



Caracterización genética de cepas de Chlamydia trachomatis detectadas en poblaciones vulnerables, de la Ciudad de Córdoba

Ana Ximena Kiguen.

Tesis - Doctor en Medicina y Cirugía - 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 Prosecretaría 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



Caracterización genética de cepas de Chlamydia trachomatis detectadas en poblaciones vulnerables, de la Ciudad de Córdoba by Ana Ximena Kiguen is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

**Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas
en poblaciones vulnerables, de la Ciudad de Córdoba**

Trabajo de Tesis de Doctorado en Medicina y Cirugía

Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

Ana Ximena Kiguen

2016

Comisión de Tesis de Doctorado

DIRECTOR

Prof. Dra. Cecilia Gabriela Cuffini

CO-DIRECTOR

Prof. Dr. Hugo Luis Pizzi

MIEMBRO

Prof. Dr. Jorge Victorio Paván

Índice

Agradecimientos	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	IX
Capítulo I. Introducción	
1.0 Introducción	
1.1 Taxonomía	3
1.2 Biología de <i>Chlamydia trachomatis</i>	
1.2.1 Ciclo de multiplicación	6
1.2.2 Estructura Antigénica y factores de virulencia	7
1.2.2.1 Lipopolisacárido	7
1.2.3 Proteínas de membrana externa	7
1.2.3.1 Proteína Mayor de membrana	7
1.2.3.2 Proteínas polimórficas de membrana externa	7
1.2.3.3 Complejo proteico de membrana externa	8
1.2.4 Proteínas del proceso celular	8
1.2.4.1 Proteínas “hsp” de stress térmico	8
1.2.4.2 Sistema de secreción tipo III	8
1.2.5 Genoma	9
1.3 Infecciones producidas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
1.4 Diagnóstico	
1.4.1 Aislamiento en cultivo celular	12
1.4.2 Detección de Antígenos	12
1.4.3 Detección de ácidos nucleicos	12
1.4.4 Amplificación de ácidos nucleicos	13
1.4.5 Determinación de anticuerpos	14
1.5 Tratamiento	14
1.6 Importancia del estudio de <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
2.0 Antecedentes	16
3.0 Objetivos	
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos específicos	21
Capítulo II. Materiales y Métodos	
4.0 Materiales y Métodos	
4.1 Poblaciones de estudio	23
4.1.1 Niños con sospecha de abuso sexual	23
4.1.2 Embarazadas	24
4.2 Validación de la técnica de Biología molecular para la determinación de <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
4.3 Determinación de la presencia de <i>Chlamydia trachomatis</i>	
4.3.1 Extracción de ADN	26
4.3.2 PCR dirigida contra plásmido críptico de <i>Chlamydia trachomatis</i>	27

4.3.3 Nested PCR dirigida contra el gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i>	28
4.3.4 Visualización de los fragmentos obtenidos por PCR	28
4.4 Genotipificación de cepas de <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
4.5 Determinación de la carga bacteriana mediante PCR en tiempo real dirigidas contra el gen que codifica para el plásmido críptico y para un fragmento del gen <i>ompA</i>	30
4.6 Secuenciamiento nucleotídico y análisis filogenético	31
4.7 Análisis Estadístico	32
Capítulo III. Resultados	
5.0 Resultados	
5.1 Validación de las técnicas de biología molecular	34
5.1.1 Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras de orina	34
5.1.1.1 Exactitud	34
5.1.1.2 Sensibilidad	34
5.1.1.3 Especificidad	35
5.1.1.4 Precisión intra ensayo	35
5.1.1.5 Precisión inter ensayo	35
5.1.2 Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras de Hisopado Faríngeo	36
5.1.2.1 Exactitud	36
5.1.2.2 Sensibilidad	36
5.1.2.3 Especificidad	36
5.1.2.4 Precisión intra ensayo	36
5.1.2.5 Precisión inter ensayo	36
5.1.3 Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras de Hisopado de Fondo de Saco Vaginal	37
5.2 Determinación de la presencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> en niños con sospecha de abuso sexual	38
5.3 Análisis de los genotipos presentes en las muestras estudiadas	41
5.4 Determinación de la prevalencia de genotipos de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras de HFSV de embarazadas	42
5.4.1 Determinación de <i>Chlamydia trachomatis</i>	42
5.4.2 Determinación de genotipos presentes en las muestras de embarazadas	44
5.5 Determinación de la carga bacteriana de las cepas detectadas	46
5.5.1 Determinación de la carga bacteriana en muestras de orina e hisopado faríngeo de niños	46
5.5.2 Determinación de la carga bacteriana en muestras de	

Hisopado de fondo de saco vaginal de embarazadas	46
5.6 Análisis Filogenético de las secuencias detectadas	47
5.6.1 Análisis filogenético de las secuencias de <i>Chlamydia trachomatis</i> de niños	47
5.6.2 Análisis filogenético de las secuencias de <i>Chlamydia trachomatis</i> de embarazadas	48
Capítulo IV: Discusión	
6.0 Discusión	53
6.1 Validación de técnicas de Biología Molecular	53
6.2 Determinación de la presencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> en niños con sospecha de abuso sexual	55
6.3 Análisis de los genotipos de <i>Chlamydia trachomatis</i> presentes en niños con sospecha de abuso sexual	57
6.4 Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> en hisopado de fondo de saco vaginal de embarazadas	57
6.5 Determinación de los genotipos de <i>Chlamydia trachomatis</i> presentes en embarazadas	58
6.6 Determinación de la carga bacteriana de <i>Chlamydia trachomatis</i> en las muestras de orina e hisopado faríngeo de niños	59
6.7 Detección de la carga bacteriana de <i>Chlamydia trachomatis</i> en hisopado de fondo de saco vaginal de embarazadas	60
6.8 Análisis filogenético de las secuencias de <i>Chlamydia trachomatis</i> de niños con sospecha de abuso sexual	61
6.9 Análisis filogenético de las secuencias detectadas en embarazadas	62
Capítulo V: Conclusiones	
7.0 Conclusiones	64
8.0 Referencias bibliográficas	67
9.0 Anexos	75
9.1 Anexo I: Consentimiento Informado para el estudio de población infantil	75
9.2 Anexo II: Asentimiento Informado utilizado en niños Mayores de siete años	81
9.3 Anexo III: Aprobación del Comité de ética del polo Hospitalario para el estudio de población infantil con sospecha de abuso sexual	84
9.4 Anexo IV: Consentimiento Informado utilizado para el estudio de <i>Chlamydia trachomatis</i> en mujeres embarazadas	85
9.5 Anexo V: Aprobación del Comité de ética Oulton-Romagosa para el estudio de embarazadas	91
9.6 Anexo VI: Publicación de reporte de caso	92

Agradecimientos

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

C.: Chlamydia

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CE: Cuerpo Elemental

CR: Cuerpo Reticulado

EPI: Enfermedad Inflamatoria Pélvica

HF: Hisopado Faríngeo

HFSV: Hisopado de Fondo de Saco Vaginal

IC: Intervalo de Confianza

ITS: Infección de transmisión sexual

LGV: Linfogranuloma Venéreo

LPS: Lipopolisacárido

MOMP: Proteína Mayor de Membrana Externa

NSE: Nivel socioeconómico

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

UNG: Uretritis no gonocócica

pb: Pares de Bases

PMP: Proteínas polimórficas de membrana

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

rpm: Revoluciones por minuto

TTSS: Sistema de secreción tipo III

μL: microlitros

μM: micromolar

Resumen

El presente trabajo de tesis se centró en la caracterización genética de cepas autóctonas de *Chlamydia trachomatis* en dos poblaciones consideradas vulnerables.

Este microorganismo es una bacteria de vida intracelular obligada, causante de la infección bacteriana sexualmente transmisible más prevalente en todo el mundo y la principal causa mundial de ceguera prevenible al ser el agente etiológico del tracoma. En embarazadas, las infecciones clamidiales no tratadas se asocian a abortos, endometritis post parto, rotura prematura de membranas y transmisión al neonato. En los recién nacidos, al entrar en contacto con secreciones maternas, puede causar conjuntivitis y/o neumonía.

En primer lugar, se lograron validar PCR con alta “performance” utilizando muestras no invasivas. Esto reviste gran importancia si se tiene en cuenta que una de las poblaciones en estudio es la infantil.

En segundo lugar, se determinó la presencia de *Chlamydia trachomatis* en dos poblaciones vulnerables; niños de 3-13 años de edad con sospecha de abuso sexual y embarazadas de 35-37 semanas de gestación. Para esto se tomaron muestras de hisopado faríngeo y orina de la población infantil e hisopado de fondo de saco vaginal de las embarazadas cuando iban a realizarse diagnóstico de portación de *Streptococcus agalactiae*.

Se obtuvo un 20% de prevalencia de infección en niños y un 6,9% en embarazadas.

Cabe destacar que la mayoría de los menores que resultaron positivos para la infección, fueron niñas, y que *Chlamydia trachomatis* se encontró tanto en orina como en hisopado faríngeo. Estos resultados resaltan la importancia de estudiar este microorganismo en la población infantil por dos motivos principales; el primero es dar un tratamiento oportuno y evitar así las posibles complicaciones que esta bacteria puede traer aparejada. El segundo motivo es que contamos con técnicas diagnósticas que utilizan muestras no invasivas para el mismo, detalle no menor a la hora de asistir a estos pacientes. Por último, consideramos importante volver a reflexionar acerca del diagnóstico extra genital de *Chlamydia trachomatis* en esta población tan sensible, ya que los resultados obtenidos hasta el momento son controversiales al respecto.

En relación a las embarazadas, nuestros resultados fueron relevantes ya que nos permitió detectar que las menores de 25 años y bajo nivel socioeconómico es el grupo de riesgo de contraer esta infección. Asimismo, fue posible que las mujeres infectadas tuvieran un tratamiento eficaz y evitar así la transmisión al neonato.

Para la caracterización genotípica se utilizaron técnicas de biología molecular como PCR-RFLP sobre el gen *ompA*. Esto nos permitió conocer la circulación de genotipos en las diferentes poblaciones. El análisis de la información obtenida permitió asociar significativamente al genotipo D, E y F con las embarazadas. Al tener claro este dato, es importante continuar con estudios que nos permitan esclarecer del éxito ecológico de éstos genotipos sobre el resto de ellos.

Por último, se analizaron filogenéticamente las secuencias obtenidas, detectándose que no existen grandes diferencias entre las cepas circulantes en nuestra ciudad con las detectadas en otras regiones del mundo. Este dato es prometedor ya que se podría inferir que las formulaciones vacunales en estudio en otras regiones del mundo, pueden ser eficaces en nuestra población.

Estos resultados representan el primer paso en el conocimiento de la epidemiología molecular de la infección por *C. trachomatis* en poblaciones vulnerables de nuestra ciudad, y también abren nuevas posibilidades de estudio para comprender la historia natural de las infecciones por *Chlamydia trachomatis*.

Abstract

The focus of this thesis work is on the genetic characterization of native strains of *Chlamydia trachomatis* in two populations considered vulnerable.

This bacterium is the cause of most prevalent sexually transmitted bacterial infection worldwide and the most important cause of preventable blindness because is the etiologic agent of trachoma. In pregnant women, untreated chlamydial infections are associated with abortions, postpartum endometritis, premature rupture of membranes and transmission to the newborn. In these babies, the contact with maternal secretions can cause conjunctivitis and/or pneumonia.

First, we were able to validate PCR with high "performance" using non-invasive samples. This is very important if you consider that one of the studied populations are children.

Second, we determined the presence of *Chlamydia trachomatis* in two vulnerable populations; children between 3 and 13 years old with suspected sexual abuse and pregnant women from week 35 to 37. In the case of children, throat swab and urine samples were taken. While for pregnant women, swabbing vaginal fornix samples were collected during *Streptococcus agalactiae* diagnosis.

We detected 20% prevalence of infection in children and 6.9% in pregnant.

It should be noted that most children who tested positive for infection were girls, and *Chlamydia trachomatis* was found in both urine and throat swab. These results highlight the importance of studying this microorganism in children for two main reasons; the first is to give timely treatment to avoid possible complications that this bacterium may ensue. The second reason is that we can use non-invasive samples for diagnosis; this is a very important topic when attending these kinds of patients. Finally, we consider important to re-think about the extra genital diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in this sensitive population, since the results obtained so far are controversial about it.

In relation to pregnant women, our results were relevant because they allowed us to detect those women fewer than 25 years and low socioeconomic status is a group of risk for this infection. It was also possible that infected women had an effective treatment preventing transmission to the newborn.

For genotypic characterization we used techniques on the *ompA* gene of molecular biology and PCR-RFLP. This made possible to us to know the circulation of genotypes in different populations. The analysis of the information collected allowed us to associate genotypes D, E

and F with pregnant significantly. To be clear on this data, it is important to continue with the studies that will help us clarify the ecological success of these genotypes for the rest of them.

Finally, we analyzed phylogenetically the sequences obtained, detecting that there are no major differences between strains circulating in our city with those found in other regions of the world. This finding is promising as it could be inferred that the vaccine formulations under study in other regions of the world, can be effective in our population.

These results represent the first step in understanding the molecular epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in vulnerable populations in our city, and also open up new possibilities for studying the natural history of infection caused by this organism.

Capítulo 1

Introducción

1.0 Introducción

Es conocido que las infecciones de transmisión sexual (ITS) acompañan a la humanidad desde los tiempos más remotos. En la Biblia se hacen alusiones a las mismas y testimonian la extensión de tales afecciones entre los antiguos hebreos. En el Levítico aparecen muchas normas higiénicas y preventivas para ellas y en el libro de los Números se relata una epidemia que produjo 24.000 muertos entre los hebreos después que éstos mantuvieran relaciones sexuales masivas con las madianitas, en un rito de consagración a Belfegor.

En el mundo grecorromano abundan las alusiones a este tipo de infecciones. Heródoto refiere que los escitas, en castigo por haber saqueado el templo de Venus, fueron castigados por la diosa con el "mal de las mujeres" (1); y Estrabón refiere que en el templo de Corinto había más de mil meretrices y también médicos especialistas en curar "enfermedades ocultas". (2)

En la obra enciclopédica de A.C. Celso (s. 1 d.C.) se refieren a diversas ITS genitales, orales y anales. Destacan entre ellas la balanopostitis, descrita con todo detalle; la phitiriasis, a la que también alude su coetáneo C. Plinius Secundus; y los condilomas, mencionados también por Scribonius Largus (3). Éstos últimos debían ser especialmente frecuentes en Roma, como puede constatarse no sólo en las obras médicas, sino también en las sátiras de Marcial y Juvenal, donde se les alude con el nombre de "higos" (4).

En el año 1913, Durand, discípulo de Nicolas-Favre, describe el linfogranuloma venéreo, denominándola enfermedad de Nicolas-Favre (5); pero no es hasta 1930 que Hellestóm y Wassen describen el agente etiológico de dicha patología en una breve comunicación, denominando a este microorganismo como *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*).

Esta bacteria pertenece al Phylum *Chlamydiae*, Clase *Chlamydia*, orden *Chlamydiales*. Todos los miembros de este orden son bacterias inmóviles, Gram negativas, de 0,2-0,5 µm de diámetro que actúan como parásitos intracelulares obligados, y se multiplican, por un ciclo de desarrollo único, en el citoplasma de las células eucariotas dentro de vacuolas, denominadas inclusiones.

1.1 Taxonomía

En 1971 Storz y Page propusieron el orden *Chlamydiales* que, originalmente, tenía una sola familia, *Chlamydiaceae*, con las especies *C. trachomatis* y *Chlamydia psittaci* (6).

Posteriormente, en 1989 y 1992, se incorporaron las especies *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum* respectivamente (7-8).

Gracias al análisis filogenético de las secuencias de ARNr 16S, se descubrieron nuevas bacterias que comparten entre un 80-90% de similitud de secuencia con las clamidias, por lo que se incluyeron siete familias adicionales a este orden: *Chlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, and *Waddliaceae*.

Los miembros de una familia de este orden, comparten $\geq 90\%$ de similitud de 16S ARNr uno con el otro; los de un género, comparten $\geq 95\%$ de similitud de secuencias; excepto el género *Chlamydia*. Es por esto que, en 1999, se decide separarlo en género *Chlamydia* y *Chlamydophila* (9). Sin embargo, en el año 2011, Whitman y col publican en el Bergey's Manual of systematic bacteriology, que la familia *Chlamydiaceae* vuelve a tener un solo género, *Chlamydia* (*C.*), que comprende nueve especies: *C. muridarum*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. caviae* y *C. abortus* (10).

Recientemente, han sido descritas nuevas especies: *C. ibidis* (11) *C. avium* y *C. gallinacea* (12); encontradas en aves Pelecaniformes, Psittaciformes y Columbiformes, respectivamente. En la figura 1 se puede observar un árbol filogenético basado en el análisis de las secuencias completas del gen que codifica para el ARNr 16S.

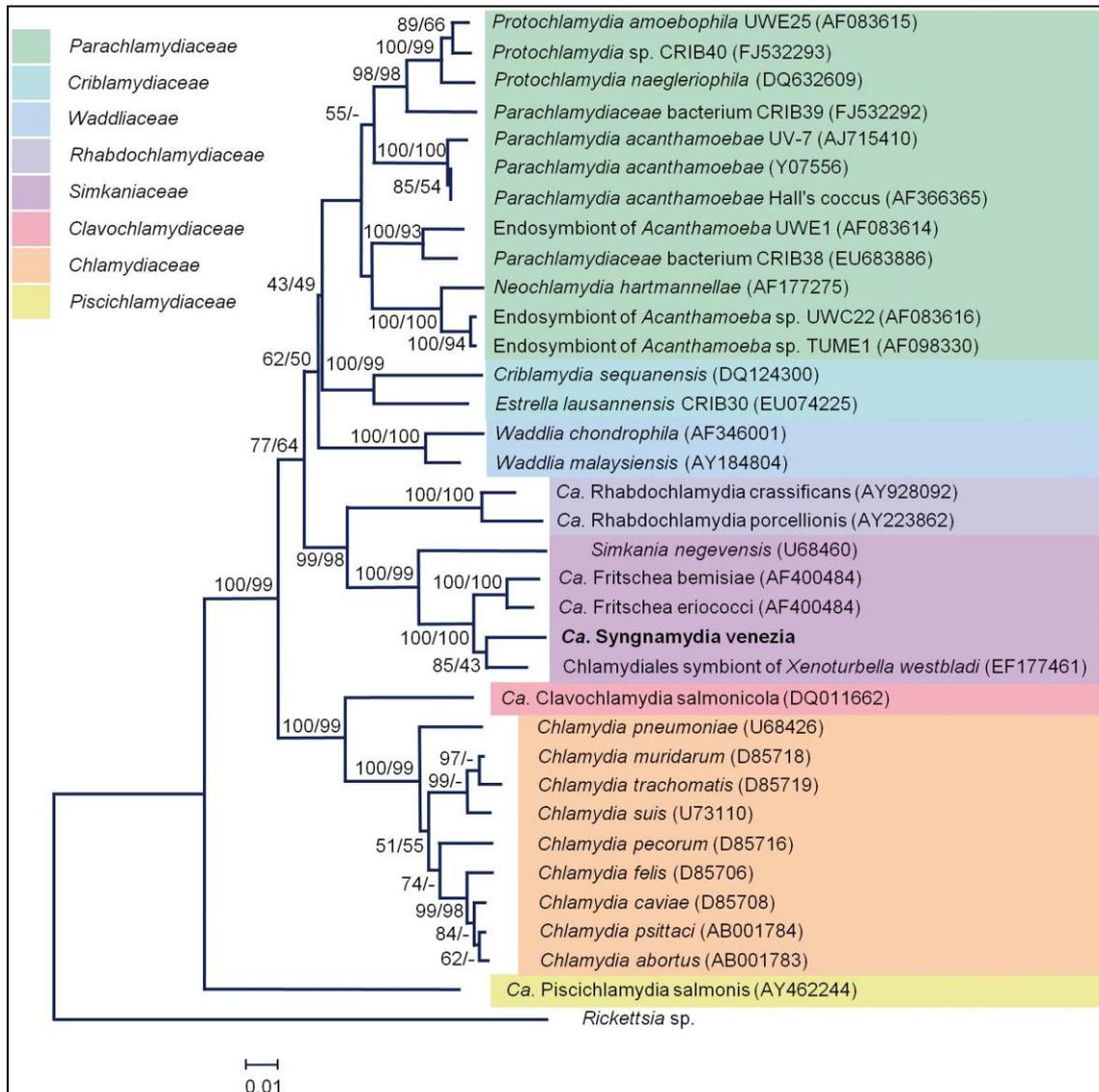


Figura 1: Árbol filogenético de los miembros del Phylum *Chlamydiae*, realizado con el método de Neighbour Joining. Se muestra el análisis de la secuencia completa del gen ARNr 16S (1477 pares de bases), utilizando *Rickettsia* sp. como grupo externo (13).

De todas las *Chlamydias* mencionadas, *C. trachomatis* es la única que infecta solo a los seres humanos y produce la ITS más frecuente en el mundo. En nuestro país no existen datos de prevalencia de esta bacteria en poblaciones vulnerables, por lo que consideramos de gran interés el estudio de esta especie en este tipo de poblaciones, para poder contribuir con datos de la epidemiología molecular de este microorganismo.

1.2 *Biología de Chlamydia trachomatis*

1.2.1 *Ciclo de multiplicación*

C. trachomatis tiene un ciclo de vida bifásico con dos formas funcional y metabólicamente distintas. La forma extracelular e infecciosa es el cuerpo elemental (CE); el mismo es pequeño (0,3 μm de diámetro) y metabólicamente inactivo. La forma intracelular es metabólicamente activa, con un tamaño de 0,5-1,6 μm de diámetro y se denomina Cuerpo Reticulado (CR) (14).

El desarrollo de este ciclo comienza con la endocitosis de los CE a las células eucariotas. Los mismos quedan dentro de pequeñas vacuolas denominadas inclusiones intracitoplasmáticas. Rápidamente luego del ingreso del CE a la célula, la inclusión se ubica cerca del núcleo y del aparato de Golgi. La inclusión sobrevive gracias a la evasión de la fusión con los lisosomas, y se ha propuesto que esto tiene que ver con la capacidad de *C. trachomatis* de lograr la inhibición de las bombas de protones de tipo V-ATPasas vesiculares (15).

Transcurridas unas 8 hs desde el ingreso del CE a la célula, el mismo se diferencia a CR; en este momento empieza la replicación por fisión binaria. Esta multiplicación llena rápidamente la inclusión y la misma se expande hasta ocupar, en ocasiones, la casi totalidad del citoplasma.

Pasadas 24-48 hs, el CR se transforma en CE, metabólicamente inactivos e infecciosos; y a las 72 hs post infección, se produce la lisis celular, permitiendo la liberación de los CE para infectar las células vecinas. (Figura 2)

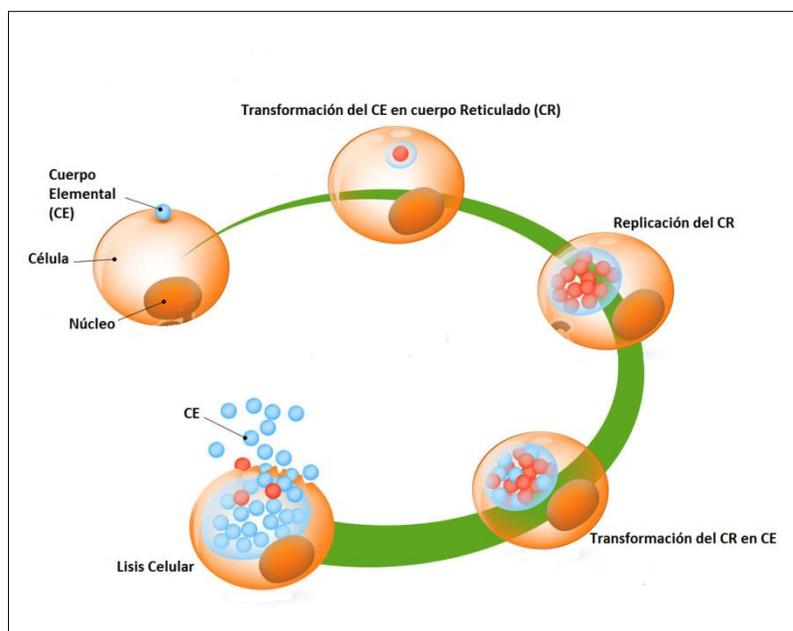


Fig. N°2: Ciclo de Vida de *C. trachomatis*.

1.2.2 Estructura Antigénica y factores de virulencia

1.2.2.1 Lipopolisacárido

El Lipopolisacárido (LPS) es un antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Nguyen et al., establecieron la relación del LPS como factor de virulencia en *Chlamydia spp.*, ya que en su ausencia, las *Chlamydias* no pueden realizar la transición de CR a CE (16).

El LPS produce reacción cruzada en las pruebas serológicas, no sólo entre los distintos miembros de la familia *Chlamydiaceae*, también con algunos LPS de enterobacterias, así como con cepas de *E. coli*.

1.2.3 Proteínas de Membrana externa

1.2.3.1 Proteína Mayor de Membrana

La Proteína Mayor de Membrana externa (MOMP) representa el 60% del peso seco de la membrana de *C. trachomatis*. Esta proteína de 40 kDa posee epitopes específicos de especie y su secuencia de aminoácidos incluye cinco dominios constantes y cuatro dominios variables (VS1 al VS4) que se exponen en la superficie y que presentan una diversidad antigénica considerable entre distintos tipos de *C. trachomatis*. La variabilidad de la secuencia de los dominios variables ha sido considerada un mecanismo de evasión de la vigilancia inmunológica del hospedador (17-18).

Se ha propuesto que la MOMP tendría función como adhesina, para el primer paso del ingreso de *C. trachomatis* a la célula hospedadora (19).

Varios estudios han demostrado que la MOMP es un potente antígeno y posee epitopes que son capaces de provocar en el hospedador tanto la respuesta inmune humoral, como celular (17, 20). Estas características hacen a la MOMP candidata para el desarrollo de vacunas y estrategias terapéuticas (21-22).

1.2.3.2 Proteínas polimórficas de membrana

Las Proteínas polimórficas de membrana (PMPs) son una familia única de proteínas de membrana, con un alto grado de diversidad entre ellas; *C. trachomatis* tiene 9 y su síntesis se lleva a cabo en las últimas fases del ciclo de desarrollo. Cumplen función de adhesinas y de autotransporte. Hay estudios que sugieren que las PMPs modulan el tropismo tisular, por lo que jugarían un papel importante en la diversificación antigénica para escapar del sistema inmune del hospedador (23).

1.2.3.3 Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína

Este complejo se encuentra en los CE, contribuyendo a la rigidez y estabilidad osmótica del mismo. Además actúa como adhesina en las primeras fases del anclaje del CE a la célula eucariota.

A este complejo lo forman 28 proteínas. Las más importantes son OmcA y OmcB. Ésta última, es la más abundante del complejo y parece estar implicada en la transición del CR a CE, por lo que juega un papel relevante en la virulencia (24).

1.2.4 Proteínas del proceso celular

1.2.4.1 Proteínas "Hsp" de Stress térmico

Estas proteínas tienen dos funciones principales: actúan como chaperonas y se expresan como respuesta al stress. Están clasificadas en familias de acuerdo a su peso molecular. Las Hsp60 o "GroEL-LIKE" se encuentran en las infecciones persistentes y se describió su presencia en infertilidad tubárica, Enfermedad Inflamatoria Pélvica y embarazos ectópicos. La exposición prolongada a la Hsp60 conduciría a la aparición de fenómenos autoinmunes.

La Hsp70 o "Dnak-like" se localiza en citoplasma y membrana externa de los CE. Se sugiere que juega un papel mediador en la adhesión de *C. trachomatis* a la célula hospedadora.

Ambas proteínas inducen una respuesta inmune de tipo humoral (25).

1.2.4.2 Sistema de secreción tipo III

Este Sistema de secreción tipo III (TTSS) es un mecanismo clave de la virulencia de *Chlamydia spp.* ya que facilita su interacción con la célula hospedadora. En el caso de *C. trachomatis*, el sistema le permite secretar proteínas TARP hacia el citoplasma de la célula hospedadora, con el fin de controlar el citoesqueleto y promover la internalización del CE (26). Otras proteínas que son secretadas por este sistema son las de la familia Inc, que intervienen en el desarrollo de la inclusión clamidial.

Está demostrado que este sistema es esencial para el desarrollo del ciclo de vida de *C. trachomatis*, ya que juega un papel importante en la diferenciación final del CR a CE (27).

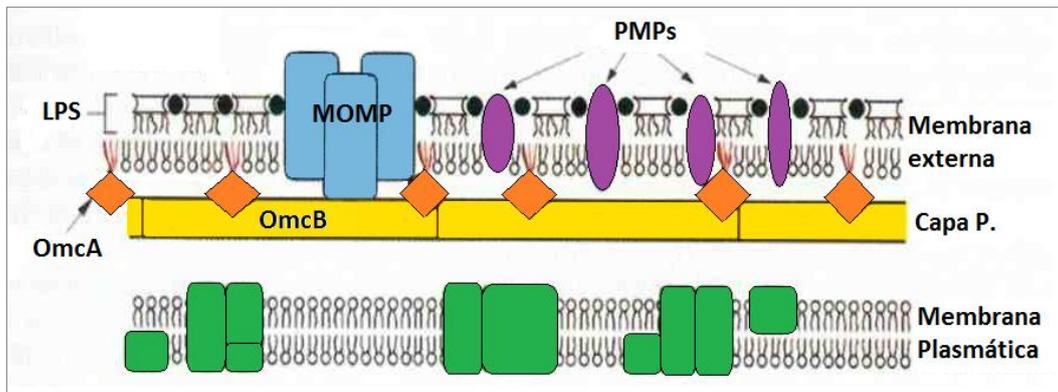


Figura 3: Estructura de la pared celular de *Chlamydia spp* (tomado de Alonso et al, 2012) (28). Se puede observar en colores las diferentes estructuras que la forman, a saber: LPS, MOMP, PMP's (*omcA* y *OmcB*)

1.2.5 Genoma

C. trachomatis tiene un genoma relativamente pequeño, comparado con el resto de las bacterias. El mismo está compuesto por un único cromosoma de $1,03 \times 10^6$ pares de bases (pb) y un plásmido de 7500 pb, el cual puede hallarse hasta en 10 copias por bacteria dependiendo del estadio de desarrollo (29). Hasta el momento, se desconoce su funcionalidad, pero se ha estudiado su composición y se sabe que el mismo contiene ADN no codificante y 8 marcos abiertos de lectura que codifican para 8 proteínas. Aún así, se lo denomina Plásmido críptico.

Cabe destacar, que se han aislado y clonado cepas libres de plásmido, lo que nos da una idea de que el mismo no es necesario para que las clamidias completen su ciclo de vida.

En el año 1998 se obtuvo la primera secuencia completa de *C. trachomatis*. En la actualidad, se cuentan con más de 69 genomas completos, que abarcan diversidad temporal y geográfica (30-36).

1.3 Infecciones producidas por *Chlamydia trachomatis*

Los aislamientos de *C. trachomatis* están clasificados en tres biovars y 21 genotipos (37). Los biovars son Ocular, Genital y Linfogranuloma Venéreo (LGV) y se dividen de acuerdo a su tropismo tisular, la patogénesis que producen en humanos y animales de laboratorio y sus características en los cultivos celulares (tabla 1) (10).

Los genotipos se denominan con una letra mayúscula de la A a la L y se clasifican de acuerdo a la variabilidad de la secuencia del gen *ompA* que codifica para la MOMP. Es interesante observar que esta clasificación coincide con la basada en las diferencias antigénicas de la MOMP que dividía a las diferentes cepas de *C. trachomatis* en serotipos o serovares.

El biovar Ocular infecta células del epitelio conjuntival. Los genotipos que pertenecen a este biovar son A, B, Ba y C (tabla 1) y son los responsables de producir tracoma. Esta patología es endémica en más de 50 países, especialmente en regiones rurales de África sub-sahariana. Su transmisión está relacionada con bajas condiciones higiénicas y se produce por contacto directo con fomites, con los ojos o a través de moscas. Los más afectados son los niños y las mujeres y la infección primaria se presenta como conjuntivitis folicular que puede curar espontáneamente. Sin embargo, infecciones repetidas conducen a la cronicidad de la infección llevando a la formación de cicatrices y ceguera.

Es importante destacar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve la lucha contra el tracoma bajo un enfoque multidisciplinar que implica cirugía, tratamiento antibiótico, higiene facial y mejoras medioambientales. El objetivo es erradicar esta patología para el año 2020 (38).

El biovar Genital es la principal causa infecciosa de transmisión sexual en el mundo y el número de casos nuevos crece cada año. Los genotipos que pertenecen a este grupo son D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, Ja y K y su sitio primario de infección son las membranas mucosas del tracto urogenital.

En hombres, la mayoría de estas infecciones tienen una presentación sintomática (75%). En esta población, *C. trachomatis* puede producir uretritis y se considera la causa más frecuente de uretritis no gonocócica (UNG) (39). Si esta infección no es tratada correctamente, el microorganismo puede acceder al tracto genital superior y producir epididimitis y trastornos en la fertilidad.

En las mujeres, la infección por este microorganismo, al contrario de lo que sucede en hombres, se presenta de manera asintomática en el 70-75% de los casos. Los casos sintomáticos pueden presentarse como cervicitis, endometritis, salpingitis. Eng y Butler comprobaron que entre el 30-40% de las adolescentes sexualmente activas estaban infectadas (40) y que hasta el 40% de ellas, podrían desarrollar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) si no recibían el tratamiento antimicrobiano específico oportunamente (41). Además, *C. trachomatis* puede producir trastornos de fertilidad, perihepatitis, abortos y partos prematuros (42).

En embarazadas, las infecciones clamidiales no tratadas se asocian a abortos, endometritis post parto, rotura prematura de membranas, transmisión al neonato en el canal del parto y bajo peso al nacer. Algunos estudios sugieren que el riesgo de infección de un recién nacido de madre infectada con *C. trachomatis* es aproximadamente del 70% y puede ocasionar bronquitis, neumonía y conjuntivitis neonatal (43). Esta infección puede persistir en los niños por aproximadamente 3 años (44). En niños mayores, la vía de transmisión de *C. trachomatis* es la vía sexual. Hammerschlag publica que la infección por *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual es menor al 5% (44) pero su detección es considerada diagnóstico de certeza del mismo (45-46).

Además, los genotipos de este biovar producen infecciones oculares benignas en adultos (conjuntivitis de inclusión). (Tabla 1)

El biovar LGV está compuesto por los genotipos L1, L2, L2a, L2b y L3. Al igual que el biovar genital, la infección se transmite sexualmente pero, estos genotipos, tienen la capacidad de producir una infección sistémica cuya patología lleva el mismo nombre del biovar.

El desarrollo de LGV presenta tres estadios bien diferenciados:

- 1- Lesión primaria, pequeña pápula o úlcera en la mucosa genital o en la piel adyacente a la puerta de entrada que es indolora y remite espontáneamente.
- 2- Linfadenopatía inguinal. La infección genera eritema y evoluciona originando abscesos denominados bubones, los cuales son dolorosos, pueden ulcerarse y drenar espontáneamente.
- 3- En la etapa terciaria ocurre la fistulización y drenaje del ganglio inflamado. Las lesiones cicatrizales pueden conducir a elefantiasis. (tabla 1) (47).

Patologías producidas por los diferentes genotipos de *C. trachomatis*

Biovar	Genotipos	Patología o Síndrome
Ocular	A, B, Ba, C	Conjuntivitis de inclusión en recién nacidos y adultos; tracoma y ceguera.
Genital	D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, Ja y K	Neumonía y conjuntivitis neonatal. Uretritis y epididimitis en hombres Síndrome uretral, cervicitis, endometritis, salpingitis, infertilidad, Perihepatitis (Sind. Fitz-Hugh-Curtis)
LGV	L1, L2, L2a, L2b y L3	Linfogranuloma Venéreo

Tabla 1: Se muestran los genotipos que componen cada biovar de *C. trachomatis* y las patologías que puede producir cada uno de ellos.

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de *C. trachomatis* se realiza por métodos de diagnóstico directos, ya sea aislamiento en cultivo celular, detección de antígenos o detección de ácidos nucleicos por biología molecular.

1.4.1 Aislamiento en Cultivo Celular

Para el aislamiento en cultivo se pueden utilizar una gran variedad de líneas celulares susceptibles de origen humano y animal, como las McCoy, HeLa 229, L929, BGMK, BHK-21 y LLC-MK2 entre otras (48). Como ventaja de esta metodología podemos referir que es posible detectar CE viables, tiene mínimo potencial de contaminación (lo que la hace el “gold standard” para casos médico-legales), y se puede conservar la cepa para estudios de genotipificación o antibiogramas.

Como desventaja podemos decir que tiene relativamente baja sensibilidad comparada con las técnicas de biología molecular (70-85% en manos experimentadas), necesita estrictos cuidados en transporte y conservación de la muestra, infraestructura avanzada y por lo menos 48 a 72 hs para identificar las inclusiones. Para esto, se utilizan anticuerpos monoclonales específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína; de LPS para reconocer todas las especies de *Chlamydia*, o de MOMP para reconocer solo *C. trachomatis*.

1.4.2 Detección de antígenos

Otro método directo que se utiliza con frecuencia es la detección de antígenos por inmunofluorescencia directa. En general, se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra LPS, aunque también pueden utilizarse contra MOMP.

La ventaja que tiene esta técnica es la rapidez en realizarla y que la muestra no necesita conservación ni refrigeración durante su transporte. La desventaja que tiene es que se necesita personal especializado y su evaluación microscópica es muy laboriosa.

Otra técnica utilizada es el enzoinmunoensayo. En general, estas pruebas rápidas, utilizan anticuerpos dirigidos contra LPS y son los test con menor sensibilidad y especificidad. Es por esto, que el CDC no aconseja su uso, mucho menos en poblaciones con bajos niveles de prevalencia de infección por *C. trachomatis* (49).

1.4.3 Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácidos nucleicos de *C. trachomatis* se puede realizar mediante técnicas de hibridación. Las mismas utilizan sondas de ADN específicas marcadas con moléculas

quimioluminiscentes, que son complementarias a una secuencia específica de ARN ribosómico de la bacteria. Cabe destacar que esta técnica no produce amplificación de los ácidos nucleicos, sino que produce la amplificación de la señal en presencia del mismo. Es por este motivo que su sensibilidad es similar al cultivo e inferior a la de las técnicas de amplificación. La desventaja que tiene la técnica es que al detectar ARN, es necesario que el microorganismo se mantenga viable, ya que el ARN puede alterarse fácilmente (50).

1.4.4 Amplificación de ácidos nucleicos

El desarrollo de pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos ha sido el más importante avance en el campo del diagnóstico de *C. trachomatis* desde el desarrollo del cultivo celular. Al ser una técnica extremadamente sensible y específica y no necesitar muestras invasivas para su realización, permite hacer el diagnóstico de esta infección a pacientes asintomáticos.

Debido a que la amplificación de ácidos nucleicos es exquisitamente sensible (90%) y altamente específica (99-100%), se ofrece la oportunidad de utilizar el muestreo no invasivo para la detección de infecciones en individuos asintomáticos que no buscarían atención médica debido a esta infección.

De todas las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la más importante es la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR); que utiliza dos cebadores de oligonucleótidos sintéticos, con secuencias que son complementarias a la región de un segmento específico de ADN presente en el organismo objetivo. La PCR puede ser género, especie, grupo o cepa específica dependiendo del diseño de la misma (48); además, existen PCR cualitativas y cuantitativas.

La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Ésta técnica nos permite, además, cuantificar la cantidad de copias presentes del ácido nucleico buscado; esto es posible siempre y cuando se cuente con un control ya cuantificado con el que se hace una curva de calibración que debe correrse al mismo tiempo que las muestras a analizar (51).

La desventaja que tiene la PCR es que no podemos aislar la bacteria viable para realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

1.4.5 Determinación de anticuerpos

La detección de anticuerpos contra *C. trachomatis*, no es de utilidad en infecciones genitourinarias producidas por este microorganismo, ya que al ser infecciones muy localizadas, no induce altos títulos de anticuerpos. Solo es útil esta metodología en LGV e infecciones neonatales, ya que las mismas son sistémicas (48).



Figura 4: Límites relativos de detección de diferentes tecnologías utilizadas para diagnosticar *C. trachomatis*. Los datos son los números de registro de CE de clamidias detectado.

1.5 Tratamiento

Según las recomendaciones del CDC, el régimen de tratamiento recomendado para las infecciones por *C. trachomatis* es 1 gr de azitromicina, vía oral, en monodosis o 100 mg de doxiciclina, vía oral, cada 12 hs por 7 días (52).

En mujeres embarazadas las alternativas terapéuticas incluyen azitromicina única dosis de 1 g o tratamientos más prolongados con eritromicina base.

En neonatos, el tratamiento recomendado es la eritromicina base 50 mg/kg/día, dividido en 4 dosis diarias por 14 días.

Alternativamente, es posible utilizar 500 mg de levofloxacina, una vez al día por 7 días o 300 mg de ofloxacina, 2 veces por día por 7 días (53).

En relación a la sensibilidad que tiene *C. trachomatis* a los antibióticos usados en la práctica diaria, podemos decir que en los aislamientos obtenidos se observa solo resistencia de tipo heterotípica (54); de todas maneras, no existen protocolos estandarizados para evaluar susceptibilidad antibiótica de este microorganismo.

Si bien se han reportado fallas de tratamiento en algunos pacientes, hay que considerar el hecho de que estas fallas no sean tales, sino que sean reinfecciones o falta de adhesión al tratamiento del paciente o de la/s parejas sexuales.

1.6 Importancia del estudio de *Chlamydia trachomatis*

La OMS estimó que en el año 2008 hubo más de 100 millones de nuevos casos de infecciones por *C. trachomatis*; de éstos, más de 26 millones correspondieron al área de América. Además, como se explicó anteriormente, *C. trachomatis* es la responsable del tracoma, primer causa de ceguera en el mundo (55).

Teniendo en cuenta que existe una alta prevalencia de esta infección, sobre todo en poblaciones vulnerables, las secuelas graves que puede producir este microorganismo en los pacientes, el complejo diagnóstico por ser una infección silenciosa y el tratamiento sencillo para evitar complicaciones; es que resulta relevante estudiar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis*. Además es necesario conocer los genotipos circulantes en nuestra región con el fin de profundizar el conocimiento de la epidemiología molecular de esta bacteria para la formulación de futuras vacunas.

2.0 Antecedentes

La OMS registró 500 millones de nuevos casos de ITS en el año 2008, de los cuales, 105 millones fueron causadas por *C. trachomatis* (55).

En la población general, existen reportes de prevalencia de esta bacteria que registran porcentajes muy variados, de acuerdo a la metodología utilizada. En Europa, Van Liere y col encontraron una prevalencia de infección del 4,8% en jóvenes de los Países Bajos (56). En Suiza, Bally y col reportaron una prevalencia del 5,5% en población general (57). Por su parte, Panatto y col informaron que en Italia, la prevalencia de *C. trachomatis* en mujeres asintomáticas es del 5,8% (58).

Hay pocas publicaciones de prevalencia en África y Asia. En Nigeria, se realizó un estudio en personas que consultaron a una clínica de ITS, encontrando una prevalencia de 9,6% (59); y en Sri Lanka la prevalencia en la misma población fue de 8,3% (60).

Las prevalencias de la Infección por *C. trachomatis* en Latinoamérica, van desde un 5,3% en mujeres sintomáticas y asintomáticas en Colombia (61), a un 10,4% en mujeres con las mismas características que las colombianas en Venezuela (62). En Chile, se encontró un 6,9% de prevalencia en mujeres adolescentes sexualmente activas (63) y en Brasil, la prevalencia encontrada de *C. trachomatis*, en jóvenes sexualmente activas menores de 25 años, es del 9,6% (64).

En nuestro país, existen escasos reportes de prevalencia de *C. trachomatis* en la población. Farinati y col, detectaron un 8,7% de infección en jóvenes asintomáticos (65) y Occhionero reportó 3,5% en la misma población en Bahía Blanca (66). Deluca halló un 26,4% de prevalencia en una población aborígen de Formosa (67); y finalmente, Monetti y col realizaron un estudio en pacientes infértiles, obteniendo una prevalencia de 7,2% (68).

La infección por *C. trachomatis* en embarazadas reviste gran importancia, ya que las infecciones no tratadas se asocian a abortos, endometritis post parto, rotura prematura de membranas, transmisión al neonato en el canal del parto y bajo peso al nacer.

En esta población, se han reportado las siguientes prevalencias de infección; 3,5% en USA (69), 12,1 % en el Reino Unido (70) y 6,4% en Australia (71). Según los estudios publicados, la prevalencia de esta bacteria difiere mucho en todo el mundo, con valores de 0,1% al 25,7% dependiendo de las características particulares de la población de embarazadas y de la metodología aplicada para dicho estudio (72). En América Latina, se han reportado prevalencias, en esta población, del 5,9% en Chile (73), 10% en Perú (74) y 11% en Brasil (75).

Con respecto a nuestro país Entrocassi y col encontraron; en Buenos Aires, una prevalencia de 19,2% en embarazadas adolescentes (76).

Es interesante destacar que los mayores rangos de prevalencias se dan en pacientes embarazadas menores de 25 años de edad y con un nivel socioeconómico bajo y que esta infección se da de manera asintomática en la mayoría de las embarazadas, por lo que no se realiza el diagnóstico.

Algunos estudios sugieren que el riesgo de infección de un recién nacido de madre infectada con *C. trachomatis* es aproximadamente del 50% y puede ocasionar bronquitis, neumonía y conjuntivitis neonatal (77). Di Bartolomeo y col realizaron un estudio en neonatos con conjuntivitis de Buenos Aires, Argentina y reportaron un 8% de prevalencia de *C. trachomatis* (78). Hay publicaciones que sugieren que este microorganismo puede persistir hasta 3 años en estos niños (79).

Existe una segunda vía de infección en niños que es la vía sexual. Las publicaciones de infección por *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual arrojan prevalencias mundiales menores al 5% (44, 80-81) pero destacan que su detección es considerado diagnóstico de certeza del abuso sexual ya que no hay otra vía de contagio (45-46).

En nuestro país no hay reportes de infección por *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual. Es importante recalcar que para realizar el diagnóstico de *C. trachomatis* con fines legales, la única metodología aprobada es el aislamiento por cultivo celular; pero a los fines del diagnóstico y tratamiento médico, para evitar las complicaciones que este microorganismo puede traer aparejadas, es muy útil la utilización de técnicas de biología molecular, ya que, tienen una sensibilidad mayor al cultivo y, por este motivo, es posible detectar la bacteria aunque exista muy baja carga bacteriana.

En relación a los genotipos de *C. trachomatis*, Verwiej S estudió las principales características de cada uno; en su publicación explica que los genotipos **D, E y F** son los más prevalentes a nivel mundial, tanto **D** como **E** se detectan principalmente en infecciones persistentes, **F** produce dolor abdominal y junto con el genotipo **K** se encuentran sobretodo en pacientes sintomáticos; el genotipo **la** sólo se detectó en mujeres asintomáticas, los genotipos **H, I y J** persistieron 2 o 3 años en mujeres a pesar de tener tratamiento antibiótico, en pacientes infértiles se encontraron los genotipos **E, F, G, K, L1 y L2** y los genotipos **G, I, y D** fueron los más frecuentes en cáncer de cuello uterino (82).

La prevalencia de los genotipos fue determinada en muchos países, obteniéndose como resultado: genotipo **D** (5-48%), **E** (22-44%) y **F** (8-20%) predominando en infecciones urogenitales, mientras **G** (4-7%), **Ga, H** (<5%), **I** (6%), **J** (5-13%), y **K** (5-10%) son menos comunes.

La gran mayoría de los datos publicados demuestran claramente que los genotipos **E** y **D** son los aislados con mayor frecuencia de infecciones del tracto genital (83-84).

En nuestra región, 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 (46,3%), seguido por el genotipo **D** (19,5%) y **F** (14,6%) en adultos, y **G** (9,2%) y **D** (7,9%) en recién nacidos. Además, se obtuvo un 2,5% del genotipo **Ja** en muestras endocervicales, mientras que en las muestras correspondientes a neonatos y pacientes masculinos este genotipo no estuvo presente (85).

En Córdoba, en la genotipificación de muestras provenientes de pacientes asintomáticos y sexualmente activos, se observó que el genotipo **E** era el más frecuente (73%), seguido del genotipo **D** (16,2%), y con menor frecuencia los genotipos **F** y **G** (5,4%) (86).

Por su parte, Monetti y col. realizaron un estudio en Córdoba en pacientes infértiles y encontraron los genotipos **L1** (50 %) seguido de **G** (25 %), **E** (12,5%) y **D** (12,5%) (68).

Existen pocas publicaciones de los genotipos presentes en embarazadas. En los trabajos de Yu J y col y Zhong y col se publicaron los hallazgos de los genotipos **E**, **F**, **H** y **D** tanto en embarazadas como en sus recién nacidos (87-88).

En América y particularmente en Argentina, no hay publicaciones acerca de los genotipos circulantes en esta población vulnerable ni hay publicaciones en niños con sospecha de abuso sexual.

Considerando que cada uno de los genotipos tiene características particulares, y que los genotipos de mayor circulación son los que producen infecciones persistentes, es de suma importancia estudiar la circulación de los mismos en poblaciones vulnerables como son las embarazadas y los niños con sospecha de abuso sexual con el fin de proporcionarles a estos pacientes un tratamiento adecuado y evitar las posibles complicaciones que esta infección puede traer aparejada.

Estas complicaciones son costosas tanto en términos psicosociales como económicos. Con el fin de disminuir estos costos se han implementado, en diferentes países, programas de detección de *C. trachomatis*. El objetivo principal del diagnóstico de esta bacteria es reducir la morbilidad mediante la detección precoz y el tratamiento específico adecuado. Como objetivo secundario de estos programas está disminuir la prevalencia total de las infecciones por *C. trachomatis* y, posteriormente, reducir la transmisión en la población.

En relación a costos financieros, se considera que un Programa de Tamizaje es efectivo cuando los costos relacionados con la logística de la detección y el tratamiento de los casos positivos son menores o iguales a los del diagnóstico y tratamiento de las complicaciones.

Algunas publicaciones demuestran que los Programas de Tamizaje puestos en marcha para esta infección son rentables en poblaciones seleccionadas (89-92).

En nuestro país no existen programas de tamizaje de *C. trachomatis* en ninguna población; ni siquiera en aquella considerada de alto riesgo, tampoco hay estudios de poblaciones vulnerables que determinen que grupo se considera de mayor riesgo para implementar estos programas.

Por este motivo, consideramos trascendental realizar estudios que brinden herramientas diagnósticas y datos estadísticos y epidemiológicos que sirvan de base para una implementación, eficiente, de dichos programas de salud pública.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la circulación de *Chlamydia trachomatis* en dos poblaciones vulnerables, con el fin de aportar datos significativos de la epidemiología molecular de esta bacteria en estos grupos de riesgo.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Validar la técnica de biología molecular para la detección de *C. trachomatis*.
- 2- Determinar la presencia de *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual.
- 3- Analizar los genotipos presentes de las cepas detectadas para identificar la circulación de cada uno de ellos en niños con sospecha de abuso sexual de la ciudad de Córdoba.
- 4- Determinar la prevalencia de genotipos de *C. trachomatis* en embarazadas de la ciudad de Córdoba con el fin de conocer la circulación de cada uno de ellos en esta población vulnerable.
- 5- Relacionar la carga bacteriana de los genotipos encontrados para establecer asociaciones con las características de los pacientes.
- 6- Caracterizar por secuenciamiento nucleotídico y análisis filogenético las cepas detectadas para relacionarlas con las halladas en otras regiones del mundo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

4.0 Materiales y Métodos

4.1 Poblaciones de estudio

4.1.1 Niños con sospecha de abuso sexual

La detección de *C. trachomatis* se realizó en muestras de orina e hisopado faríngeo (HF) de pacientes de 3 a 14 años con sospecha de abuso sexual.

Criterios de inclusión: La población de estudio estuvo constituida por niños de 3 a 14 años de edad. Se incluyeron pacientes provenientes de la Unidad Judicial de la Mujer y el Niño y del Hospital Pediátrico del Niño Jesús, de la ciudad de Córdoba, presentando sospecha de abuso sexual.

Previo a la toma de muestras, los profesionales de los nosocomios mencionados se comunicaban con los responsables de este estudio, quienes eran los encargados de dirigirse al lugar para:

- ✓ Explicarle a los pacientes y a sus tutores la importancia del estudio de *C. trachomatis*
- ✓ invitar a los pacientes a participar en este proyecto
- ✓ Hacer firmar el consentimiento informado (Anexo I) y asentimiento informado a los mayores de 7 años (Anexo II); ambos documentos aprobados por el Comité de Ética del Polo Hospitalario (CIEIS) y la Comisión de Ética de la Provincia de Córdoba (COEIS) (Anexo III)
- ✓ Obtener la muestra de HF de cada paciente
- ✓ Entregarle a los pacientes tubos estériles para la toma de primer chorro de orina.

Una vez obtenidas las muestras, se transportaron al Instituto de Virología “Dr. J.M Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, para su procesamiento.

Los HF se conservaron y transportaron en 1 ml de medio de transporte de sacarosa-fosfato-glutamato. Al llegar al laboratorio cada muestra fue dividida en dos alícuotas; una de ellas de 200 µl se usó para la detección de *C. trachomatis* utilizando técnicas de biología molecular y la restante fue almacenada a -80°C.

Las muestras de primer chorro de orina fueron centrifugadas a 2000 rpm por un lapso de 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se dividió el sedimento en dos alícuotas, una de ellas de 200 µl, que se utilizó para la detección de *C. trachomatis* por PCR y la restante se almacenó a -80°C.

Una vez realizadas las determinaciones todas las alícuotas de ambas muestras fueron desechadas en bolsas de residuos patógenos.

4.1.2 Embarazadas

La detección de *C. trachomatis* en esta población se realizó a partir de muestras de hisopado de fondo de saco vaginal (HFSV) de pacientes embarazadas.

Criterios de inclusión: La población de estudio estuvo constituida por pacientes embarazadas entre la semana 35-37 de gestación, que concurrieron a la Dirección de Especialidades Médicas Centro (DEMC) de la Municipalidad de la ciudad de Córdoba y al laboratorio LACE S.A a realizarse el estudio de portación de *Streptococcus agalactiae*.

Previo a la toma de muestras, los profesionales responsables de cada laboratorio, explicaron a las pacientes la importancia de realizar el estudio de *C. trachomatis*, las posibles complicaciones de esta infección e invitaron a las pacientes a participar del proyecto. Posteriormente, se les solicitó la firma del consentimiento informado (Anexo IV) aprobado por el Comité de Ética Oulton- Romagosa (CIEIS) y la Comisión de Ética de la Provincia de Córdoba (COEIS) (Anexo V), y se les tomaron dos muestras. La primera para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* y una segunda muestra de HFSV para la detección de *C. trachomatis*.

Una vez obtenida la muestra, la misma se conservó a 4°C en 1 ml de medio de transporte de sacarosa-fosfato-glutamato. Al llegar al laboratorio se procedió a su procesamiento de la siguiente manera:

- 1) Las muestras fueron homogeneizadas por agitación con vortex durante 1 minuto con perlas de vidrio para asegurar el desprendimiento de todas las células del hisopo de dacrón.
- 2) La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1,5 ml para su posterior centrifugado.
- 3) Se centrifugó la muestra a 2000 rpm por un lapso de 5 minutos para eliminar detritos celulares.
- 4) El sobrenadante se dividió en dos alícuotas; una de las cuales se conservó a -80°C y la restante se utilizó para el diagnóstico de *C. trachomatis*.

4.2 Validación de la técnica de Biología molecular para la determinación de *C. trachomatis*

Para la implementación de los ensayos de biología molecular, primero, se seleccionaron los oligonucleótidos iniciadores en base al análisis de las secuencias nucleotídicas de aislamientos de *C. trachomatis* publicadas en Genbank.

Luego se obtuvo un stock bacteriano de la cepa patrón *C. trachomatis* L2 434BU. El mismo fue titulado en células LLCMK2 por el método de unidades formadoras de inclusión (UFI) bajo medio líquido y la concentración bacteriana fue expresada como número de UFI por mililitro (UFI/ml) (93).

Para validar cada una de las técnicas de biología molecular se siguió el protocolo de Rabenau; se determinó **exactitud, sensibilidad, especificidad y precisión intra e inter ensayo** de las PCR dirigidas contra los genes que codifican MOMP y Plásmido críptico de *C. trachomatis* en muestras de orina, HF e HFSV (94). Para esto se utilizaron 20 controles de cada tipo de muestras infectados con la cepa de *C. trachomatis* L2 434BU y la misma cantidad de controles negativos.

Se determinó el límite de detección de cada PCR. Para conocerlo, se realizaron diluciones de la cepa patrón, se realizó extracción de ADN y amplificación del mismo y se observó la concentración más baja que detectó cada una de las técnicas de biología molecular.

Una vez determinado el límite de detección, se obtuvieron controles positivos fuertes de cada control con una concentración bacteriana mayor a $1 \log_{10}$ sobre el límite de detección (1000 copias); y controles positivos débiles con una concentración de hasta $1 \log_{10}$ (10 copias), sobre el límite de detección.

Para obtenerlos, se infectaron las muestras que se utilizaron como controles positivos, con la concentración indicada para que los mismos fuesen fuertes o débiles. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de los controles infectados y se los almacenó a -20°C hasta su utilización.

Se utilizó como método de referencia la PCR en tiempo real tanto de plásmido críptico como del gen *ompA*. Es importante destacar que no se usó el aislamiento en cultivo celular como método de referencia para la validación, ya que la orina es tóxica para las células y no es posible realizarlo con este tipo de muestra.

La exactitud se define como el grado de conformidad de una cantidad medida o calculada a su valor real. Puede ser calculada comparando los resultados con los obtenidos utilizando el método de referencia.

Para determinarla se utilizaron 3 controles positivos de 1000 copias, 3 controles positivos débiles (10 copias) y 3 controles negativos para *C. trachomatis*. Todos ellos fueron analizados tanto por PCR convencional (por triplicado) como por PCR en tiempo real; dirigidas contra los genes que codifican plásmido críptico y MOMP.

La sensibilidad está definida como la proporción de verdaderos positivos sobre todos los positivos; y para obtenerla se utilizaron 10 controles positivos fuertes y 10 controles positivos débiles.

La especificidad son los verdaderos negativos sobre todos los que resultaron negativos. Para determinarla se usaron 20 controles negativos para *C. trachomatis*. Es importante descartar la reacción cruzada de los iniciadores con otras bacterias. Es por ello que dentro de esos 20 controles se utilizaron 3 controles positivos para *Neisseria gonorrhoeae*, 3 infectados con *Haemophilus spp.*, 3 con *Escherichia coli*, 3 controles positivos para *Streptococcus spp.*, 3 controles infectados con *Staphylococcus spp.* y 5 controles negativos.

La precisión de una técnica es el grado de concordancia de los resultados de un test dentro de una misma corrida (precisión intra-ensayo) y de una corrida a otra (precisión inter-ensayo). Para determinarlas se utilizaron un control positivo fuerte (1000 copias) y un control positivo débil (10 copias). Se larga la corrida con cada uno de estos controles por triplicado para la precisión intra ensayo y en 3 corridas diferentes para la interensayo.

4.3 Determinación de la presencia de *C. trachomatis*

4.3.1 Extracción de ADN

Todas las muestras a analizar fueron sometidas a extracción de ADN 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 y 200 µl de "binding buffer".
- 2) Las muestras fueron homogeneizadas una a una por agitación con vortex durante 1 minuto.
- 3) Luego se las colocó en baño seco a 60 °C durante 1 hora.
- 4) Posterior a la incubación, se inactivó la enzima por adición de 100 µl de alcohol isopropílico absoluto y se homogeneizó suavemente con el tips de extracción.
- 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 por 1 minuto a 8000 rpm.

- 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 centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto.
- 9) Se descartó el alcohol precipitado y se agregó 500 µl de buffer de lavado 2, previamente suplementado 30 ml de alcohol etílico absoluto.
- 10) Se llevó a centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto.
- 11) Se descartó el alcohol precipitado y se centrifugó la columna sola a 12000 rpm durante 1 minuto, para eliminar restos de alcohol que puedan inhibir la enzima GoTaq polimerasa de la PCR.
- 12) Se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 1,5 ml y se adicionó 200 µl del buffer de elución.
- 13) Se dejó reposar la columna por el lapso de 2 minutos.
- 14) Se llevó a centrifuga durante 1 minuto a 8000 rpm.
- 15) Se descartó la columna y se almacenó el extracto de ADN a -20°C hasta su utilización.

4.3.2 PCR dirigida contra plásmido críptico de *C. trachomatis*

Se estableció la técnica de PCR para la detección de un fragmento de 201 pb del gen que codifica el plásmido críptico de *C. trachomatis*.

Los iniciadores seleccionados fueron CTP1 y CTP2 (95). (Tabla número 2)

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de 25 µl, en presencia de 25 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada desoxinucleótido (dNTPs) (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP), 1,5 mM de MgCl₂, 0,3% de Dimetilsulfóxido (DMSO₄) y 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA).

La reacción constó de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo tenía una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, un "annealing" a 55°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1,5 minutos. Finalmente la etapa de extensión a 72°C por 4 minutos. Cabe aclarar que se utilizaron controles internos positivos y negativos en cada corrida.

4.3.3 *Nested PCR dirigida contra el gen ompA de C. trachomatis*

Se estableció la técnica de PCR para la detección de un fragmento de 1087 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis*.

Los iniciadores seleccionados fueron NLO/NRO y PCTM3/SeroA2 (95). (Tabla número 2)

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de 50 µl, en presencia de 25 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3% de DMSO₄ y 1 unidad de enzima GoTaq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA).

La reacción constó de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 6 minutos, seguido por 49 ciclos de amplificación. Cada ciclo tenía una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, un “annealing” a 45°C durante 3 minutos y una elongación a 72°C durante 3 minutos. Finalmente la etapa de extensión a 72°C por 4 minutos; utilizando controles internos negativos y positivos para cada corrida.

Cebadores utilizados en las PCR dirigidas a los genes que codifican MOMP y Plásmido críptico

Oligonucleótido ^a	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del fragmento
CTP1 (S)	TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA	201 pb
CTP2 (A)	TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC	
NLO (S)	ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG	1087 pb
NRO (A)	CTC AAC TGT AAC TGC GTA TTT	
PCTM3 (S)	TCC TIT GCA AGC TCT GCC TGT GGG GAA TCC T	965 pb
SeroA2 (A)	TIT CTA GAT CTT CAT TCT TGT T	

^a Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, “sense”; A “antisense”).

Tabla 2: Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de fragmentos de 201 pb (plásmido críptico), 1087 pb y 965 pb (gen *ompA*).

4.3.4 *Visualización de los fragmentos obtenidos por PCR*

La visualización de los productos de ambas PCR, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo 0,5 µl/ml de bromuro de etidio. La visualización de los productos amplificados se examinó mediante el uso de un transiluminador ultra-violeta (Sigma).

4.4 Genotipificación de cepas de *C. trachomatis*

La genotipificación de las cepas de *C. trachomatis* se realizó mediante el estudio del Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Para esta técnica fueron necesarios 6,5 µl de cada producto positivo de PCR dirigida al gen *ompA*; a ellos se les adicionó 10,5 µl de agua estéril y 2,5 U de la enzima de restricción *AluI* (Promega Corporation, Madison, USA). Posteriormente, se incubaron en baño seco (AccuBlock™ Digital Dry Bath. Labnet International Inc.) a 40°C por el lapso de una hora.

Los productos de la digestión fueron revelados en un gel al 7% de poliacrilamida, revelado con tinción de plata (96), y comparados con los patrones de referencia publicados por Xia y col. (37) (figura 5).

A las muestras que resultaron genotipo **D** se las sometió, además, a digestión con 2,5 UI de la enzima de restricción *CfoI* (Promega Corporation, Madison, USA) con 10,5 µl de agua estéril y 6,5 µl del producto positivo de PCR. Lo mismo se realizó con las muestras que resultaron genotipo G o C utilizando las enzimas de restricción *BstUI* y *HinfI*, *EcoR* y *DdeI* (Promega Corporation, Madison, USA) respectivamente (Figura 6).

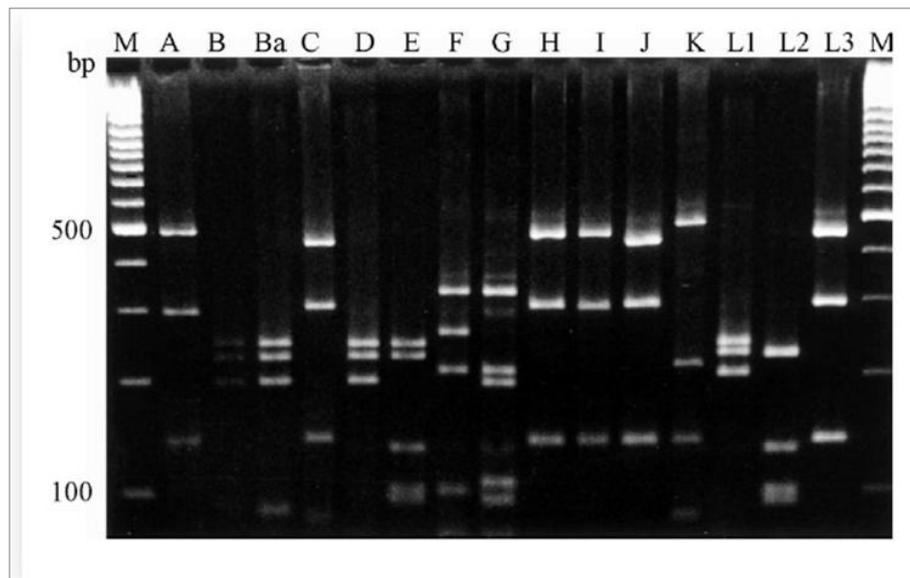


Figura 5: Patrones de referencia de los diferentes genotipos de *C. trachomatis*. (37). Se observa como M la corrida del control de peso molecular de 100 pb. Luego se observan los patrones de digestión producidos con la enzima de restricción *AluI* en el producto de amplificación de 1087 pb del gen *ompA*.

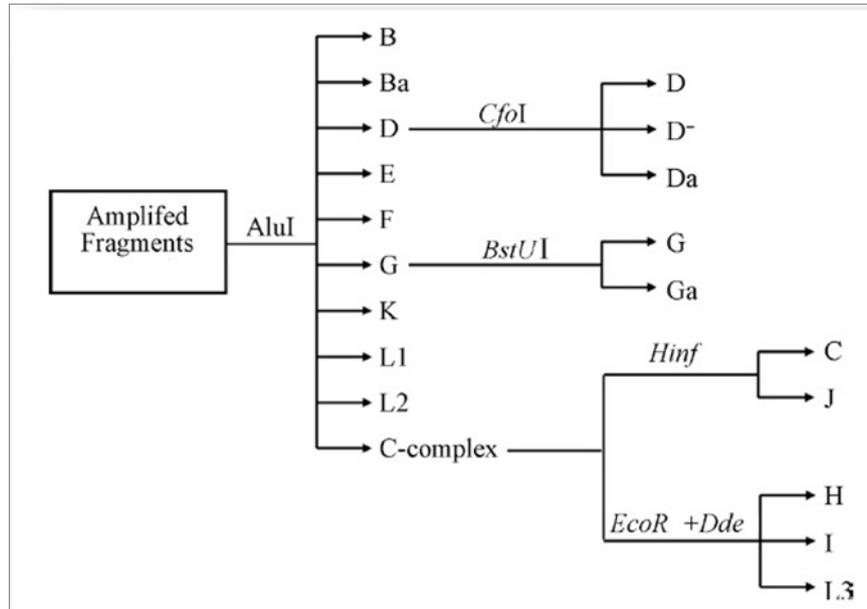


Figura 6: Representación esquemática de la estrategia utilizada para la genotipificación de *C. trachomatis* mediante PCR y RFLP de la región amplificada *ompA* (37). Se puede advertir que el genotipo D debe ser sometido a digestión con la enzima de restricción *CfoI* para determinar genovariantes D- y Da. Lo mismo sucede con el complejo C, que debe ser digerido con la enzima *Hinf* para determinar genotipos C y J y con *EcoR + Dde* para lograr diferenciar genotipos H, I, y L3 que, como se observa en la figura 5 no tienen grandes diferencias cuando son digeridos solo con *AluI*.

4.5 Determinación de la carga bacteriana mediante PCR en tiempo real dirigidas al gen que codifica para plásmido críptico y para un fragmento del gen *ompA*

Para la implementación de estos ensayos, previamente se cuantificó la cepa de *C. trachomatis* L2 434BU que fue utilizada como control positivo de reacción, mediante titulación del stock en células LLCMK2 por el método de unidades formadoras de inclusión (UFI) bajo medio líquido. La concentración de ADN bacteriana fue expresada como número de UFI por mililitro (UFI/ml) (93).

Para la realización de la curva de calibración para estandarizar el ensayo, se realizó la extracción de ADN a las mismas alícuotas del stock anteriormente descrito.

Estos ensayos amplificaron por un lado, un fragmento del gen que codifica el Plásmido críptico de *C. trachomatis* y por otro, un fragmento del gen *ompA*. Ambas PCR, se realizaron a partir de 10,5 µl de ADN, en un volumen final de 25 µl, en presencia de 1,5 µl de iniciadores y sondas (tabla N° 3) con el agregado de 12,5 µl de Platinum Quantitative PCR SuperMixUDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) y 0,5 µl de ROX Reference Dye (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) en dilución 1/10; usando un termociclador ABI Prism7500 (Applied Biosystems). El límite de detección (Ct) fue previamente fijado en 0,2 y mantenido en todos los ensayos (97).

La eficiencia de reacción se calculó utilizando la fórmula, $E: 10^{(-1/m)-1}$, siendo E, la eficiencia de la corrida y m, la pendiente de la curva de calibración. La eficiencia aceptada se fijó entre 90-110 %.

Para la conversión de las copias de genomas de *C. trachomatis* en UFI se utilizó la relación formulada por Everett y col (9).

Cada muestra fue realizada por duplicado y en todos los ensayos se utilizó curva de calibración.

Cebadores y sondas utilizadas en las qPCR dirigidas a los genes que codifican MOMP y Plásmido críptico

Iniciadores y sondas	Secuencia (5´ - 3´)	Fluoróforo y "quenchers"
CT-Plásmido-F (S)	AAC CAA GGT CGAT GTG ATA G	
CT-Plásmido-R (A)	TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT	FAM/NFQ
CT-Plásmido-Sonda	CGA ACT CAT CGG CG-MGB	
CT-MOMP-F (S)	GAC TTT GTT TTT CGA CCG TGT T	
CT-MOMP-R (A)	ACA RAA TAC ATC AAA RCG ATC CCA	VIC/NFQ
CT-MOMP-Sonda	ATG TTT ACV AAY GCY GCT T-MGB	

^a Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, "sense"; A "antisense").

Tabla 3: Secuencia nucleotídica de Iniciadores y sondas utilizadas como método de referencia para la Validación de las PCR convencionales para muestras de orina, HF e HFSV y para la cuantificación de carga bacteriana.

4.6 Secuenciamiento nucleotídico y análisis filogenético

Los productos de la PCR convencional dirigida al gen *ompA*, fueron extraídos del gel y purificados a partir de la banda, utilizando el equipo comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente el ADN (4µl) purificado fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular-Low DNA MASS™ ladder (Life-Technologies, USA) que permite establecer la cantidad aproximada de ADN (ng/µl) presente en la muestra pre-secuenciación.

El ADN purificado fue sometido a la reacción de secuenciación en ambas direcciones utilizando los iniciadores de la respectiva PCR (Macrogen, Inc. Seúl, Corea).

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos amplificados, las mismas fueron editadas utilizando el programa ClustalX (Conway Institute UCD Dublín, Dublín, Irlanda).

Posteriormente las secuencias consenso obtenidas se compararon mediante BLASTn 2.2.19 Basic Local Alignment Search Tool (98) contra el conjunto completo de fragmentos genómicos de *C. trachomatis* obtenidos del banco de datos GenBank, mediante un corte E-value de 5^{-10} .

Mediante el programa MEGA versión 7 (99) 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 utilizando el programa ModelTest 3.7 (100) y se procedió a su análisis mediante la implementación del programa PhyML 3.0 (101).

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 (102).

4.7 Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un análisis de estadística descriptiva. Las variables discretas se describieron en porcentajes con un intervalo de confianza del 95%. Las variables continuas normales se describieron en medias y desvíos estándar; mientras que las no normales en medianas y rangos.

Posteriormente, para estudiar la asociación entre algunas variables se realizó en primera medida un análisis de tablas de contingencia mediante el Test de chi cuadrado o Test de Fisher según corresponda.

Finalmente, y a los fines de estimar la relación entre la carga bacteriana y variables de interés, se construyeron modelos de regresión logística lineal, los cuales incluyeron la carga bacteriana como variable respuesta y toda la información de las variables de interés (Edad, Nivel Socioeconómico [NSE], Carga bacteriana) como covariables. Se estimaron los Odds Ratio y sus respectivos Intervalos de confianza del 95%.

Todos los análisis fueron realizados utilizando el software Stata, versión 12.1 (103).

Capítulo 3

Resultados

5.0 Resultados

5.1 Validación de las técnicas de biología molecular

Se obtuvo un stock bacteriano de la cepa de *C. trachomatis* L2 434Bu con una carga de 1.35×10^6 UFI/ml, con el que se trabajó para determinar el límite de detección de cada una de las PCR. Para esto se utilizaron como controles positivos diluciones seriadas 1:10 del stock contaminando cada uno de los controles positivos usados para la validación.

El límite de detección de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y la MOMP resultó ser de 10 copias (1 UFI). (Tabla 4)

Límite de Detección de *C. trachomatis* en las PCR dirigidas a los genes que codifican MOMP y Plásmido críptico

Concentración bacteriana (UFI/ml)	MOMP Positivos/nro. de réplicas (%)	PLÁSMIDO CRÍPTICO Positivos/nro. de réplicas (%)
1.35×10^6	5/5 (100)	5/5 (100)
1.35×10^5	5/5 (100)	5/5 (100)
1.35×10^4	5/5 (100)	5/5 (100)
1.35×10^3	5/5 (100)	5/5 (100)
1.35×10^2	5/5 (100)	5/5 (100)
1.35×10^1	4/5 (80)	5/5 (100)
1.35	0/5 (0)	0/5 (0)

Tabla 4: Estimación del límite de detección por PCR del gen *ompA* y Plásmido críptico de *C. trachomatis* utilizando diluciones seriadas 1:10 del stock bacteriano de la cepa L2 434Bu. Los rangos de éxito de amplificación sugieren que el límite de detección de ambas PCR es mayor a 10 copias de cada gen determinado.

5.1.1 Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de *C. trachomatis* en muestras de orina (Tabla 5).

5.1.1.1 Exactitud

Se obtuvo una exactitud del 100% en las dos PCR estudiadas.

5.1.1.2 Sensibilidad

Se obtuvo una sensibilidad del 100% en la PCR de plásmido críptico y de 95,2% en la PCR dirigida al gen *ompA*.

5.1.1.3 Especificidad

Se obtuvo una especificidad del 100% en la PCR de plásmido críptico y del 90,9% en la de MOMP.

5.1.1.4 Precisión intra ensayo

Se obtuvo una precisión intra ensayo del 100% en ambas PCR estudiadas.

5.1.1.5 Precisión inter ensayo

Se obtuvo una precisión inter ensayo del 100% en ambas PCR estudiadas.

Validación de PCR dirigida al gen *ompA* y al Plásmido críptico en muestras de orina

Muestra de Orina con concent. (UFI/ml)	Tipo de PCR	Exactitud Positivos/nro. de réplicas (%)	Sensibilidad Positivos/nro. de réplicas (%)	Especificidad Negativos/nro. de réplicas (%)	Precisión intra ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)	Precisión inter ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)
<i>C. trachomatis</i> 1x10 ³	Plásmido	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
	MOMP	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>C. trachomatis</i> 1x10 ²	Plásmido		5/5 (100)			
	MOMP		4/5 (80)			
<i>C. trachomatis</i> 1x10 ¹	Plásmido		10/10 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
	MOMP		10/10 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>Neisseria spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Haemophilus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			2/3 (66,7)		
<i>E. coli</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			2/3 (66,7)		
<i>Streptococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Staphylococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
Negativo	Plásmido	0/3 (0)		5/5 (100)		
	MOMP	0/3 (0)		5/5 (100)		
Total	Plásmido	100%	100%	100%	100%	100%
	MOMP	100%	95,2%	90,9%	100%	100%

Tabla 5: Se muestran las réplicas y resultados de las determinaciones realizadas para determinar las variables necesarias para la validación de ambas PCR en muestras de orina.

5.1.2 *Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de C. trachomatis en muestras de Hisopado faríngeo (Tabla 6).*

5.1.2.1 *Exactitud*

Se obtuvo una exactitud del 100% en ambas PCR estudiadas

5.1.2.2 *Sensibilidad*

Se obtuvo una sensibilidad del 100% en la PCR de plásmido críptico y del 95,2% en la del gen *ompA*.

5.1.2.3 *Especificidad*

Se obtuvo una especificidad del 95,2% en la PCR de plásmido críptico y del 100% en la PCR del gen *ompA*.

5.1.2.4 *Precisión Intra ensayo*

Se obtuvo una precisión intra ensayo del 100% en ambas PCR estudiadas.

5.1.2.5 *Precisión Inter ensayo*

Se obtuvo una precisión inter ensayo del 100% en ambas PCR estudiadas.

Validación de PCR dirigida al gen *ompA* y al Plásmido críptico en muestras de HF

Muestra de HF con concent. (UFI/ml)	Tipo de PCR	Exactitud Positivos/nro. de réplicas (%)	Sensibilidad Positivos/nro. de réplicas (%)	Especificidad Negativos/nro. de réplicas (%)	Precisión intra ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)	Precisión inter ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
1x10 ³	MOMP	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido		5/5 (100)			
1x10 ²	MOMP		5/5 (100)			
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido		10/10 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
1x10 ¹	MOMP		09/10 (90)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>Neisseria spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Haemophilus spp.</i>	Plásmido			2/3 (66,7)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>E. coli</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Streptococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Staphylococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
Negativo	Plásmido	0/3 (0)		5/5 (100)		
	MOMP	0/3 (0)		5/5 (100)		
Total	Plásmido	100%	100%	95,2%	100%	100%
	MOMP	100%	95,2%	100%	100%	100%

Tabla 6: Se muestran las réplicas y resultados de las determinaciones realizadas para determinar las variables necesarias para la validación de ambas PCR en muestras de HF.

5.1.3 Validación de las PCR dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y MOMP de *C. trachomatis* en muestras de HFSV.

En este tipo de muestras, todas las variables estudiadas resultaron ser del 100% tanto en la PCR dirigida al gen que codifica el plásmido críptico como al gen *ompA*. Todos los resultados de la validación se encuentran disponibles en la tabla 7.

Validación de PCR dirigida al gen *ompA* y al Plásmido críptico en muestras de HFSV

Muestra de HFSV con concent. (UFI/ml)	Tipo de PCR	Exactitud Positivos/nro. de réplicas (%)	Sensibilidad Positivos/nro. de réplicas (%)	Especificidad Negativos/nro. de réplicas (%)	Precisión intra ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)	Precisión inter ensayo Positivos/nro. de réplicas (%)
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
1x10 ³	MOMP	3/3 (100)	5/5 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido		5/5 (100)			
1x10 ²	MOMP		5/5 (100)			
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido		10/10 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
1x10 ¹	MOMP		10/10 (100)		3/3 (100)	3/3 (100)
<i>Neisseria spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Haemophilus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>E. coli</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Streptococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
<i>Staphylococcus spp.</i>	Plásmido			3/3 (100)		
	MOMP			3/3 (100)		
Negativo	Plásmido	0/3 (0)		5/5 (100)		
	MOMP	0/3 (0)		5/5 (100)		
Total	Plásmido	100%	100%	100%	100%	100%
	MOMP	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 7: Se muestran las réplicas y resultados de las PCR realizadas para determinar las variables necesarias para la validación de ambas PCR en muestras de HFSV.

5.2 Determinación de la presencia de *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual.

Se estudiaron un total de 65 pacientes con sospecha de abuso sexual. De ellos, el 78% (n=51) (IC: 66,5%-87,7%) de los pacientes pertenecían al sexo femenino y el 22% (n=14) (IC: 12,3%-33,5%) restante al sexo masculino. En relación a las edades de los niños, el 44,6% (n=29) (IC: 32,2%-57,5%) tenían edades comprendidas entre 3 y 7 años, mientras que el 55,4% (IC: 42,5%-67,3%) pertenecían al rango etario de 8-13 años (n=36) con una media de edad de 8 años ± 2. (Figura 6).

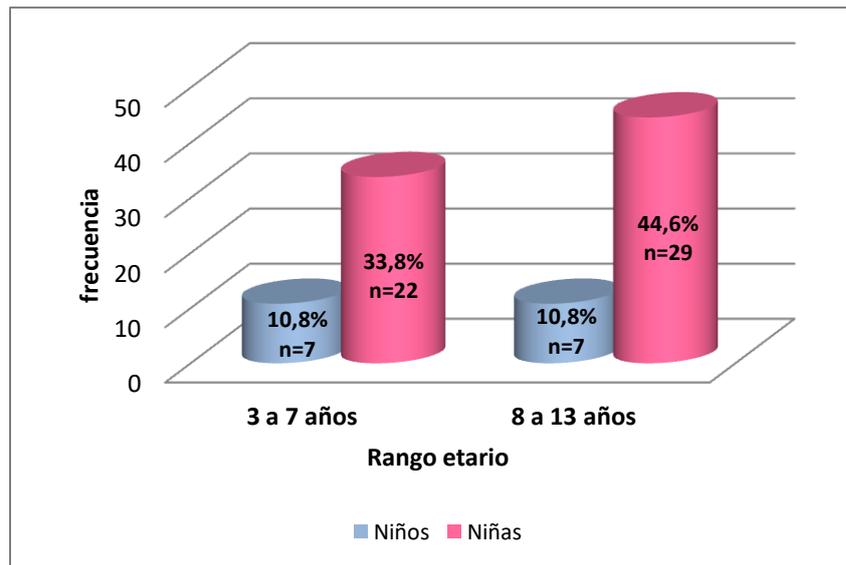


Figura 6: En el gráfico se muestra la distribución de los pacientes estudiados de acuerdo al género y a la edad de los mismos. En color rosa se observan las niñas en el rango etario de 3-7 y 8-13 años. En gris se observa la distribución de pacientes masculinos de acuerdo al rango etario que tenían al momento de la toma de las muestras de orina e HF.

Es importante recalcar que de los 65 pacientes estudiados, el 86% de ellos (n=56) derivaron ambas muestras solicitadas (orina e HF); el 7,7% derivaron solo HF (n=5), y el 6,3% restante (n=4), solo orina. En total se obtuvieron 121 muestras, 60 orinas y 61 HF. (Figura 7)

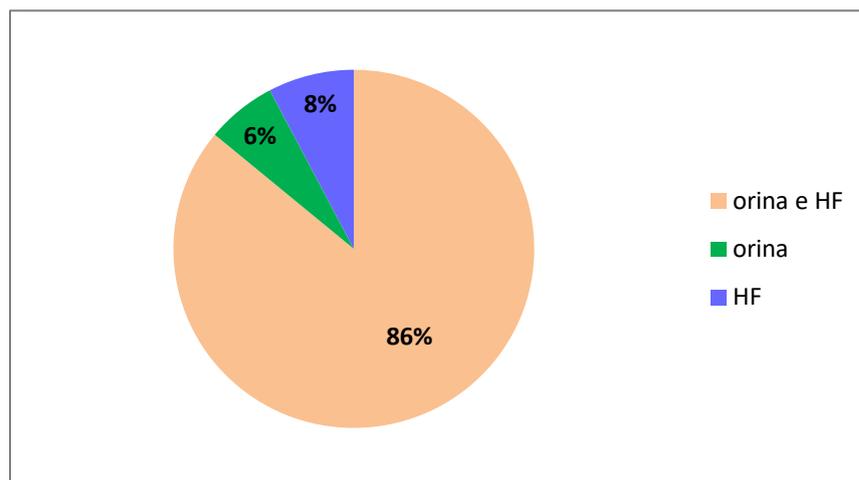


Figura 7: Se muestra gráficamente la distribución del muestreo realizado para el estudio. En violeta está representado la proporción de pacientes que solo derivaron HF. En verde se puede observar la cantidad de pacientes que derivaron sólo orina y en beige es posible contemplar la proporción de pacientes que derivaron ambas muestras para realizar la determinación de *C. trachomatis*.

Se obtuvo una prevalencia de infección por *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual del 20% (n=13) (IC: 11,1%-31,8%); considerando que en alguna o todas sus muestras se detectó la presencia del gen *ompA* y/o plásmido críptico. De los pacientes con

infección, el 92,3% (n=12) resultaron ser de sexo femenino y el 7,7% (n=1) restante fue de sexo masculino (92,3% vs 7,7% p= 0,3). En relación a la edad de los niños, el 38,5% (n=5) tenían edades comprendidas entre 3 y 7 años, mientras que el 61,5% (n=8) restante, estaba en un rango etario de 8 a 13 años de edad (38,5% vs 61,5% p=0,8) (Figura 8), con una edad media de $8,7 \pm 2,8$ años.

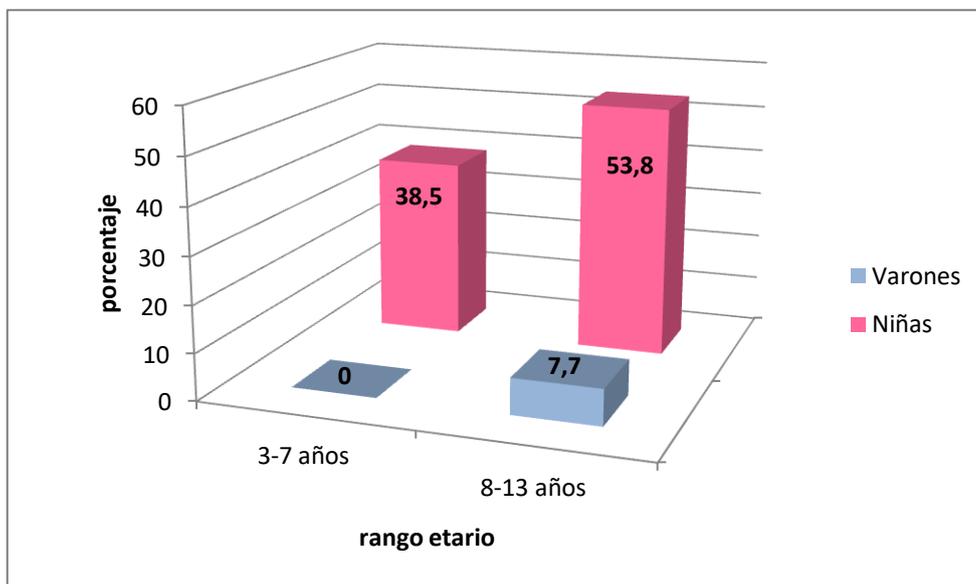


Figura 8: En este gráfico se puede vislumbrar claramente la proporción de pacientes infectados con *C. trachomatis* de acuerdo al género y la edad de cada uno de ellos. En color rosa se pueden ver las niñas que resultaron positivas divididas en los rangos etarios 3-7 y 8-13 años; y en gris se puede percibir que solo hubo un niño que resultó infectado con esta bacteria y que pertenecía, al momento de la toma de la muestra al rango etario de 8-13 años de edad.

En relación a las muestras que resultaron positivas, es interesante destacar que 3 de los pacientes estudiados, resultaron tener ambas muestras positivas; por lo que el total de muestras positivas en el estudio fue de 16 (13,2%) (IC: 7,7%-20,5%).

Se realizó la distribución de resultados positivos de acuerdo al tipo de muestra, y se observó que el 62,5% (n=10) de las mismas fueron HF y el 37,5% (n=6) fueron muestras de orina (62,5% vs 37,5%. p=0,4). Del total de HF positivos, el 40% (n=4) eran de niñas entre 3-7 años de edad, y el 60% restante (n=6), pertenecieron a 5 niñas y 1 varón de entre 8-13 años.

Las muestras de orinas pertenecieron a 2 niñas de 3-7 años (33,3%) y a 4 niñas de entre 8 y 13 años (66,6%). (Figura 9).

Es importante recalcar que de una de las muestras de HF positivas, que pertenecía a una niña del rango etario de 8 a 13 años, no se logró obtener la muestra de orina. Lo mismo ocurrió con una muestra positiva de orina de otra niña de 8 a 13 años de edad, que no se logró obtener el HF.

Los tres pacientes en donde se detectó *C. trachomatis* tanto en orina como en HF eran de sexo femenino; 1 de ellas pertenecían al rango etario de 3-7 años y las dos restantes al rango 8-13 años.

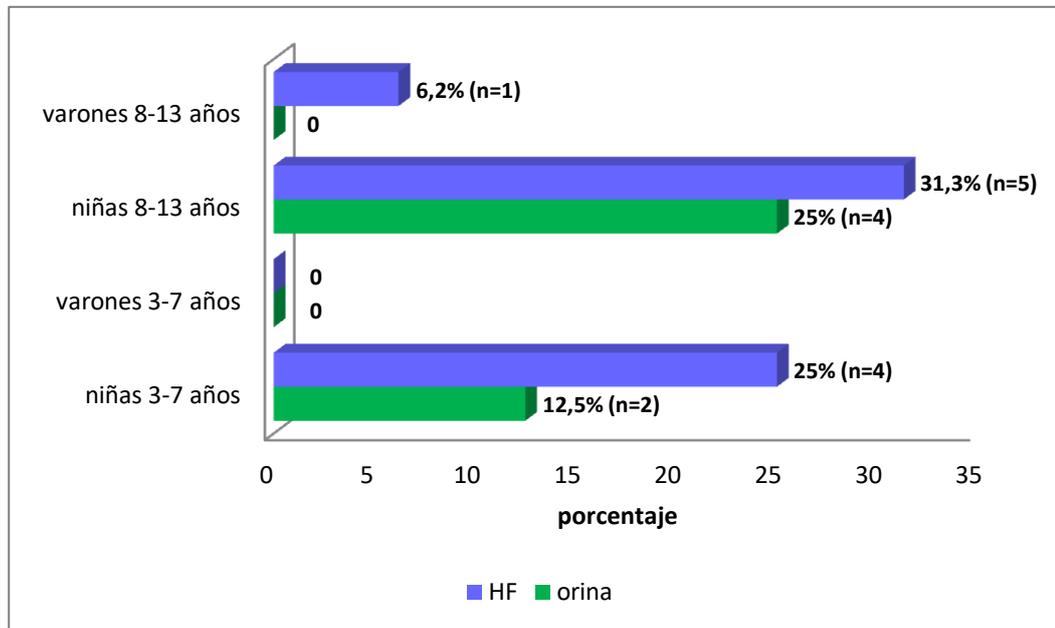


Figura 9: Se muestra gráficamente la distribución (%) de muestras positivas de acuerdo al tipo de muestra, género y edad del paciente. En violeta se puede observar la distribución de HF de acuerdo al género y edad de los pacientes y en verde el mismo análisis para muestras de orina.

5.3 Análisis de los genotipos presentes en las muestras estudiadas

De las 16 muestras que resultaron positivas para *C. trachomatis* a través de la PCR dirigida al plásmido críptico, solo se pudo amplificar la región *ompA* en 5 de ellas (31,3%), por lo que solo de esas muestras se logró hacer la genotipificación.

Se identificó el genotipo D a partir de un HF de una niña de 3-7 años, de un HF de un niño perteneciente al rango etario de 8-13 años, y de una orina de una niña del mismo rango etario. Se detectó además el genotipo L2 de ambas muestras de una paciente de 8-13 años.

5.4 Determinación de la prevalencia de genotipos de *C. trachomatis* en muestras de HFSV de embarazadas

5.4.1 Determinación de *C. trachomatis*

Se estudiaron un total de 509 muestras de HFSV de embarazadas en las semanas 35-37 de gestación. Las voluntarias tenían edades comprendidas entre 14 y 43 años, con una media de edad de 26 ± 6 . Las edades fueron divididas en 7 rangos para su análisis; las mismas pueden verse en la tabla 8.

Distribución etaria del muestreo			
Rango Etario (años)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	IC
< 16	8	1,6	0,7 - 3,2
16-20	106	20,8	17,4 - 24,7
21-25	144	28,3	24,5 - 32,5
26-30	108	21,2	17,8 - 25
31-35	97	19	15,8 - 22,8
36-40	40	7,9	5,7 - 10,6
>40	6	1,2	0,5 - 2,7
Total	509	100	

Tabla 8: Se muestran las frecuencias y porcentajes de los rangos etarios de todas las embarazadas ingresadas en el estudio.

En relación al nivel socioeconómico (NSE), el mismo se determinó de acuerdo a si la paciente recibía asignaciones por parte del Estado y si concurrieron a una institución pública o privada a realizarse la portación de *Streptococcus agalactiae*. Del total de pacientes incluidas en este estudio, el 57,8% (n=294) (IC: 53,3%-62%) de las mismas, percibía, al momento de la toma de muestra, la asignación universal por hijo y era asistida en una institución pública. Al 42,2% restante (n=215) se las consideró de un NSE más favorable (IC: 37,9%-46,7%) ya que no aplicaron para la asignación universal y eran atendidas en instituciones privadas donde debían abonar todas las prácticas que se les realizaba. (Figura 10)

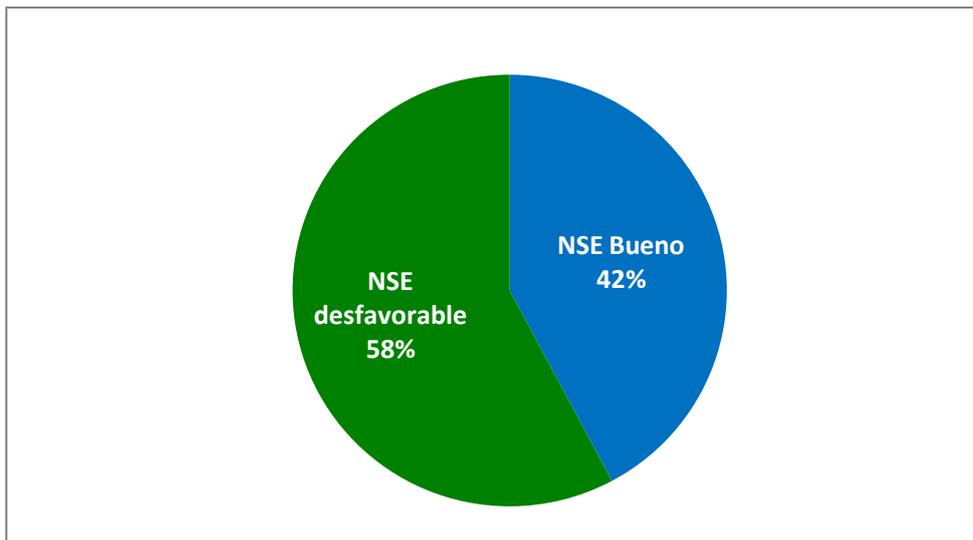


Figura 10: En el gráfico se muestra en verde la proporción de pacientes con un NSE desfavorable que se incluyeron en este estudio y en azul se puede apreciar la proporción de pacientes con NSE más beneficioso.

Se obtuvo una prevalencia de infección por *C. trachomatis* del 6,9% (n=35) (IC: 4,9%-9,5%). (Figura 11)

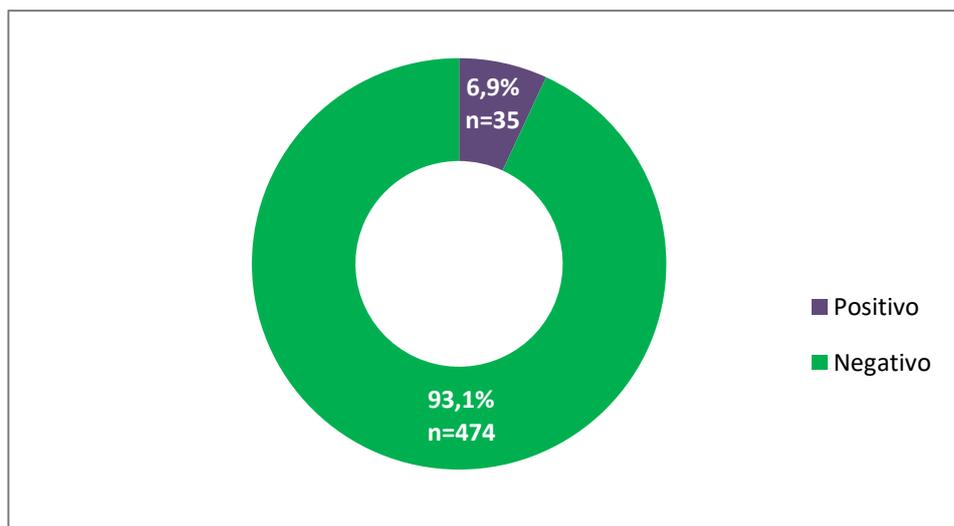


Figura 11: Se muestra en violeta el porcentaje de embarazadas infectadas por *C. trachomatis* y en verde el porcentaje de pacientes que no estaba infectada al momento de la toma de muestra.

Con respecto a la edad de las pacientes embarazadas, se observó que existe una relación estadísticamente significativa entre las pacientes menores de 26 años y la infección por *C. trachomatis* ya que el 86% (n=30) de ellas estaban en un rango etario de 14 a 25 años (p=0,00003). Se realizó esta división etaria ya que de esta manera es posible discutir nuestros resultados con los datos bibliográficos disponibles (65).

Además, se encontró una relación entre el NSE y la infección por este microorganismo, ya que el 91,4% (n=32) de las pacientes que resultaron positivas para la infección pertenecían a un desfavorable NSE (91,4 vs 8,6 p=0,00006). (Figura 12)

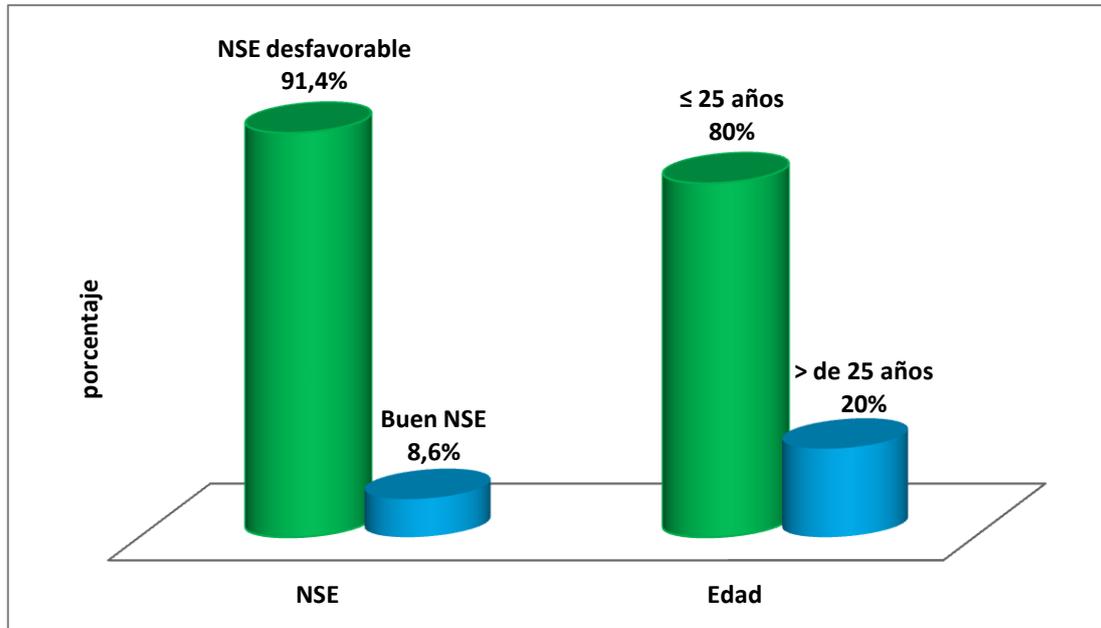


Figura 12: Se muestra gráficamente el porcentaje de las pacientes positivas en función de la Edad y NSE. En verde se puede observar las variables menores de 25 años y desfavorable NSE y en azul se aprecian las variables mayores de 25 años y mejor NSE.

5.4.2 Determinación de los genotipos presentes en las muestras de embarazadas

Se lograron genotipificar 34 de las 35 muestras que resultaron positivas para *C. trachomatis*. La muestra restante no se logró genotipificar ya que era la muestra que tenía menor carga bacteriana, por lo que solo se obtuvo el resultado positivo utilizando la PCR dirigida al gen que codifica el plásmido críptico.

Los genotipos encontrados fueron 7 de los 21 que tiene *C. trachomatis*. En la figura 13 se muestran los genotipos encontrados.

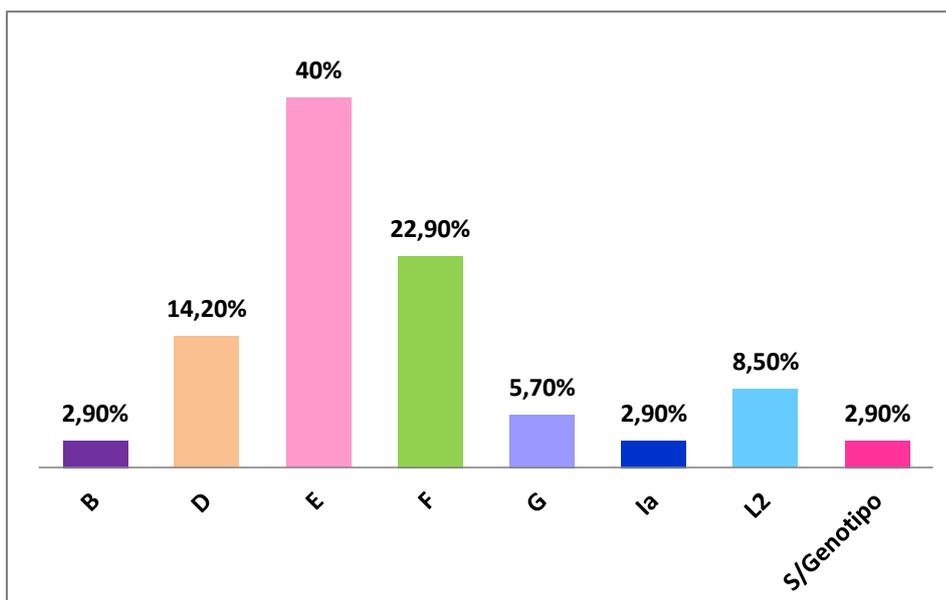


Figura 13: Se muestra la proporción de genotipos encontrados en las muestras HFSV de las embarazadas que participaron del estudio. Es posible detectar claramente que la mayor proporción de muestras tenían los genotipos E (rosa), F (verde) y D (beige). El 20% restante de los genotipos se dividió en 4 genotipos a saber: L2 (celeste), G (lila), Ia y B (azul y violeta respectivamente).

Como se puede observar, el genotipo E fue el más prevalente en las mujeres embarazadas, seguido del genotipo F y D. En la tabla 9 se muestra la distribución de genotipos de acuerdo al rango etario de las pacientes.

Distribución de genotipos de acuerdo al rango etario

Edad	Positivos (35/509)/Genotipos (34/35)							Sin genotipo	Total
	B	D	E	F	G	Ia	L2		
< 16	1			1					2 (5,7%)
16-20		1	6	2	1				10 (28,6%)
21-25		3	6	5		1	3		18 (51,4%)
26-30			2					1	3 (8,5%)
31-35		1							1 (2,9%)
36-40					1				1 (2,9%)
>40									
Total	1 (2,9%)	5 (14,2%)	14 (40%)	8 (22,9%)	2 (5,7%)	1 (2,9%)	3 (8,5%)	1 (2,9%)	35 (100%)

Tabla 9: Se muestran los genotipos encontrados en las muestras de embarazadas de acuerdo a la edad de las mismas. En rosa se resaltan el genotipo E y en celeste el rango etario 21-25 que son los más prevalentes.

5.5 Determinación de la carga bacteriana de las cepas detectadas

5.5.1 Determinación de la carga bacteriana en muestras de orina e HF de niños

No fue posible realizar la determinación de carga bacteriana en las muestras de los niños por los siguientes motivos:

- Como se mencionó anteriormente, hubo 11 muestras que fueron solo plásmido positivo; y al no poder amplificar el gen *ompA*, no fue posible determinar la carga bacteriana por PCR en tiempo real, ya que la misma estaba dirigida a esa región de la bacteria. De todas formas, sabiendo que existen 10 copias de plásmido por cada copia de MOMP, podemos inferir que estas muestras tenían una escasa carga bacteriana.
- Las cinco muestras en las que se amplificó el gen *ompA* por PCR convencional, no amplificaron en la PCR en tiempo real, por lo que no se logró tener la carga bacteriana de esas muestras.

5.5.2 Determinación de la carga bacteriana en muestras de HFSV de embarazadas

Se determinó la carga bacteriana de 34 de las 35 muestras que resultaron positivas. Debido a que las muestras presentaron un rango muy amplio de carga bacteriana, se decidió transformar la carga bacteriana a \log_{10} para su análisis, ya que de esta manera, se obtuvo una distribución más simétrica.

Se encontraron cargas bacterianas de \log_{10} 1,4 a 5,5 copias/ml con una mediana de \log_{10} 2,9 copias/ml.

Para estimar la relación entre la carga bacteriana con la edad, el NSE y los genotipos detectados, se construyeron modelos de regresión logística múltiple. Para medir la intensidad de asociación entre las variables de exposición (Edad, NSE, Genotipos) con la carga bacteriana, se utilizó el Odds Ratio (OR).

El análisis de las variables anteriormente mencionadas en función de la carga bacteriana detectada, mostró que las pacientes que tienen genotipos D, E o F, tienen 5,4 (IC 95% 0,87; 33,3) veces más chance de tener altas cargas bacterianas, que las pacientes en las que se detectaron otros genotipos. (Tabla 10)

Estimaciones de OR de la carga bacteriana con los distintos factores de riesgo

Variables OR	OR	IC 95% para OR		Valor-p
		Inferior	Superior	
Edad (<25 años)	0,6	0,07	5,22	0,6
NSE (bajo)	2,5	0,17	38,25	0,4
Genotipos (D, E, F)	5,4	0,87	33,3	0,06

Tabla 10: Estimación de los valores de *Odds Ratio*, sus intervalos de confianza y valor-*p* con variable dependiente caracterizada como carga bacteriana mayor o menor a la mediana y covariables, obtenidos del modelo de regresión logística múltiple.

5.6 Análisis Filogenético de las secuencias detectadas

5.6.1 Análisis filogenético de las secuencias de *C. trachomatis* de niños

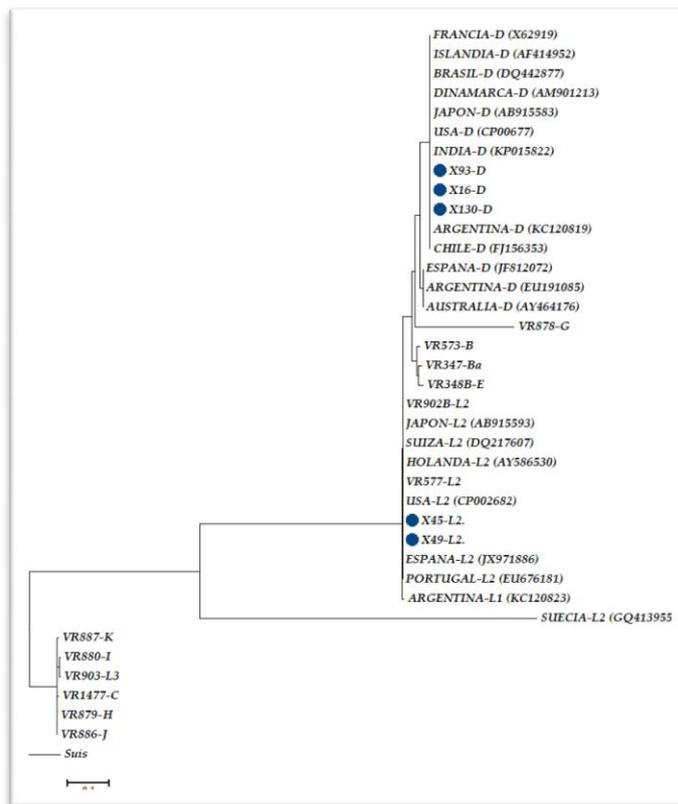


Figura 14: Dendrograma obtenido de un fragmento de 1087 pb del gen *ompA*, construido por Máxima Verosimilitud. Las cepas que pertenecen a este estudio se denominan X y están señaladas en azul. El nombre de las secuencias indica el país de origen, el genotipo y entre paréntesis el código de acceso al banco de genes. La secuencia de *C. suis* se incluyó como grupo externo.

Se analizaron filogenéticamente las 5 muestras que amplificaron para el gen *ompA*. En la figura 14 se muestra el árbol filogenético realizado en donde se comparan las muestras de niños amplificadas con cepas obtenidas en el banco de genes.

Los resultados obtenidos a partir del dendrograma muestran que las secuencias locales agruparon estrechamente entre sí y asociaron a las secuencias patrones homólogos de *C. trachomatis* y con las detectadas en otras regiones del mundo. Cabe destacar que en Genbank no hay publicadas secuencias de *C. trachomatis* de niños con sospecha de abuso sexual, por lo

que en el árbol filogenético se pueden observar secuencias detectadas en muestras genitales de adultos.

Las secuencias X16-D, X93-D y X130-D agruparon más estrechamente con secuencias originarias de América, países europeos y asiáticos, publicadas en Genbank, pero es interesante observar que existen algunas diferencias con las secuencias de Australia, España y una detectada en el país.

En la secuencia X16-D se encontraron varios cambios nucleotídicos que resultaron en cambios aminoacídicos. Los mismos son:

- ✓ posición 304 (A por C)
- ✓ posición 335 y 350 (A por G)

Además se encontraron cambios que no representaron cambios nucleotídicos en las siguientes posiciones:

- ✓ posición 342 (A por G)
- ✓ posición 389 (T por A)

5.6.2 *Análisis filogenético de las secuencias de C. trachomatis de embarazadas*

Se analizaron filogenéticamente 32 de las 35 muestras positivas. Las 3 muestras restantes no fueron aptas para la secuenciación y el posterior análisis filogenético.

El análisis de estas cepas nos muestra que todas las secuencias agrupan estrechamente con las homólogas detectadas en este estudio y con las detectadas en otras partes del mundo (Figura 16). A pesar de esto, existen algunas pequeñas diferencias que se detallan a continuación:

- ✓ La secuencia Co294-E tiene dos cambios nucleotídicos que resultan en cambios aminoacídicos; en la posición 80 (G por T) y en la posición 110 (C por T).
- ✓ La secuencia Co140-E tiene un cambio nucleotídico en la posición 155 (G por A) que no tiene como consecuencia un cambio aminoacídico.
- ✓ La secuencia Co159-B tiene 7 cambios nucleotídicos de los cuales 4 resultan en cambios aminoacídicos. Se encontraron cambios C por T en las posiciones 62 y 179; A por G en las posiciones 87, 117 y 182; T por G en la posición 128 y A por T en la 161. Los cambios aminoacídicos se dan en las posiciones 62, 117, 128 y 182. Todos estos cambios producen que esta secuencia esté más estrechamente relacionada a la detectada en una muestra genital de Australia (AY464143).

- ✓ La secuencia Co243-la tiene un cambio nucleotídico en la posición 459 (A por G). Este cambio no se correlaciona con un cambio aminoacídico, pero es la causa de que nuestra secuencia agrupe mejor con la secuencia Portugal-la (DQ116398) (Figura 17).

En este árbol filogenético se puede observar, al igual que en el anterior, que nuestras secuencias de genotipo D, no agrupan tan estrechamente con la detectada en Buenos Aires a partir de muestras genitales, ya que esta última secuencia tiene 11 cambios nucleotídicos con respecto a las estudiadas en nuestra provincia.

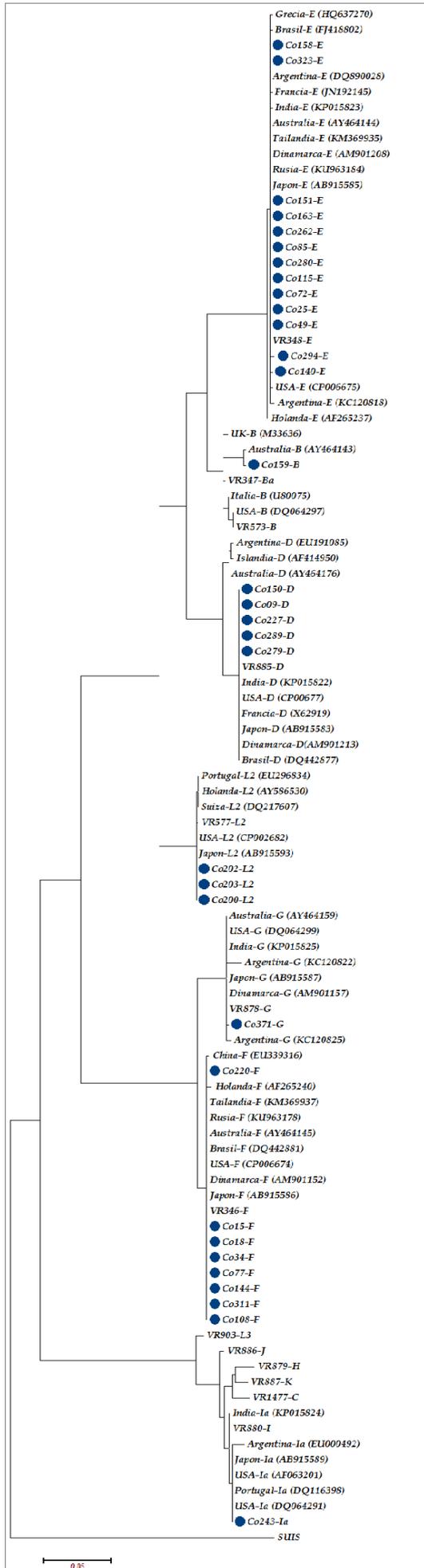


Figura 16: Dendrograma obtenido de un fragmento de 593 pb del gen *ompA*, construido por Máxima Verosimilitud. Las cepas que pertenecen a este estudio son denominan Co y están señaladas en azul. El nombre de las secuencias indica el país de origen, el genotipo y entre paréntesis el código de acceso al banco de genes. La secuencia de *C. suis* se incluyó como grupo externo.

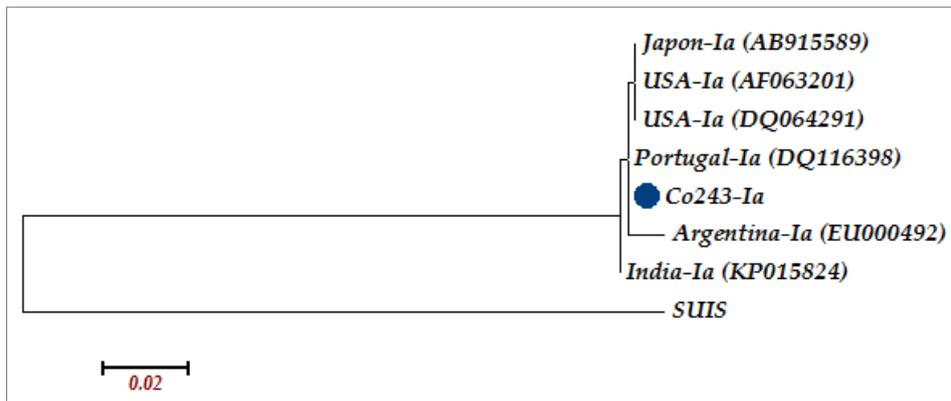


Figura 17: Dendrograma obtenido de un fragmento de 593 pb del gen *ompA* de las secuencias de genotipo Ia de *C. trachomatis*, construido por Máxima Verosimilitud. La cepa que pertenece a este estudio se denomina Co243-Ia y está señalada en azul. Se puede observar que agrupa estrechamente con la secuencia Portugal-Ia (DQ116398).

Capítulo 4

Discusión

6.0 Discusión

6.1 Validación de técnicas de Biología molecular

La primera parte de este estudio consistió en poner a punto y validar las técnicas de biología molecular que se usarían, posteriormente, para la determinación de *C. trachomatis* en las dos poblaciones vulnerables seleccionadas. Para esto, se utilizó el protocolo publicado por Rabenau y col. que determina las variables a tener en cuenta para la validación, a saber: exactitud, especificidad, sensibilidad, precisión intra ensayo e inter ensayo para cada tipo de muestra que se tomarían de los pacientes (94).

En nuestro estudio obtuvimos un 100% de exactitud en ambas PCR tanto en muestras de orina, HF e HFSV. Este resultado concuerda con el publicado por Gimenes y col, que obtuvo la misma exactitud en la validación de su PCR pero en muestras de semen (104). Además, Currie y col. encontraron ese resultado con respecto a la exactitud en muestras de orina e HFSV (105).

La sensibilidad de la PCR dirigida al gen *ompA* en muestras de orina fue del 95,2%, al igual que la PCR dirigida al gen *ompA* en muestras de HF. El resto de las PCR tuvieron una sensibilidad del 100% en éstas muestras. Por su parte, Currie y col. obtuvieron un 100% de sensibilidad tanto en orina como en HFSV (105). Morré y col, publicaron una sensibilidad del 96,1% en grupos de muestras de orina; obteniendo resultado muy similar al nuestro (106).

En relación a la especificidad, nuestra validación arrojó un 90,9% para la PCR dirigida al gen que codifica la MOMP en muestras de orina y un 95,2% en la PCR de Plásmido críptico en HF. El resto de las PCR tuvieron una especificidad del 100% para los 3 tipos de muestras. Tanto Currie y col como Morré y col, obtuvieron un 100% de especificidad en orina y en HFSV (105-106).

Cabe destacar que la especificidad de la PCR para MOMP en las muestras de orina puede deberse, justamente, a que esa muestra puede contener numerosas bacterias Gram negativas. Las mismas tienen una pared similar a *C. trachomatis* y podría ser ésta la causa de los dos resultados positivos encontrados cuando la muestra se encontraba contaminada con *E. coli* y *Haemophilus spp.*. De todas formas, es importante destacar que los resultados de la validación de esta PCR nos demuestran que la misma tiene una alta performance y es sumamente útil para el diagnóstico de esta bacteria a nivel de orina.

Este objetivo de la tesis tenía un propósito importante en relación a la población infantil: tener disponible una técnica diagnóstica para muestras no invasivas; de esta manera, es posible no exponer a los niños a situaciones incómodas a la hora de la toma de muestras, poder realizar el diagnóstico de *C. trachomatis* y, en caso de ser necesario, dar el tratamiento adecuado para evitar las complicaciones que pueden ocasionarse como consecuencia de esta infección.

Si bien es cierto que la Academia Americana de Pediatría (AAP) determina que para fines legales la única metodología aprobada es el aislamiento por cultivo celular (46); sin embargo, a los fines diagnósticos y de tratamiento médico, es muy útil la utilización de técnicas de biología molecular, ya que tienen una sensibilidad mayor al cultivo y, por este motivo, es posible detectar la bacteria aunque exista baja carga bacteriana.

Con respecto al estudio de la infección por *C. trachomatis* en las embarazadas, se validaron las PCR en muestras de HFSV. Esta muestra no representa ningún riesgo para la mujer ni para su embarazo, ya que se obtiene en el mismo momento que la muestra para la investigación de la portación de *Streptococcus agalactiae* y de ser necesario, se está a tiempo de dar el tratamiento antibiótico antes del parto, para evitar la transmisión y las posibles complicaciones que *C. trachomatis* puede provocar en el recién nacido y en la puerpera.

Según las recomendaciones del CDC en 2014, las técnicas de biología molecular demostraron ser mucho más sensibles que el aislamiento por cultivo celular, siendo capaces de detectar de un 20-50% más infecciones por *C. trachomatis* que el método considerado "gold estándar" (107). Es por este motivo que el CDC recomienda el uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el tamizaje y diagnóstico de *C. trachomatis* en la población general. Es importante destacar que no aconseja el uso de estas técnicas en caso de abuso sexual en niños o diagnóstico en muestras extra genitales; los estudios en este sentido son alentadores pero insuficientes ya que el tamaño muestral de los mismos es pequeño, además de mezclar varios sitios anatómicos y niños con adolescentes (80, 108). Los resultados de este estudio son importantes ya que aportarán datos en referencia al uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de esta bacteria en muestras extra genitales y en niños con sospecha de abuso sexual.

Nuestro trabajo concuerda con los estudios de sensibilidad y especificidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ya que fue posible determinar que las PCR validadas dirigidas a los genes que codifican el plásmido críptico y la MOMP de *C. trachomatis*, en muestras de orina, HF e HFSV son altamente sensibles y específicas (39).

En la actualidad, los estudios de sensibilidad y especificidad de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos están enfocados en el diagnóstico por PCR en tiempo real

(109-111), pero este tipo de metodología no nos permite hacer análisis filogenéticos ya que amplifican fragmentos muy pequeños del genoma de la bacteria y, por lo tanto, no es factible realizar análisis de mutaciones, etc. Además, la PCR en tiempo real es más costosa que la PCR convencional, por lo que no sería costo efectivo utilizarla en tamizaje de la población general.

6.2 Determinación de la presencia de *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual.

La segunda parte de este estudio consistió en determinar la presencia de *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual.

Para poder estudiar esta población, primero debemos dejar claramente determinado el abuso sexual infantil. Según la Organización mundial de la Salud (OMS) es: “la participación de un niño en una actividad sexual que no comprende plenamente, a la que no es capaz de dar un consentimiento, o para la que por su desarrollo no está preparado y no puede expresar su consentimiento, o bien que infringe las leyes o los preceptos sociales” (40).

La incidencia real del abuso sexual infantil es desconocida a nivel mundial. El National Center on Child Abuse and Neglect (NCCAN) estima que la incidencia anual de abuso sexual en Estados Unidos es entre 70.000 y 250.000 casos por año (112); y es interesante destacar que solo el 4% de los pacientes examinados por sospecha de abuso sexual, tiene alteraciones en el examen físico (45).

La presencia de una ITS en un niño, siempre nos debe hacer sospechar un abuso. Se cree que, aproximadamente, el 5% de los niños abusados contrae alguna ITS como consecuencia del mismo. Según la AAP, la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y *C. trachomatis* es considerado diagnóstico de certeza de abuso sexual (46), siempre y cuando se descarte la transmisión perinatal de este último microorganismo en niños menores de 3 años (46, 113). Por este motivo, los niños menores de esa edad quedaron excluidos de este estudio.

Revisando la bibliografía existente de prevalencia de *C. trachomatis* en niños con sospecha de abuso sexual, encontramos a Girardet y col. que refieren haber encontrado un 3,1% (15/485) de niñas infectadas con *C. trachomatis* en Estados Unidos (80). Por su parte, Kelly y col, hallaron, en Nueva Zelanda, un 0,9% (20/2162) de infección por este microorganismo (81). Ambos autores utilizaron el aislamiento por cultivo celular como método diagnóstico. En nuestro estudio encontramos un 20% de los pacientes infectados con *C. trachomatis*.

Esta diferencia de prevalencia entre nuestro estudio y los otros publicados puede deberse a varios factores. Por un lado, la técnica utilizada, ya que nosotros utilizamos biología molecular, que, como ya se explicó anteriormente, tiene más sensibilidad que el aislamiento por cultivo celular. Por otro lado, nuestro número muestral fue pequeño, lo que puede llevar a sesgos en cuanto a la prevalencia de la infección.

Del total de niños infectados por *C. trachomatis* en el trabajo de Kelly y col, el 90% eran niñas (81). Girardet y col encontraron a esta bacteria solo en niñas (80). Nuestro trabajo concuerda con estos hallazgos, ya que del total de niños infectados, el 92% eran niñas y el 8% restante, fueron varones. Hay autores que sugieren que la delgadez del epitelio vaginal de las niñas y la posibilidad de abusos reiterados y sin uso anticonceptivos de barrera, son factores que contribuyen a que la infección sea más frecuente en esta población (80).

Con respecto a la edad, en nuestro estudio la edad media de los niños infectados fue de $8,7 \pm 2,8$ años. Kelly y col refieren que la edad media de los pacientes infectados es de 11 ± 4 años (80-81). Esta diferencia puede deberse a que en su estudio, la población estudiada tenía edades comprendidas entre 0 a 17 años.

Hammerschlang y col confirman estos datos, ya que en su revisión consta que el abuso sexual infantil se da, en su mayoría, en niñas y con un rango etario de 8 a 12 años de edad (45).

En nuestro trabajo, el 62,5% de las muestras positivas para *C. trachomatis* eran HF y el 37,5% restante se encontraron en muestras de orina. Si bien es cierto que el CDC no recomienda el "screening" de *C. trachomatis* en sitios extragenitales en niños con sospecha de abuso sexual, hay estudios que recomiendan el uso de la biología molecular en muestras como la orina, ya que esta técnica ofrece una clara ventaja sobre el cultivo en cuanto a la sensibilidad y el tipo de muestra (no invasiva) (114).

Los estudios existentes en HF, fueron realizados en adultos; determinando que un número significativo de infecciones, en mujeres jóvenes, se pierden por realizar solo diagnóstico genital de la misma. En niños con sospecha de abuso sexual, no está recomendado el diagnóstico extragenital de *C. trachomatis* (107). Sin embargo, Kellogg y col refieren que la cavidad oral es un sitio frecuente de abuso sexual en niños y, generalmente, las ITS se presentan de manera asintomática en este sitio (115). Es por este motivo, que consideramos importante estudiar el HF en esta población para conocer la real situación de la infección por *C. trachomatis* en boca. Cabe destacar que, generalmente, son los estomatólogos los que descubren lesiones compatibles con abuso y derivan a los niños para ser evaluados por posibles abusos sexuales.

6.3 Análisis de los genotipos de *C. trachomatis* presentes en niños con sospecha de abuso sexual.

La importancia de realizar este objetivo radica en conocer la circulación de *C. trachomatis* en esta población vulnerable. Son escasos los estudios que realizan genotipificación de *C. trachomatis* en niños, pero según la bibliografía consultada es de esperar que en los niños la circulación de genotipos sea semejante a los adultos. Verweij publica que los genotipos **D** y **E** son los que prevalecen en las distintas poblaciones estudiadas alrededor del mundo (82). Por su parte, Yu y col. encontraron genotipos **E**, **F**, **H** y **D** en muestras de recién nacidos (87). En Argentina, Gallo Vaulet y col un 72,4% de prevalencia de genotipo **E** en neonatos con oftalmía (85). En nuestro trabajo estudiamos niños con sospecha de abuso sexual y fue posible genotipificar 5 de las 16 muestras positivas. Los genotipos identificados fueron **D** y **L2**. Vale destacar que la edad de los niños es mayor a la estudiada por el grupo de Buenos Aires, y que la vía de transmisión de los recién nacidos es a través del canal del parto, por lo que se puede inferir que los genotipos encontrados en esta población, coincidirían con los encontrados en el tracto genital de mujeres sexualmente activas.

Las muestras que pudimos genotipificar resultaron ser muy escasas como para poder realizar alguna estimación estadística y consideramos que sería de suma importancia continuar con este estudio con el objetivo de determinar la real circulación de genotipos de *C. trachomatis* en esta población tan vulnerable.

6.4 Determinación de *C. trachomatis* en HFSV de embarazadas

En nuestro estudio detectamos una prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en embarazadas del 6,9%. En el mundo se han publicado prevalencias de 12,1% en Reino Unido (70), 6,4% en Australia (116), 3,5% en Estados Unidos (71), 6,1% en África central y 6,9% en Sudáfrica (117). Es importante destacar que la prevalencia más baja de infección se da, justamente, en el país que tiene programas de tamizaje de esta infección, tanto en la población general como en embarazadas (118). En América Latina, se han detectado prevalencias de 5,9% en Chile (73), 10% en Perú (74) y 11% en Brasil (75).

Es interesante destacar que nuestra prevalencia esta dentro de las más bajas de Latinoamérica; y además, coincide con las detectadas en Sudáfrica y Australia.

En relación a la edad, podemos recalcar que, al igual que en la población general, la infección en nuestra población de estudio se da en menores de 25 años (117), con una edad media de pacientes infectadas con *C. trachomatis* es de 21,6 años. De Borborema coincide con esto, ya que el 72% de las pacientes que estaban infectadas con esta bacteria tenían menos de 25 años (75). Por su parte, Chen estudio pacientes de 16 a 25 años en Melbourne detectando el 77% de las infecciones en pacientes menores de 20 años (116). En España, Piñeiro y col encontraron que la prevalencia de *C. trachomatis* en embarazadas menores de 25 años fue del 6,4% decreciendo, sustancialmente, a medida que aumenta la edad de las pacientes; 2% en mujeres entre 25-29 años y 0,5% en mayores de 30 años (119). Vidwan, por su parte, encontró una edad media de las pacientes infectadas de 25,6 años (72). Todo indica que ser menor de 25 años es un factor de riesgo para la infección por este microorganismo; tanto es así que el CDC y la Unión Europea, recomiendan el tamizaje de *C. trachomatis* en embarazadas menores de esa edad (107, 120).

En cuanto al NSE, Farinati y col, publicaron que, en jóvenes asintomáticos de 18 a 25 años, tener un bajo NSE es considerado un factor de riesgo para la infección por *C. trachomatis* (65). Crichton y col realizaron una revisión bibliográfica en donde encuentran una fuerte evidencia de asociación entre la infección por *C. trachomatis* y el nivel socioeconómico (121); además, refieren que el riesgo se duplica si el nivel educativo es bajo. Por nuestra parte, nuestros resultados son coincidentes con los presentados por Farinati y Crichton, ya que encontramos que las embarazadas con bajos recursos económicos son más propensas a contraer esta infección ($p=0,00006$) (65, 121).

6.5 Determinación de los genotipos de *C. trachomatis* presentes en embarazadas

Existen diversos estudios que determinan los genotipos de *C. trachomatis* en distintas poblaciones. La mayoría de ellos, concuerdan en que el genotipo **E** es el prevalente, independientemente de la población estudiada. Ejemplo de esto observamos en el trabajo de Gharsallah y col. que encontraron este genotipo en el 66,4% de los pacientes que asistieron a un centro de ITS y trabajadoras sexuales tunecinas (122). En España, Mejuto y col. reportaron un 37,5% de prevalencia de genotipo **E** en hombres que tienen sexo con hombres (123), seguido del genotipo **G** con un 25% y del **D** con un 12%. En Argentina, Gallo Vaulet y col encontraron una clara prevalencia de genotipo **E** tanto en adultos como en neonatos, con cifras de 46,3% y 72,4% respectivamente (85).

Son escasos los trabajos que determinan los genotipos de *C. trachomatis* en embarazadas. En nuestro trabajo encontramos que los genotipos más prevalentes son **E, F y D**. Estos resultados coinciden con los de Yu y col. que encontraron genotipos **E, F, H y D** en embarazadas y sus recién nacidos (87). Por su parte, Zhong y col hallaron en mujeres parturientas los genotipos **E, F y D** (88). Además, en Tailandia, Bandea y col estudiaron muestras de orina de mujeres embarazadas y encontraron los siguientes genotipos: **F, D, H, K, E, Ia, B, Ja y G** (124).

Es evidente que los genotipos **D y E** son los más prevalentes alrededor del mundo, pero aún resta definir las razones de esta situación. Byrne postula que estos dos genotipos son menos inmunogénicos que otros, y por lo tanto, son las cepas más prevalentes en todas las poblaciones examinadas (83). Alternativamente, es posible que algunos atributos de virulencia aún indefinidos (por ejemplo, los factores relacionados con la transmisión) están vinculados a los genotipos **D y E**, y les proporcionan una ventaja biológica independiente de sus genes *ompA*. Contrariamente a Byrne, Verweij y col determinaron que estos dos genotipos están asociados a infecciones persistentes; esta situación sería la responsable de que la respuesta inmune desatada por los genotipos **E y D** es mayor que la que producen el resto de los genotipos (82).

6.6 Determinación de la carga bacteriana de *C. trachomatis* en las muestras de orina e HF de niños

En las muestras de niños, se obtuvieron 11 muestras que resultaron positivas para plásmido críptico de *C. trachomatis* pero negativas para el gen que codifica la MOMP. Sabiendo que existen 10 copias de plásmido críptico por cada copia del gen *ompA*, podemos inferir que las muestras que no amplificaron este último gen, tenían una muy baja carga bacteriana.

Las cinco muestras que habían amplificado para el gen *ompA* en la PCR convencional, no amplificaron en la PCR en tiempo real, por lo que no fue posible determinar sus cargas bacterianas. Este resultado nos hace pensar que la carga bacteriana de estas últimas muestras era baja, ya que se lograron amplificar en la Nested PCR que, por el hecho de ser dos reacciones sobre el mismo fragmento de la bacteria, tiene mayor sensibilidad que la PCR en tiempo real.

Este es el primer aporte a la bibliografía acerca de la carga bacteriana de *C. trachomatis* en esta población, ya que no existe ningún reporte en donde se haya intentado tener la carga bacteriana en muestras de niños con sospecha de abuso sexual.

6.7 Determinación de la carga bacteriana de *C. trachomatis* en HFSV en embarazadas

La importancia de realizar este punto reside en poder correlacionar la carga bacteriana de *C. trachomatis* con los datos demográficos de las pacientes y los genotipos, con el objetivo de detectar si existe alguna relación entre ellos y determinar si alguna característica de las pacientes puede ser tomado como factor pronóstico de la infección

Se determinó la carga bacteriana de *C. trachomatis* de las pacientes embarazadas que resultaron positivas para la infección. Se logró obtener la carga bacteriana de 34 de las 35 pacientes positivas y las mismas estaban en un rango de 1,4 a 5,5 \log_{10} .

Batteiger y col postulan que la carga bacteriana disminuye a medida que aumenta la edad de los pacientes. Según los autores, esto es así porque la inmunidad adquirida en infecciones anteriores, restringe la replicación de la bacteria en personas mayores (125). En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas de carga bacteriana en pacientes menores de 25 años comparadas con las mayores de esa edad ($p=0,6$).

Dirks y col. realizaron un estudio para determinar la carga bacteriana en una población atendida en centros de ITS y una muestra de la población general (118). Encontraron una media de carga bacteriana en mujeres de \log_{10} 4,2 copias/ml, sin diferencias entre las dos poblaciones estudiadas. En nuestro estudio la media de carga bacteriana de *C. trachomatis* es de \log_{10} 2,9 copias/ml. Por su parte, Jalal y col encuentran una media de carga bacteriana de esta bacteria en mujeres de \log_{10} 5,6 copias/ml, sin encontrar relación con la edad de las pacientes, el genotipo, ni la presentación clínica (126). Ellos concluyen en que la carga bacteriana y la diversidad del gen *ompA*, juega un papel muy pobre en la patogénesis de la infección genital por *C. trachomatis*. Nuestros resultados son coincidentes con los de Jalal, ya que ninguna de las embarazadas que resultaron positivas tenían sintomatología clínica y las cargas bacterianas observadas en ellas tenían gran variabilidad (126).

Walker y col encontraron que las cargas bacterianas eran mayores cuando la infección se daba por genotipo **D** (127); Eckert y col coinciden con lo reportado por Walker y además refieren que esto se da con los genotipos **E** y **F** (128). En nuestro trabajo, pudimos observar

que las pacientes infectadas con estos genotipos tienen 5,4 veces más chances de tener altas cargas bacterianas. Es posible que esto contribuya a que los genotipos mencionados sean los más prevalentes alrededor del mundo

6.8 Análisis filogenético de las secuencias de *C. trachomatis* de Niños con sospecha de abuso sexual.

Este punto del trabajo tiene mucha importancia desde el punto de vista de la epidemiología molecular, ya que la secuenciación y el posterior análisis de las mismas son las herramientas adecuadas para observar mutaciones en el fragmento amplificado de *C. trachomatis*.

Al análisis filogenético, el árbol construido presenta 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*. Brunelle y col. proponen que existe una tendencia marcada en la agrupación de los serovares, que no está relacionado con el tropismo tisular (129). Por su parte, Stothard y col y Lutter y col, plantean que la diversidad de la MOMP se puede haber dado como respuesta a la presión inmune, con el objetivo de ser diversa y poder, de ese modo, evadirlo (130-131); y que no juega un papel importante en la patogenicidad de la infección. En nuestro trabajo, nuestro árbol filogenético coincide con lo propuesto por estos autores, ya que los grupos no se dan de acuerdo al tropismo tisular ni la patogenicidad de cada genotipo.

Nuestros resultados coinciden, además con los publicados por Monetti y col, que realizaron el análisis filogenético del gen *ompA* en muestras de pacientes infértiles de la Ciudad de Córdoba, Argentina (68).

En relación a las secuencias de genotipo **D**, podemos observar que agrupan estrechamente entre sí y con casi todas las secuencias de América, Europa y Asia. Dentro de las secuencias comparadas existe una detectada por Monetti y col, que pertenece a un hisopado uretral de un paciente de sexo masculino, y forma parte del árbol filogenético mostrado en la figura 14 (ARGENTINA-D-KC120819) (68). Se puede observar que agrupa estrechamente con nuestras secuencias de niños.

Finkelhor y col reportan que la mayor parte de los abusos son perpetrados por hombres; 83% en varones y 98% en niñas (132). Considerando que las secuencias encontradas en este estudio agrupan estrechamente con un hisopado uretral de un hombre y que la infección por *C. trachomatis* en la población estudiada se da por contacto sexual, sería muy

importante aumentar el número muestral para poder analizar si existen verdaderas asociaciones entre estas dos poblaciones.

Por el contrario, la secuencia de genotipo **D** detectada en muestra genital y publicada en Genbank por Gallo Valuet y col (ARGENTINA-D-EU191085) (85), no agrupa tan estrechamente con las de la región y si con cepas de España y Australia.

En relación a las secuencias de **L2** detectadas en nuestra estudio, es posible decir que agrupan estrechamente entre sí y con las publicadas en otras partes del mundo, salvo con la secuencia detectada en Suecia (SUECIA-L2-GQ413955), la cual no agrupa con ninguna de las estudiadas en este árbol. Esta secuencia está publicada por Christenson y col en un trabajo en donde se hace un análisis de secuencias detectadas en hombres que tienen sexo con hombres y diagnóstico de Linfogramuloma venéreo; en Europa y Estados Unidos (133). En este trabajo utilizan como método de análisis la tipificación multilocus de secuencias (MLST) y refieren que la secuencia mencionada tiene cambios aminoacídicos no publicados anteriormente. Es posible que las diferencias detectadas con nuestras secuencias se deban a que la MLST es más sensible. Por este motivo, sería interesante analizar las cepas detectadas en niños con sospecha de abuso sexual con esta última técnica para observar más detenidamente los cambios presentes.

6.9 Análisis filogenético de secuencias de *C. trachomatis* detectadas en embarazadas

Al igual que el árbol construido a partir de las secuencias de niños, el árbol filogenético construido a partir de las secuencias de embarazadas, presenta las mismas subdivisiones que proponen Brunelle y col (129). Además, nuestros resultados son coincidentes con los de Monetti y col, Stothard y col y Lutter y col (68, 130-131).

En relación al agrupamiento de nuestras secuencias, podemos decir que en todos los casos agrupan estrechamente entre sí; solo Co294-E presenta dos cambios nucleotídicos con respecto al resto de las secuencias de este trabajo y Co140-E presenta un solo cambio.

No hay ninguna secuencia que agrupe con secuencias de otros genotipos y el dato interesante de este árbol es que nuestras secuencias de genotipo **D** no agrupan tan estrechamente con la detectada en Buenos Aires a partir de una muestra cervical. Esta última secuencia tiene 11 mutaciones puntuales que la diferencian del resto de las secuencias analizadas. Desafortunadamente, esta secuencia no pertenece a ningún estudio publicado, por lo que no es posible realizar un análisis exhaustivo de las causas por las que la misma tiene estos cambios con respecto al resto de las secuencias analizadas.

Capítulo 5

Conclusiones

7.0 Conclusiones

Durante la realización de este trabajo de tesis se logró poner a punto una técnica de biología molecular utilizando muestras de orina, HF e HFSV. Cabe destacar que las 6 PCR lograron tener una excelente “performance”.

El contar con técnicas relativamente sencillas, que utilicen muestras no invasivas para el diagnóstico de la infección por *C. trachomatis*, es muy importante, si tenemos en cuenta que una de las poblaciones estudiadas es la infantil; porque de esta manera, es posible evitar incomodar a los pacientes y además se logra, sin mayores dificultades, realizar el diagnóstico y el tratamiento oportuno, para impedir todas las complicaciones que esta bacteria puede traer aparejada en el futuro de estos niños.

Con respecto a las embarazadas, las PCR puestas a punto no representan ningún riesgo ni incomodidad para la paciente y su bebé ya que se toma la muestra en el mismo momento que se hace la portación de *Streptococcus agalactiae*. Consideramos que es un buen momento para realizar esta toma ya que, si la muestra se toma en el primer trimestre de embarazo, no podemos descartar la reinfección posterior al diagnóstico y tratamiento, en cambio, si la muestra es tomada en la semana 35-37 todavía se está a tiempo de dar un tratamiento adecuado para evitar la infección en los recién nacidos.

Con respecto a la población infantil con factores de riesgo de abuso sexual, las conclusiones más importantes a las que pudimos arribar son, en primer lugar, que nuestra prevalencia es mayor a las reportadas por otros autores, en segundo lugar, pudimos observar que la mayoría de los pacientes infectados con *C. trachomatis* eran de sexo femenino en un rango etario de 8 a 12 años de edad.

Este trabajo es la primera aproximación que tenemos de esta ITS en la cavidad oral en esta población vulnerable, y con los resultados obtenidos podemos decir que es trascendente conocer la real situación de la infección por *C. trachomatis* en la boca ya que es un sitio frecuente de abuso en niños.

En relación a la genotipificación, en las muestras de niños encontramos genotipos **D** y **L2**, pero creemos que las muestras que lograron ser genotipificadas resultaron ser muy escasas como para poder realizar alguna estimación estadística; es por este motivo que consideramos que sería de suma importancia continuar con este estudio con el objetivo de determinar la real circulación de genotipos de *C. trachomatis* en esta población tan expuesta a esta ITS.

Es importante destacar que la mayoría de las muestras tenían bajas cargas bacterianas. Afirmamos esto porque la mayoría de las muestras resultaron ser positivas sólo para plásmido críptico y las que se lograron amplificar con la Nested PCR dirigida al gen *ompA* para *C. trachomatis*, no amplificaron en la real time PCR. Consideramos que sería conveniente poner a punto una técnica aún más sensible para la cuantificación de muestras de la población infantil, con el objetivo de poder realizar estudios más profundos de epidemiología molecular en esta población.

La segunda población vulnerable que se estudió fue mujeres embarazadas. Se encontró una prevalencia del 6,9% de infección por *C. trachomatis*. Nuestra prevalencia coincide con las medias de prevalencia de Latinoamérica, Australia y Sudáfrica. Es conocido que los países que han implementado programas de tamizaje para esta bacteria han visto reducida la prevalencia de infección tanto en la población general como en poblaciones vulnerables.

En este estudio se logró identificar el grupo de riesgo dentro de las pacientes embarazadas; el mismo son las pacientes menores de 25 años y con bajo NSE. Tener en claro esto reviste mucha importancia a la hora de pensar en programas de tamizaje en esta población, ya que, de esta manera, se lograría disminuir la transmisión a los recién nacidos, reducir la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* y evitar gastos en Salud Pública.

En relación a los genotipos circulantes en las embarazadas, pudimos establecer que los genotipos más prevalentes en nuestra población son **E**, **F** y **D**. Este dato coincide con los reportados en distintos estudios realizados. Existen varias publicaciones que intentan explicar cómo estos genotipos logran tener mayor circulación que el resto a nivel mundial, pero ninguna tiene resultados concluyentes. Es por esto que creemos necesario indagar en esta característica ya que de esta forma, se tienen más elementos a la hora de pensar una fórmula vacunal o tratamientos alternativos.

En este trabajo pudimos determinar las cargas bacterianas que teníamos en las muestras de embarazadas y detectamos que las mismas son levemente menores a las encontradas por otros autores. Pudimos observar que éstas no están relacionadas a la edad de las pacientes ni al NSE, pero si pudimos percibir que las infecciones dadas por los genotipos **D**, **E** y **F** tienen cargas levemente más elevadas que las infecciones dadas por el resto de los genotipos de *C. trachomatis*.

Revisando la bibliografía existente con respecto a este tema, hay investigadores que postulan que la respuesta inmune desatada en la primoinfección por *C. trachomatis* tendría efecto sobre la replicación en reinfecciones, lográndose una menor carga bacteriana en las mismas. Sería interesante poder establecer que sucede, en poblaciones vulnerables, con la carga bacteriana en primoinfección y reinfecciones, información que no fue posible determinar durante el desarrollo de este trabajo.

Además, estos autores proponen que ni la carga bacteriana ni la diversidad del gen *ompA* juegan un rol importante en la patogénesis de la infección por esta bacteria. En nuestro trabajo pudimos observar que no existen diferencias clínicas en las embarazadas en relación al genotipo de *C. trachomatis* encontrado en cada una de ellas ni en relación a la carga bacteriana; información que se condice con lo postulado anteriormente.

Este trabajo de tesis es el primer estudio de la infección por *C. trachomatis* en dos poblaciones vulnerables de nuestra ciudad, y creemos que es un aporte de gran utilidad en relación a la ITS más prevalente del mundo, ya que, teniendo en cuenta algunos aspectos de esta investigación, se podrían llevar a cabo programas de tamizaje con el objetivo de disminuir la transmisión de esta bacteria, las complicaciones y bajar los costos que *C. trachomatis* trae aparejada en Salud Pública.

8.0 Referencias Bibliográficas

- 1) De Halicarnaso, H. *Los nueve libros de la historia*. WM Jackson. 1952.
- 2) Dávila, C. *La Leyenda Negra*. Suplemento de Anuario de Estudios Americanos, Sección Historiografía y Bibliografía, 18(2), 365. 1974.
- 3) Celso, AC. *Los ocho libros de la Medicina*. Ed. Iberia, SA Barcelona, Tomos II.1966.
- 4) Juvenal DJ. *Sátiras*. Ed Siberia, Barcelona. 1959.
- 5) Durand M., Nicolas J., Favre M. *Lymphogranulomatose inguinale subaiguë d'origine génitale probable peut-être vénérienne*. Bull. et mém. Soc. méd. d. hôp. de Paris; 35, 274. 1913.
- 6) Storz J., Page LA. *Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov.* In J Syst Bacteriol; 21, 332-334. 1971.
- 7) Grayston T., Kuo CC., Campbell LA., Wang SP. *Chlamydia pneumonia sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR*. Int J Syst Bacteriol; (39), 88-90. 1989.
- 8) Fukushi H., Hirai K. *Proposal of Chlamydia pecorum sp. nov. for Chlamydia strains derived from ruminants*. Int J Syst Bacteriol; (42), 306-308. 1992.
- 9) Everett KD., Bush RM., Andersen AA. *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 new species, and standards for the identification of organisms*. Int J Syst Bacteriol; 49 (2): 415-40. 1999.
- 10) Whitman WB. *Bergey's Manual of systematic bacteriology, segunda edicion, volume 4. Phylum XXIV. Chlamydiae* Garrity and Holt; 843-878. 2001
- 11) Vorimore F., Hsia RC., Huot-Creasy H., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G., Laroucau K. *Isolation of a New Chlamydia species from the Feral Sacred Ibis (Threskiornis aethiopicus): Chlamydia ibidis*. PLoS ONE; 8(9): [e74823. doi:10.1371/journal.pone.0074823. 2013]
- 12) Sachse K., Laroucau K., Riege K., Wehner S., Dilcher M., Creasy HH., Weidmann M., Myers G., Vorimore F., Vicari N., Magnino S., Liebler-Tenorio E., Ruetgger A., Bavoil PM., Hufert FT., Rosselló-Móra R., Marz M. *Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of Chlamydia avium sp. nov. and Chlamydia gallinacea sp. nov.* Syst Appl Microbiol; 37(2): 79-88. 2014.
- 13) Fehr A., Walther E., Schmidt-Posthaus H., Nufer L., Wilson A., Svercel M., Richter D., Segner H., Pospischil A., Vaughan L. *Candidatus Syngnamydia venezia, a novel member of the phylum Chlamydiae from the broad nosed pipefish, Syngnathus typhle*. PLoS One; 8(8): e70853. 2013.
- 14) Arango Al., Mattar S., Visbal J. *Chlamydia trachomatis: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos*. MVZ-Córdoba; 6 (2): 87-96. 2001.
- 15) Schramm N., Bagnell CR., Wyrick PB. *Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells*. Infect Immun; 64(4): 1208-14. 1996.
- 16) Nguyen B., Valdivia R. *A chemical mutagenesis approach to identify virulence determinants in the obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis*. Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols; 347-358. 2014.
- 17) Baehr W., Zhang YX., Joseph T., Su HUA., Nano FE., Everett KD., Caldwell HD. *Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes*. Proc Natl Acad Sci USA; 85(11): 4000-4004. 1988.

- 18) Stephens RS., Sanchez-Pescador R., Wagar EA., Inouye C., Urdea MS. *Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes*. J. Bacteriol; 169, 3879–3885. 1987.
- 19) Su H., Spangrude GJ., Caldwell HD. *Expression of Fc gamma RIII on HeLa 229 cells: possible effect on in vitro neutralization of Chlamydia trachomatis*. Infect Immun; 59(10): 3811-4. 1991.
- 20) Zhang YX., Stewart S., Joseph T., Taylor HR., Caldwell D. *Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis*. J. Immunol; 138: 575–581. 1987.
- 21) Brunham RC., Zhang DJ., Yang X., McClarty, GM. *The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease*. J. Infect. Dis; 181(3): S538-S543. 2000.
- 22) Stephens, RS. *Chlamydial genomics and vaccine antigen discovery*. J. Infect. Dis.; 181: S521–S523. 2000.
- 23) Nunes A., Nogueira PJ., Borrego MJ., Gomes JP. *Adaptive evolution of the Chlamydia trachomatis dominant antigen reveals distinct evolutionary scenarios for B- and T-cell epitopes: worldwide survey*. PLoS One; 5(10): e13171. 2010.
- 24) Millman KL., Tavaré S., Dean D. *Recombination in the ompA Gene but Not theomcB Gene of Chlamydia Contributes to Serovar-Specific Differences in Tissue Tropism, Immune Surveillance, and Persistence of the Organism*. J. Bacteriol; 183(20): 5997-6008. 2001.
- 25) Hanson BR., Tan M. *Transcriptional regulation of the Chlamydia heat shock stress response in an intracellular infection*. Mol. Microbiol; 97(6): 1158-1167. 2015.
- 26) Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, Carabeo RA, Hackstadt T. *A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin*. Proc Natl Acad Sci USA; 101(27):10166-71. 2004.
- 27) Muschiol S., Bailey L., Gylfe Å., Sundin C., Hultenby K., Bergström S., Henriques-Normark, B.. *A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of Chlamydia trachomatis*. Proc Natl Acad Sci USA; 103(39): 14566-14571. 2006.
- 28) Alonso R., Galán JC., Gutiérrez Fernández J., Rodríguez Domínguez M., Salinas J., Sanbonmatsu Gámez S. *Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas*. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. [<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>]. 2012.
- 29) Ferreira R., Borges V., Nunes A., Borrego MJ., Gomes JP. *Assessment of the load and transcriptional dynamics of Chlamydia trachomatis plasmid according to strains' tissue tropism*. Microbiol Res; 19; 168(6): 333-9. 2013.
- 30) Stephens RS., Kalman S., Lammel C., Fan J., Marathe R., Aravind L., Mitchell W., Olinger L., Tatusov RL., Zhao Q., Koonin EV., Davis RW. *Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis*. Science; 282(5389): 754-9. 1998.
- 31) Seth-Smith HMB., Harris SR., Persson K., Marsh P., Barron A., Bignell A., Bjartling C., Clark L., Cutcliffe LT., Lambden PR., Lennard N., Lockey SJ., Quail MA., Salim O., Skilton RJ., Wang Y., Holland MJ., Parkhill J., Thomson NR., Clarke IN. *Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain*. BMC Genomics; 10: 239. 2009.
- 32) Jeffrey BM., Suchland RJ., Quinn KL., Davidson JR., Stamm WE., Rockey DD. *Genome sequencing of recent clinical Chlamydia trachomatis strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination*. Infect Immun; 78: 2544–2553. 2010.
- 33) Unemo M., Seth-Smith HMB., Cutcliffe LT., Skilton RJ., Barlow D., Goulding D., Persson K., Harris SR., Kelly A., Bjartling C., Fredlund H., Olcén P., Thomson NR., Clarke IN. *The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization*. Microbiology; 156: 1394–1404. 2010.

- 34) Somboonna N., Wan R., Ojcius DM., Pettengill MA., Joseph SJ., Chang A., Hsu R., Read TD., Dean D. *Hypervirulent Chlamydia trachomatis clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L(2)) and D lineages*. *Mol Biol Evol*; 2: e00045–e00011. 2011.
- 35) Harris SR., Clarke IN., Seth-Smith HMB., Solomon AW., Cutcliffe LT., Marsh P., Skilton RJ., Holland MJ., Mabey D., Peeling RW., Lewis DA., Spratt BG., Unemo M., Persson K., Bjartling C., Brunham R., de Vries HJ., Morré SA., Speksnijder A., Bébéar CM., Clerc M., de Barbeyrac B., Parkhill J., Thomson NR. *Whole-genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing*. *Nat Genet*; 44: 364–366. 2012.
- 36) Joseph SJ., Didelot X., Rothschild J., de Vries HJ., Morre SA., Read TD., Dean D. *Population genomics of Chlamydia trachomatis: insights on drift, selection, recombination, and population structure*. *Mol. Biol. Evol*; 29: 3933–3946. 2012.
- 37) Xia Y., Xiong L. *Progress in genotyping of Chlamydia trachomatis*. *Chin Med J*; 127(22): 3980-3986. 2013.
- 38) Organización Mundial de la Salud. *Salud ocular universal: un plan de acción mundial 2014-2019*. Disponible en [<http://www.who.int/blindness/en/>]. 2013.
- 39) Gaydos C., Maldeis NE., Hardick A., Hardick J., Quinn TC. *Mycoplasma genitalium compared to Chlamydia, Gonorrhoea and Trichomonas as an etiologic agent of urethritis in men attending STD clinics*. *Sex Transm Infect*; 85 (6): 438-440; 2009.
- 40) Eng TR., Butler WT. *The hidden epidemic: Confronting sexually transmitted diseases*. National Academies Press. (1997).
- 41) Soper DE. *Pelvic inflammatory disease*. *Obstet Gynecol*. 116: 419-428. 2010.
- 42) Kortekangas-Savolainen O. *Hospital-Diagnosed Late Sequelae after Female Chlamydia trachomatis Infections in 1990-2006 in Turku, Finland*. *Gynecol Obstet Invest*; 73(4): 299-303. 2012.
- 43) Kakar S., Bhalla P., Maria A., Rana M., Chawla R., Mathur NB. *Chlamydia trachomatis causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center*. *Indian J Med Microbiol*; 28: 45-7. 2010.
- 44) Hammerschlag MR. *Sexually transmitted diseases in sexually abused children: medical and legal implications*. *Sex Transm Inf*; 74: 167-174. 1998.
- 45) Hammerschlag MR., Guillén CD. *Medical and Legal implications of testing for Sexually Transmitted Infections in Children*. *Clin Microbiol Rev*; 23 (3): 493-506. 2010.
- 46) American Academy of Pediatrics. *Guidelines for the Evaluation of Sexual Abuse of Children: Subject Review*. *PEDIATRICS*; 103(1): 186-191. 1999.
- 47) Kapoor, S. *Re-emergence of lymphogranuloma venereum*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*; 22(4): 409-416. 2008.
- 48) Black CM. *Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections*. *Clin Microbiol Rev*; 10(1): 160-84. 1997.
- 49) Papp P., Schachter JR., Gaydos J., Van Der Pol CA., Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, CDC. *Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae - 2014*. *MMWR Recomm Rep*; 14: 63(RR-02), 1-19. 2014.
- 50) Rodríguez-Domínguez M., Sanbonmatsu S., Salinas J., Alonso R., Gutiérrez J., Galán JC. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*; 32(6): 380-385. 2014.
- 51) Aguilera P., Tachiquín MR., Munive MGR., Olvera BP., Cárdenas MEC. *PCR en tiempo real*. 2010.
- 52) Díaz MS. *¿Cuál es el mejor tratamiento de la infección urogenital por Chlamydia trachomatis?*. SEMERGEN-Medicina de Familia. 2016.

- 53) Piedrahita-Agudelo M., Ramírez-Granada J. *Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de las neumonías atípicas en la infancia*. Rev. Med. Risaralda; 21(1): 48-57. 2015.
- 54) Suchland RJ., Geisler WM., Stamm WE. *Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of Chlamydia spp.* Antimicrob. Agents Chemother; 47(2): 636-642. 2003.
- 55) World Health Organization. *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008*. World Health Organization. 2012.
- 56) Van Liere GA., Dukers-Muijers NH., van Bergen JE., Götz HM., Stals F., Hoebe CJ. *The added value of chlamydia screening between 2008-2010 in reaching young people in addition to chlamydia testing in regular care; an observational study*. BMC infectious diseases; 14(1): 612. 2014.
- 57) Bally F., Quach A., Greub G., Jaton K., Petignat C., Ambord C., Spencer B. *Opportunistic testing for urogenital infection with Chlamydia trachomatis in south-western Switzerland, 2012: a feasibility study*. Euro. Surveill; 20(9). 2015.
- 58) Panatto D., Amicizia D., Bianchi S., Frati ER., Zotti CM., Lai PL., Tanzi, E. *Chlamydia trachomatis prevalence and chlamydial/HPV co-infection among HPV-unvaccinated young Italian females with normal cytology*. Hum vaccin Immunother; 11(1): 270-276. 2015.
- 59) Nwankwo EO., Magaji NS. *Prevalence of Chlamydia trachomatis infection among patients attending infertility and sexually transmitted diseases clinic (STD) in Kano, North Western Nigeria*. Afr Health Sci; 14(3): 672-678. 2014.
- 60) Mangalika GK., Cankanamge SK., Priyadarshana D., Shamini P., Sujatha M., Geeganage W., Nalaka A. *Prevalence of Chlamydia trachomatis in women attending sexually transmitted disease clinics in the Colombo district, Sri Lanka*. Indian J. Pathol Microbiol; 57(1): 55. 2014.
- 61) Sánchez RM., Ruiz-Parra AI., Ostos-Ortiz, OL. *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): 171-181. 2006.
- 62) Arráiz N., Ginestr, M., Perozo A., Castellano M., Urdaneta B., García MM. *Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por Chlamydia trachomatis en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela*. Rev Chil Infect; 24(1): 48-52. 2007.
- 63) Huneus A., Pumarino MG., Schilling A., Robledo P., Bofil M. *Prevalencia de Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae en adolescentes chilenas*. Rev Med Chil; 137(12): 1569-1574. 2009.
- 64) De Lima YAR., Turchi MD., Fonseca ZC., Garcia FLB., Cardoso FADB., da Guarda Reis MN., Alves MDFC. *Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil*. Int. J. Infect. Dis; 25: 16-21. 2014.
- 65) Farinati A., Zitto T., Bottiglieri M., Gastaldello R., Cuffini C., Cannistraci R., López H. *Infecciones asintomáticas por Chlamydia trachomatis: un problema controlable en la población adolescente*. Rev. panam. Infectol; 10(1): 8-12. 2008.
- 66) Occhionero M., Paniccia L., Pedersen D., Rossi G., Mazzucchini H., Entrocassi A., Fermepin MR. *Prevalencia de la infección por Chlamydia trachomatis y factores de riesgo de infecciones transmisibles sexualmente en estudiantes universitarios*. Rev. Argent. Microbiol.; 47(1): 9-16. 2015.
- 67) Deluca GD., Basiletti J., Schelover E., Vásquez ND., Alonso JM., Marín HM., Picconi MA.. *Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina*. Braz. J. Infect. Dis; 15(6): 567-572. 2011.
- 68) Monetti MS., Molina R., Estofan P., Frutos MC., Kiguen AX., Venezuela RF., Cuffini C. *Distribution of Chlamydia trachomatis Genotypes in Infertile Patients of Córdoba, Argentina*. Int J Virol Mol Biol; 2(1): 1-6. 2013.

- 69) Blatt AJ., Lieberman JM., Hoover DR., Kaufman HW. *Chlamydial and gonococcal testing during pregnancy in the United States*. Am J Obstet Gynecol; 207(1): 55-e1. 2012.
- 70) Norman JE., Wu O., Twaddle S., Macmillan S., McMillan L., Templeton A., Reid, M. *An evaluation of economics and acceptability of screening for Chlamydia trachomatis infection, in women attending antenatal, abortion, colposcopy and family planning clinics in Scotland, UK*. BJOG; 111(11): 1261-1268. 2004.
- 71) Bilardi JE., De Guingand DL., Temple-Smith MJ., Garland S., Fairley CK., Grover S., Chen MY. *Young pregnant women's views on the acceptability of screening for chlamydia as part of routine antenatal care*. BMC public health; 10(1): 1. 2010.
- 72) Vidwan NK., Regi A., Steinhoff M., Huppert JS., Staat MA., Dodd C., Verghese V. *Low prevalence of Chlamydia trachomatis infection in non-urban pregnant women in Vellore, S. India*. PloS one; 7(5): e34794. 2012.
- 73) Ovalle A., Martínez MA., de la Fuente F., Falcon N., Feliú F., Fuentealba F., Gianini, R. *Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres embarazadas atendidas en un hospital público de Chile*. Rev Chil Infect; 29(5): 517-520. 2012.
- 74) Cabeza J., García PJ., Segura E., García P., Escudero F., La Rosa S., Klausner JD. *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. 2015.
- 75) de Borborema-Alfaia APB., de Lima Freitas NS., Astolfi Filho S., Borborema-Santos CM. *Chlamydia trachomatis infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance*. Braz J Infect Dis; 17(5): 545-550. 2013.
- 76) Entrocassi AC., Gualtieri VP., Baptista G., Rizzo M., Parisi A., Rodríguez Fermepin M., Quiruelas S. *Implementación de un programa para la detección de infecciones por Chlamydia trachomatis en embarazadas jóvenes de la provincia de Buenos Aires*. Rev Argent Microbiol; 45 (1): 13. 2013.
- 77) Kakar S., Bhalla P., Maria A., Rana M., Chawla R., Mathur NB. *Chlamydia trachomatis causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center*. Indian J Med Microbiol; 28: 45-7. 2010.
- 78) Di Bartolomeo S, Mirta DH, Janer M, Rodríguez Fermepin MR, Sauka D, Magariños F, de Torres RA. *Incidence of Chlamydia trachomatis and other potential pathogens in neonatal conjunctivitis*. Int J Infect Dis; 5(3): 139-43. 2001.
- 79) Gaydos C., Hardick J. *Point of care diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances*. Expert review of anti-infective therapy; 12(6): 657-672. 2014.
- 80) Girardet RG., Lahoti S., Howard LA., Fajman NN., Sawyer MK., Driebe EM., Hammerschlag MR. *Epidemiology of sexually transmitted infections in suspected child victims of sexual assault*. Pediatrics; 124(1): 79-86. 2009.
- 81) Kelly P., Koh J. *Sexually transmitted infections in alleged sexual abuse of children and adolescents*. J Paediatr Child Health; 42(7-8): 434-440. 2006.
- 82) Verweij SP., Lanjouw E., Bax CJ., Quint KD., Oostvogel PM., Dörr PJ., Morré SA. *Serovar D and E of serogroup B induce highest serological responses in urogenital Chlamydia trachomatis infections*. BMC infectious diseases; 14(1): 1. 2014.
- 83) Byrne GI. *Chlamydia trachomatis strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity*. J Infect Dis; 201(2): 126-133. 2010.
- 84) Lagergård T., Hadad R., Tunbäck P., Lindholm L., Löwhagen G. B., Unemo M. *Distribution of Chlamydia trachomatis ompA genovars and the new variant of C. trachomatis in the Göteborg area, Sweden*. Eur J Clin Microbiol; 29(5): 609-611. 2010.
- 85) Gallo Vaulet L., Entrocassi C., Corominas AI., Rodríguez Fermepin M. *Distribution study of Chlamydia trachomatis genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires*,

- Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. BMC Res Notes; 9; 3: 34. 2010.
- 86) Cuffini C., Bottiglieri M., Kiguen X., Alonso C., Valdes Deimundo R., Isa MB., Cannistraci R., Gonzalez S., Farinati A. *Molecular Epidemiology of Genital Chlamydia trachomatis Infection in Asymptomatic Adolescent-Young People*. J. Microbiol. Res; 2 (4):114-117. 2012.
- 87) Yu J., Wu S., Li F., Hu L. *Vertical transmission of Chlamydia trachomatis in Chongqing China*. Curr Microbiol, 58(4): 315-320. 2009.
- 88) Zhong XY., Yu JL., Wang J., Deng B., Liu GX., Yu YX., Li Y. *Genotyping of major outer membrane protein gene of Chlamydia trachomatis by cleavase fragment length polymorphism analysis*. Zhonghua er ke za zhi; 43(1): 5-8. 2005.
- 89) Postma MJ., Welte R., van den Hoek JA., Jager JC., van Doornum GJ., Coutinho RA. *Opportunistic screening for genital infections with Chlamydia trachomatis among the sexually active population in Amsterdam. III. Cost-effectiveness analysis of screening women and the role of reinfection and partner treatment*. Ned Tijdschr Geneesk; 143(47): 2383-2385. 1999.
- 90) Welte R., Kretzschmar M., Leidl R., Van Den Hoek JA., Jager JC., Postma MJ. *Cost-effectiveness of screening programs for Chlamydia trachomatis: a population-based dynamic approach*. Sex Transm Dis; 27(9): 518-529. 2000.
- 91) Andersen B., Gundgaard J., Kretzschmar M., Olsen J., Welte R., Øster-gaard L. *Prediction of costs, effectiveness, and disease control of a population-based program using home sampling for diagnosis of urogenital Chlamydia trachomatis infections*. Sex Transm Dis; 33(7): 407-415. 2006.
- 92) De Vries R., Van Bergen JE., Jong-van den Berg D., Lolkje TW., Postma, MJ. *Systematic screening for Chlamydia trachomatis: estimating cost-effectiveness using dynamic modeling and Dutch data*. Value Health; 9(1): 1-11. 2006.
- 93) Cuffini C, Guzmán LA, Villegas N, Alonso CE, Martínez Riera L, Rodríguez Fermepín M, Entrocassi A, Adamo MP, Pedranti M, Zapata M. *Isolation of Chlamydophila pneumoniae from Atheromas of the Carotid Artery and their antibiotics susceptibility profile*. Rev Enf Infecc y Microbiol Clín; 24: 81-85. 2006.
- 94) Rabenau HF., Kessler HH., Kortenbusch M., Steinhorst A., Raggam RB., Berger A. *Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology*. Journal of clinical virology; 40(2): 93-98. 2007.
- 95) Lan J., Walboomers JM., Roosendaal R., Van Doornum GJ., MaLaren DM., Meijer CJ., Van Den Brule AJ. *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(5): 1060-1065. 1993.
- 96) Hering AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. *Rapid Diagnosis of rotavirus infections by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels*. J Clin Microbiol; 16: 473-7. 1982.
- 97) Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. *Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies*. Mol Cell Probe; 20: 60–63. 2006.
- 98) Zheng Zhang S., Schwartz L., Wagner Webb M. *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*. J Comput Biol; 7(1-2): 203-214. 2000.
- 99) Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. Mol Biol Evol; 30(12): 2725-2729. 2013.
- 100) Posada D, Crandall KA. *Modeltest: testing the model of DNA substitution*. Bioinformatics; 14(9): 817–818. 1998.
- 101) Guindon S, Gascuel O. *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst Biol; 52(5): 696–704. 2003.

- 102) Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. *Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees*. BMC Bioinformatics; 8(1): 460. 2007.
- 103) Stata software, version 12.1 Statacorp. College Station, TX 77845, USA.
- 104) Gimenes F., Medina FS., De Abreu ALP., Irie MMT., Esquiçati IB., Malagutti N., Consolaro MEL. *Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR*. PLoS One; 9(6): e98862. 2014.
- 105) Currie M J., McNiven M., Yee T., Schiemer U., Bowden, FJ. *Pooling of clinical specimens prior to testing for Chlamydia trachomatis by PCR is accurate and cost saving*. J Clin Microbiol; 42(10): 4866-4867. 2004.
- 106) Morré SA., Meijer CJ., Munk C., Krüger-Kjaer S., Winther JF., Jørgensens HO., van den Brule AJ. *Pooling of urine specimens for detection of asymptomatic Chlamydia trachomatis infections by PCR in a low-prevalence population: cost-saving strategy for epidemiological studies and screening programs*. J Clin Microbiol; 38(4): 1679-1680. 2000.
- 107) Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2013.
- 108) Embree JE., Lindsay D., Williams T., Peeling RW., Wood S., Morris M. *Acceptability and usefulness of vaginal washes in premenarcheal girls as a diagnostic procedure for sexually transmitted diseases*. Pediatr Infect Dis J; 15(8): 662-667. 1996.
- 109) Kim Y., Kim J., Lee KA. *Analytical Performance of Multiplex Real-Time PCR for Six Sexually Transmitted Pathogens*. Clinical laboratory; 61(11): 1749-1754. 2014.
- 110) Fernández G., Martró E., González V., Saludes V., Bascuñana E., Marcó C., Ausina V. *Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections*. Enferm Infecc Microbiol Clin; [doi: 10.1016/j.eimc.2015.10.014]. 2015.
- 111) Dhawan B., Rawre J., Ghosh A., Malhotra N., Ahmed MM., Sreenivas V., Chaudhry R. *Diagnostic efficacy of a real time-PCR assay for Chlamydia trachomatis infection in infertile women in north India*. The Indian journal of medical research; 140(2): 252. 2014.
- 112) Fallon B., Trocmé N., Fluke J., MacLaurin B., Tonmyr L., Yuan YY. *Methodological challenges in measuring child maltreatment*. Child Abuse Negl; 34(1): 70-79. 2010.
- 113) Bell TA., Stamm WE., Kuo CC., Wang SP., Holmes KK., Grayston JT. *Risk of perinatal transmission of Chlamydia trachomatis by mode of delivery*. J Infect; 29(2): 165-169. 1994.
- 114) Black CM., Driebe EM., Howard LA., Fajman NN., Sawyer MK., Girardet RG., Igietseme JU. *Multicenter study of nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in children being evaluated for sexual abuse*. Pediatr Infect Dis J; 28(7): 608-613. 2009.
- 115) Kellogg N. *Oral and dental aspects of child abuse and neglect*. Pediatrics; 116(6): 1565-1568. 2005.
- 116) Chen MY, Fairley CK, De Guingand D, Hocking J, Tabrizi S, Wallace EM, Grover S, Gurrin L, Carter R, Pirodda M. *Screening pregnant women for chlamydia: what are the predictors of infection?*. Sex Transm Infect; 85(1): 31-35, [published Online First 15th Aug 032008]. 2009.
- 117) Adachi K., Nielsen-Saines K., Klausner, JD. *Chlamydia trachomatis Infection in Pregnancy: The Global Challenge of Preventing Adverse Pregnancy and Infant Outcomes in Sub-Saharan Africa and Asia*. BioMed Research Int. 2016.
- 118) Dirks JA., Wolffs PF., Dukers-Muijers NH., Brink AA., Speksnijder AG., Hoebe CJ. *Chlamydia trachomatis load in population-based screening and STI-clinics: implications for screening policy*. PloS one; 10(3): [e0121433]. 2015.
- 119) Piñeiro L., Lekuona A., Cilla G., Lasa I., Martinez-Gallardo LP., Korta J., Pérez-Trallero, E. *Prevalence of Chlamydia trachomatis infection in parturient women in Gipuzkoa, Northern Spain*. SpringerPlus; 5(1): 1-5. 2016.
- 120) Bernloehr A., Smith P., Vydellingum V. *Antenatal care in the European Union: a survey on guidelines in all 25 member states of the Community*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 122(1): 22-32. 2005.

- 121) Crichton J., Hickman M., Campbell R., Batista-Ferrer H., Macleod, J. *Socioeconomic factors and other sources of variation in the prevalence of genital chlamydia infections: A systematic review and meta-analysis*. BMC public health; 15(1): 729. 2015.
- 122) Gharsallah H., Bom RJ., Bruisten SM., Himschoot M., Frikha-Gargouri O., Hammami A. *Identification of a dominant Chlamydia trachomatis strain in patients attending sexual transmitted infection clinic and female sex workers in Tunisia using a high resolution typing method*. Infect Genet Evol; 44: 444-449. 2016.
- 123) Mejuto P., Boga JA., Junquera M., Torreblanca A., Leiva PS. *Genotyping Chlamydia trachomatis strains among men who have sex with men from a Northern Spain region: a cohort study*. BMJ open; 3(6): [e002330]. 2013.
- 124) Bandea CI., Kubota K., Brown TM., Kilmarx PH., Bhullar V., Yanpaisarn S., Black CM. *Typing of Chlamydia trachomatis strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (omp1)*. Sex transm Infect; 77(6): 419-422. 2001.
- 125) Batteiger BE., Xu F., Johnson RE., Rekart ML. *Protective immunity to Chlamydia trachomatis genital infection: evidence from human studies*. J Infect Dis; 201(2): S178-S189. 2010.
- 126) Jalal H., Verlander NQ., Kumar N., Bentley N., Carne C., Sonnex C. *Genital chlamydial infection: association between clinical features, organism genotype and load*. Journal of medical microbiology; 60(7): 881-888. 2011.
- 127) Walker J., Tabrizi SN., Fairley CK., Chen MY., Bradshaw CS., Twin J., Urban E. *Chlamydia trachomatis incidence and re-infection among young women—behavioural and microbiological characteristics*. PloS one; 7(5): [e37778]. 2012.
- 128) Eckert LO., Suchland RJ., Hawes SE., Stamm WE. *Quantitative Chlamydia trachomatis cultures: correlation of chlamydial inclusion-forming units with serovar, age, sex, and race*. J Infect Dis; 182(2): 540-544. 2000.
- 129) Brunelle BW., Sensabaugh GF. *The ompA gene in Chlamydia trachomatis differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome*. Infect Immun; 74(1): 578-585. 2006.
- 130) Stothard DR., Boguslawski G., Jones RB. *Phylogenetic analysis of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants*. Infection and immunity; 66(8): 3618-3625. 1998.
- 131) Lutter EI., Bonner C., Holland MJ., Suchland RJ., Stamm WE., Jewett TJ., Hackstadt T. *Phylogenetic analysis of Chlamydia trachomatis Tarp and correlation with clinical phenotype*. Infect Immun; 78(9): 3678-3688. 2010.
- 132) Finkelhor D., Hotaling G., Lewis IA., Smith C. *Sexual abuse in a national survey of adult men and women: prevalence characteristics and risk factors*. Child Abuse Negl; 14: 19–28. 1990.
- 133) Christerson L., Vries HJC., Barbeyrac, BD., Gaydos, CA., Henrich, B., Hoffmann, S., Herrmann, B. *Typing of lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis strains*. Emerg Infect Dis; 16(11): 1777-1779. 2010.

9.0 Anexos

9.1 Anexo I: Consentimiento Informado para el estudio de población infantil

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Detección de *Chlamydia trachomatis* en orina e Hisopado faríngeo.

-Código de Identificación del voluntario:.....

Título del estudio: **Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas en población infantil con sospecha de abuso sexual, de la ciudad de Córdoba**

LUGAR DE DESARROLLO DEL ESTUDIO:

Laboratorio de Clamidias y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella".
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dirección: Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria CP: 5016. Córdoba.

Teléfono: (0351) 4334022

Teléfono de contacto durante las 24 hs: (0351)156566781

INVESTIGADORES PRINCIPALES: Dra. Cecilia CUFFINI, Med. Ana Ximena Kiguen

Lea esta información cuidadosamente:

Usted ha aceptado que la muestra de orina e Hisopado faríngeo de su hijo/a o representado sean utilizadas para la detección de *Chlamydia trachomatis*. Firmar el presente consentimiento, confirma que usted está de acuerdo en que el niño participe en este estudio e indica su deseo de participar en este momento. Su participación en la investigación es opcional. Antes de brindar su consentimiento, por favor lea este formulario. Formule tantas preguntas como necesite, para asegurarse que comprende que implicará la participación en esta investigación.

Una vez que ha presentado su consentimiento, aún tiene derecho de retirarse del estudio sin poner en riesgo el seguimiento y/o tratamiento del niño con su médico de cabecera.

Recibirá una copia firmada de este formulario para que la conserve y a la que deberá remitirse si lo necesitara.

¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO?

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, que causan un amplio rango de enfermedades.

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es la principal causa de ITS en el mundo. La mayoría de las mujeres infectadas con *C. trachomatis* son asintomáticas; sin embargo esta infección en ocasiones puede causar síntomas como uretritis, cervicitis, endometritis, perihepatitis, salpingitis, entre otras. En mujeres embarazadas, las infecciones clamidiales no tratadas se asocian a abortos, endometritis post parto, rotura prematura de membranas, bajo peso al nacer y transmisión al neonato en el canal del parto.

En contraposición a las mujeres, la infección por *C. trachomatis* es asintomática en el 25% de los hombres infectados y es considerada la causa más frecuente de uretritis no gonocócica. Las complicaciones a las que está expuesta esta población son: epididimitis, prostatitis, infertilidad y Síndrome de Reiter (conjuntivitis, artritis, uretritis y máculas).

Los niños pueden adquirir esta infección a través de dos vías de transmisión: perinatal, y sexual.

Algunos estudios sugieren que el riesgo de infección de un recién nacido de madre infectada con *C. trachomatis* es aproximadamente del 50% y puede ocasionar bronquitis, neumonía y conjuntivitis neonatal. Esta infección puede persistir en los niños por aproximadamente 3 años.

La segunda vía de transmisión se da en los casos de abuso sexual. Hay estudios que publican que la infección por *C.tr* en niños con sospecha de abuso sexual es menor al 5% pero su detección es considerada diagnóstico de certeza del mismo.

¿QUÉ IMPLICA LA PARTICIPACIÓN DE MI HIJO/A O REPRESENTADO EN ESTA INVESTIGACIÓN?

La participación de su hijo/a o representado en este estudio significa permitir:

1º) Que las muestras obtenidas (orina e hisopado faríngeo) sean utilizadas para detectar *C. trachomatis*.

¿COMO SE TOMAN LAS MUESTRAS Y QUE SE HACE CON ELLAS?

Obtención de las muestras: Las muestras serán obtenidas por profesionales entrenados para tal fin que serán designados por la Dirección del Hospital Pediátrico del Niño Jesús y médicos de la Unidad Judicial de la Mujer y el Niño. Se obtendrá una muestra de hisopado faríngeo y una muestra de primer chorro de orina de cada paciente en tubos estériles que serán provistos por el Instituto de Virología.

Conservación de las muestras: Las muestras deberán ser conservadas a 4°C hasta 48 horas.

Transporte de las muestras: Una vez tomadas las muestras, los responsables designados de cada Institución avisarán al personal del Instituto de Virología para que ellos transporten las muestras dentro de las 48 hs de tomadas las mismas.

Informes de resultados: Los resultados de los estudios de detección de *C.tr* en las muestra de orina e hisopado faríngeo le serán informados por el grupo investigador a los profesionales tratantes y éstos últimos, informaran la presencia o ausencia de *C.tr* a los tutores del niño.

Eliminación de las muestras: las muestras obtenidas para el proyecto serán desechadas en bolsas de residuos de patógenos una vez que se hayan realizado todas las determinaciones.

¿DE QUE MANERA LA IDENTIDAD DE MI HIJO/A O REPRESENTADO Y LOS RESULTADOS SE MANTENDRÁN CONFIDENCIALES?

Los patrocinadores de este estudio han tomado varias medidas para mantener la confidencialidad de los participantes. Estas se describen a continuación.

I. Codificación de las muestras de orina e hisopado faríngeo

Las muestras no tendrán su nombre ni su dirección en ella.

Cada muestra estará codificada con un número de cuatro cifras que van desde el 0001 al 1000; este número vincula directamente la muestra y los resultados con su nombre. Los profesionales que realicen los análisis de laboratorio no conocerán su identidad a partir de este número de código. Las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) y los investigadores pueden acceder a la lista. Esto es para asegurar que el estudio esté realizado en forma correcta. Al firmar el formulario de consentimiento informado, está autorizando esta revisión.

II. Acceso Restringido a las muestras de orina e hisopado faríngeo.

El Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba controlará y guardará las muestras en una habitación segura. Sólo se permitirá la entrada a personal autorizado. Sólo podrán tener acceso a la misma, la Dra. Cecilia Cuffini, Med. Esp. En Microbiología Clínica Ximena Kiguen, Lic. Jessica Mosmann, Bioq. Esp. En Virol. Fernando Venezuela, Biol. Marina Monetti, Biol. Celia Frutos.

III. Acceso Restringido a los Resultados

Los resultados de los análisis de laboratorio serán almacenados por los investigadores principales en registros de papel y electrónico. No será identificado por su nombre en estos registros. Sus resultados sólo serán rotulados con un número de código. Esto es para proteger su privacidad. Sus resultados serán guardados tanto tiempo como sea necesario.

Sólo las siguientes personas pueden conocer los resultados de sus análisis:

- i. la Dra. Cecilia Cuffini, Med. Ana Ximena Kiguen.
- ii. Los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) (aquellos que revisan la conducción de estudios de investigación en seres humanos).
- iii. El Consejo de Evaluación Ética de Investigación en Salud (CoEIS).
- iv. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

Los resultados de las muestras pueden ser publicados o agregados a bases de datos públicas. También pueden ser discutidos, analizados y publicados en reuniones públicas. Ninguna presentación o publicación identificará su nombre. Los resultados del estudio están protegidos de acuerdo a lo previsto en las “Pautas internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos” de la Organización de la Salud, en la ley Nacional 25326 de Protección de Datos Personales.

Se le informa que la presente investigación se realizará conforme los criterios éticos de declaración de Helsinki y sus modificaciones.

IV. Almacenamiento del Consentimiento Informado

Los Investigadores principales guardarán su formulario de consentimiento informado de Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas en población infantil con sospecha de abuso sexual, de la ciudad de Córdoba. Las personas que tienen acceso a su Historia Clínica no sabrán que participó en un estudio de investigación al mirarla. Pueden revisar su consentimiento informado las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS), el personal del estudio y

representantes autorizados por los Patrocinadores. Se le entregará una copia de su formulario de consentimiento informado firmado.

V. Destino de las muestras una vez realizado el Diagnóstico

Una vez realizadas todas las determinaciones necesarias para llegar al diagnóstico de *C.tr* las muestras serán desechadas en bolsas de residuos patógenos.

¿QUÉ SUCEDE SI LUEGO DECIDO RETIRAR DEL ESTUDIO A MI HIJO/A O REPRESENTADO?

La participación en el estudio es voluntaria y opcional. Si cambia de parecer o decide que no quiere que su hijo/a o representado siga participando, puede pedir la destrucción de las muestras de orina e hisopado faríngeo a los Investigadores Principales. Cualquier resultado de los análisis ya realizados no será borrado. Esto es para proteger la calidad de la investigación. Si decide retirar la participación de su hijo/a o representado en esta investigación no afectará la atención y/o tratamiento que el mismo estuviera recibiendo, ni causará ninguna sanción o pérdida de los beneficios a los cuales tuviera derecho.

¿OBTENDRÉ LOS RESULTADOS DE LABORATORIO?

Los resultados de los estudios de la detección de *C. trachomatis* en las muestra de orina e hisopado faríngeo le serán informados por el grupo investigador a los profesionales tratantes y éstos últimos, informaran la presencia o ausencia de *C. trachomatis* a los tutores del niño.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS?

Participar en el estudio representa para su hijo/a o representado el inconveniente de realizar un hisopado faríngeo, lo cual podría ocasionar molestias locales leves. No teniendo la misma riesgos para su salud.

La muestra de orina deberá obtenerse por micción espontánea de los primeros 10-20 ml de orina. La recolección se hará en frasco estéril. Esto no implica ningún riesgo ni molestias a su hijo/a o representado.

¿SE ME PAGARÁ POR LA PARTICIPACION DE MI HIJO/A O REPRESENTADO O POR EL USO DE LOS RESULTADOS?

No se le pagará por participar en el estudio de Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas en población infantil con sospecha de abuso sexual, de la ciudad de Córdoba. No se le pagará por ningún uso de las muestras de orina e hisopado faríngeo. Si permite que su hijo/a o representado participe, está proporcionando las muestras para ser usadas por los investigadores principales.

A su vez, *ninguno de los investigadores y/o colaboradores* recibirán remuneración por parte de los Patrocinadores por la realización de este estudio.

CONTACTOS PARA PREGUNTAS

Ante cualquier consulta los participantes de este estudio podrán comunicarse con la **Dra. Cecilia Cuffini** Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Cs. Médicas, Enfermera

Gordillo Gómez s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba, **Tel Lab: 0351-4334022. Med. Esp. en Microbiología Clínica. Ana Ximena Kiguen**, Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria. CP (5016), Córdoba. **Tel Personal: 0351-156566781. Tel Lab: 0351- 4334022.**

Si tiene alguna pregunta sobre sus derechos como Sujeto de Investigación, por favor comuníquese con el **“Comité CIEIS del Niño y el Adulto”**, Bajada Pucará 2025. CP (5000). Coordinador del Comité: **Dr. Daniel David**; Tel.: 0351-4584331. Dir. de e-mail: cieispolohospitalario@gmail.com. **Oficina SERFIS-COEIS: Hospital Misericordia**, Belgrano 1500 esq. Richardson, 1° Piso – Ciudad de Córdoba. Teléfono de contacto: 0351-156846590.

Yo....., declaro: haber leído y comprendido las hojas de información; haber podido hacer cualquier pregunta libremente, haber recibido suficiente información, haber sido informado por un investigador cuyo nombre y apellido se hace constar, haber comprendido que la participación de mi hijo/a o representado es voluntaria; haber comprendido que puedo retirarlo libremente sin perjuicio, por lo que doy mi consentimiento para que mi hijo/a o representado participe en el estudio “Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas en población infantil con sospecha de abuso sexual, de la ciudad de Córdoba” que se realiza en el Laboratorio de Clamidia y HPV del Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Los responsables de este proyecto son Med. Ana Ximena Kiguen y Dra. Cecilia Cuffini.

Nombre del paciente: _____

Firma del Padre, Madre o Tutor

Nº de DNI

Aclaración del Nombre del Individuo

___/___/___
Fecha

Firma del Testigo o Representante Legal

(si aplica)

Nº de DNI

Aclaración del Nombre del Testigo o Representante Legal

(si aplica)

___/___/___
Fecha

Relación que tiene con el sujeto:

Confirmando que el Individuo arriba firmante recibió la información necesaria para el Consentimiento Informado, la cual le fue explicada en mi presencia.

Firma de la persona que obtiene el Consentimiento informado

Nº de DNI

Aclaración de la persona que obtiene el consentimiento informado

___/___/___
Fecha

Declaro haber recibido una copia del consentimiento: FIRMA:

9.2 Anexo II: Asentimiento informado utilizado para niños mayores de 7 años.

Formulario de Asentimiento informado para Niños

Proyecto de Investigación “Caracterización genética de cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas en población infantil con sospecha de abuso sexual, de la ciudad de Córdoba.”

¿Qué significa Asentimiento informado?

Te vamos a dar información y te vamos a invitar a participar en un estudio de investigación. El Asentimiento informado significa que entendiste todo lo posible sobre este estudio de investigación y que estás de acuerdo en participar por tu propia voluntad.

¿Qué es *Chlamydia trachomatis*?

Chlamydia trachomatis es una bacteria. Las bacterias son tan pequeñas que no se pueden ver. Esta bacteria puede estar en el cuerpo y enfermar a las personas.

¿Por qué se está realizando la Investigación?

Queremos conocer en cuantos chicos está presente la *Chlamydia trachomatis*.

Invitación

Se te está invitando a participar en este proyecto. Por favor lee esta información prestando mucha atención o pedile a alguien que te la lea en voz alta. Tomate tiempo para pensar. Ya conversamos con tu padre/madre/tutor sobre esta investigación y ellos ya saben que te estamos preguntando si estás de acuerdo. Si no querés participar en el proyecto, no estás obligado a hacerlo aunque tus papás lo hayan autorizado. Le podes hacer todas las preguntas que tengas a tu médico (Dr. _____), amigos, tus papás o cualquier persona con la que te sientas cómodo.

¿Qué tengo que hacer?

Solo tenés que dejarnos sacar un poquito de saliva de la boca con un hisopo. Esto no te va a doler, quizás te moleste un poquito pero no te va a pasar nada más. Nosotros te vamos a dar un frasco en donde tenés que juntar un poco de orina cuando vayas al baño y dejársela a tu médico. Con eso ya nos estas ayudando mucho a encontrar a esta bacteria.

¿Estoy obligado a participar?

No. Nadie se va a enojar con vos si no querés participar. Tu médico te va a seguir atendiendo igual, aunque no participes.

PODES DEJAR DE PARTICIPAR EN LA INVESTIGACION CUANDO QUIERAS SIN TENER QUE EXPLICARLE NADA A LOS MEDICOS.

¿Cuánto tiempo durará la investigación?

La investigación durará un año aproximadamente. Pero vos solo tenés que dejarnos tomar las muestras una vez.

¿Qué sucede si el resultado de este estudio me da positivo?

Si el resultado de tu estudio resultara positivo, nosotros le avisaremos a tu médico, para que el te llame y llame a tus padres y así ver cuál es el mejor tratamiento para destruir a esta bacteria.

¿Qué se hace con las muestras cuando se termina el estudio?

Una vez que terminamos de hacer todas las pruebas para saber si en las muestras está la *Chlamydia trachomatis*, las muestras se van a eliminar así que podés quedarte tranquilo porque tus muestras no serán utilizadas para otras determinaciones.

¿Mis registros de salud se conservarán en privado?

Si. Las personas que realizan este estudio solo podrán conocer información relacionada con la investigación y tu nombre no figurará en ninguno de los artículos sobre resultados de este proyecto.

Muchas gracias por leer toda esta información

**Formulario de Asentimiento Informado para niños
Proyecto “Detección de Chlamydia trachomatis en población infantil con factores de riesgo
de abuso sexual en la Ciudad de Córdoba”**

Hace un círculo alrededor de todos los ítems.

¿Has leído (o te han leído) sobre este proyecto?	SI	/	NO
¿Te ha explicado este proyecto alguna persona?	SI	/	NO
¿Has entendido de qué se trata este proyecto?	SI	/	NO
¿Has hecho todas las preguntas que querías?	SI	/	NO
¿Te respondieron las preguntas de modo que entiendas?	SI	/	NO
¿Has entendido que está bien si decidís dejar de participar?	SI	/	NO
¿Estás de acuerdo en participar?	SI	/	NO

Si cualquiera de las respuestas es NO o no deseas participar, ¡no firmes con tu nombre!
Si deseas participar, escribe tu nombre y la fecha de hoy.

Tu nombre _____ Fecha _____

Firma de Padre/Madre/Tutor _____ Fecha _____

Firma del médico _____ Fecha _____

Gracias por tu colaboración

9.3 Anexo III: Aprobación del Comité de ética del Polo Hospitalario para estudio de población infantil con sospecha de abuso sexual.

Ministerio de
SALUD

GOBIERNO DE LA
PROVINCIA DE
CORDOBA

CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

INFORME DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Caracterización Genética de cepas de Chlamydia trachomatis en población infantil con sospecha de abuso sexual, en la Ciudad de Córdoba

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN: N/A

NOMBRE Y TÍTULO DEL INVESTIGADOR: Dra. Cecilia Cuffini

NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN Y SEDE DE LA INVESTIGACIÓN: CIEIS del Niño y del Adulto / Hospital Pediátrico del Niño Jesús

FECHA Y LUGAR DE LA DECISIÓN: Córdoba, 03 de Septiembre del 2015

DECLARACION DE LA DECISIÓN TOMADA: APROBADO

- ✓ Protocolo versión 1.3, 30 de julio de 2015.
- ✓ Consentimiento Informado, versión 1.0, de fecha 28 de mayo de 2014.
- ✓ Asentimiento Informado para niños, versión 1.0, de fecha 28 de mayo de 2014

EN EL CASO DE UNA DECISION POSITIVA EL INVESTIGADOR DEBERÁ:

ENTREGAR LOS REPORTES DE AVANCES AL CIEIS

NOTIFICAR AL CIEIS TODA ENMIENDA AL PROTOCOLO, O AL MATERIAL DE RECLUTAMIENTO O DE LA INFORMACIÓN PARA LOS POTENCIALES PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACIÓN O EL FORMATO DE CI.

REPORTAR EVENTOS ADVERSOS SERIOS E INESPERADOS.

INFORMAR LA TERMINACIÓN DEL ESTUDIO O CIRCUNSTANCIAS NO ESPERADAS O DECISIONES SIGNIFICATIVAS TOMADAS POR OTROS CIEIS.

EL INVESTIGADOR DEBERÁ INFORMAR AL PACIENTE EL NOMBRE DEL CIEIS QUE EVALUÓ Y COMO LOCALIZARLO (dirección, teléfono) Y EL NOMBRE, DIRECCIÓN Y TELÉFONO DEL COEIS


Dr. MARÍA ESTELA
CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA
DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD


Dr. LUIS JUNCOS
CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA
DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD


Dr. EUGENIO CECCHETTO
CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA
DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

9.4 Anexo IV: Consentimiento Informado utilizado para el estudio de *C. trachomatis* en mujeres embarazadas

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

-Detección *Chlamydia spp* en muestras endocervicales-

Código de Identificación del Voluntario: _ _ _ _

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Detección de *Chlamydia spp* en mujeres embarazadas de la ciudad de Córdoba, Argentina.”

PATROCINADORES: Laboratorio de Clamidas y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba con la colaboración del Laboratorio de Microbiología, perteneciente a la Dirección de Especialidades Medicas Centro (DEMC) de la Municipalidad de Córdoba.

LUGAR DE DESARROLLO DEL ESTUDIO:

Laboratorio de Clamidas y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella”.
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dirección: Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria CP: 5016. Córdoba.

Teléfono: (0351) 4334022

Teléfono de contacto durante las 24 hs: (0351)156566781

INVESTIGADORES PRINCIPALES: Med. Ana Ximena Kiguen, Bioq. Marcela Marramá, Biol.

Marina Monetti y Bioq. Gabriela Hernandez Fregonese

Lea esta información cuidadosamente:

Usted ha aceptado que su muestra de hisopado de fondo de saco vaginal sea utilizada para la detección de *Chlamydia spp*. Firmar el presente consentimiento, confirma que usted está de acuerdo en participar en este estudio e indica su deseo de participar en este momento. Su participación en la investigación es opcional. Antes de brindar su consentimiento, por favor lea este formulario. Formule tantas preguntas como necesite, para asegurarse que comprende que implicará participar en esta investigación.

Una vez que ha presentado su consentimiento, aún tiene derecho de retirarse del estudio sin poner en riesgo su seguimiento y/o tratamiento con su médico de cabecera.

Recibirá una copia firmada de este formulario para que la conserve y a la que deberá remitirse si lo necesitara.

¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO?

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, son bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, que causan un amplio rango de enfermedades en aves y mamíferos incluyendo al hombre. *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) es la principal causa de ITS en el mundo. La

mayoría de las mujeres infectadas con *C. trachomatis* son asintomáticas; sin embargo esta infección en ocasiones puede causar síntomas como uretritis, cervicitis, endometritis, perihepatitis, salpingitis, entre otras. En mujeres embarazadas, las infecciones clamidiales no tratadas se asocian a abortos, endometritis post parto, rotura prematura de membranas, bajo peso al nacer y transmisión al neonato en el canal del parto. Algunos estudios sugieren que el riesgo de infección de un recién nacido de madre infectada con *C. trachomatis* es aproximadamente del 50% y puede ocasionar bronquitis, neumonía y conjuntivitis neonatal. Esta infección puede persistir en los niños por aproximadamente 3 años. Diversos estudios de prevalencia refieren que anualmente, la infección por este microorganismo tiene una prevalencia de 3,5% mujeres embarazadas en USA, 12,1 % en el Reino Unido y del 6,4% en Australia; sin embargo no hay estudios de prevalencia en pacientes embarazadas en nuestra región. Además de *C. trachomatis*, estudios recientes desarrollados en Suiza, Grecia, Japón, asociaron la presencia de otras *Chlamydia spp* (*C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. caviae*) con uretritis, cervicitis, y aborto en tracto genital. Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, y sabiendo que en nuestro país no existen datos acerca de la infección por *Chlamydia spp* en mujeres embarazadas, es de suma importancia estudiar tanto la presencia de especies clamidiales en esta población, como sus características genéticas.

Es importante destacar que las muestras serán obtenidas en el Laboratorio de Microbiología (DEMC) Municipalidad de Córdoba y posteriormente enviadas al Instituto de Virología para la detección de *Chlamydia spp.*, si Ud. como paciente está de acuerdo y previa firma del consentimiento informado.

¿QUÉ IMPLICA MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Mi participación en este estudio significa permitir:

1º) Que la muestra obtenida (hisopado cervical) sea utilizada para detectar *C. trachomatis*, *C. abortus*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*.

2º) Completar una ficha (en Anexos) con:

- a) Antecedentes epidemiológicos: edad, sexo, tipo de actividad laboral, animales con qué tiene contacto.
- b) Antecedentes Personales: menarca, hábitos sexuales, antecedentes obstétricos
- c) Antecedentes personales Patológicos: Motivo de consulta

¿DE QUE MANERA MI IDENTIDAD Y RESULTADOS SE MANTENDRÁN CONFIDENCIALES?

Los patrocinadores de este estudio han tomado varias medidas para mantener la confidencialidad de los participantes. Estas se describen a continuación.

I. Codificación de la muestra de fondo de saco vaginal

Su muestra no tendrá su nombre ni su dirección en ella.

Su muestra estará codificada con un número de cuatro cifras que van desde el 0001 al 1000; este número vincula directamente su muestra y los resultados con su nombre. Los profesionales que realicen los análisis de laboratorio no conocerán su identidad a partir de este número de código. Las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) y los investigadores pueden acceder a la lista. Esto es para asegurar que el estudio esté realizado en forma correcta. Al firmar el formulario de consentimiento informado, está autorizando esta revisión.

II. Acceso Restringido a su muestra de fondo de saco vaginal.

El Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba controlará y guardará su muestra en una habitación segura. Sólo se permitirá la entrada a personal autorizado. Sólo podrán tener acceso a la misma, la Dra. Cecilia Cuffini, Med. Ximena Kiguen, Lic. Jessica Mosmann, Bioq. Esp. En Virol. Fernando Venezuela, Biol. Marina Monetti, Biol. Celia Frutos.

III. Acceso Restringido a los Resultados

Los resultados de los análisis de laboratorio serán almacenados por los investigadores principales en registros de papel y electrónico. No será identificado por su nombre en estos registros. Sus resultados sólo serán rotulados con un número de código. Esto es para proteger su privacidad. Sus resultados serán guardados tanto tiempo como sea necesario.

Sólo las siguientes personas pueden conocer los resultados de sus análisis:

- v. la Dra. Cecilia Cuffini, Med. Ana Ximena Kiguen, Biol. Marina Monetti.
- vi. Laboratorio de Microbiología. Dirección de Especialidades Médicas, Centro. (DEMC).
- vii. Los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS) (aquellos que revisan la conducción de estudios de investigación en seres humanos).
- viii. El Consejo de Evaluación Ética de Investigación en Salud (CoEIS).
- ix. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

Los resultados de las muestras pueden ser publicados o agregados a bases de datos públicas. También pueden ser discutidos, analizados y publicados en reuniones públicas. Ninguna presentación o publicación identificará su nombre. Los resultados del estudio están protegidos de acuerdo a lo previsto en las “Pautas internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos” de la Organización de la Salud, en la ley Nacional 25326 de Protección de Datos Personales.

Se le informa que la presente investigación se realizará conforme los criterios éticos de declaración de Helsinki y sus modificaciones.

IV. Almacenamiento del Consentimiento Informado

Los Investigadores principales guardarán su formulario de consentimiento informado de análisis de especies clamidiales en una población de mujeres embarazadas. Las personas que tienen acceso a su Historia Clínica no sabrán que participó en un estudio de investigación al mirarla. Pueden revisar su consentimiento informado las autoridades regulatorias, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS), el personal del estudio y representantes autorizados por los Patrocinadores. Se le entregará una copia de su formulario de consentimiento informado firmado.

¿QUÉ SUCEDE SI LUEGO DECIDO RETIRARME DEL ESTUDIO?

Su participación en el estudio es voluntaria y opcional. Si cambia de parecer o decide que no quiere seguir participando, puede pedir la destrucción de su muestra de fondo de saco vaginal a los Investigadores Principales. Cualquier resultado de los

análisis ya realizados no será borrado. Esto es para proteger la calidad de la investigación. Si decide retirar su participación en esta investigación no afectará la atención y/o tratamiento que estuviera recibiendo, ni causará ninguna sanción o pérdida de los beneficios a los cuales tuviera derecho.

¿OBTENDRÉ MIS RESULTADOS DE LABORATORIO?

Los resultados de los estudios de la detección de *C. trachomatis* en su muestra de hisopado de fondo de saco vaginal le serán informados por el grupo investigador a los patrocinadores (Laboratorio de Microbiología-DEMC) y éstos últimos, informaran la presencia o ausencia de *C. trachomatis* al momento de informar el resultado de *Streptococcus agalactiae*. Será informado solo el resultado de *C. trachomatis* ya que hasta el momento solo están demostradas las complicaciones que produce esta bacteria en mujeres embarazadas y protocolizado su tratamiento. En caso de solicitarlo, le serán informados los resultados de las restantes especies clamidiales. Los resultados de los exámenes no serán utilizados para otro fin más que el expuesto. Sin embargo, el Patrocinador no tiene control sobre la privacidad de sus resultados una vez que se los otorgue.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS?

Debido a que en el presente estudio se determinará la presencia de *Chlamydia spp.*, a partir de la muestra tomada en el Laboratorio de Microbiología de la Municipalidad de Córdoba (DEMC) para el control de *Streptococcus agalactiae*, este estudio no supone toma de muestra adicional, no existiendo riesgo colateral alguno para el paciente.

¿SE ME PAGARÁ POR PARTICIPAR O POR EL USO DE MIS RESULTADOS?

No se le pagará por participar en el estudio de detección de *Chlamydia spp.* en mujeres embarazadas a partir de muestras endocervicales. No se le pagará por ningún uso de su muestra de fondo de saco vaginal. Si participa, está proporcionando su muestra para ser usada por los investigadores principales.

A su vez, *ninguno de los investigadores y/o colaboradores* recibirán remuneración por parte de los Patrocinadores por la realización de este estudio.

CONTACTOS PARA PREGUNTAS

Ante cualquier consulta los participantes de este estudio podrán comunicarse con la **Dra. Cecilia Cuffini** Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Cs. Médicas, Enfermera Gordillo Gómez s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba, **Tel Lab: 0351-4334022. Med. Esp. en Microbiología Clínica. Ana Ximena Kiguen**, Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas. **Biol. Marina Monetti**, Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria. CP (5016), Córdoba. **Tel Personal: 0351-156566781. Tel Lab: 0351- 4334022.**

Si tiene alguna pregunta sobre sus derechos como Sujeto de Investigación, por favor comuníquese con el “**Comité CIEIS Oulton-Romagosa**”, Av. Vélez Sarsfield 562. 1° subsuelo. CP (5000). Horario de atención: lunes y miércoles de 15:30 a 18 hs. Coordinador del Comité: Dr. **Facello Adolfo**; Subcoordinador: Dr. **Soria Néstor**. Tel:

0351-4267792 o a la **Oficina SERFIS-COEIS: Hospital Misericordia**, Belgrano 1500 esq. Richardson, 1° Piso – Ciudad de Córdoba .Teléfono de contacto: 0351-156846590

Yo....., declaro: haber leído y comprendido las hojas de información; haber podido hacer cualquier pregunta libremente, haber recibido suficiente información, haber sido informado por un investigador cuyo nombre y apellido se hace constar, haber comprendido de mi participación voluntaria; haber comprendido que puedo retirarme libremente sin perjuicio, por lo que doy mi consentimiento para participar en el estudio **“Detección de *Chlamydia spp* en mujeres embarazadas de la ciudad de Córdoba, Argentina”** que se realiza en el Laboratorio de Clamidia y HPV del Instituto de Virología “Dr. J.M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, con la colaboración del Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Especialidades Médicas Centro de la Municipalidad de Córdoba. Los responsables de este proyecto son Med. Ana Ximena Kiguen, Dra. Cecilia Cuffini.

Firma del Individuo

 Nº de DNI

Aclaración del Nombre del Individuo

___/___/___
 Fecha

 Firma del Testigo o Representante Legal

(si aplica)

 Nº de DNI

 Aclaración del Nombre del Testigo o Representante Legal

(si aplica)

___/___/___
 Fecha

Relación que tiene con el sujeto:

Confirmo que el Individuo arriba firmante recibió la información necesaria para el Consentimiento Informado, la cual le fue explicada en mi presencia.

Firma de la persona que obtiene el Consentimiento informado

Aclaración de la persona que obtiene el consentimiento informado

 Nº de DNI

___/___/___
 Fecha

Declaro haber recibido una copia del consentimiento: FIRMA:

9.5 Anexo V: Aprobación del Comité de ética Oulton-Romagosa para el estudio de Embarazadas.

FORMULARIO DE RESOLUCIÓN



Instituto OULTON
Investigación y Tratamiento Ambulatorio
Avda. Vélez Sarsfield 502 | Córdoba | Argentina
Tel. (0351) 4261700 | Fax. (0351) 4267766

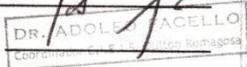
**COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA
DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
OULTON ROMAGOSA**

INFORME DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN no sponsorados

Título del Protocolo:	Detección de Chlamydia spp en mujeres embarazadas de la ciudad de Córdoba, Argentina.
Investigador Principal	Dra. Cecilia Cuffini
Lugar de realización	Laboratorio de Clamidias y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" Facultad de Ciencias Médicas. UNC
CRO/Patrocinante	Sin Sponsor
Los siguientes documentos fueron recibidos, revisados y evaluados:	Protocolo versión 3.0, de fecha 05 de marzo de 2014. Formulario de Consentimiento Informado versión 3.0 del 05 de marzo de 2014.
Presentación inicial al CIEIS	09.dic.13
Última presentación	10.mar.14
Fecha de resolución por el CIEIS	12 MAR. 2014
RESOLUCIÓN	APROBADO CON RECOMENDACIÓN

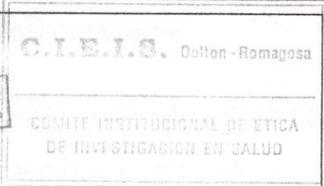
Institución: Instituto Oulton- Clínica Privada Romagosa

Firma en nombre del Comité: 

Aclaración de firma y sello: 

Nombre del Comité: CIEIS Oulton -Romagosa

Lugar y fecha: Córdoba, 12 MAR. 2014



SELLO COMITÉ

POE 01-GD-03.1 anexo
CIEIS OULTON ROMAGOSA

Pág 1 de 3

9.6 Anexo VI: Publicación de reporte de caso

Vol.3, No.2, 97-100 (2014)
<http://dx.doi.org/10.4236/crcm.2014.32024>

Case Reports in Clinical Medicine

Chlamydia trachomatis in a girl suspected of sexual abuse in the city of Córdoba, Argentina

Ana Ximena Kiguen¹, Graciela Ochonga², Fernando Venezuela¹, Marina Monetti¹,
 María Celia Frutos¹, Jessica Mosmann¹, Cecilia Cuffini¹

¹Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Virología "Dr. JM Vanella", Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; ccuffini@fcm.unc.edu.ar

²Cátedra de Odontopediatría de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Received 5 November 2013; revised 5 December 2013; accepted 3 January 2014

Copyright © 2014 Ana Ximena Kiguen *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for SCIRP and the owner of the intellectual property Ana Ximena Kiguen *et al.* All Copyright © 2014 are guarded by law and by SCIRP as a guardian.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis (*C.tr*) infections are the most prevalent bacterial sexually transmitted infections worldwide. They are often asymptomatic and therefore underdiagnosed as there is no routine screening surveillance. This case supports the possibility of sexual abuse as a route of transmission of *C.tr*. It is well known that nearly one third of sexually assaulted children are at risk for infection by a sexually transmitted agent. This is why in cases of sexual abuse, it is standardized that *C.tr* positive results by Nucleic Acid Amplification Techniques (NAATs) should be confirmed looking for another *C.tr* target; for this reason, we used a Polymerase Chain Reaction (PCR) directed to cryptic plasmid of *C.tr*. Confirmation was specified by the use of another PCR with a different genetic target (*ompA*) and sequencing. We concluded that our patient's oral lesions were probably originated by her father's sexual abuse.

KEYWORDS

Chlamydia trachomatis; Sexual Abuse; Girl; Argentina

1. INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis (*C.tr*) infections are the most prevalent bacterial sexually transmitted infections (STI) worldwide [1].

C.tr infection is often asymptomatic and therefore underdiagnosed, as there is no routine screening surveil-

lance. The real prevalence of chlamydial infection in the general population is currently unknown. A study conducted by professionals from the Universidad Nacional de Córdoba and the Universidad Católica de Córdoba (Argentina) determined that 8.7% of sexually active asymptomatic young people (18 - 25 years) are infected with *C.tr* [2].

Untreated *C.tr* infections can lead to serious complications such as salpingitis, probably resulting in pelvic pain and tubal pregnancy or infertility in women and epididymo-orchitis in men [3]. Babies may acquire the infection at birth if their mother's cervix is infected resulting in neonatal ophthalmia, pneumonitis, or both, in addition to nasopharyngeal and genital tract colonization, which may persist for 2 - 3 years after birth [4,5].

Another route of transmission in children is sexual abuse. The identification of a STI in a child should always suggest sexual abuse, and may have both, medical and serious legal implications [6] mainly because it can be used to support the occurrence or allegations of sexual abuse and, in some cases, may prompt an investigation of possible abuse [7].

The implications of the identification of a sexually transmitted agent in children as evidence of a possible sexual abuse varied according to the pathogen involved. According to The American Academy of Pediatrics (AAP), *C.tr* isolation is diagnostic of sexual abuse when perinatal transmission is discarded [8]. It has been suggested that the thinness of the vaginal epithelium in pre-pubertal girls and the likelihood of repeated abuse by the same perpetrator may increase the risk of *C.tr* acquisition after unprotected intercourse; however, published prevalence studies of STIs in sexually abused children have reported rates of infection lower than 5% [9].

This case supports the possibility of sexual abuse as a

Copyright © 2014 SciRes.

OPEN ACCESS

transmission route of *C.tr.*

2. CASE REPORT

A 13-year-old girl was referred to the dentist because of white vegetative lesions on the ventral side of the tongue and exfoliative cheilitis of the lips semimucosa (Figure 1). The stomatological exam suggested chlamydial infection and samples of the lesions were taken for pathological and molecular analysis. The mode of transmission was a source of concern and two possibilities were considered: perinatal transmission or recent acquisition resulting from sexual abuse. For this reason, the girl was referred to the interdisciplinary Department of Abuse at the Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba city, Argentina. Due to suspicious attitudes of the girl's father, the dentist decided to report the alleged abuse case. Subsequently, justice officers started the study protocol for sexual abuse.

The child's mother was seen at the Genitourinary Medicine Department. She denied any history suggestive of past or current chlamydial infection and screening for sexually transmitted infection, including urine testing by polymerase chain reaction (PCR) yielded negative results.

The girl's father was also seen at the Genitourinary Medicine Department. He also denied any data suggestive of chlamydial infection, but screening for sexually transmitted infections yielded positive results for *C.tr* in urine.

Under the assumption that sexual abuse had occurred, the girl was examined, but no genital stigmata of sexual abuse were found. Urine, pharyngeal swab and samples of oral lesions were positive for *C.tr* by PCR.

The formal interview of the girl, conducted by an interdisciplinary team (pediatrician and psychologist), resulted complex and unsatisfactory because she suffered mild mental retardation. The girl's mother recounted that her husband was the caretaker of the child and that although the three of them cohabited in the same house, she was separated from her husband.

The girl's father flatly denied having abused his



Figure 1. Photograph of white vegetative lesion on the ventral side of the tongue.

daughter, but the judge in charge of this case decided to separate the girl from the father and provide medical treatment to eradicate *C.tr.* in addition to psychological therapy. This study was in accordance with the Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud.

3. DISCUSSION

Siegel indicated that nearly one third of sexually assaulted children were forced to submit to sexual intercourse, placing them at risk for infection by a sexually transmitted agent [10].

Interdisciplinary work is very important in cases of sexual abuse to dispose conclusive evidences. The victim's story is one of the most important of them [11]. Though we could not get the story of abuse by the girl, we found that both the girl and her father had *C.tr* infection. Furthermore, the mother was negative for this microorganism and she had no history of *C.tr* infection.

Although the girl was 13 years old, we had to discard perinatal transmission because this infection may persist several years [12].

According to the molecular differences of *ompA* gene, *C.tr* is divided into different genotypes that are responsible for various diseases. A, B, Ba y C genotypes produce trachoma; D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J y K are responsible for urogenital infections in adults and respiratory and conjunctival neonatal infections; finally, L1, L2, L2a and L3 genotypes cause lymphogranuloma venereum [13,14]. In women, asymptomatic clinical presentation occurs in 70% - 75% of cases. Approximately 30% - 40% of sexually active teens are infected and up to 40% of them could develop pelvic inflammatory disease if they are not properly treated [15]. Besides the aforementioned complication, *C.tr* can cause fertility problems, abortions and premature births [3].

In contrast to women, asymptomatic *C.tr* infection takes place in the 25% of the infected men [1] and is considered the most frequent cause of nongonococcal urethritis [16]. The complications that this population is exposed to are: epididymitis, prostatitis, infertility and Reiter's Syndrome (conjunctivitis, arthritis, urethritis and macules) [17]. It is worth mentioning that the girl's father did not present any of these pathologies when the urine sample was taken.

In pregnant women, untreated chlamydial infections are associated with abortions, postpartum endometritis, premature rupture of membranes, low birth weight and transmission to the infant through the birth canal [18]. Some studies suggest that the risk of infection of a newborn mother infected with *C.tr* is approximately 50% and may cause neonatal bronchitis, pneumonia and conjunctivitis [5].

It is important to note that the diagnosis was performed using nucleic acid amplification tests (NAATs).

We know that culture remains the gold standard for diagnosis of *C.tr* in this population because of its high specificity [6], but the difficulty in maintaining the viability of the organism during transportation and the low sensitivity limit its usefulness [19].

NAATs for detection of *C.tr* became widely available in early 1990s and offers the advantages of higher sensitivity and ease of specimen collection (urine specimens), when compared with cultures [19].

In cases of sexual abuse, it is standardized that *C.tr* positive results by NAATs should be confirmed looking for another *C.tr* target [20], so we utilized a PCR directed to cryptic plasmid of *C.tr*. Confirmation was specified as use of another PCR with a different genetic target (*ompA*) and sequencing.

We know that this bacterium can be easily eliminated by antibiotic therapy; therefore, early diagnosis and treatment of infected individuals are very important to prevent the spread of the infection and severe sequelae.

US Centers for Disease Control and Prevention recommend to treat children older than eight years with oral Azithromycin (1 g single dose) or Doxycycline (100 mg orally twice a day for 7 days) [7]. The same treatment schedule is used for prophylaxis after sexual assault.

Additionally, Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2010 suggest the examination for STIs within 1 - 2 weeks after the assault unless prophylactic treatment was provided.

4. CONCLUSIONS

As we know, *C.tr* infection is asymptomatic in most cases, so innovative screening strategies are needed to interrupt the transmission of *C.tr* and connect the hidden cases to care. This way, it would be possible to reduce the prevalence of this infection and prevent transmission to this vulnerable population.

The diagnosis would not have been achieved if the possibility of chlamydial infection had not been initially considered by the dentist and the appropriate swab taken for chlamydial testing. Additionally, the assistance of the Hospital de Niños multidisciplinary team, who specializes in sex abuse cases, was very helpful. For all these reasons, we concluded that our patient's oral lesions were probably originated by her father's sexual abuse.

FUNDING

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Técnica de la Provincia de Córdoba-Argentina. PIO2010-MincytCba. 2011-2013. Ref. Res. [MINCYT Cba. No 170/2011] and Fundación Roemmers.

REFERENCES

[1] Pérez Monrás, M. and Almanza Martínez, C. (2001) *Clamidia*. Microbiología y parasitología médica. II. Ciencias Médicas, La Habana, 431-432.

- [2] Farinati, A., Zitto, T., Bottiglieri, M., Gastaldello, R., Cannistraci, R., Gonzalez, S., Tossoroni, D., Isa, M.B., Pavan, J., López, H. and Cuffini, C. (2008) Infecciones asintomáticas por *Chlamydia trachomatis*: Un problema controlable en la población adolescente. *Revista Panamericana de Infectología*, **10**, 8-12.
- [3] Kortekangas-Savolainen, O., *et al.* (2012) Hospital-diagnosed late sequelae after female *Chlamydia trachomatis* infections in 1990-2006 in Turku, Finland. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, **73**, 299-303. <http://dx.doi.org/10.1159/000334822>
- [4] Bell, T.A., Stamm, W.E., Wang, S.P., Colmes, K.K. and Grayston, J.T. (1992) Chronic *Chlamydia trachomatis* infections in infants. *JAMA*, **267**, 400-402. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1992.03480030078041>
- [5] Kakar, S., Bhalla, P., Maria, A., Rana, M., Charla, R. and Mathur, N.B. (2010) *Chlamydia trachomatis* causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **28**, 45-47. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.58728>
- [6] American Academy of Pediatrics Committee on Child Abuse and Neglect (1991) Guidelines for the evaluation of sexual abuse of children. *Pediatrics*, **87**, 254-260.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. *MMWR Recommendations and Reports*, **59**, 1-102.
- [8] Academy of Pediatrics (1999) Guidelines for the evaluation of sexual abuse of children: Subject review. *Pediatrics*, **103**, 186-191.
- [9] Ingram, D.L., Everett, V.D., Lyna, P.R., White, S.T. and Rockwell, L.A. (1992) Epidemiology of adult sexually transmitted disease agents in children being evaluated for sexual abuse. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **11**, 8. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-199211110-00008>
- [10] Siegel, J.M., Sorenson, S.B., Golding, J.M., Burnam, M.A. and Stein, J.A. (1987) The prevalence of childhood sexual assault: The Los Angeles epidemiologic catchment area project. *American Journal of Epidemiology*, **126**, 1141-1152.
- [11] Kellogg, N. and The Committee on Child Abuse and Neglect (2005) The evaluation of sexual abuse in children. *Pediatrics*, **116**, 506-512. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2005-1336>
- [12] Stenberg, K. and Mardh, P.A. (1986) Persistent neonatal chlamydial infection in a 6 year old girl. *Lancet*, **328**, 1278-1279. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92702-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92702-9)
- [13] Lopez-Hurtado, M. and Guerra-Infante, F.M. (2002) Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatología y Reproducción Humana*, **16**, 140-150.
- [14] Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A. (2006) *Microbiología médica*. 5th Edition, Elsevier, Madrid, 523-531.
- [15] Soper, D.E. (2010) Pelvic inflammatory disease. *Obstetrics*

- & *Gynecology*, **116**, 419-428.
<http://dx.doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181e92c54>
- [16] Gaydos, C., Maldeis, N.E., Hardick, A., Hardick, J. and Quinn, T.C. (2009) Mycoplasma genitalium compared to chlamydia, gonorrhea and trichomonas as an etiologic agent of urethritis in men attending STD clinics. *Sexually Transmitted Infections*, **85**, 438-440.
<http://dx.doi.org/10.1136/sti.2008.035477>
- [17] Motrich, R.B., Cuffini, C., Mackern Oberti, J.P., Maccioni, M. and Rivero, V.E. (2006) Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. *Journal of Infection*, **53**, 175-183.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2005.11.007>
- [18] Bilardi, J.E., De Guingand, D., Temple-Smith, M.J., Garland, S., Fairley, C.K., Grover, S., *et al.* (2010) Young pregnant women's views on the acceptability of screening for chlamydia as part of routine antenatal care. *BMC Public Health*, **10**, 505.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-10-505>
- [19] Black, C.M. (1997) Current methods for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 160-184.
- [20] Hammerschlag, M.R. and Gaydos, C.A. (2012) Guidelines for the use of molecular biological methods to detect sexually transmitted pathogens in cases of suspected sexual abuse in children. *Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases Methods in Molecular Biology*, **903**, 307-317.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-937-2_21

NOTE LIST OF ABBREVIATIONS

C.tr.: Chlamydia trachomatis
 NAATs: Nucleic Acid Amplification Techniques
 PCR: Polimerase Chain Reaction
 STI: Sexual Transmitted Infections
 AAP: American Academy of Pediatrics