que ha quedado demostrado con la disponibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Entre las ventajas que ofrece se pueden mencionar la disponibilidad de cepas viables para la realización de estudios de sensibilidad a antimicrobianos y el estudio de la interacción del microorganismo con la célula hospedadora. Además, en muchos países es la única metodología aceptada cuando existen implicancias legales, como en casos de abusos sexuales.

Las limitaciones del cultivo celular se relacionan con su relativa baja sensibilidad, la exigente conservación de la muestra, el costo y alto nivel de entrenamiento del personal, que junto con la demora de 3 a 7 días en obtener los resultados, reducen su práctica a centros especializados.

El aislamiento en cultivos celulares, por su elevada especificidad, ha sido la técnica de referencia para el diagnóstico de *C. trachomatis*. En la actualidad, a partir de los nuevos parámetros de sensibilidad aportados por las técnicas de amplificación génica, se propone la creación de un gold standard "expandido" para evaluar los nuevos procedimientos de diagnóstico, especialmente las técnicas moleculares.

b) Inmunofluorescencia directa. La inmunofluorescencia con antisueros policlonales fue utilizada desde la década de 1960 para la detección de antígenos de *Chlamydia* spp., tanto en material clínico como en cultivo celular. Sin embargo, el gran impacto en el diagnóstico de *C. trachomatis* llegó en la década de 1980, con el advenimiento de la tecnología de anticuerpos monoclonales. El primer tipo de metodología en desarrollarse fue la inmunofluorescencia directa (IFD) y permitió que un mayor número de laboratorios accedan al diagnóstico de este microorganismo.

La IFD se puede realizar sobre los extendidos de las mismas muestras destinadas al cultivo o el extendido del hisopado cervical. Los anticuerpos monoclonales, conjugados con isotiocianato de fluoresceína, van dirigidos contra el LPS de membrana o contra la MOMP de *C. trachomatis*.

Con esta metodología pueden detectarse en las muestras clínicas tanto células infectadas con inclusiones características como cuerpos elementales aislados.

La sensibilidad de la IFD, en comparación con el cultivo celular varía entre 80-90 %, y la especificidad entre 98-99 % (68). La alta especificidad de la IFD se atribuye a su capacidad de visualizar la morfología y coloración de las características inclusiones clamidiales.

Es la única prueba de diagnóstico que permite la evaluación simultánea de la calidad de la muestra en cuanto a número y tipo de células obtenidas. Es una técnica rápida y simple, pero el examen microscópico y la interpretación de los resultados requieren un observador experimentado.

c) ELISA "enzyme linked immunosorbant assay". Las técnicas de ELISA aparecieron a fines de los años 80 y se basan en la detección del LPS clamidial, antígeno común a todas las especies de clamidias que infectan humanos y más soluble que la MOMP.

Los primeros análisis inmunoenzimáticos (EIA) se caracterizaron por su baja especificidad dando reacciones cruzadas con bacterias Gram negativas. A partir de 1990 los EIA incluyen un anticuerpo bloqueador para confirmar los resultados positivos, mejorando así la especificidad. (76)

Estas pruebas presentan una sensibilidad y especificidad menor a la del cultivo y la IFD, siendo su uso práctico en poblaciones de alta prevalencia pero carecen de suficiente especificidad en poblaciones de bajo riesgo.

Los EIA rápidos cualitativos, son muy simples de efectuar, requieren de 20 a 30 minutos para su lectura y han sido diseñados para ser usados por el médico en su consultorio, con el objeto de iniciar un tratamiento antimicrobiano de inmediato. En general estas pruebas rápidas son significativamente menos sensibles y específicas que sus homólogos cuantitativos. (98)

Las pruebas rápidas no deben ser utilizadas en una población de baja prevalencia o para los individuos asintomáticos debido a la posibilidad de resultados falsos positivos. Los resultados de una prueba rápida se deben considerar siempre presuntivos y, en caso positivo, debe confirmarse mediante una prueba de laboratorio. (68)

d) Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. El desarrollo de los ensayos basados en la tecnología de amplificación de ácido nucleico (TAAN) ha sido el avance más importante en el campo del diagnóstico de clamidia desde que se sustituyeron la utilización del saco vitelino por las técnicas de cultivo celular para el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas (68) . Estas técnicas son al menos 20-30 % más sensibles (capacidad de detectar una única copia del gen) y casi 100 % específicas. (103)

Existen tres técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos que han sido empleadas para el diagnóstico de *C. trachomatis*: la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa) y la AMT (Amplificación Mediada por Transcripción). La PCR y la LCR amplifican ADN, mientras que AMT amplifica ARN. La PCR es la técnica más usada por ser fácil de implantar en los laboratorios e incluso está disponible en forma comercial. Su blanco molecular es por lo general el gen que codifica para la MOMP o el plásmido críptico, éste último se encuentra entre cuatro y diez copias por célula. Sin embargo debe considerarse que, si bien han sido descriptas ocasionalmente, existen cepas que carecen del plásmido (75).

La primera prueba de PCR para la detección de *C. trachomatis* aprobada por la FDA ("Food and Drug Administration") en los Estados Unidos de Norteamérica fue desarrollado por Roche Diagnostics, Basel Suiza (Roche-Amplicor). Desde 1993, Amplicor PCR ha sido utilizada para muestras urogenitales y orina, con una sensibilidad de 90 % y una especificidad de 99-100 %.(86)

Las muestras sobre las que pueden realizarse las TAANs son las descriptas anteriormente, e inclusive, otras que en general no son resueltas por las técnicas anteriores, como material de biopsias o muestras de semen; y muestras poco invasivas como el primer chorro de orina. Debido a su gran sensibilidad y alta especificidad las técnicas de amplificación ofrecen una tasa de detección alta en individuos sintomáticos y adecuada en asintomáticos, permitiendo incluso utilizar muestras de orina con mejores resultados que otros procedimientos, siendo esto una ventaja en estudios de tamizaje a gran escala.

La mayor sensibilidad de estos ensayos implica más riegos de contaminación accidental con los segmentos amplificados. El problema de la contaminación, junto con el costo y la necesidad de áreas específicamente destinadas y personal de laboratorio cuidadosamente capacitado, son limitaciones que se deben tener en cuenta en el laboratorio clínico. En la actualidad, la PCR a tiempo real parecería lentamente ir reemplazando la PCR convencional, debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación. En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior.

Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. (31)Según la revisión de Black, el número de microorganismos mínimo que puede detectar por muestra cada técnica es entre 1 y 10 para la amplificación de ADN, entre 5 y 100 para el cultivo, entre 10 y 500 para la IFD, entre 500 y 10.000 para la hidridización con sondas y de 5.000 a 100.000 para los EIAs. (12)(Figura 4)

e) Serología. Las pruebas serológicas no son de utilidad en el diagnóstico de infecciones de las vías genitales causadas por *C. trachomatis*, ya que estas no producen títulos de anticuerpos elevados. Sólo se utiliza en el diagnóstico de los casos de linfogranuloma venéreo. Las técnicas más efectivas son la micro-inmunofluorescencia (MIF) y la fijación de complemento, cuidadosamente estandarizadas. La MIF es de gran utilidad en las infecciones por *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. La detección de la presencia de IgM específica es la técnica de elección para el diagnóstico de la neumonía del recién nacido (12)

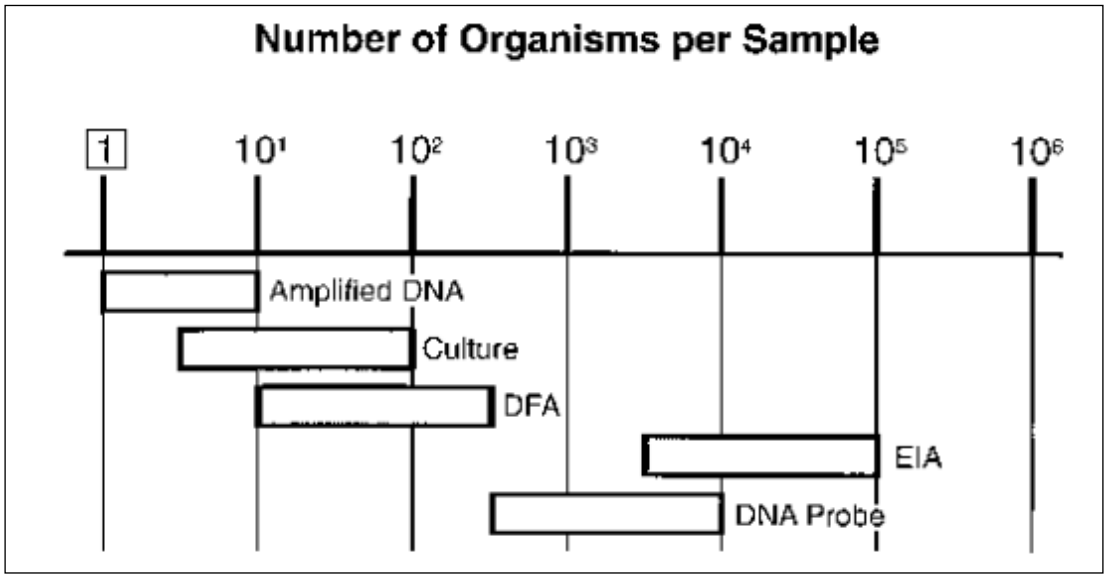


Figura 4: Sensibilidad analítica de las distintas metodologías diagnósticas (Black, 1997). (12)

Respuesta inmunológica causada por *C. trachomatis*

La infección por *C. trachomatis*, tanto en los modelos animales como en el humano, induce una respuesta específica de anticuerpos. Los dos componentes más importantes de *C. trachomatis*, que inducen la aparición inicial de la respuesta inmunológica humoral, son el LPS y la MOMP. Ambas sustancias provocan la aparición de anticuerpos neutralizantes, de los cuales, unos bloquearán el efecto tóxico del LPS, y otros, la adhesión de la bacteria a su célula huésped (anticuerpos anti MOMP). Debido a las características estructurales del LPS, el cual consiste de un lípido A, región central constituida por heterooligosacáridos (denominada "core") y un antígeno O (unidades oligosacarídicas), lo hacen ser un antígeno tóxico y timo independiente. Es tóxico, porque induce la producción de citocinas proinflamatorias como Interleuquina I y Factor Necrótico Tumoral, las cuales en grandes cantidades producen caquexia en el individuo; y es timo independiente, porque puede estimular directamente a los linfocitos B, induciendo su diferenciación y producción de anticuerpos, esto debido principalmente a las unidades repetitivas de oligosacáridos, que presenta el antígeno O. En el caso de la MOMP, los antisueros y los anticuerpos monoclonales obtenidos de la inmunización de animales, han demostrado que existen diferentes dominios antigénicos en esta proteína, lo que ha generado que estos anticuerpos tengan una gran utilidad, tanto en el diagnóstico como en la serotipificación, ya que éstos han identificado 18 serovariedades diferentes de *C. trachomatis*, que han sido clasificadas con letras de la A-L, y los cuales están asociados a los diversos padecimientos clínicos que produce este microorganismo (Tabla 1). Además, se ha demostrado que los anticuerpos anti MOMP neutralizan la infección por *C. trachomatis*, tanto en cultivo celular, como en los modelos animales. Sin embargo, cabe señalar que los genes que codifican para la proteína MOMP muestran un gran polimorfismo alélico que, al parecer, ocurre frecuentemente debido a las mutaciones puntuales y/o por eventos recombinantes. Este tipo de polimorfismo puede representar un mecanismo de evasión por parte de la bacteria a la respuesta inmune humoral, ya que el cambio de un solo aminoácido en la MOMP puede evadir la acción de los anticuerpos neutralizantes, lo que tiene implicancias importantes para el desarrollo de vacunas (64)

Tratamiento de la infección genital por *C. trachomatis*

El tratamiento adecuado de las personas infectadas por *C. trachomatis* impide el avance de la infección y la transmisión de la enfermedad. La posibilidad de reinfección se puede prevenir mediante el tratamiento de todas las parejas sexuales. Las demoras en recibir tratamiento han sido asociadas con complicaciones serias, como enfermedad inflamatoria pélvica (EPI) (49).

El CDC recomienda 2 g de azitromicina por vía oral en una dosis única, o 100 mg de doxiciclina por vía oral dos veces al día durante siete días, para la infección genitourinaria por *C. trachomatis*. Regímenes alternativos incluyen eritromicina 500 mg por vía oral cuatro veces al día, levofloxacina 500 mg por vía oral una vez al día durante 7 días o 300 mg por vía oral de ofloxacina durante siete días. (24)

Estudios comparativos de tratamientos con azitromicina y doxicilina, han demostrado que ambos fueron igualmente eficaces, con tasas de curación de 97 y 98 % respectivamente (62). La azitromicina tiene la ventaja de permitir un mejor cumplimiento del tratamiento debido a la aplicación de una única dosis. La eritromicina puede ser menos eficaz que la azitromicina o doxiciclina, a causa de la frecuente aparición de efectos secundarios gastrointestinales, que pueden llevar al incumplimiento. Levofloxacina y ofloxacina son alternativas de tratamiento eficaces pero son más caras y no ofrecen ninguna ventaja en el régimen de dosificación.
Los pacientes bajo tratamiento deben abstenerse de tener relaciones sexuales por siete días después del inicio del tratamiento y su pareja debe ser tratada al mismo tiempo, con el fin de prevenir la reinfección.

En mujeres embarazadas la levofloxacina, ofloxacina y doxiciclina están contraindicadas. Por lo tanto, se recomienda la azitromicina 2 g por vía oral en una sola dosis o amoxicilina 500 mg por vía oral tres veces al día. Tres semanas después de la finalización del tratamiento las pacientes embarazadas deben realizarse pruebas de laboratorio para confirmar la curación. Si el riesgo de reinfección es alto, el esquema debe repetirse durante todo el embarazo. (24)

Situación epidemiológica de la infección por *C. trachomatis*

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año se producen 498,9 millones de casos nuevos de infecciones transmisibles sexualmente causadas por *Trichomonas vaginalis* (276,4 millones), *Neisseria gonorrhoeae* (106,1 millones) y *Treponema pallidum* (10,6 millones), principalmente en hombres y mujeres de edades comprendidas entre los 15 y los 49 años. La mayor proporción se observa en la región del Pacífico Occidental con 128,2 millones de casos, seguida por la región de las Américas con 125,7 millones de casos, y por la región de África, 92,6 millones. *C. trachomatis* produce una de las ITS más frecuentes en el mundo, estimándose alrededor de 100 millones de casos nuevos cada año. (116)

La tasa de infecciones por *C. trachomatis* en la mayoría de las poblaciones es muy variable, ubicándose en rangos desde 1 al 40% (80). Según datos de la OMS la prevalencia en Estados Unidos es del 3 al 11%, en Europa del 2 al 9% y en América Latina del 6 al 40%. Este rango tan amplio de prevalencia se debe principalmente al tipo de estudio, la metodología empleada y la población analizada (por ej.: sintomática y asintomática), y si ésta se encuentra asociada con factores de riesgo conocidos: promiscuidad, género, edad, condición socioeconómica. (53)

Situación epidemiológica en Estados Unidos de Norteamérica

En Estados Unidos de Norteamérica, la infección por *C. trachomatis* es la infección de transmisión sexual más frecuente. En base a las estimaciones de las encuestas nacionales realizadas entre 1999-2008, la prevalencia de infección por *C. trachomatis* fue 6,8 % en las mujeres de 14-19 años sexualmente activas. (27)

En el año 2012 fueron reportados un total de 1.422.976 casos de infecciones por *C. trachomatis* a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en los 50 estados y el Distrito de Columbia. Este recuento corresponde a una tasa de 456,7 casos por cada 100.000 habitantes, lo que supone un incremento del 0,7 % con respecto al índice de 453,4 en el año 2011. Durante el período 1992-2012, la tasa de infección por *C. trachomatis* aumentó de 182,3 a 456,7 casos por cada 100.000 habitantes. El aumento de las infecciones por *C. trachomatis* reportadas en los últimos 20 años refleja la expansión de los programas de tamizaje, el uso de pruebas de

diagnóstico cada vez más sensibles, un mayor énfasis en la notificación de casos, y las mejoras en los sistemas de información utilizados para la presentación de informes (25,26)

En el mismo año 2012, las tasas de infección por *C. trachomatis* reportadas por cada estado varió entre 233,0 casos por cada 100.000 habitantes en New Hampshire hasta 774,0 casos en Mississippi. Durante el período 1995-2011, las tasas de infección por *C. trachomatis* aumentaron cada año (Figura 5). En el 2012, la tasa global entre las mujeres (643,3 casos por 100.000 mujeres) fue similar a la reportada en el año 2011 (643,4 casos por cada 100.000 mujeres). Este es el primer año, desde la presentación de informes a nivel nacional, que no se registró un aumento.

Entre los hombres, el valor aumentó durante los años 2011-2012 de 254,4 a 262,6 casos por 100.000 hombres. Como en años anteriores, la tasa de casos reportados entre las mujeres fue alrededor de dos veces la tasa entre los hombres (Figura 6). Estas cifras menores entre los hombres sugieren que muchas de las parejas sexuales de las mujeres con infección por *C. trachomatis* no reciben un diagnóstico adecuado o no denuncian la infección. Los costos, en ese país, alcanzan los 2,4 billones de dólares y son atribuidos al tratamiento de las secuelas en la mujer, a menudo irreversibles, como son la enfermedad inflamatoria pélvica, los embarazos ectópicos y la infertilidad. La infección por *C. trachomatis* constituye la infección de transmisión sexual más onerosa después de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). (87)

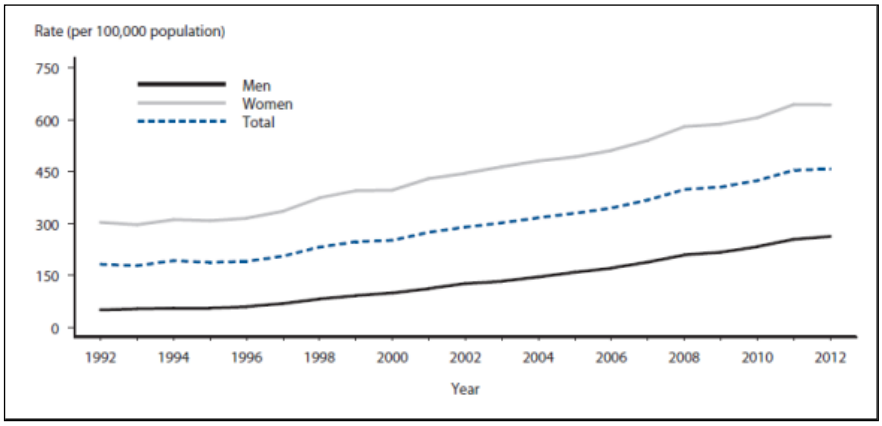


Figura 5. *C. trachomatis*, tasas de infección por sexo, EEUU, 1992-2012.(25)

Con relación a la edad, las tasas de infección por *C. trachomatis* son más altas en los adolescentes y adultos jóvenes de 15-24 años. Entre las mujeres los mayores registros se observaron entre los 15-19 años (3.291,5 casos por 100.00 mujeres) y entre los 20-24 años (3.695,5 casos por 100.000 mujeres). Entre los varones las mayores tasas se observaron entre los 20-24 años (1.350,4 casos por 100.000 hombres) (Figura 6).

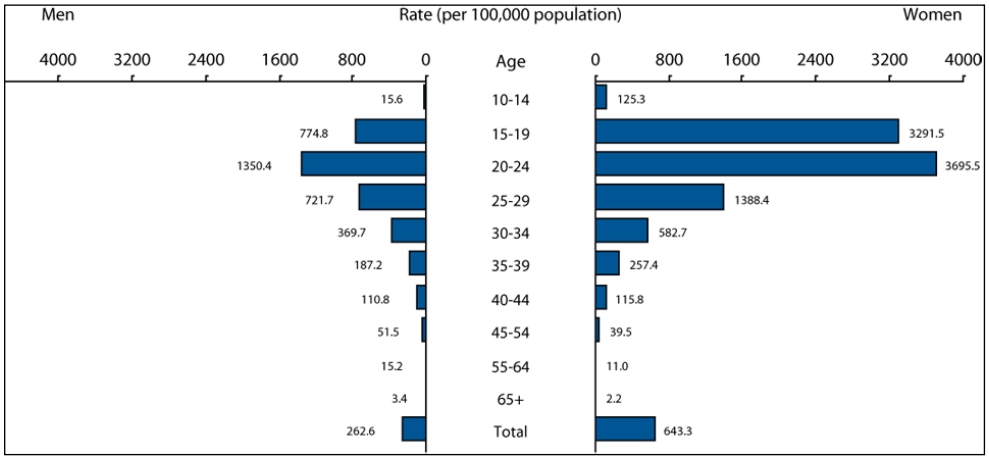


Figura 6. *C. trachomatis*, tasas por edad y sexo, EEUU, 2012. (25)

<u>Situación epidemiológica en Europa</u>

La infección por *C. trachomatis* es la ITS notificada con más frecuencia en Europa. En el año 2011 se notificaron 346.911 casos en los 25 países miembros de la Unión Europea, con una tasa global de 175 por cada 100.000 habitantes. La infección fue más frecuente en las mujeres que en los hombres, con tasas de 203 por cada 100.000 mujeres y 145 por cada 100.000 hombres. (39)(Figura 7)

Las comparaciones entre los países de la Unión Europea son difíciles debido a las diferencias que existen en los sistemas de vigilancia, los métodos diagnósticos utilizados, la cantidad de tamizajes y la proporción de sub-registros. La disponibilidad de programas de tamizaje dirigidos específicamente a subgrupos de la población pueden afectar significativamente el número de casos informados. De allí que la verdadera incidencia y prevalencia probablemente sea mayor a la notificada (ECDC, Annual Epidemiological Report, 2013). (40)

El 73 % de todos los casos de infecciones por *C. trachomatis* en el 2011 fue reportado en los jóvenes de entre 15 y 24 años de edad, con las tasas más altas entre las mujeres de 15 a 19 años (1.748 casos por cada 100.000)

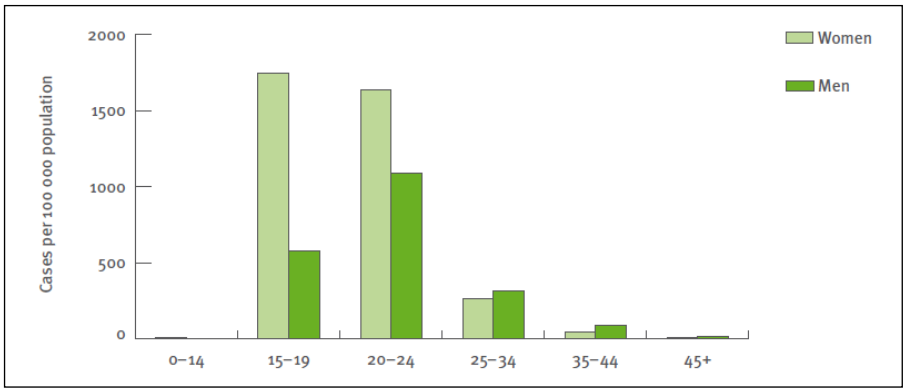


Figura 7. Edad y tasa de casos reportados de *C. trachomatis* por cada 100.000 habitantes en función de género, 2011, Unión Europea.(39)

<u>Situación epidemiológica en Australia</u>

En Australia, una revisión sistemática realizada por Vajdic y col. entre los años 1997 y 2004, informó una prevalencia media global de infección genital por *C. trachomatis* de 4,6 %. Entre los australianos nativos, el valor de prevalencia fue 7,5 % para los hombres y 8,7 % para las mujeres, mientras que entre los extranjeros las cifras fueron 1,5 % y 1,4 % respectivamente. En otros grupos las cifras fueron: 3,3 % en mujeres atendidas en clínicas de salud sexual; 5,6 % en adolescentes y adultos jóvenes; 3,3 % en trabajadores del sexo y 1,6 % en hombres que tienen sexo con hombres (110)

Según un informe anual del Sistema de Vigilancia de Enfermedades de Notificación Nacional (NNDSS) de Australia, en el año 2010, se notificaron 74.305 casos de infección por *C. trachomatis,* lo que equivale a una tasa de 333 por 100.000 habitantes. Esto representó un aumento del 17 % en comparación con la tasa reportada en 2009 (285/100.000 habitantes). Entre los años 2005 y 2010, las tasas de infección por *C. trachomatis* aumentaron en un 64 %, de 203 a 333 por 100.000 habitantes (7). En el año 2010, las tasas aumentaron en todos los territorios y estados australianos.

Las tasas de infección por *C. trachomatis* en hombres y mujeres, durante el 2010, fueron 279 y 384 por cada 100.000 habitantes respectivamente. En comparación con el año 2009, se incrementaron en un 19 % en varones y 15 % en mujeres. En el grupo de edad menor a 30 años, las tasas en las mujeres superaron a las de los hombres, mientras que éstos tuvieron tasas más altas a mayor edad. (Figura 8)

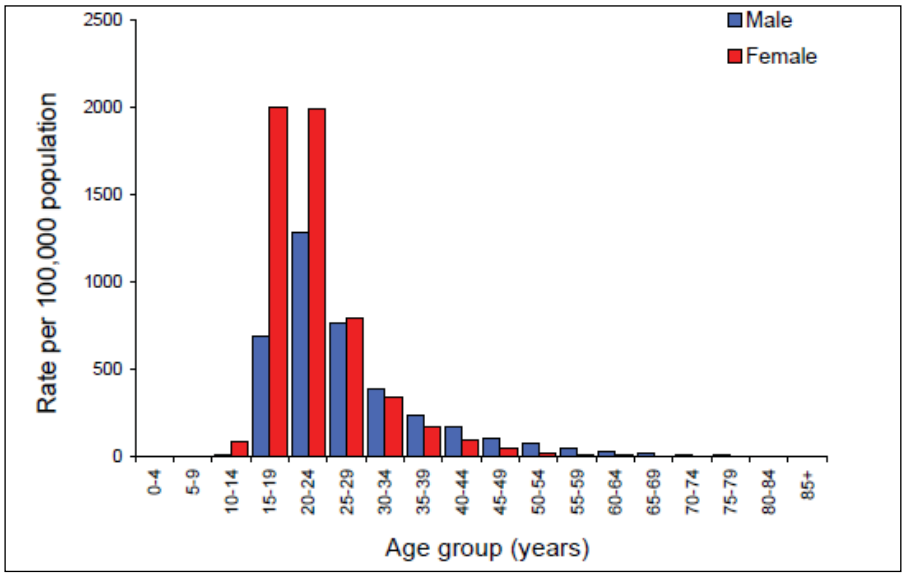


Figura 8. Edad y tasa de casos reportados de *C. trachomatis* por cada 100.000 habitantes en función de género, 2010, Australia. (7)Entre los años 2005 y 2010, hubo un aumento de tendencia en las tasas de notificación de *C. trachomatis* a través de ambos sexos y en todos los grupos de edad (Figura 9). El mayor aumento, tanto en hombres como mujeres, se observó en el grupo de 15 a19 años.

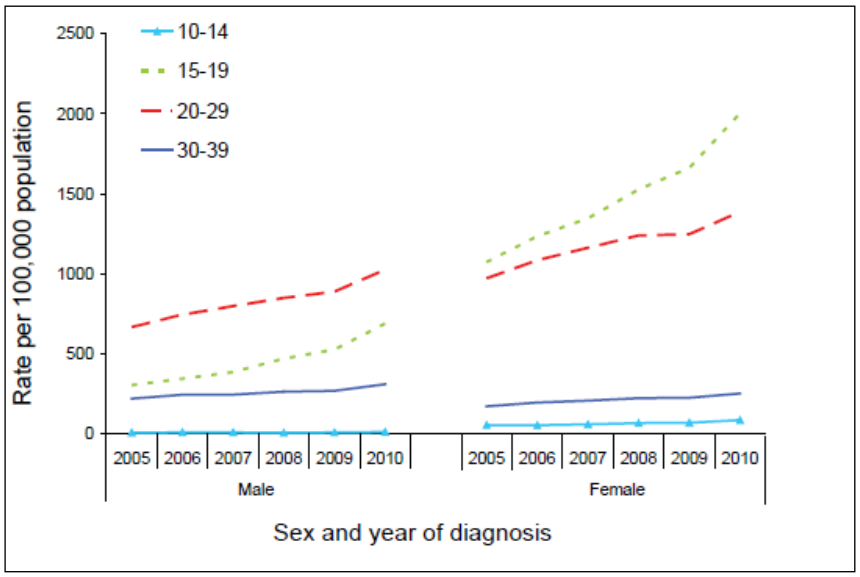


Figura 9. Tasas de infección por C. trachomatis en personas de 10 a 39 años de edad, según sexo, años y grupos de edad, Australia, 2010. (7)

<u>Situación epidemiológica en América Latina</u>

En los países de América Latina, los datos recabados en la bibliografía científica muestran valores de prevalencia de la infección por *C. trachomatis* que oscilan entre 1,0 % y 52,8 %. La tabla 2 presenta los datos recopilados entre los años 1997 y 2013, detallándose el lugar donde se realizó el estudio, año, metodología empleada, características de la población estudiada y prevalencia encontrada. La disparidad en las prevalencias encontradas se puede adjudicar principalmente a diferencias en el tipo de estudio realizado, la metodología diagnóstica empleada y la población analizada.

Tabla 2. Prevalencia de la infección genital por *C. trachomatis* en América Latina por país (1997-2013).

País, ciudad	Fecha	Técnica	Población	Nº	Prevalencia (%)
Brasil, Fortaleza (84)	2007	LCR	Mujeres sexualmente activas	579	4,5
Brasil, Salvador, Bahía (66)	2008 /2010	PCR	Adolescentes sexualmente activas entre 10 y 19 años	100	31,0
Brasil, Curitiba (92)	2011	PCR	Mujeres sexualmente activas entre 16 y 23 años	335	10,7
Chile, Santiago (56)	2006 /2007	PCR	Mujeres jóvenes y adolescentes sexualmente activas	203	6,9
Colombia, Bogotá (100)	2004	PCR	Mujeres sintomáticas y asintomáticas	355	5,3
Cuba, La Habana (46)	2002 /2003	PCR	Mujeres que asistieron a consultas de ginecología, infertilidad y terminación del embarazo	124	6,9
México, Mérida (21)	1998	EIA	Mujeres atendidas en dos clínicas de planificación familiar	1.100	6,7
México, (34)	2011	PCR	Mujeres infértiles	152	15,8
Nicaragua (30)	1999 /2000	PCR	Mujeres sintomáticas y asintomáticas	1185	4,1
Paraguay (38)	2011	antígeno	Mujeres en edad fértil que acudieron a estudio de cuello uterino	148	4,1
Perú, Iquitos(91)	1999	LCR	Mujeres trabajadoras sexuales	100	22,0

Perú(22)	2002	PCR	Adultos jóvenes de la población general.	15261 4485	4,2 (H) 6,5 (M)
Venezuela, Maracaibo (5)	2006	IFD PCR	Mujeres sintomáticas y asintomáticas atendidas en un ambulatorio rural	54 54	5,5 9,3
Venezuela, Maracaibo (6)	2006 /2007	PCR	Mujeres sintomáticas y asintomáticas atendidas en dos centros de Salud privados	168	7,7

De los datos registrados en Latinoamérica, se observa que en los últimos años, las técnicas de biología molecular fueron las metodologías de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis*.

Situación epidemiológica en la República Argentina

En nuestro país, los datos recopilados en bibliografía científica, presentaciones en congresos y talleres, comunicaciones personales y del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), abarcan el período 1994-2013 (Tabla 3). La tabla 3 presenta los estudios realizados entre los años 1994 y 2012, registrándose prevalencias de infección por *C. trachomatis* que oscilan entre 1,2 % y 24,9 %.

Tabla 3. Prevalencia de la infección genital por *C. trachomatis* en la República Argentina (1994-2012).

Lugar (cita)	**Fecha**	**Técnica**	**Población**	**Nº**	**Prevalencia (%)**
Bs As (44)	2000 /2004	ELISA Cultivo /PCR	Adultos sintomáticos de ambos sexos.	3.236	1,8
Bs As (36)	2006 /2007	PCR	Mujeres jóvenes y adolescentes	1.179	4,4

Chaco y Corrientes (35)	2004 /2005	PCR	Mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino	189	24,9
Córdoba (32)	2012	PCR	Adolescentes y jóvenes asintomáticos	427	8,7
Córdoba (77)	2012	PCR	Pacientes infértiles	660	7,27
Río Cuarto, Córdoba (90)	1994 /1999	ELISA	Mujeres y hombres atendidos en el Servicio de Ginecología y Urología	2.630	11,5

En el estudio multidisciplinario, realizado en la ciudad de Córdoba, por profesionales de la Universidad Nacional de Córdoba y de la Universidad Católica de Córdoba, resultó que el 8,7% de los jóvenes (18 a 25 años) sexualmente activos asintomáticos estaban infectados con *C.trachomatis*, predominando esta infección en mujeres menores de 21 años con necesidades básicas insatisfechas. (42)

Infecciones por *Chlamydia trachomatis*

Cabe destacar que más del 70% de las infecciones genitales por *C.trachomatis* en mujeres y el 50% en hombres son asintomáticas (32). Sin embargo, a pesar de permanecer asintomáticos pueden desarrollar infecciones persistentes, que eventualmente conducen a graves secuelas reproductiva (68). Las personas infectadas asintomáticas, no acuden a consultas médicas, no son diagnosticadas, no reciben el tratamiento antimicrobiano específico y son los responsables de complicar la situación epidemiológica debido a su comportamiento de portadores silentes del microorganismo.

Tracoma

Esta enfermedad, producida por los serotipos A, B, Ba y C de *C. trachomatis*, es una conjuntivitis crónica con una marcada reacción folicular y una hipertrofia

papilar de la conjuntiva. Las formas graves se dan a partir de sucesivas reinfecciones, principalmente con serotipos diferentes del original, que generan una reacción inflamatoria más agresiva, y por lo tanto un daño mayor. La necrosis de los folículos suele producir cicatrices en la conjuntiva, ocasionando una deformación con inversión de los párpados (entropión) y un crecimiento anormal de las pestañas hacia el ojo (trichiasis). Las lesiones corneales que se producen agravan el cuadro inicial con úlceras recidivantes, alteración del flujo lacrimal y la función glandular, lo que aumenta la posibilidad de sobre-infecciones bacterianas (4). Todos estos factores coadyuvan a la pérdida de la visión.

Linfogranuloma venéreo (LGV)

Es una enfermedad sistémica producida por *C. trachomatis* serotipos L1 a L3, 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 manera 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, uretra o vagina (101). Los brotes recientes de LGV se han registrado en Europa, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá, principalmente entre hombres infectados con HIV que tienen sexo con hombres (33)

Infecciones genitales en el hombre

Las complicaciones a la que está expuesta la población masculina son: uretritis no gonocócica, epididimitis, prostatitis, infertilidad y Síndrome de Reiter (conjuntivitis, artritis, uretritis y máculas) (78).

Infecciones genitales en la mujer

C. trachomatis afecta principalmente a mujeres adolescentes y jóvenes menores de 20 años de edad. Las mujeres sintomáticas pueden mostrar signos de enfermedad como secreción cervical mucopurulenta, ectopia cervical hipertrófica y friabilidad (71). Los síntomas clínicos consisten en disuria, secreción vaginal anormal, abundante

sangrado menstrual y dolor pélvico (51). En la mujer las complicaciones asociadas a esta infección son la enfermedad inflamatoria pélvica, dolor pélvico crónico, embarazo ectópico e infertilidad (59).

Se estima que el 10 al 40% de las mujeres infectadas con *C.trachomatis* que no reciben tratamiento oportuno, pueden desarrollar Enfermedad inflamatoria pélvica (EPI); que ocasiona dolor pélvico, embarazos ectópicos e infertilidad (41). El daño de las trompas de Falopio por la infección es responsable del 30 al 40% de los casos de infertilidad femenina. Además, la probabilidad de tener embarazos ectópicos es 6 a 10 veces mayor en las mujeres que han sufrido EPI (85). También poseen mayor riesgo de adquirir VIH (67). *C.trachomatis* está descripta como un posible cofactor de la infección por el virus Papiloma humano (VPH) en el desarrollo de cáncer de cuello de útero. Se estima que *C. trachomatis* puede estar presente en el 20% de los casos de neoplasia cervical (89). Por lo tanto, la coinfección de *C.trachomatis* y el VPH de alto riesgo oncogénico juegan un papel central en la etiología de las neoplasias intraepiteliales cervicales y el cáncer de cuello uterino (107).

Microbiota vaginal y su función protectiva frente a la infección por *C. trachomatis*.

La microbiota vaginal es un mecanismo de defensa muy importante para evitar infecciones en el tracto genital femenino; en mujeres en edad fértil está compuesta principalmente por Lactobacilos que evitan la proliferación de bacterias patógenas en la vagina a través de la producción de ácido láctico, H_2O_2 y bacteriocinas (72). La composición de la microbiota vaginal no es constante, sufriendo variaciones en la respuesta a factores exógenos y endógenos.

Los Lactobacilos metabolizan la glucosa-6-fosfato, producto de fermentación del glucógeno, con producción de ácido láctico, que es responsable del pH vaginal ácido (<4,5). El ambiente ácido de la vagina evita la excesiva proliferación de microorganismos endógenos y/o exógenos potencialmente patógenos.

También desempeña un rol muy importante la interferencia bacteriana, fenómeno por el cual los Lactobacilos utilizan el espacio, recursos y nutrientes impidiendo así la proliferación de posibles patógenos. (54)

El exudado vaginal normal de una mujer en edad fértil está constituido por un trasudado de la pared vaginal y moco cervical, es de aspecto homogéneo, color blanquecino e inodoro. En el podemos encontrar, células epiteliales vaginales, leucocitos menos de 10 /cpo, abundantes microorganismos con predominio de Lactobacilos, y <4,5.

Vulvovaginitis

Las alteraciones que ocurren en el ambiente vaginal pueden aumentar o disminuir las ventajas selectivas para determinados microorganismos, dándole así la oportunidad de producir una vulvovaginitis. (45)

Se denomina "Vulvovaginitis" a la inflamación de la región genital femenina: vulva, vagina. Es una de las principales causa de consulta en Atención Primaria de la Salud. Aproximadamente el 85-90% de las vulvovaginitis (VV) son de naturaleza infecciosa siendo Vaginosis bacteriana (VB), Candidiasis vulvovaginal (CVV) y Tricomoniasis vaginal (TV) las más frecuentes. (63)

La Vaginosis Bacteriana (VB) es una entidad clínica polimicrobiana que se caracteriza por presentar una secreción vaginal anormal con desplazamiento de los lactobacilos por *Gardnerella vaginalis, Micoplasma hominis* y microorganismos anaerobios (Complejo GAMM), es decir, hay un aumento de microorganismos que normalmente forman parte de la microbiota habitual pero en muy bajas concentraciones, por este motivo no es considerada una infección de transmisión sexual (108). No se caracteriza por presentar respuesta inflamatoria y hasta un 50% de las pacientes pueden cursar asintomáticas. Está asociada a complicaciones obstétricas, y es considerada un factor de riesgo para la adquisición de (VIH) y otras ITS debido al desequilibrio que produce en la microbiota vaginal. (2,119)

La vulvovaginitis candidiásica (CVV) es uno de los diagnósticos más frecuentes en la práctica clínica diaria. Tiene una incidencia aproximada del 25% y

ocupa el segundo lugar entre las vulvovaginitis (VV), precedidas solo por la Vaginosis bacteriana (VB). Se calcula que casi el 75% de las mujeres adultas presentan al menos un episodio de VVC a lo largo de su vida, y que un 40% a 50% de ellas sufren un segundo episodio. A su vez, los episodios de recurrencia afectan al 5% de las pacientes. *Candida albicans* es la especie más frecuentemente detectada en VVC (80-90% de casos). No se observa modificación de la microbiota vaginal. (50)

La tricomoniasis es una infección producida por un protozoo flagelado llamado *Trichomonas vaginalis* que afecta el tracto genitourinario, tanto del varón como de la mujer. En la mayoría de los casos la transmisión sigue la vía sexual, en algunas ocasiones la infección podría transmitirse por fómites, artículos de baño (toallas, esponjas húmedas) y juguetes sexuales aunque este mecanismo de contagio está limitado por la labilidad de este parásito. Luego de su instalación en la vagina, la proliferación del parásito causa degeneración y descamación del epitelio vaginal, con abundante infiltración leucocitaria. Produce además, un desplazamiento de la microbiota habitual por otros microorganismos que generalmente se encuentran en bajas proporciones, situación similar a lo que ocurre en VB. Está asociada a complicaciones obstétricas. (99)

La microbiota vaginal, y el sistema inmune en forma equilibrada y conjunta contribuyen significativamente a mantener el estado fisiológico del tracto genital femenino, cualquier alteración en este equilibrio puede ocasionar el desarrollo de determinadas patologías lo cual repercute en la función óptima de la actividad sexual y reproductiva y por ende en la calidad de vida de la mujer. (54)

Algunos estudios sugieren una relación directa entre microbiota vaginal patológica e infecciones del tracto genital superior, es decir una microbiota vaginal alterada predispondría a la adquisición de infecciones del tracto genital superior, por ejemplo: VIH y otras ITS (74)

Complicaciones en el embarazo

En mujeres embarazadas, diversos trabajos refieren que anualmente la infección por *C.trachomatis* tiene una prevalencia de 3,5% en USA (13), 12,1% en Reino Unido y del 6,4% en Australia (11). En América Latina, se han reportado prevalencias en embarazadas; del 5,9% en Chile (88), 10% en Perú (18) y 11% en Brasil (15). En Argentina se dispone de escasos datos de prevalencia de *C. trachomatis* en embarazadas. En Buenos Aires, se reportó en el año 2001 una prevalencia de 2,5% de *C. trachomatis* en embarazadas asistidas en un hospital de esa provincia y cabe destacar que ese estudio se realizó sólo en aquellas mujeres sintomáticas. (37)

Las infecciones por *C.trachomatis* en las mujeres embarazadas se asocian a abortos, endometritis post parto, ruptura prematura de membranas (11,29). Cuando el saco amniótico se rompe más de una hora antes del inicio del trabajo de parto se considera ruptura prematura de membranas (Rpm). Cuanto más precozmente se produzca la infección, mayor riesgo para el feto debido a la prematuridad y sus consecuencias. El diagnóstico requiere ecografía y especuloscopia; para el seguimiento se realizan controles de forma sistemática que incluyen: ecografía, hemograma y Proteina C Reactiva, cultivo de *Streptococcus agalactiae*, cultivo vaginal, endocervical y urocultivo microbiológicos de rutina. (43, 85, 105)

Algunos consensos incluyen tratamiento antibiótico y en ocasiones se recomienda la administración de ciertos corticoesteroides para reducir los riesgos de complicaciones relacionadas con la prematurez, por ejemplo, el síndrome de dificultad respiratoria, la hemorragia intraventricular y la muerte perinatal.(55)

Algunos estudios reportaron que el 4% de los partos prematuros y el 4,5% de las Rpm son ocasionadas por *C.trachomatis*. (59)

En el Reino Unido se ha reportado que *C.trachomatis* es la responsable del 8% de los abortos espontáneos. (69) Los recién nacidos (RN) prematuros, antes de la semana 37 de gestación, tienen un alto riesgo de muerte en sus primeros años de vida. Deben permanecer en la Unidad Neonatológica de Cuidados Intensivos. Algunas de las medidas recomendadas son Incubadora, surfactante para RN de menos de 32 semanas y nutrición adecuada por medio de sonda alimentaria o suero intravenoso.

Pueden permanecer desde una semana hasta dos meses dependiendo el grado de complicación que presenten. (1)

En caso de ocurrir un aborto espontáneo, pérdida espontánea de un feto antes de la semana 20 del embarazo, la paciente es sometida a estudios de laboratorio, ecografía y examen clínico general. En caso que el aborto espontáneo no haya sido completo puede requerirse cirugía e internación (42, 85)

Complicaciones en recién nacidos

Los recién nacidos de madres positivas para *C. trachomatis* tienen del 60 al 70% de probabilidad de infectarse durante el paso por el canal del parto. Algunos estudios sugieren que también puede producirse transmisión intrauterina en las últimas semanas del embarazo, especialmente si ha habido rotura prematura de membranas. La infección perinatal puede provocar colonización de la faringe, el recto y la vagina de los recién nacidos. Aproximadamente del 30 al 50% de ellos, desarrollarán conjuntivitis de inclusión y el 10-20% neumonía (29, 58, 73)

La conjuntivitis aparece entre el 2º y 14º día, mientras que la neumonía se reconoce mayormente entre las 4ª y 16ª semanas de vida. La conjuntivitis por *C. trachomatis* tiene un período de incubación de 5 a 14 días (53, 59, 81) pero pueden presentarse signos de infección desde el nacimiento si hubo ruptura prematura de membranas. Las manifestaciones clínicas de la conjuntivitis son: exudado purulento, inyección conjuntival y edema palpebral. La afectación de la córnea es limitada y normalmente se produce sin secuelas, pero en la ausencia de tratamiento adecuado la infección puede mantenerse latente meses o incluso años. Si no es tratada correctamente puede producir cicatrización corneal. El manejo es ambulatorio, requiere estudios de laboratorio, cultivo conjuntival y tratamiento antibiótico con eritromicina (36, 73)

De los RN colonizados el 10-20% puede desarrollar neumonía. La misma puede presentarse como un cuadro clínico similar al de una bronquiolitis, precisando en ocasiones ingreso hospitalario (36). En lactantes pequeños y prematuros las manifestaciones iniciales son más severas y precoces con mayor incidencia de apneas y dificultad respiratoria, en ocasiones puede llegar a ser potencialmente grave como para requerir ingreso en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (9). La infección

puede además afectar a otros órganos, provocando endocarditis, otitis media aguda, coroiditis, meningoencefalitis, y pustulosis palmoplantar crónica. (47, 81)

La tendencia mundial de las tasas de prevalencia de *C.trachomatis* va en aumento cada año, con excepción de los países donde se implementaron programas de "*screening"* (detección-tratamiento de *C. trachomatis* y educación de prevención de infecciones enfermedades de transmisión sexual [ITS]), tales como Finlandia, Dinamarca, EEUU y Australia cuyo resultado ha sido una reducción importante de la infección por *C. trachomatis* y de sus complicaciones (19,24)

En Argentina no existen programas que garanticen la detección de *C. trachomatis,* en estadios tempranos o asintomáticos para evitar de este modo las consecuencias de la infección y los gastos innecesarios que esto conlleva.

Teniendo en cuenta que en nuestro país no existen datos acerca de la infección por *C. trachomatis* en embarazadas, es de suma importancia estudiar tanto la presencia de esta ITS en esta población, como sus características genéticas. Así también, analizar el costo/beneficio de la detección de la infección por *C. trachomatis* y el tratamiento antimicrobiano específico en función a los costos de la atención médica de las complicaciones y secuelas.

2.- HIPÓTESIS

La *C. trachomatis* infecta mujeres embarazadas y es más frecuente en menores de 25 años.

La implementación de la detección de *C.trachomatis* en las embarazadas y su tratamiento antimicrobiano específico disminuye; como consecuencia, los costos de salud pública ocasionados por las complicaciones de esta infección en los recién nacidos.

3.- OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en mujeres que cursan el tercer trimestre de embarazo evaluando los factores de riesgo asociados, caracterizando a nivel molecular los genotipos presentes y analizando el costo/beneficio de la implementación del tamizaje de esta infección bacteriana.

Objetivos específicos

a.- Determinar la prevalencia de *C. trachomatis* en embarazadas asistidas en Centros de Salud Municipales de la Ciudad de Córdoba, Argentina a fin de asociarlos con factores de riesgo específicos como la edad.

b.- Estudiar los genotipos de *C.trachomatis* presentes en esta población con el objetivo de aportar datos para la formulación de futuras vacunas.

c.- Analizar el costo/beneficio de la detección de la infección por *C. trachomatis* y el tratamiento antimicrobiano específico en función de los costos de la atención médica de las complicaciones y secuelas de los neonatos.

d- Determinar la presencia de vulvovaginitis en embarazadas asistidas en Centros de Salud Municipales de la Ciudad de Córdoba, Argentina a fin de asociarla con la frecuencia de infección de *C.trachomatis*.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Este estudio se realizó de forma prospectiva de Septiembre a Diciembre de 2013 en La Dirección de Especialidades Médicas Centro (DEM), Ciudad de Córdoba. Es una Institución pública municipal abierta a la población en general. Esta dirección es la encargada de la prestación de atención médica de Primer Nivel a su Área Programática y de Segundo Nivel, mediante las Especialidades y Subespecialidades a la población del área capitalina de la ciudad de Córdoba que abarca 97 Centros de Salud Municipales distribuidos en toda la Ciudad. En total la Municipalidad de Córdoba tiene bajo programa aproximadamente 5000 embarazadas por año. La población que concurre a la DEM es de características socioeconómicas muy heterogénea ya que los pacientes son derivados de los distintos Centros de Salud periféricos distribuidos en la Ciudad de Córdoba, en su mayoría poseen empleos informales y carecen de Obra Social.

Para la realización del presente trabajo se incluyeron 279 embarazadas que concurrieron al Laboratorio de Microbiología de la DEM Centro a realizarse el estudio de portación de *Streptococcus agalactiae*, durante el periodo comprendido entre septiembre a diciembre de 2013. La técnica de muestreo fue sucesivo. Previo a la toma de muestra las pacientes firmaron el consentimiento informado.

Criterios de inclusión: Mujeres de 16 a 42 años de edad, embarazadas entre la semana 35-37 de gestación, que concurrieron al Laboratorio de Microbiología a realizarse el estudio de portación de *Streptococcus agalactiae*.

Criterios de exclusión: pacientes embarazadas de menos de 35 semanas de gestación. Pacientes menores de 16 años o mayores de 42 años.

Recolección de información.

Se llevaron a cabo dos procedimientos con las siguientes finalidades.

1. Para lograr el consentimiento informado, se les explico a las mujeres la confidencialidad de los resultados obtenidos, el tratamiento de las muestras y el procedimiento para la toma de la muestra.
2. Se realizó un cuestionario para conocer los datos socio demográficos y socio económicos. Nombre, apellido, edad, asistencia escolar, ocupación de las mujeres estudiadas, recibe algún ingreso en forma permanente. (Anexo 1)

Aspectos éticos

Este trabajo de investigación está aprobado por el Comité de ética Oulton-Romagosa y CIEIS.

Obtención de la muestra

Al mismo momento que se obtiene la muestra para investigar la presencia de *Streptococcus agalactiae*, se tomaron dos hisopos más:

1. Hisopado de las paredes y fondo de saco vaginal en medio de transporte Stuart se utilizó para realizar el diagnóstico de VV, mediante examen en fresco, cultivo en Sabouraud, Test de Aminas y tinción de Gram con la aplicación de los criterios de Amsel y score de Nugent (3, 82)

2. Hisopado cervical-vaginal, para la obtención de células, utilizando hisopo de dacron en buffer fosfato salino para la detección de *C. trachomatis* por biología molecular (61)

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial de extracción de Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) de acuerdo al siguiente protocolo.

1) A cada tubo de reacción de 1,5 ml que contenía 200 µl de la muestra, se le adicionó 20 µl de Proteinasa K.
2) Las muestras fueron homogeneizadas una a una por agitación con vortex durante 1 minuto.
3) Luego se las colocó en baño de agua a 60 ºC durante 1 hora.
4) Luego de la incubación, se inactivó la enzima por adicción de 100 µl de alcohol isopropílico absoluto y se homogeneizó suavemente.
5) La fase acuosa se transfirió a un tubo de reacción de 2 ml que contenía la columna de extracción y se sometió a centrifugación a 5900 xg por 1 minuto.
6) Posteriormente, se transfirió la columna a un tubo de reacción de 2 ml de lavado de la columna.
7) Se adicionó 500 µl de buffer de lavado 1, previamente suplementado con 80 ml de alcohol etílico absoluto.
8) Se llevó a centrífuga a 5900 xg durante 1 minuto.
9) Se descartó el alcohol precipitado y se agregó 500 µl de buffer de lavado 2, previamente suplementado con alcohol etílico absoluto.
10) Se descartó el alcohol precipitado y se centrifugó la columna sola a 13400 xg durante 1 minuto, para eliminar restos de alcohol que puedan inhibir la enzima Go Taq polimerasa de la PCR.
11) Se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 1,5 ml y se adicionó 200 µl del buffer de elución.
12) Se centrifugó a 5900 xg durante 1 minuto.
13) Se descartó la columna y se almacenó el extracto de ADN a 4 ºC hasta su utilización.

Observación: la técnica de separación de la muestra y hasta el paso 3 de la extracción de ADN se realizó bajo campana de seguridad biológica, decontaminando previa y posteriormente la superficie de trabajo con luz ultravioleta.

Hemi nested PCR- *C. trachomatis*

Se utilizará en la PCR inicial los cebadores A1, A2 dirigidos contra el gen *ompA* que codifica la MOMP de *C. trachomatis*. Los cebadores usados generan un producto de aproximadamente 1.1-kb. A partir de este producto se realizará la Hemi nested PCR usando los cebadores: A2 y PCTM3, que se muestran en la (tabla 4). Los detalles de la reacción fueron publicados por Walboomers et al, 1993. (113)

PCR plásmido de *C. trachomatis*

Se usarán los cebadores CTP1/CTP2 dirigidos contra el gen codificador del plásmido críptico. Los detalles de esta reacción fueron publicados por Bassiri et al, 1995. (10)

Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó sobre la secuencia obtenida por técnica de PCR genérica para la amplificación de un fragmento genómico de los dominios II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia*.

Se estableció la técnica de PCR genérica para la detección de un fragmento de 576 pb de los dominios variables II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia*.

Los oligonucleótidos se seleccionaron de acuerdo al protocolo previamente descripto por Sachse and Hotzel, 2003. (97)

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en presencia de 0,2 mM de los respectivos oligonucleótidos, de 0,8 mM de dNTPs y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA) en volumen final 50 µl.

La reacción de PCR en el termociclador consistió de una etapa de desnaturalización inicial a 95 ºC durante 30 segundos, 35 ciclos a 95 ºC durante 30 segundos, 50 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante 30 segundos, seguido por una etapa de extensión final a 94 ºC por 10 minutos.

La cepa L_2/434/*Bu* de *C. trachomatis* (CP002024) que se encontraba almacenada en el laboratorio de *Chlamydia* del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", fue utilizada como control positivo de reacción.

Tabla 4: Secuencias de cebadores y condiciones de la reacción de amplificación.

Nombre de PCR y gen de C.trachomatis amplificado	**Nombre y secuencia de Cebadores o "Primers"**	**Tamaño amplicon (pb)**	**N° de ciclos**	**T. "annealing" (°C).**
PCR genérica. **Gen *ompA***	**CHOMP191** 5'GCIYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC3' **CHOMP371** 5'TTAGAAICKGAATTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC3'	**576–597**	**35**	**50**
PCR anidada ***Gen ompA***	**SeroA1** 5'ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG3' **SeroA2** 5'TTTCTAGAT/ CTTCATT/CTTGTT3´ **PCTM3** 5'TCCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCT3'	**1100** **1050**	**49**	**45** **45**
PCR ***gen plásmido críptico***	CTP1 5' TAGTAACTGCCACTTCATCA-3' CTP2 CTP2: 5' TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3'	**240**	**40**	**55**

Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se visualizarán por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% revelado con bromuro de etidio bajo un transiluminador de UV. (Figura 10)

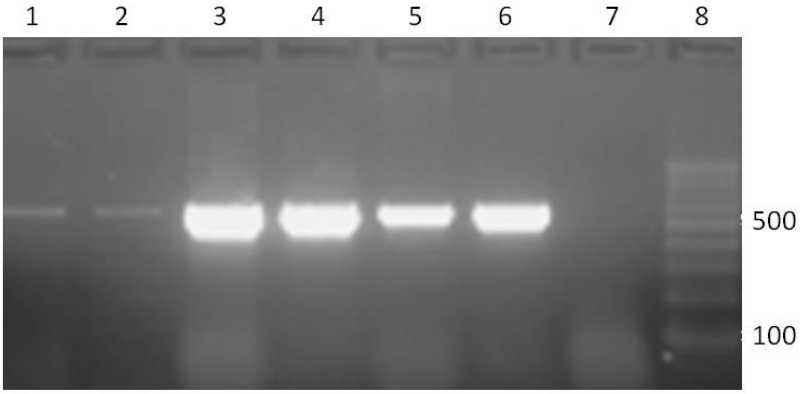


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR genérica del gen *ompA* de *Chlamydia*. *Calles 1 y 2: muestras positivas no aptas para secuenciar. Calles 3 a 5: muestras positivas aptas para secuenciar. Calle 6: control positivo. Calle 7: control negativo. Calle 8: Control de ADN.*

Caracterización genómica de los amplicones de *Chlamydia* mediante secuenciación directa.

El producto; ADN (4µl) purificado, obtenido por la técnica de PCR genérica para la amplificación de un fragmento genómico de los dominios II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia*; posteriormente fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular "Low DNA MASS^{TM} ladder" (Life-Technologies, USA) que permitió establecer la cantidad (ng/µl) aproximada de ADN presente en la muestra pre-secuenciación.

El ADN purificado (150ng/µl) fue sometido a la reacción de secuenciación en ambas direcciones utilizando los cebadores de la PCR genérica; CHOMP191 y CHOMP371, en la empresa Macrogen, Inc.; Seúl, Corea.

Una vez obtenida las secuencias de los fragmentos amplificados, las mismas fueron editadas utilizando el programa ClustalX (Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Irlanda). Posteriormente las secuencias; consenso, obtenidas se compararon mediante BLASTn 2.2.19 -Basic Local Alignment Search Tool- (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) (118) contra el conjunto completo de fragmentos genómicos de *Chlamydia* obtenidos del banco de datos GenBank, mediante un corte E-value de 5^{10}.

Mediante el programa MEGA versión 4 (106) se realizó el alineamiento de todas las secuencias disponibles en el banco de datos GenBank. El modelo de sustitución nucleotídica fue seleccionado acorde al Criterio de Akaike implementado el programa ModelTest 3.7 (Universidad de Vigo, Galicia, España) (94) y se procedió a su análisis mediante la implementación del programa PhyML 3.0 (Université de Montpellier, Montpellier, Francia) (52)

A fin de obtener un dendograma consenso con soporte estadístico se procedió a realizar un "bootstrap" o generación de pseudoréplicas de la matriz original de ADN (2000 veces).

La edición final de los dendogramas obtenidos se realizó utilizando el programa Dendroscope (Universidad de Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) (57)

Análisis estadístico

Se determinó una muestra calculada con un error del 5% y una confianza del 95%, para un total de 279 mujeres.

Se utilizó soporte estadístico Infostat versión 2015.

5.- RESULTADOS

Características de la población

Se estudiaron 279 mujeres con edades comprendidas entre 16 y 42 años con una media de 21 años. Correspondían 184 (66%) al rango etario de 16 a 25 años; 85 (30%) al rango de 26 a 35 años y 10 (4%) a mayores de 35 años. En el gráfico 1 se representa los resultados del nivel de educación de las mujeres estudiadas. Del total de mujeres encuestadas (n: 279), 61 (21,8%) habían completado el nivel primario de escolarización (PC), 8 (2,9%) relataban un nivel primario incompleto (PI), 90 (32,3%) habían completado el nivel secundario de educación (SC) y 120 (43%) referían un nivel secundario incompleto (SI).

Nivel de Escolarización

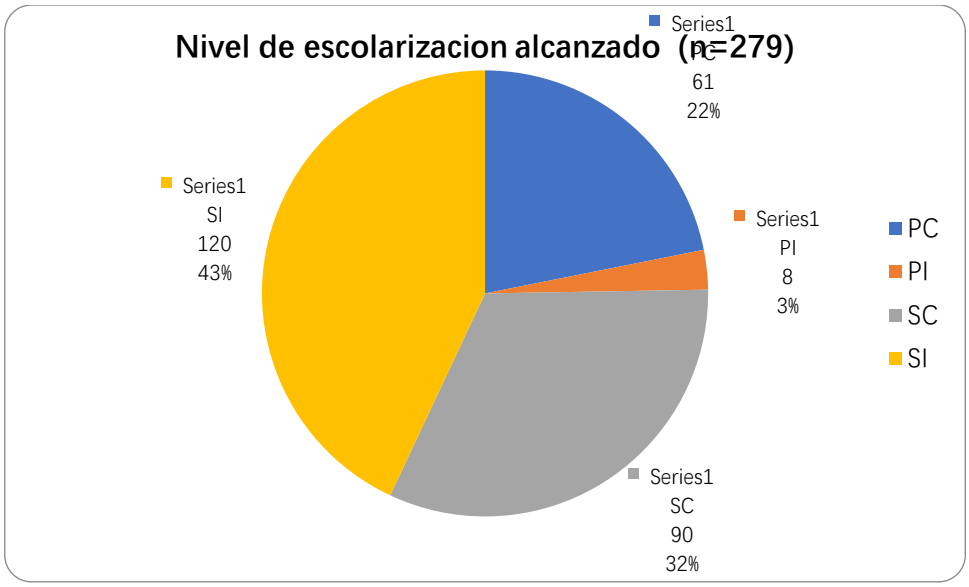


Grafico 1. PC: Primaria completa. PI: Primaria incompleta. SC: Secundario completo. SI: Secundario incompleto

Del total de mujeres; 257 (92%) eran amas de casa y 22 (8%) trabajaban fuera de su hogar. El 98% de las mujeres recibía asignación universal por hijo.

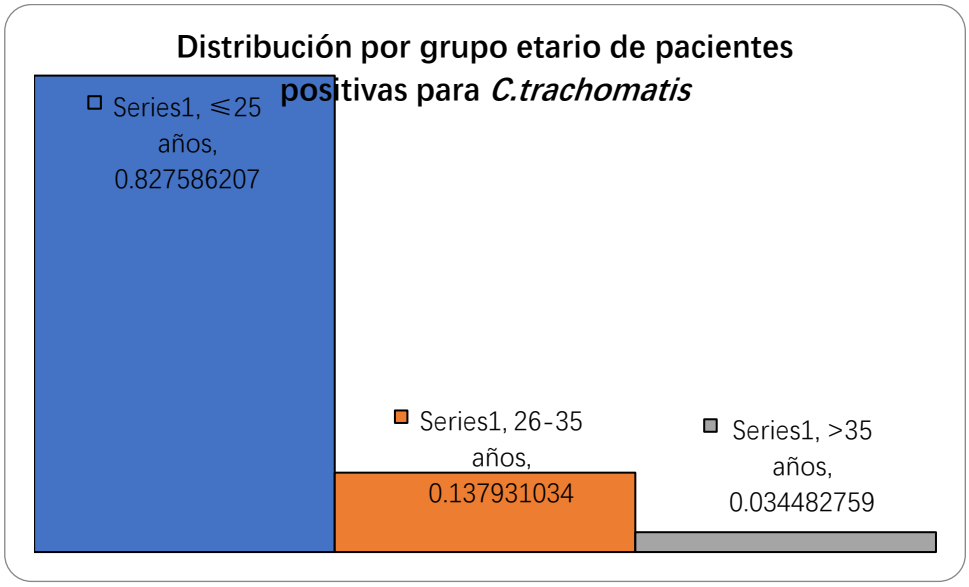
Prevalencia de *C.trachomatis* en embarazadas asistidas en Centros de Salud Municipales de la Ciudad de Córdoba, Argentina

Se detectó *Chlamydia trachomatis* en 29 mujeres, lo cual corresponde al 10,4% (IC 95%: 7,1%-14,5%) del total de la población estudiada.

Distribución por grupo etario

En el **Gráfico 2** se representa la distribución de la prevalencia de *C.trachomatis* en función a los grupos etarios.

En el rango etario correspondiente a mujeres de 16 a 25 años (n: 184), resultaron infectadas 24; lo cual corresponde al 82.8% de las mujeres infectadas. En el rango de 26 a 35 años (n=85) se detectaron 4 (13,8%) positivas y por último de las 10 mujeres mayores a 35 años, solo 1 (3,4%) presentó la infección por *C.trachomatis*.



Se evidenció asociación significativa entre la detección de *C. trachomatis* en menores de 25 años (p=0,018, X2=4,22: OR=2,74 1,01-7,44).

En cuanto al nivel de educación alcanzado y la infección por *C.trachomatis* no hubo asociación significativa.

En el grupo con nivel primario de escolarización completo, 5 mujeres fueron positivas (8,2%); 1(12,5%) correspondía al grupo con nivel primario incompleto, 7 (7,8%) al del nivel secundario completo y 16 (13,3%) al del nivel secundario incompleto. *Chlamydia trachomatis* fue detectada con mayor frecuencia en embarazadas que no habían completado el nivel secundario de educación; sin embargo, no se evidenció asociación significativa con en este grupo.

Presencia de Vulvovaginitis:

Se determinó la presencia de Vulvovaginitis (VV) en 106 pacientes; siendo el 18,6% de las Vulvovaginitis asociada a la presencia de Candida (CVV) (n=52), mientras que el 15,1% correspondían a Vaginosis Bacteriana (VB) (n=42), el 3,6% de Vulvovaginitis por *Trichomonas vaginalis* (TV) (n=10) y en 2 mujeres se revelaron las coinfecciones de VB+CVV y TV + CVV, representando cada una 0,36% (n=1)

No hubo diferencias significativas entre la infección por *C. trachomatis* con CVV, VB o TV.

Vulvovaginitis	*Pacientes*	*Porcentaje*
CVV	52	18.6%
VB	42	15.1%
TV	10	3.6%
VB+VCC	1	0.2%
TV+VCC	1	0.2%
TOTAL	106	37.7%

Tabla 5. Porcentaje de pacientes con Vulvovaginitis. CVV (Vulvovaginitis por Candida spp, VB(Vaginosis Bacteriana), TV (Trichomonas vaginalis).

Genotipos de *C.trachomatis*

El estudio de genotipficación se pudo realizar en 17 de las 29 muestras que habían resultado plásmido críptico positivas; quizás debido a la pérdida de la calidad del ADN, ya que para este estudio debe estar una amplia secuencia del gen *ompA* con una excelente conservación de la información genética y también puede ser debido a la diferencia de sensibilidad entre ambas PCRs.

Los genotipos encontrados a partir de las muestras positivas secuenciadas de las mujeres embarazadas, fueron: F = 35,2% (6/17); E = 29,4% (5/17); D = 11,8% (2/17); L2 = 11,8% (2/17); B = 5,9% (1/17) y G = 5,9% (1/17). En la figura 11 se observa la pantalla que resulta del programa Mega cuando se realiza la comparación de las secuencias genéticas obtenidas de las muestras positivas y las secuencias preexistentes en el Genbank brindadas por los investigadores de diferentes lugares del mundo.

En la primera columna están nombradas las diferentes secuencias patrones del Genbank y las positivas obtenidas en nuestro estudio.

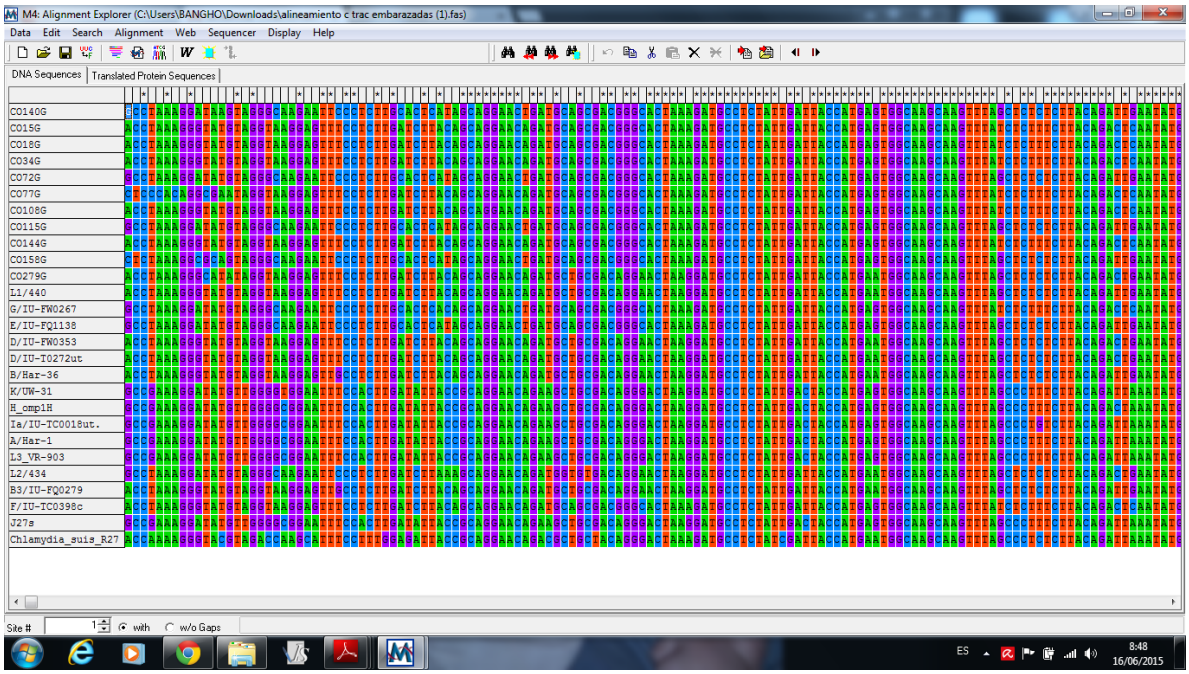


Figura 11. Alineamiento de secuencias en el programa Mega. Cada nucleótido está representado con diferentes colores. El * indica que el mismo nucleótido se repite para todas las secuencias analizadas.

El método más utilizado para la tipificación de *C. trachomatis* es el estudio del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) por la digestión de los productos de PCR con endonucleasas de restricción (61), que reconocen un sitio de clivaje genotipo-específico. Sin embargo, la RFLP no puede distinguir algunos genotipos y no es capaz de identificar mutaciones puntuales. Estos cambios nucleotídicos se observan; en la pantalla del programa Mega, con diferentes colores de las cuadrículas; mientras aquellas columnas que poseen el asterisco en su parte superior corresponden a los nucleótidos que son idénticos en todas las secuencias analizadas.

Por lo tanto en nuestro estudio, los genotipos de *C. trachomatis* fueron obtenidos por la técnica de secuenciamiento. El análisis de las secuencias permitió construir el árbol filogenético que se presenta en la figura 12 y asimismo determinar los genotipos por agrupación de las secuencias con aquellas patrones del Genbank.

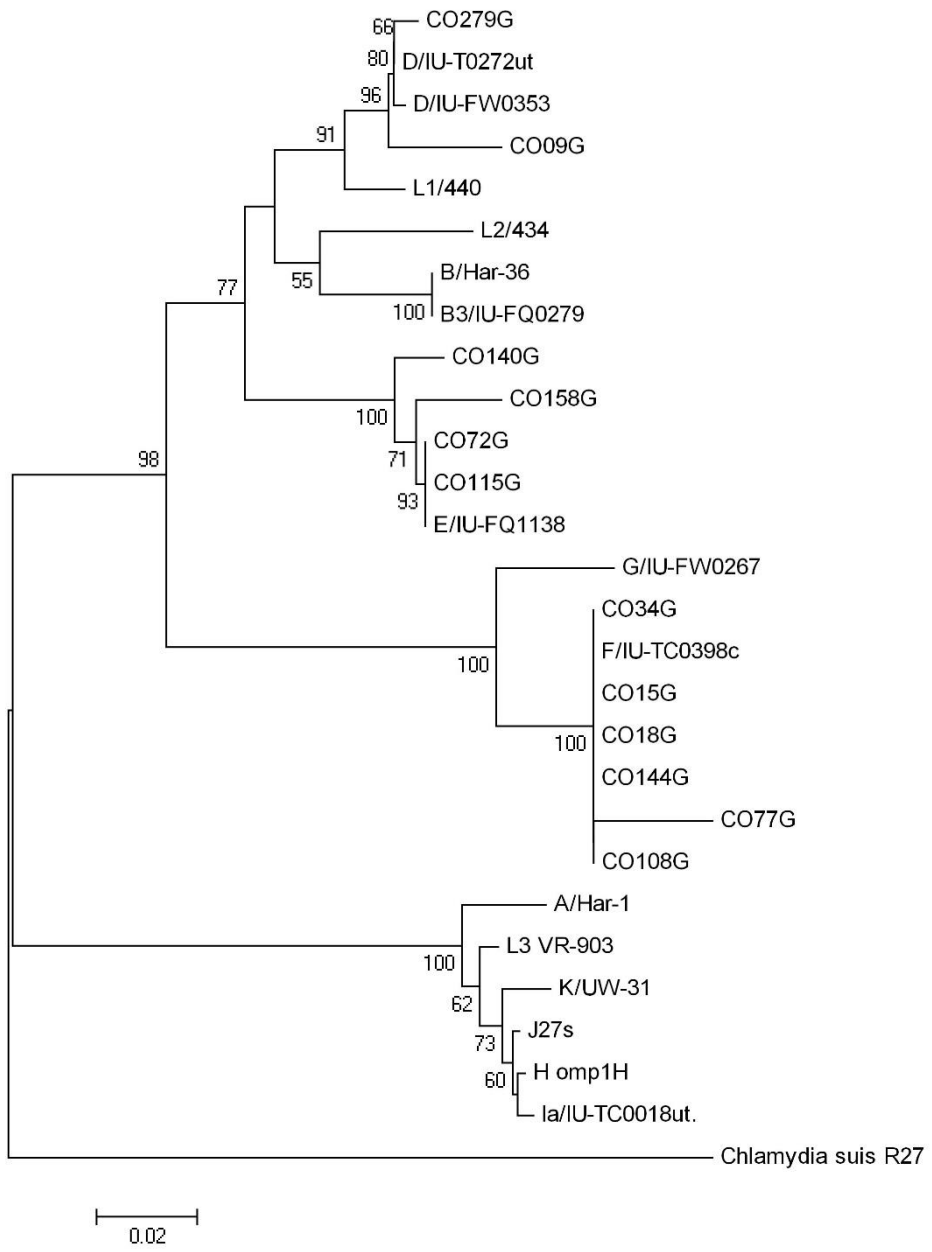


Figura 12: Dendograma obtenido del análisis de un fragmento de 590 nt del gen *ompA* de *Chlamydia*, construido por Máxima Verosimilitud utilizando GTR+G como modelo de sustitución de nucleótidos con los parámetros sugeridos por ModelTest 3.7 (software PhyML). Las secuencias que pertenecen a este estudio son denominan CO Nº G. La secuencia de *C. suis R27* se incluyó como grupo externo. Son indicados los valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) mayores a 50, en los nodos de las ramas.

Análisis de costos para las complicaciones: Conjuntivitis y Neumonía neonatal por *C. trachomatis*.

Debido a que el análisis es en base a la prevalencia de *C.trachomatis* detectada en embarazadas (10,4%), la frecuencia de transmisión (8,39), los protocolos de manejo de las correspondientes patologías (34,39,84) y el nomenclador de costos para hospitales públicos (http://infoleg.mecon.gov.ar) , se realizó sólo para las complicaciones de Neumonía y Conjuntivitis de los recién nacidos de madres infectadas; porque para las demás complicaciones del embarazo; por ej: abortos, endometritis postparto, ruptura prematura de membrana no hay reportes de la frecuencia de *C. trachomatis* como agente responsable de dichas complicaciones.

Conjuntivitis neonatal por *C. trachomatis*

Teniendo en cuenta que el 70% de los recién nacidos (RN) de madres infectadas puede colonizarse; de ellos, el 50% desarrollar conjuntivitis, y conociendo la prevalencia de *C. trachomatis en esta población vulnerable* se puede deducir el siguiente análisis:

En el Programa Municipal de Embarazo y Puerperio son atendidas 5000 embarazadas por año, sabiendo que el costo aproximado por el tratamiento de una conjuntivitis neonatal por *C. trachomatis* es de 100 dólares (Tabla 6); el gasto para tratar dicha patología ocasionada por *C. trachomatis* correspondería a 18.200 dólares por año.

Tabla 6. Gasto Anual por Conjuntivitis Neonatal por *C.trachomatis* en Embarazadas bajo Programa Municipal.

Total de embarazadas bajo Programa Municipal	Portadoras de *C. trachomatis*	Recién nacidos colonizados	Recién nacidos con Conjuntivitis	Costo del tratamiento por paciente	Costo del tratamiento para el total de la población a cargo
5000	**520**	**364**	**182**	**USD* 100**	**USD18.200**

*Dólares

Neumonía neonatal por *C. trachomatis*

Teniendo en cuenta que el 70% de los RN pueden infectarse, que el 20% de ellos puede desarrollar neumonía y conociendo la prevalencia de *C. trachomatis en esta población vulnerable* se procede al siguiente análisis:

Siendo 364 los RN que pueden infectarse, el 20% de ellos podrían desarrollar neumonías n= 73 RN y considerando que el costo por día en una unidad de neonatología de un centro de mayor complejidad del ámbito de la salud pública es de 706 dólares (USD 392 día de internación más USD 314 tratamiento surfactante), teniendo que permanecer de una semana a dos meses dependiendo el cuadro respiratorio y la prematurez del RN. El costo por una semana de tratamiento es de 4.942 dólares y en el total de la población a cargo del programa municipal generaría un gasto de 360.766 dólares por año. (Tabla 7)

Tabla 7. <u>Gasto Anual por Neumonía Neonatal por *C.trachomatis* en Embarazadas bajo Programa Municipal.</u>

Total de embarazadas bajo Programa Municipal	Portadoras de *C.trachomatis*	RN colonizados	RN con Neumonia neonatal por *C. trachomatis*	Costo del tratamiento por paciente/semana	Costo total
5000	**520**	**364**	**73**	**USD 4.942**	**USD 360.766**

Costo del "Screening" por PCR y del tratamiento antimicrobiano específico a las pacientes *C.trachomatis* positivas.

El costo de la detección de *C.trachomatis* por PCR es de 20 dólares, para realizarlo en la población general de embarazadas que se atiende bajo el programa municipal el costo total corresponde a 100.000 dólares. En cuanto al tratamiento antimicrobiano específico que se realiza con azitromicina, el costo por paciente es de 5 dólares. Y sabiendo que la prevalencia de esta ITS es del 10,4% en la población de embarazadas atendidas bajo el programa municipal; se generaría un gasto de USD 2600 dólares que correspondería al tratamiento de aquellas que resultan positivas en el tamizaje. (Tabla 8)

Tabla 8. Comparación de los gastos totales anuales ocasionados por las complicaciones en el RN infectado por *C.trachomatis* y por el Screening de las embarazadas.

	Costo anual ocasionado pos las complicaciones Conjuntivitis y Neumonía	Costo del "Screening" por PCR al total de las embarazadas bajo Programa Municipal y del tratamiento antibiótico a las positivas.
Costo anual ocasionado por la Neumonía neonatal por *C. trachomatis (Internación, tratamiento)*	**USD 360.766**	
Costo anual ocasionado por la Conjuntivitis neonatal ocasionado por *C.trachomatis (Tratamiento)*	**USD 18.200**	
Total de gasto anual	**USD 378.966**	**USD 102.600**

6.- DISCUSIÓN

La infección genital por *Chlamydia trachomatis* es considerada en la actualidad una de las causas más frecuentes de infecciones transmisibles sexualmente (ITS) a nivel mundial y afecta principalmente al grupo de jóvenes menores de 25 años. En la mujer puede producir secuelas obstétricas serias durante el embarazo, así como en el recién nacido al pasar a través del canal de parto.

La prevalencia de infección por *C. trachomatis* en embarazadas difiere en distintas regiones del mundo, presenta valores de 0,1% a 25,7% según la población estudiada (95, 111). En Europa, la tasa más baja de prevalencia se reportó en el Reino Unido (2,4%) (83), seguido de Alemania (3,1%) (14) y los Países Bajos (6,4%) (96). En los grupos etarios de menos de 25 años se observaron tasas de prevalencia más elevadas con un 6,1% en Alemania (14), 8,6% en el Reino Unido (83) y el 11,8% en Portugal. (16)

Otros estudios reportaron una prevalencia de *C. trachomatis* en embarazadas menores de 24 años de 3,2% en Australia (28), 6,8% en los EE.UU. (104), y 9,8% en Brasil (93)

Este es el primer reporte de la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* (10,4%) y de sus genotipos en embarazadas síntomáticas y asintomáticas de nuestra región. La prevalencia resultó ser superior a la informada en otras regiones pero coincide con otros reportes en haber sido diagnosticada principalmente en menores de 25 años (32), encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre el aislamiento de *C. trachomatis* y este rango etario, considerando ese rango etario un importante factor de riesgo para la adquisición de la infección por *C. trachomatis.*

Es importante señalar que la población estudiada respecto a su situación sociodemográfica y socio-económica, puede ser considerada de clase media baja, solo el 32,3 % completó los estudios secundarios y la mayoría de las mujeres reciben mensualmente algún tipo de asignación familiar, en su mayoría (98%) reciben la asignación universal por hijo. Podemos considerar al igual que otros reportes, el nivel socio económico bajo como un factor de riesgo descripto para la adquisición de la infección por *C.trachomatis*. (31)

Como se mencionó anteriormente la microbiota vaginal representa uno de los factores más importantes que posee el tracto genital para enfrentar a los microorganismos patógenos, en este trabajo no se observó asociación significativa entre la presencia de vulvovaginitis y la detección de *Chlamydia trachomatis*, esto puede deberse a que en el Programa de Control de Embarazo Municipal está incluido un estudio de flujo vaginal antes de la semana 21 de embarazo para diagnosticar y tratar la Vaginosis Bacteriana, evitando así las complicaciones que esta entidad produce durante el embarazo.(2, 108)

El CDC recomienda hacer pruebas de detección de *C.trachomatis* en la primera visita prenatal y repetir las pruebas en el tercer trimestre si la mujer es menor de 25 años o pertenece a un grupo de alto riesgo. Los países que han implementado estas recomendaciones disminuyeron la prevalencia de *esta ITS*. (41). En nuestro estudio la detección fue realizada durante el tercer trimestre de embarazo, existen trabajos que demostraron que el tratamiento de las infecciones por *C.trachomatis* en este periodo pueden prevenir complicaciones posnatales maternas y neonatales (32, 90, 115), además es importante destacar el beneficio de realizar la toma de muestra para investigar *C.trachomatis* en forma conjunta con el "Screening" del Estreptococo beta hemolítico Grupo B (*S. agalactiae*).

Por último la reacción de PCR comparada con otras técnicas de diagnóstico ofrece la mayor garantía para la detección de *C. trachomatis* en poblaciones asintomáticas ofreciendo una alta sensibilidad y especificidad. (S: 90-95%, E: 98-99%) (114)

La prevalencia de los diferentes genotipos de *C. trachomatis* fue determinada en muchos países, obteniéndose como resultado las siguientes prevalencias: genotipo D (5-48%), E (22-44%) y F (8-20%) predominando éstos en las infecciones urogenitales, mientras que los genotipos: G (4-7%), Ga, H (<5%), I (6%), Ia, J (5-13%), y K (5-10%) resultaron menos frecuentes. Eventualmente pueden encontrarse genotipos B y Ba (77). Según otros estudios, los genotipos más tradicionales en pacientes con infección urogenital son E, F, D, G y K, constituyendo entre el 60 y 80% de los pacientes positivos (101)

Un estudio realizado en Córdoba, Argentina, reportó que en muestras provenientes de jóvenes asintomáticos y sexualmente activos, el genotipo E era el más frecuente (73%), seguido del genotipo D (16%), y con menor frecuencia los genotipos F y G (5%). (32, 33) Mientras que en nuestro estudio; los genotipos F (35%) y E (29%) de *C.trachomatis* fueron los encontrados más frecuentemente en las muestras de las embarazadas; seguidos por los genotipos D (12%); L2 (12%); B (6%) y G (6%).

Por otra parte, en un trabajo realizado en la provincia de Buenos Aires a partir de muestras positivas para la infección por *C.trachomatis* de pacientes adultos y neonatos con "ophthalmia neonatarum", el genotipo E fue el más prevalente independientemente del origen de la muestra (46%), seguido por el genotipo D (19%) y F (15%) en adultos, y G (9%) y D (8%) en recién nacidos. Además, se obtuvo un 2,5% del genotipo Ja en muestras endocervicales, mientras que en las muestras correspondiente a neonatos y pacientes masculinos este genotipo no estuvo presente. (78)

En líneas generales, nuestros resultados coinciden con lo reportado en la mayoría de los estudios publicados, tanto en Argentina (71,78) como en otros países del mundo, en los cuales se detecta una mayor prevalencia de los genotipos E, D y F en infecciones genitales. No obstante, es importante hacer notar que diferimos con respecto a la bibliografía consultada en cuanto al hallazgo del genotipo B, fenómeno que no se da habitualmente.

En relación al análisis filogenético, el árbol construido mostró tres grandes subdivisiones, en las cuales las ramas principales no coinciden con los tropismos tisulares y patrones de presentación clínica asociada a la infección por *C.trachomatis* en hospedadores humanos. Se obtuvo una distribución de genotipos similar a lo descripto por Brunelle et al (17), en la caracterización filogenética del gen *ompA*, donde proponen que existe una tendencia marcada en la agrupación de los serovares, que no está relacionado con el tropismo tisular. Resultados análogos fueron obtenidos por Monetti et al (77) y Lutter et al.(65), quien además propone que la variabilidad de MOMP se debe a la antigenicidad de ésta y a la presión selectiva del sistema inmune.

Los programas de “screening” tienen como objetivo la reducción de la morbilidad en los individuos mediante la detección temprana, el tratamiento específico oportuno y la disminución de la prevalencia general de infección en la población.

La mayoría de las evaluaciones económicas en salud han demostrado que la tamización de *C. trachomatis* en embarazadas es costoefectiva. (13, 77)

Los análisis del screening oportunista han mostrado ser rentables para las infecciones con prevalencias entre el 2% y el 8% (4) por lo tanto la implementación del “screening” en nuestra población de embarazadas menores de 25 años sería costo/beneficio adecuado, siendo beneficioso no sólo para la embarazada también para su pareja, el recién nacido e indirectamente para la población en general.

Estudios realizados en África y Francia concluyeron que el “screening” prenatal implica mayores beneficios para la salud materna e infantil, presentando análisis de costo beneficio aceptable, especialmente cuando el estudio es restringido a las mujeres menores de 25 años. (32, 90)

Muchos trabajos reportan que los síntomas y signos clínicos no son predictivos de *C. trachomatis* y que un enfoque sindrómico no logra identificar a las mujeres embarazadas infectadas (36, 43, 62). Además el tratamiento empírico de esta infección elevaría el costo en aquellas pacientes no infectadas y que además podrían; eventualmente, inducir la resistencia bacteriana.

Los gastos que ocasionan anualmente solo la atención de las complicaciones de neumonía y conjuntivitis neonatal por *C.trachomatis* superan los USD 378.966 requiriendo prestaciones de alta complejidad, recursos humanos muy calificados, tecnologías avanzadas e insumos farmacéuticos de alto costo. Además en el análisis de costo no se incluyeron los gastos que ocasionan las complicaciones: ruptura prematura de membrana, nacimiento prematuro y aborto espontáneo, lo cual elevaría aun más el gasto que debería afrontar el sistema de salud, si se tiene en cuenta que cada una de estas complicaciones tiene un costo por paciente de USD 278, USD 4.942/semana, USD 115 respectivamente. También deben incluirse los gastos en la economía familiar que estas complicaciones ocasionan, como también el costo moral que generan en las mujeres. Siendo de USD 100.000 el costo del “screening” mediante

biología molecular al total de embarazadas bajo programa municipal por año, podemos concluir que el mismo es costo beneficio aceptable en nuestra población en estudio.

7.- CONCLUSIÓN

Estos resultados proporcionan los primeros datos sobre prevalencia de *Chlamydia trachomatis* (10,4%) en embarazadas asistidas en centros de salud municipales de la ciudad de Córdoba.

Nuestro trabajo muestra que las pacientes embarazadas menores de 25 años y con bajo nivel socioeconómico son un grupo de alto riesgo para la infección por *C.trachomatis.* Conociendo las consecuencias que esta infección trae aparejada y que la manera más efectiva de prevenir las complicaciones es el diagnostico y tratamiento oportuno de la mujer embarazada, se justifica la necesidad de incluir el diagnostico de esta bacteria en los programas de screening de esta población particular.

El grupo de pacientes menor de 25 años mostró asociación significativa con la presencia de *Chlamydia trachomatis,* identificándose como grupo de riesgo. La detección temprana; principalmente en mujeres menores de 25 años, y el tratamiento específico de esta infección bacteriana en el embarazo reduciría los riesgos de morbilidad tanto del recién nacido como de la madre.

Se puede considerar que el "screening" es costo- beneficio adecuado cuando los costos relacionados con el diagnóstico y el tratamiento de las secuelas tardías supere o al menos compense en gran medida los costos relacionados con la logística de la detección y el tratamiento de los casos positivos. En nuestro estudio el tratamiento de las complicaciones supera el gasto que ocasionaría el "screening" en las mujeres embarazadas.La prevalencia encontrada es superior a la publicada en otros lugares del mundo que han decidido incorporar el "screening" de *C. trachomatis* en embarazdas, obteniendo una reducción importante de la infección por *C. trachomatis* y de sus complicaciones.

Es recomendable la detección precoz de *C. trachomatis* en embarazadas, utilizando técnicas sensibles y especificas como la PCR, para reducir la incidencia de complicaciones en la mujer y el RN. Es importante resaltar que a las complicaciones intrínsecas a la infección por *C. trachomatis*, se suman otras complicaciones potenciales, debido a que la infección por *Chlamydia trachomatis* predispone a la

adquisición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del papiloma humano (HPV), por lo cual la investigación de *C. trachomatis* cobra cada vez mayor relevancia en el impacto de la salud pública. El diagnóstico y el tratamiento de la infección por *Chlamydia trachomatis* durante el tercer trimestre del embarazo puede prevenir la infección del recién nacido. Por lo tanto, la detección preventiva debe ser vista como una prioridad para la detección precoz de la infección por *C. trachomatis* como parte de las estrategias de salud pública locales.

RECOMENDACIONES

La infección por *Chlamydia trachomatis* impone una carga económica sustancial en el sistema de atención de la salud. Dadas las consecuencias mórbidas en neonatos y embarzazadas se sugiere que:

Las mujeres embarazadas deben ser controladas en el tercer trimestre conjuntamente con el screening de *Streptococcus agalactiae*.

Los esfuerzos deben incluir: la educación, la disminución de las barreras a la atención, promoción de la detección de rutina de *Chlamydia trachomatis*, el tratamiento rápido y eficaz de las personas infectadas y sus parejas.

Es recomendable que el “screening” sea incorporado en los Programas de Control de Embarazo y Puerperio de la Municipalidad de Córdoba para disminuir la transmisión de este patógeno, garantizar un tratamiento oportuno y evitar las complicaciones en la salud reproductiva de las mujeres afectadas y sus hijos.

Se debería realizar otro estudio para determinar la frecuencia con que *Chlamydia trachomatis* produce complicaciones en las embarazadas y sus RN, como asi también evaluar la efectividad del tratamiento en las embarazadas positivas para *Chlamydia trachomatis*.

En Argentina la prevalencia de *C. trachomatis* en el recién nacido es desconocida y es probablemente una infección subdagnosticada, la cual se debería

investigar como agente etiológico de conjuntivitis y neumonía durante el primer año de vida

Los resultados de este estudio indican que la Municipalidad de Córdoba puede mejorar sustancialmente la gestión de *C. trachomatis* en atención prenatal. Los cambios en las estrategias de diagnóstico y tratamiento pueden mejorar la salud materna e infantil, así como el uso de recursos económicos.

8.- BIBLIOGRAFIA

1. Alexander ER, Harrison HR. 1983. Role of *Chlamydia trachomatis* in perinatal infection. Rev Infect Dis. 5:713-9.
2. Allsworth J, Peipert J. 2011. Severity of Bacterial Vaginosis and the Risk of Sexually Transmitted Infection". Am J Obstet Gynecol. 205(2): 113.e1–113.
3. Amsel R, Totten P, Spiegel C, Chen K, Eschebach D, Holmes KK. 1983. Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial epidemiologic associations. Am J Med .74: 14-22.
4. Arango I, Máttar S, Visbal J. 2001. *Chlamydia trachomatis:* Aspectos Microbiológicos, Clínicos y Epidemiológicos. Revista MVZ Córdoba, Montería, Colombia. 6(2):87-96.
5. Arráiz R, Ginestre P, Castellano G, Perozo M, Urdaneta V. 2006. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de hisopado endocervical por inmunofluorescencia directa y reacción en cadena de la polimerasa. Rev Soc Ven Micobiol. 26(1):14-8.
6. Arráiz N, Marcucci R, Colina S, Reyes F, Rondón N, Bermúdez V, Reyna N. 2008. Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres consultantes en Maracaibo, Venezuela. Rev salud públic. 10(4):615-24.
7. Australia's notifiable diseases status, 2010: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. Department of Health. Australian Government. Communicable Diseases Intelligence (CDI). 2012; 36(1).
8. Barnes RC. 1989. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin Microbiol Rev. 2:119-36.
9. Barnett ED, Klen JO. 2006. Bacterial infections of the respiratory tract. In: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. Remington JS, Klein JO, eds. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders Co; 2006:297-317.
10. Bassiri M. 1995. Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from women by ligase chain reaction. J Clin Microbiol. 4: 898-900.

11. Bilardi J; De Guingand D; Temple-Smith M; Fairley C; Grover S; Wallace E; Hocking J; Tabrizi S; Pirotta M; Chen M. 2010. Young pregnant women's views on the acceptability of screening for chlamydia as part of routine antenatal care. BMC Public Health.10: 505.
12. Black CM. 1997. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev. 10:160–84.
13. Blatt AJ, Lieberman JM, Hoover DR, Kaufman HW. 2012. Chlamydial and gonococcal testing during pregnancy in the United States. Am J Obstet Gynecol. 207(1):55.e1-8.
14. Bohm I, et al. *Chlamydia trachomatis* screening program employing semi-automated real-time PCR: results and perspectives. J Clin Virol 2009; 46 S3:S27-32.
15. Borborema-Alfaia AP, Freitas NS, Astolfi Filho S, Borborema-Santos CM. 2013. *Chlamydia trachomatis* infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance. Braz J Infect Dis. 17(5):545-50.
16. Borges-Costa J, Matos C, Pereira F. 2011. Sexually transmitted infections in pregnant adolescents: prevalence and association with maternal and foetal morbidity. J Eur Acad Dermatol Venereol. 26: 972-5.
17. Brunelle BW, Sensabaugh GF. 2012. Nucleotide and phylogenetic analyses of the *Chlamydia trachomatis ompA* gene indicates it is a hotspot for mutation. BMC Res Notes. 5:53.
18. Cabeza J, García PJ, Segura E, García P, Escudero F, La Rosa S, León S, Klausner JD . 2014. Feasibility of *Chlamydia trachomatis* screening and treatment in pregnant women in Lima, Peru: a prospective study in two large urban hospitals. Sex Transm Infect. 91(1):7-10.
19. Cacho J, Sanz F, Blanco MA. 2001. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: Necesidad Urgente de Detección y Tratamiento en mujeres. Enferm. Infect Microbiol Clin. 19; 419-421.
20. California STD/HIV Prevention Training Center. Sexually transmitted *Chlamydial* infections 2004.

http://www.stdhivtraining.net/pdf/Chlamydia_Screen.pdf.

21. Canto-de Cetina T, Polanco-Reyes L, Fernández-González V, Ruiz-García S. 2003. Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. Salud Pública Mex. 45(5):657-61.
22. Cárcamo CP, Campos PE, García PJ, Hughes JP, Garnett GP, Holmes KK. 2012. Prevalences of sexually transmitted infections in young adults and female sex workers in Peru: a national population-based survey. Lancet Infect Dis. 12(10):765-73.
23. Centers for Disease Control and Prevention. Guiderlines for treatment of sexually transmitted disease. Morbility and Mortaly Weekly reports 1998; 42:1-102.
24. Center for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. Atlanta, USA. 2010.
25. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Grand Rounds: *Chlamydia* prevention: challenges and strategies for reducing disease burden and sequelae. MMWR 2011; 60(12):370-3.
26. Center for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. 2012.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2014.
28. Chen MY, Fairley CK, De Guingand D, Hocking J, Tabrizi S, Wallace EM, Grover S, Gurrin L, Carter R, Pirotta M, Garland S. 2009. Screening pregnant women for *chlamydia*: what are the predictors of infection? Sex Transm Infect 2009; 85:31-5.
29. Chojnacka K; Szczapa J; Kedzia W. 2012. Perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis* and its complication in preterm infants. Ginekol Pol. 83(2):116-21.
30. Claeys P, Gonzalez C, Gonzalez M, Van Renterghem L, Temmerman M. 2002. Prevalence and risk factors of sexually transmitted infections and cervical neoplasia in women's health clinics in Nicaragua. Sex Transm Infect. 78(3):204-7.

31. Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22(5):299-305.
32. Cuffini C, Bottiglieri M, Kiguen X, Alonso CE, Valdes Deimundo R, Isa MB, Cannistraci R, Gonzalez S, Farinati A. 2012. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic adolescent-young people. J Microbiol Research. 2(4):114-7.
33. Dal Conte I, Mistrangelo M, Cariti C, Chiriotto M, Lucchini A, Vigna M, Morino M, Di Perri G. 2014. Lymphogranuloma venereum: an old, forgotten re-emerging systemic disease. Panminerva Med. 56(1):73-83.
34. De Haro-Cruz MJ, Deleón-Rodriguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, Guerra-Infante FM. 2011. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens of infertile Mexican women. Enferm Infecc Microbiol Clin. 29(2):102-8.
35. Deluca GD, Marin HM, Schelover E, Chamorro EM, Vicente L, Albhom M, Alonso JM. 2006. Infecciones por *Chlamydia trachomatis y Papilomavirus* en mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino. MEDICINA (Buenos Aires). 66: 303-6.
36. Di Bartolomeo S, Entrocassi AC, Gallo Vaulet ML, Montenegro G, Rodríguez Fermepin M. 2011. Elevada frecuencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres jóvenes y adolescentes. Rev Soc Arg Ginecol Inf Juv.18 (2).
37. Di Bartolomeo S1, Rodríguez M, Sauka D, Alberto De Torres R. 2001. Microbiologic profile in symptomatic pregnant women's genital secretions in Gran Buenos Aires, Argentina. Enferm Infecc Microbiol Clin. 19(3):99-102.
38. Duarte C, Soilán AM. 2011. Detección de *Chlamydia trachomatis, esporos micóticos y Trichomonas vaginalis* en mujeres en edad fértil que acuden a los Hospitales San Pablo y Regional de San Lorenzo. Rev Nac (Itauguá). 3(2):36-42.
39. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2011. Stockholm: ECDC; 2013.

40. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.
41. Everett K; Bush RM; Andersen AA. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov.*, each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol. 49:415-40.
42. Farinati A, Zitto T, Bottiglieri M, Gastaldello R, Cuffni C, Cannistraci R, Gonzalez S, Tossorono D, Isa MB, Pavan J, Lopez H. 2008. Infecciones asintomáticos por *Chlamydia trachomatis* un problema controlable en la población adolescente. Rev Panam Infectol. 10(1):8-12.
43. Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia. www.fasgo.org.ar.
44. Fermepin MR, Entrocassi AC, Sauka DH, Vaulet ML Corominas AL. 2007. *Chlamydia trachomatis* serovars in Buenos Aires, Argentina: predominance of serovar E in ophthalmia neonatorum. Sex Transm Dis. 34:1041.
45. Fosch S, Fogolín N, Azzaroni E, Pairetti N, D´Ana L, Minacori H, Tita I, Redona M, Gribaudo G. 2006. Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos. Rev Argent Microbiol. 38(4):202-5.
46. Frontela Noda M, Rodríguez Marín Y, Verdejas Varela OL, Valdés Martínez FJ. 2006. Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres cubanas en edad reproductiva. Rev Cubana Endocrinol. 17(2).
47. Gaston de Leo. 2013. Costo de Atención de los Recién Nacidos en un Hospital Público General Interzonal de la Provincia de Bs As. Rev Arg Salud Pública. 4 (17): 6-12.
48. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. 2001. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. J Infect Dis. 184:879-84
49. Geisler WM, Wang C, Morrison SG, Black CM, Bandea CI, Hook EW 3rd. 2008. The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the

interval between screening and returning for treatment. Sex Transm Dis. 35:119–23.

50. Gorka Barrenetxea Ziarrusta. 2002. “Vulvovaginitis candidiásica”. Rev Iberoam Micol. 19: 22-24.
51. Gottlieb S.L, Haggety C, Taylor I, Low N, Xu F, Ness R. 2010. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. J Infect Dis. 20: 134-155.
52. Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 52(5):696–704.
53. Haggerty CL; Gottlieb CL; Taylor B; Low N; Xu F; Ness R. 2010. Risk of Sequelae after *Chlamydia trachomatis* Genital Infection in Women. J Infect Dis. 201(S2):S134–S155.
54. Hickey, Roxana J. 2012. “Understanding Vaginal Microbiome Complexity from an Ecological Perspective.” Transl Res. 160(4):267-82. doi: 10.1016/j.trsl.2012.02.008.
55. Hofmeyr GJ. Administración prenatal de corticoesteroides para mujeres con riesgo de parto prematuro: Comentario de la BSR (última revisión: 2 de febrero de 2009). La Biblioteca de Salud Reproductiva de la OMS; Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
56. Huneeus A, Pumarino MG, Schilling A, Robledo P, Bofil M. 2009. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes chilenas. Rev méd Chile. 137(12):1569-74.
57. Huson DH, Richter DC, Rausch C, Dezulian T, Franz M, Rupp R. 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. BMC Bioinformatics. 8(1):460.
58. Kakar S, Bhalla P, Maria A, Rana M, Chawla R, Mathur NB. 2010. *Chlamydia trachomatis* causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. Indian J Med Microbiol. 28: 45-7.
59. Kortekangas-Savolainen O. 2012. Hospital-Diagnosed Late Sequelae after Female *Chlamydia trachomatis* Infections in 1990-2006 in Turku, Finland. Gynecol Obstet Invest. 73(4):299-303.

60. Krieg NR. 2010. Bergey´s Manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Co. Baltimore. Vol 4 pag 843-846.
61. Lan J; Walboomers JMM; Roosendaal R; Van Doornum GJ; MacLaren DM; Meijer CJ; Van den Brule AJ. 1993. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Micriobiol. 31:1060-5.
62. Lau CY, Qureshi AK. 2002. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. Sex Transm Dis. 29:497-502.
63. Linda O. Eckert, M.D.2006. Acute Vulvovaginitis. N Engl J Med; 355:1244-1252
64. López-Hurtado M; Guerra-Infante F. 2002. Papel de los Anticuerpos en el Desarrollo de la Infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el Diagnóstico. Perinatol Reprod Hum.16: 140-150.
65. Lutter EI, Bonner C, Holland MJ, Suchland RJ, Stamm WE, Jewett TJ, McClarty G, Hackstadt T. 2010. Phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* Tarp and correlation with clinical phenotype. Infect Immun. 78(9): 3678-88.
66. Machado MS; Costa e Silva BF; Gomes IL; Santana IU; Grassi MF. 2012. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. Braz J Infect Dis. 16:188-91.
67. Mackern Oberti JP; Motrich R; Breser M; Sanchez L; Cuffini C; Rivero V. 2013. *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: An update. J. Reprod. Immunol. 100: 37-53.
68. Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M. 2013. Genital *Chlamydia trachomatis*: An update. Indian J Med Res. 138(3):303-16.
69. Mallinson H, Hopwood J, Skidmore S, Phillips C, Jones I. 2002. Provision of *Chlamydia* testing in a nationwide service offering termination of pregnancy: with data capture to monitor prevalence of infection. Sex Transm Infect. 78(6): 416–421. doi: 10.1136/sti.78.6.416

70. Mandell GL. Enfermedades por Chlamydias. En: Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. Cuarta edición. Capítulo 157. Editorial Médica Panamericana 1995. p. 1502-1518.
71. Marazzo J, Martin D. 2007. Management of woman with cervicitis. Clin Infect Dis. 44:102-110.
72. Martin R, Soberon N, Vazquez F, Suarez JE. 2008. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26(3):160-7.
73. Martins J, Ribeiro L, Correira de Aguiara JM, Garrote Marcosa M. 2011. Infección por *Chlamydia trachomatis* en el primer año de vida. Anales de Pediatría. 74(5):298-302.
74. Mastromarino P, Di Pietro M, Schiavoni G, Nardis C, Gentile M, Sessa R. 2014. Effects of vaginal lactobacilli in *Chlamydia trachomatis* infection. Int J Med Microbiol. 304(5-6):654-61. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.006.
75. Matsumoto A, Izutsu H, Miyashita N, Ohuchi M; 1998. Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma. J Clin Microbiol; 36(10):3013-9.
76. Moncada J, Schachter J, Bolan G, Engelman J, Howard L, Mushahwar I, Ridgway G, Mumtaz G, Stamm W, Clark A. 1990. Confirmatory assay increases specificity of the Chlamydiazyme test for *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix. J Clin Microbiol. 28:1770-3.
77. Monetti MS, Molina R, Estofan P, Frutos MC, Kiguen AX, Venezuela RF, Paglini G, Cuffini C. 2013. Distribution of *Chlamydia trachomatis* genotypes in infertile patients of Córdoba, Argentina. IJVMB. 2(1):1-6.
78. Motrich RB, Cuffini C, Mackern Oberti JP, Maccioni M, Rvro V. 2006. *Chlamydia trachomatis* occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. J. of Infect. 53: 175-183.
79. Moulder JW. 1984. Chlamydiales. In: Bergey`s Manual of Sistematic Bacteriology, Vol 1. Krieg NR, Holt JG, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
80. Mylonas I. 2010. Female genital *Chlamydia trachomatis* infection: where are we heading?. Arch Gynecol Obstet. 285(5):1271-1285.

81. Nissen MD. 2007. Congenital and neonatal pneumonia. Paediatr Respir Rev. 8(3):195-203.
82. Nugent R, Krohn M, Hillier S. 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol . 29: 297-301.
83. Oakeshott, P., Hay, P., Hay, S., Steinke, F., Rink, E., Thomas, B., Kerry, S. 2002. Detection of *Chlamydia trachomatis* infection in early pregnancy using self-administered vaginal swabs and first pass urines: a cross-sectional community-based survey. Br J Gen Pract. 52(483):830-2.
84. Oliveira Araújo F; Pfleger V; Lang K; Heukelbach J; Miralles I; Fraga F; Queiroz Sousa A; Stoffler-Meilicke M; Ignatius R; Sansigolo Kerr LF; Feldmeier H. 2007. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 102(6):751-6.
85. OMS, 59 ª Asamblea Mundial de la Salud. A 59/11. Mayo 2006. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59-REC1/s/Anexo2-sp.pdf.
86. Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg-Arska M, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP, van Loon AM. 1992. Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol. 30:2122–8.
87. Ostos Ortiz O; Melida R. 2003. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. Nova-Publicacion Cientifica. 1(1): 1-116.
88. Ovalle A, Martínez MA, de la Fuente F, Falcon N, Feliú F, Fuentealba F y Gianini R.2012. Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres embarazadas atendidas en un hospital público de Chile. Rev Chilena Infectol. 29 (5): 517-520.
89. Paavonen J. 2012. *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract: State of the art. Annals of Medicine. 44: 18-28.
90. Pájaro MC, Barberis IL, Godino S, Pascual L, Agüero M. 2001. Epidemiology of sexually transmitted diseases in Río Cuarto, Argentina. Rev Latinoam Microbiol. 43(4):157-60.

91. Paris M, Gotuzzo E, Goyzueta G, Aramburu J, Caceres CF, Castellano T, Jordan NN, Vermund SH, Hook EW 3rd. 1999. Prevalence of *gonococcal and chlamydial* infections in commercial sex workers in a Peruvian Amazon city. Sex Transm Dis. 26:103-7.
92. Piazzetta RCPS, Carvalho NS, Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. 2011. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 33(11): 328-33.
93. Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocêncio LA, Miranda AE. 2011. *Chlamydia trachomatis* Prevalence and Risk Behaviors in Parturient Women Aged 15 to 24 in Brazil. Sex Transm Dis. 38; 957-961.
94. Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 1998; 14(9):817–818.
95. Ramos, B. R., Polettini, J., Marcolino, L. D., Vieira, E. P., Marques, M. A., Tristao, A. R. & Silva, M. G. 2011. Prevalence and risk factors of *Chlamydia trachomatis* cervicitis in pregnant women at the genital tract infection in obstetrics unit care at Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, Brazil. J Low Genit Tract Dis. 15(1):20-4. doi: 10.1097/LGT.0b013e3181ed3d58.
96. Rours, G. I. J. G., Verkooyen, R. P., Willemse, H. F. M., van der Zwaan, E. A. E., van Belkum, A., de Groot, R., Ossewaarde, J. M. 2005. Use of Pooled Urine Samples and Automated DNA Isolation To Achieve Improved Sensitivity and Cost-Effectiveness of Large-Scale Testing for *Chlamydia trachomatis* in Pregnant Women. J Clin Microbiol. 43(9), 4684–4690. doi:10.1128/JCM.43.9.4684-4690.
97. Sachse, K., & Hotzel, H. 2002. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by Nested-PCR. Methods Mol Biol. 216, 123–136.
98. Saison F, Mahilum-Tapey L, Michel CE, Buttress ND, Nadala B, Magbanua JP, Harding-Esch EM, Vaillaruel MO, Canong L, Celis RL, Lee HH. 2007. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection and performance of Chlamydia rapid tests among low- and high-risk Filipino women in resource-limited settings. J Clin Microbiol. 45:4011-7.

99. Salomon MC, Martinez N, Delgado D, Gonzalez Arra C, Bittar V, Gonzalez N. 2011. “Prevalencia de *Trichomonas vaginalis* en Trabajadores Sexuales”. MEDICINA (Buenos Aires).71: 429-431.

100. Sánchez RM, Ruiz-Parra AI, Ostos-Ortiz OL. 2006. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* detectada por reacción en cadena de la polimerasa en un grupo de mujeres jóvenes sintomáticas y asintomáticas en Bogotá, Colombia. Rev Colomb Obstet Ginecol. 57(3):171-81.

101. Schachter J, Osoba AO. 1983. Lymphogranuloma venereum. Br Med Bull. 39:151-4.

102. Schachter J. 1989. Why we need a program for the control of *Chlamydia trachomatis*. N Engl J Med. 320(12):802-4.

103. Schachter J, Hook WE, Martin DH, Willis W, Fine P, Fuller D, Jordan J, Janda WM, Chernesky M. 2005. Confirming positive results of Nucleic Acid amplification tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: All NAATs are not created equal. J Clin Microbiol. 43:1372-3.

104. Silveira MF, Erbelding EJ, Ghanem KG, Johnson HL, Burke AE, Zenilman JM. 2010. Risk of *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy: effectiveness of guidelines-based screening in identifying cases. Int J STD AIDS. 21:367-70.

105. SOGIBA. Sociedad de Ginecología y Obstetricia Bs As. www.sogiba.org.ar.

106. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 24: 1596-1599.

107. Tavares MC. 2014. *Chlamydia trachomatis* infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. Mol Biol Rep. 41(2): 865-74.

108. Turovskiy Y, Sutyak K , Chikindas M. 2011. The etiology of bacterial vaginosis”. J Appl Microbiol. 110(5): 1105–1128.

109. Vaccarella S; Lortet-Tieulent J; Plummer M; Franceschi S; Bray F. 2013. Worldwilde trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. Eur. J Cancer. 49(15):3262-73 .

110. Vajdic CM, Middleton M, Bowden FJ, Fairley CK, Kaldor JM. 2005. The prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* in Australia 1997-2004: a systematic review. Sex Health. 2(3):169-83.

111. Vidwan, N. K., Regi, A., Steinhoff, M., Huppert, J. S., Staat, M. A., Dodd, C. & Verghese, V. 2012. Low prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in non-urban pregnant women in Vellore, S. India. PLoS One. 7(5):e34794. doi: 10.1371/journal.pone.0034794.

112. Villegasa E; Sollozano A; Camacho A; Gutierrez J. 2008. *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26(10):627-35.

113. Walboomers J.M.M. 1993. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 31:1060–1065.

114. Wang SP; Kuo CC; Barnes RC; Stephens RS; Grayston JT.1985. Inmunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. J Infect Dis. 152:791-800.

115. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR 17; 59(RR-12):1-110.

116. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012.

117. Youder Bl, Stamm WE, Koester CM, Alexaner ER. 1981. Microtest procedure for isolation of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol. 13:1036-9.

118. Zheng Zhang S, Schwartz L, Wagner & Webb M. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 7(1-2):203-214.

119. Zhou, X. 2010. “Recent Advances in Understanding the Microbiology of the Female Reproductive Tract and the Causes of Premature Birth.” Infect Dis Obstet Gynecol. Volume 2010, Article ID 737425. doi: 10.1155/2010/737425.