

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA



Tesis Doctoral

**ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *CHLAMYDIA*
TRACHOMATIS EN GIPUZKOA (2006-2015): PREVALENCIA EN GESTANTES,
IMPACTO EN LA POBLACIÓN Y GENOTIPOS CIRCULANTES**

Luis Piñeiro

San Sebastián, junio 2016

I

Agradacimientos

Al Dr. Emilio Pérez-Trallero, por su ejemplo y estímulo constante.

Al Dr. Gustavo Cilla, por su ayuda en la realización y revisión de esta tesis, especialmente en los momentos más difíciles durante estos años.

A todo el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia, por su colaboración diaria.

A Cristina Sarasqueta, por el análisis estadístico.

A mi familia, por su apoyo y comprensión.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFTR: canal transmembrana de cloruro activado por AMP (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

CE: cuerpo elemental

CHSP60: proteína clamidial de choque térmico 60

CIC: células intersticiales de Cajal

CIE: clasificación internacional de enfermedades

CIN: neoplasia intraepitelial cervical

CR: cuerpo reticulado

Ct: ciclo de amplificación (cycle threshold)

dNTP: dinucleótidos fosfato

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

EDO: enfermedad de declaración obligatoria

EEUU: Estados Unidos de América (USA)

EIP: enfermedad inflamatoria pélvica

ETS: enfermedades de transmisión sexual

EUSTAT: Instituto Vasco de Estadística

FDA: Food and Drug Administration

HSH: hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres

HTS: heterosexuales

HUD: Hospital Universitario Donostia

IFD: inmunofluorescencia indirecta

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

INF: interferón

iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible

ITS: infecciones de transmisión sexual

ITU: infección de tracto urinario

LCR: reacción en cadena de la ligasa

LGV: linfogranuloma venéreo

LPS: lipopolisacárico

MLST: multilocus sequence typing

MLVA: multilocus VNTR análisis

MOMP: proteína principal de membrana externa (major outer membrane protein)

MTV: medio de transporte viral

NF κ B: factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa (nuclear factor kappa-light-chain enhancer de células B activadas)

nvCT: nueva variante sueca de *Chlamydia trachomatis*

OMP: otras proteínas de membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSI: Organizaciones Sanitarias Integradas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PROKRs: receptores proquineticina

PVH: papilomavirus humano

RNBP: recién nacido de bajo peso
RPM: rotura prematura de membrana
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIM: Sistema de Información Microbiológica
ST: secuenciotipo
TAAN: técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
TGU: tracto genito urinario
TNF: factor de necrosis tumoral
TPHA: Treponemal Passive Hemagglutination Assay
UAP: Unidades de Atención Primaria
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory
VHS: virus herpes simplex
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
VNTR: variable number of tandem repeat

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Historia.....	3
1.2. Microbiología.....	7
1.2.1. Taxonomía-clasificación.....	7
1.2.2. Estructura.....	7
1.2.3. Ciclo biológico.....	9
1.3. Epidemiología.....	12
1.3.1. Transmisión.....	12
1.3.2. Incidencia.....	14
1.3.3. Prevalencia.....	16
1.3.4. Datos en España.....	19
1.4. Clínica, etiopatogenia y secuelas.....	21
1.4.1. Historia natural y expresión clínica de la infección.....	21
1.4.2. Mecanismos etiopatogénicos.....	25
1.4.3. Complicaciones y secuelas de la infección en la mujer.....	29
1.4.4. Complicaciones y secuelas de la infección en el hombre.....	38
1.4.5. Complicaciones y secuelas de la infección en el recién nacido.....	40
1.5. Diagnóstico microbiológico.....	42
1.6. Tratamiento.....	46
1.6.1. Susceptibilidad antimicrobiana.....	46
1.6.2. Pautas de antibioticoterapia.....	47

1.6.3. Control de contactos.....	50
1.7. Prevención.....	50
2. HIPÓTESIS.....	59
3. OBJETIVOS.....	61
3.1. Objetivo general.....	61
3.2. Objetivos principales.....	61
3.3. Objetivos secundarios.....	62
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
4.1. Diseño del estudio.....	65
4.2. Ámbito geográfico del estudio.....	65
4.2.1. Descripción de Gipuzkoa y su población.....	65
4.2.2. Ámbito territorial del área de salud de Gipuzkoa.....	67
4.3. Población objeto de estudio.....	70
4.3.1. Cribado de la infección en puérperas (entre 2011 y junio de 2015): prevalencia, complicaciones gestacionales y transmisión vertical.....	70
4.3.2. Impacto e incidencia de la infección en Gipuzkoa (2006-2015).....	72
4.3.3. Papel de <i>C. trachomatis</i> en cuadros de enfermedades de transmisión sexual y en relación a otros agentes causantes de infecciones de transmisión sexual.....	72
4.3.4. Epidemiología molecular: genotipos <i>ompA</i> , detección de la nueva variante de <i>C. trachomatis</i> y Multilocus Sequence Typing.....	74
4.4. Muestras clínicas.....	76
4.5. Métodos diagnósticos.....	78
4.5.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	80
4.5.2. Amplificación y detección de ácidos nucleicos.....	81

4.5.3. Identificación de genotipos de <i>C. trachomatis</i>	84
4.5.4. Identificación de la nueva variante de <i>C. trachomatis</i>	87
4.5.5. Detección e identificación rápida del genotipo LGV.....	89
4.5.6. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	90
4.6. Soporte informático.....	91
4.7. Análisis estadístico.....	92
4.7.1. Estadística descriptiva.....	92
4.7.2. Estadística analítica.....	93
4.8. Ética.....	94
5. RESULTADOS.....	95
5.1. Cribado de la infección en puérperas de Gipuzkoa (entre 2011 y junio de 2015)	95
5.1.1. Datos de prevalencia globales, por periodos, grupos de edad y país de origen	95
5.1.2. Características clínico-epidemiológicas de los casos positivos.....	98
5.1.3. Complicaciones gestacionales.....	98
5.1.4. Transmisión vertical.....	99
5.2. Impacto e incidencia de la infección por <i>C. trachomatis</i> en Gipuzkoa.....	102
5.2.1. Análisis de la demanda diagnóstica.....	102
5.2.2. Análisis de la incidencia (casos nuevos/100.000 habitantes) de infección por <i>C. trachomatis</i> en la población objeto de estudio por sexo y grupos de edad, periodos y comarcas.....	109

5.3. Papel de <i>C. trachomatis</i> en cuadros de enfermedades de transmisión sexual y en relación a otros agentes causantes de infecciones de transmisión sexual	114
5.3.1. Varones con síndrome uretral	114
5.3.2. Mujeres con diagnóstico de enfermedad inflamatoria pélvica.....	120
5.4. Epidemiología molecular.....	121
5.4.1. Genotipos <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	121
5.4.2. Análisis de la posible introducción de la nueva variante de <i>C. trachomatis</i> en tres áreas geográficas distantes de España	128
5.4.3. Multilocus Sequence Typing.....	129
5.5. Comparación del rendimiento diagnóstico de la muestra de orina y uretral	133
6. DISCUSIÓN.....	135
6.1. Cribado de la infección en puérperas de Gipuzkoa	135
6.1.1. Prevalencia	135
6.1.2. Infección por <i>C. trachomatis</i> y prematuridad	146
6.1.3. Transmisión vertical.....	147
6.2. Impacto e incidencia de la infección por <i>C. trachomatis</i> en Gipuzkoa.....	151
6.2.1. Demanda diagnóstica	151
6.2.2. Incidencia de nuevos casos de infección.....	155
6.3. Incidencia y papel de <i>C. trachomatis</i> en relación a otros agentes de infecciones de transmisión sexual	161
6.3.1. Varones con síndrome uretral	161
6.3.2. Varones con uretritis no sospechada clínicamente.....	166
6.3.3. Mujeres con sospecha clínica de enfermedad inflamatoria pélvica	168

6.4. Epidemiología molecular.....	170
6.4.1. Genotipos <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i>	170
6.4.2. Análisis de la posible introducción de la nueva variante de <i>C. trachomatis</i> en tres áreas geográficas distantes de España	177
6.4.3. Multilocus Sequence Typing.....	178
6.5. Comparación del rendimiento diagnóstico de la muestra de orina y uretral	183
7. CONCLUSIONES	185
8. BIBLIOGRAFÍA	189
9. ANEXOS	231
Anexo I.- Población de Gipuzkoa objeto del estudio	231
Anexo II.- Índice de números GenBank.....	232
Anexo III.- Publicaciones científicas.....	233
Anexo IV.- Financiación	257

1. INTRODUCCIÓN

La infección por *Chlamydia trachomatis* es un importante y creciente problema de salud pública mundial y actualmente la principal causa bacteriana de infecciones de transmisión sexual (ITS). La incidencia de esta infección es mayor en mujeres jóvenes y es especialmente importante en este grupo de la población debido a sus potenciales consecuencias en el aparato reproductor femenino: enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), patología tubárica e infertilidad. Durante la gestación, la infección por *C. trachomatis* se ha asociado con complicaciones como el aborto espontáneo, el embarazo ectópico, la rotura prematura de membranas (RPM), y el parto pretérmino. Además, la infección puede transmitirse perinatalmente al recién nacido causando conjuntivitis neonatal, nasofaringitis y neumonía. En el hombre, la infección también es más frecuente en varones jóvenes y puede ocasionar epididimitis, orquitis y esterilidad.

Las principales manifestaciones clínicas de la infección por *C. trachomatis* son la cervicitis en las mujeres y la uretritis en los hombres. Sin embargo, debido a las especiales características de este microorganismo intracelular (ciclo de división bifásico, metabolismo lento) y su interacción con la respuesta inmune del huésped, su infección puede pasar frecuentemente desapercibida y no ser diagnosticada hasta la aparición de las posibles complicaciones y secuelas. La infección asintomática favorece su diseminación entre la población, asociada fundamentalmente a conductas sexuales de riesgo.

C. trachomatis se clasifica actualmente en 14 genotipos/serovariedades (A-C, D-K, L1-L3) según la variabilidad genética de la proteína principal de la membrana externa (major outer membrane protein, MOMP), número mayor si se consideran las distintas genovariantes identificadas en algunos de ellos (B/Ba, D/Da, G/Ga, I/Ia, J/Ja, L2/L2b,

Introducción

etc). Los genotipos que más frecuentemente producen infecciones del tracto genitourinario son los genotipos D, E, F, G, H, I, J y K. Los genotipos L1-3 se asocian al linfogranuloma venéreo (LGV), infección tradicionalmente más común en países tropicales y subtropicales. Sin embargo, en los últimos años se han descrito en Europa numerosos casos de LGV en hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH) presentando típicamente proctitis, estando asociados al genotipo LGV-IIb. Aunque ocasionalmente también descritos en infecciones genitales, los genotipos A, B, y C son la causa del tracoma (conjuntivitis folicular crónica), una de las principales causas de ceguera en el mundo y endémica especialmente en áreas rurales del África sub-sahariana donde su transmisión por contacto directo con los ojos o a través de moscas se ve favorecido por las malas condiciones higiénicas.

En el presente siglo el diagnóstico microbiológico y el tratamiento de la infección por *C. trachomatis* han mejorado considerablemente. El diagnóstico, debido al desarrollo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), cuya progresiva introducción en los laboratorios está contribuyendo (entre otros factores) al incremento en el número y en la rapidez de la detección de los casos. El tratamiento, debido a la existencia desde hace veinte años de una antibiòticoterapia más sencilla y eficaz para erradicar el microorganismo en los pacientes, siendo el control de los contactos sexuales esencial en el manejo de esta infección para cortar las cadenas de transmisión y las reinfecciones. Además, debido al importante y creciente impacto de la infección por *C. trachomatis* en la salud pública, las principales agencias internacionales implicadas en la vigilancia de las ITS (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC]...) han propuesto diversas medidas de

prevención y niveles de intervención para mejorar su control local y conocimiento general (ej. cribados en ciertos grupos de población).

Siguiendo estas recomendaciones, esta Tesis Doctoral ha estudiado la evolución de la infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa desde la introducción de TAAN para su diagnóstico en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia (HUD) en el año 2006 y ha investigado aspectos de su epidemiología aún poco descritos en España hasta 2015. A nivel molecular, se han estudiado los genotipos circulantes de *C. trachomatis* y su evolución temporal, comparando los resultados con la distribución existente en otras zonas geográficas de España distantes de Gipuzkoa (Canarias, Sevilla). Para valorar la necesidad de implementar medidas preventivas, entre 2011 y junio de 2015 se estudió la prevalencia de *C. trachomatis* en parturientas, analizándose la prevalencia de la infección por grupos de edad.

1.1. Historia

El tracoma es la primera enfermedad humana conocida causada por chlamydia. El término “trachoma” fue descrito hacia el año 60 antes de Cristo por el médico siciliano Pedanius Dioscorides y los estadios de la enfermedad fueron descritos un siglo más tarde por Galeno ^(1,2). Sin embargo, egipcios (en el papiro de Ebers de 1.500 antes de Cristo ya se describe el tracoma) y chinos ya tenían conocimiento sobre la enfermedad, así como éstos últimos sobre el posible beneficio de la aplicación de sales de cobre alrededor de los ojos. Las Cruzadas extendieron la enfermedad desde Oriente Medio hacia Europa, y más tarde, las tropas de Napoleón después de la campaña de Egipto re-diseminaron la infección en Europa, siendo empleados los términos ophtalmia egipcia y

Introducción

ophtalmia militar. En 1907, Halberstaedter y Prowazek descubrieron que la causa del tracoma podía ser un microorganismo capaz de formar inclusiones intracitoplasmáticas en orangutanes infectados experimentalmente ⁽³⁾. El actual nombre “Chlamydia” procede de un término equivocado, ya que estos autores pensaron que habían descubierto “mantled protozoans” (protozoos envueltos), término usado para definir las vacuolas intracitoplasmáticas en las que observaban en tinciones de Giemsa de raspados conjuntivales de casos de tracoma numerosos microorganismos en forma de partículas elementales rojizas embebidas en una matriz azul o envoltura (“mantle”, manto). Por ello, utilizaron la designación “Chlamydozoa” cuya raíz deriva de la palabra griega “Chlamys/khlamus” que significa manto ⁽⁴⁾.

Figura 1. Dibujo (obtenido de Mårdh et al) que representa que el tracoma ya era una enfermedad reconocida en China hace miles de años.



Entre 1909 y 1911 éstos y otros autores (Staargardt, Lindner) describieron inclusiones similares en células conjuntivales de niños con ophtalmia no gonocócica y en secreciones uretrales de hombres con uretritis no gonocócica ^(5,6). En 1910 Fritsch y colaboradores mostraron que el mismo tipo de inclusiones intracitoplasmáticas se podía observar en monos infectados experimentalmente con secreciones de los ojos de los niños con conjuntivitis, de secreciones uretrales de hombres con uretritis, y de secreciones cervicales de las madres de los niños infectados, pudiéndose establecer el vínculo entre las infecciones oculares y genitales cuando comprobaron que madres infectadas podían transmitir la infección verticalmente a los recién nacidos ⁽⁷⁾. Durante la década de 1930 Thygeson y colaboradores realizaron nuevas observaciones sobre la patología y la transmisión de las infecciones genitales por chlamydia ⁽⁸⁾. Entre 1935 y 1941 Miyagawa y colaboradores y Rake y colaboradores establecieron que el linfogranuloma venéreo era una infección causada por *C. trachomatis* ^(9,10).

Pero a partir de la década de 1950, con la aparición de métodos diagnósticos como el cultivo de *C. trachomatis* a partir de células embrionarias de huevos de gallina por T'ang y colaboradores, pudo desarrollarse la investigación sobre las infecciones genitales por chlamydia¹¹. En 1959 Jones y colaboradores fueron los primeros en recuperar *C. trachomatis* del cérvix de una madre y de los ojos de su hijo con signos de conjuntivitis¹². También se pudo demostrar así la transmisión sexual de la infección de unos individuos a otros y del tracto genital a los ojos de adultos. En 1965 Gordon y Quan introdujeron una técnica de cultivo empleando células McCoy irradiadas, lo que permitió mejorar el diagnóstico de las infecciones por chlamydia ⁽¹³⁾, siendo la técnica perfeccionada en sucesivas modificaciones.

En 1970 Wang y Grayston desarrollaron una técnica de microinmunofluorescencia capaz de subdividir *C. trachomatis* en serotipos ⁽¹⁴⁾. En 1984 Tam, Bell y colaboradores

Introducción

introdujeron el empleo de anticuerpos monoclonales especie-específicos para la detección directa de chlamydia en muestras clínicas, mejorando así la sensibilidad y rapidez diagnóstica ^(15,16). Estos avances diagnósticos permitieron en las décadas de 1970 y 1980 constatar la importancia de *C. trachomatis* como una entidad clínica implicada en la etiología de uretritis no gonocócicas en varones y de cervicitis en mujeres, así como de sus posibles complicaciones (salpingitis, epididimitis, peritonitis, neumonía neonatal...), facilitando el conocimiento de la epidemiología de la infección. En los últimos años el desarrollo de las técnicas moleculares ha supuesto una revolución en el diagnóstico y conocimiento de esta infección. Los estudios pioneros sobre los lipopolisacáridos de la pared de Dhir y colaboradores, sobre la MOMP de Caldwell y colaboradores y sobre el plásmido críptico de Lovett y colaboradores se iniciaron en los años 70 ^(17,18,19). Sin embargo, la introducción de métodos moleculares comerciales capaces de detectar esas dianas y disponibles para los laboratorios de Microbiología sólo se ha producido al final del siglo XX y principio del XXI.

Tabla 1. Resumen de los principales hitos históricos en el conocimiento de *C. trachomatis*.

Año	Hito histórico
1907	Detección de inclusiones intracitoplasmáticas en exudados conjuntivales de pacientes con tracoma
1909-1911	Demostración de inclusiones intracitoplasmáticas en conjuntivitis neonatales, y en uretritis y cervicitis de padres de esos niños
1930-	Descripción del ciclo biológico de <i>Bedsonia</i> (<i>C. psittaci</i>). Aislamiento del agente causante del LGV en ratones; observación de similitudes entre los ciclos biológicos del agente del LGV y <i>C. psittaci</i>
1957	Aislamiento de <i>C. trachomatis</i> en huevos embrionarios de gallina
1965	Aislamiento de <i>C. trachomatis</i> en células McCoy irradiadas
1970	Desarrollo de la micro-inmunofluorescencia, técnica que permite la subdivisión de <i>C. trachomatis</i> en serotipos
1970-	Implicación de <i>C. trachomatis</i> en infecciones genitales no complicadas (uretritis, cervicitis) y complicadas (salpingitis, epididimitis, peritonitis, infecciones perinatales...)
1980-	Caracterización bioquímica, antigénica y genética
1982-1984	Desarrollo de anticuerpos monoclonales especie-específicos para pruebas de inmunofluorescencia microscópica
1990-	Desarrollo de técnicas diagnósticas moleculares

1.2. Microbiología

1.2.1. Taxonomía-clasificación

C. trachomatis es una bacteria inmóvil intracelular obligada de la familia *Chlamydiaceae*, orden Chlamydiales⁽²⁰⁾. Junto con *C. pneumoniae* y *C. psittaci* son las especies del género *Chlamydia* que con más frecuencia producen patología en el hombre, siendo discutido que las dos últimas puedan clasificarse en un nuevo género denominado *Chlamydophila* basándose en las diferencias de los cuerpos de inclusión (en *C. trachomatis* vacuolares y con glicógeno, en *C. pneumoniae* y *C. psittaci* ovales y sin glicógeno), la susceptibilidad a las sulfonamidas (*C. trachomatis* más sensible) y más recientemente en el análisis genético de las subunidades 16S y 23S del ARNr^(21,22,23).

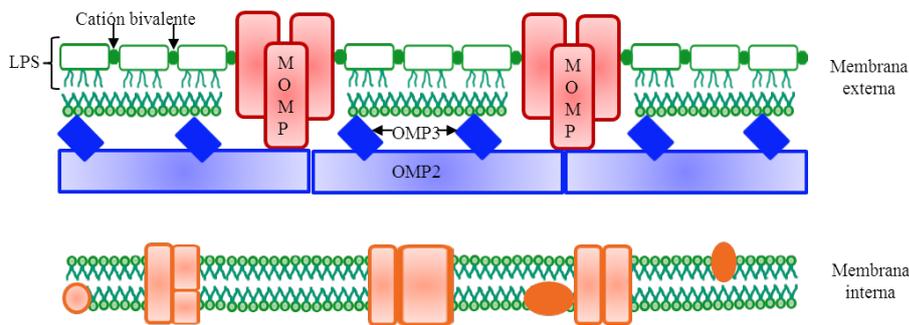
1.2.2. Estructura

Chlamydia está compuesta por proteínas (35%), lípidos (40-50%) y posee tanto ADN como ARN. El tamaño del genoma de *C. trachomatis* está compuesto por una doble hebra de ADN que oscila entre 1 y 1,24 Mb (siendo los más pequeños de las especies bacterianas junto con los micoplasmas) con un contenido en G+C del 40% aproximadamente y con capacidad de codificar más de 600 proteínas. Además de un ADN cromosómico, *C. trachomatis* posee varias copias (7-10) de un ADN plasmídico de 7,5 kb llamado plásmido críptico (salvo un pequeño porcentaje de cepas mutantes que carecen de él) y que lo diferencia de las otras especies, por lo que se ha empleado como una de las dianas diagnósticas⁽²⁴⁾. La pared celular de *C. trachomatis* (figura 2) se asemeja a la de las bacterias gramnegativas, aunque sin peptidoglicano, y contiene dos membranas trilaminares: una membrana externa y una membrana interna citoplásmica.

Introducción

La membrana externa se compone de: a) un lipopolisacárido (LPS), b) proteínas estructurales como la MOMP y otras proteínas de membrana externa (OMP) ricas en cisteína (pcr), y c) otras proteínas de superficie y componentes no proteináceos.

Figura 2. Estructura de la pared de *Chlamydia*.

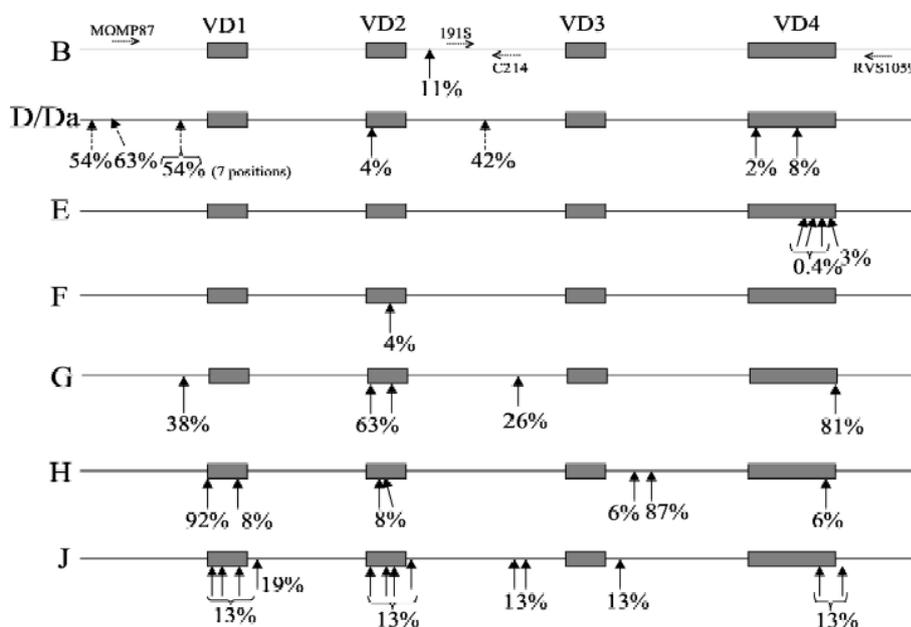


LPS: lipopolisacárido; MOMP: proteína principal de la membrana externa; OMP: otras proteínas de membrana externa ricas en cisteína.

El LPS es común a todas las especies de la familia y se diferencia del LPS de otras bacterias por su menor actividad endotóxica debido a los inusuales ácidos grasos de cadena larga de su lípido A. La MOMP de 40 kDa supone el 50-60% de las proteínas de la pared, está codificada por el gen *ompA*, tiene función de porina y adherencia electrostática, contiene epítomos antigénicos (principal candidato a vacuna) y 4 dominios variables (VD1-4) que permiten su clasificación en serovariedades y genotipos (figura 3). La OMP2 es de 60 kDa, está en el espacio periplásmico, y contribuye a la integridad estructural (como el peptidoglicano de otras bacterias) y estabilidad osmótica de la pared (fundamentalmente de los cuerpos elementales). La OMP3 es una lipoproteína hidrofílica de 12-15 kDa que se adhiere a la heparina de las membranas de las células huésped permitiendo su entrada. Otras proteínas de superficie como las llamadas proyecciones de superficie (detectadas en los cuerpos elementales) o

las “spikelike rods” (detectadas en formas de transición entre el cuerpo elemental y el cuerpo reticulado) parecen tener función de adherencia o de transporte de moléculas.

Figura 3. Representación de los dominios variables (VD) en el gen *ompA* que permiten su clasificación en genotipos (obtenida de Lysén et al, J Clin Microbiol 2004;42:1641-7). Las flechas indican los cambios en los nucleótidos comparados con la secuencia de de cepas de referencia. Las flechas discontinuas indican posiciones con cambios comparados con D/B120 pero no observados en la cepa Da D/IC-Ca18. Los porcentajes expresan la proporción de secuencias con cambios de nucleótidos en cada serotipo. Las secuencias de los cebadores están indicadas como flechas punteadas; así, el fragmento de 480-pb está flanqueado por los cebadores 191S y RVS1059 y el fragmento de 990-pb por los cebadores MOMP87 y RVS1059.



1.2.3. Ciclo biológico

Chlamydia posee un ciclo biológico particular (figuras 4 y 5) que le diferencia del resto de bacterias y que tiene consecuencias en el diagnóstico de laboratorio, la etiopatogenia clínica y el tratamiento antibiótico. En él se diferencian dos formas (tabla 2), el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticulado (CR). El CE tiene un tamaño de 200-400 nm y es la partícula infectiva que se adhiere a receptores aún poco conocidos en la célula

Introducción

eucariota huésped ⁽²⁵⁾. Su pared celular es más rígida, posee antígenos sero-específicos y puede sobrevivir extracelularmente un tiempo limitado antes de infectar a las células. El CE entra en la célula formando una vesícula o fagosoma y migra hasta el espacio perinuclear donde comienza a reorganizarse y transformarse en CR a partir de 8-12 horas. Esta diferenciación se acompaña de cambios en el tamaño de la bacteria y en el contenido de cisteína de las proteínas de la membrana externa disminuyendo su estabilidad. Esta labilidad se acompaña también de la formación de poros por los que *Chlamydia* obtiene nutrientes y energía de la célula huésped. Los CR son así metabólicamente activos, y se dividen por fisión binaria dentro de vacuolas que van creciendo formando cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Aproximadamente a las 18-24 horas los CR empiezan a transformarse nuevamente en CE hasta que finalmente la célula se lisa y se liberan al exterior los CE que pueden infectar otras células y perpetuar el ciclo. El ciclo en total puede durar 48-72 horas. Finalmente, en ocasiones se pueden generar bajo determinadas condiciones (modificaciones en pH y temperatura, depleción de nutrientes, tratamiento antibiótico, interferón gamma...) unas formas intracelulares intermedias, aberrantes y resistentes que pueden persistir evitando la respuesta inmune del huésped y contribuir al desarrollo de una infección crónica.

Figura 4. Esquema del ciclo biológico de *Chlamydia*.

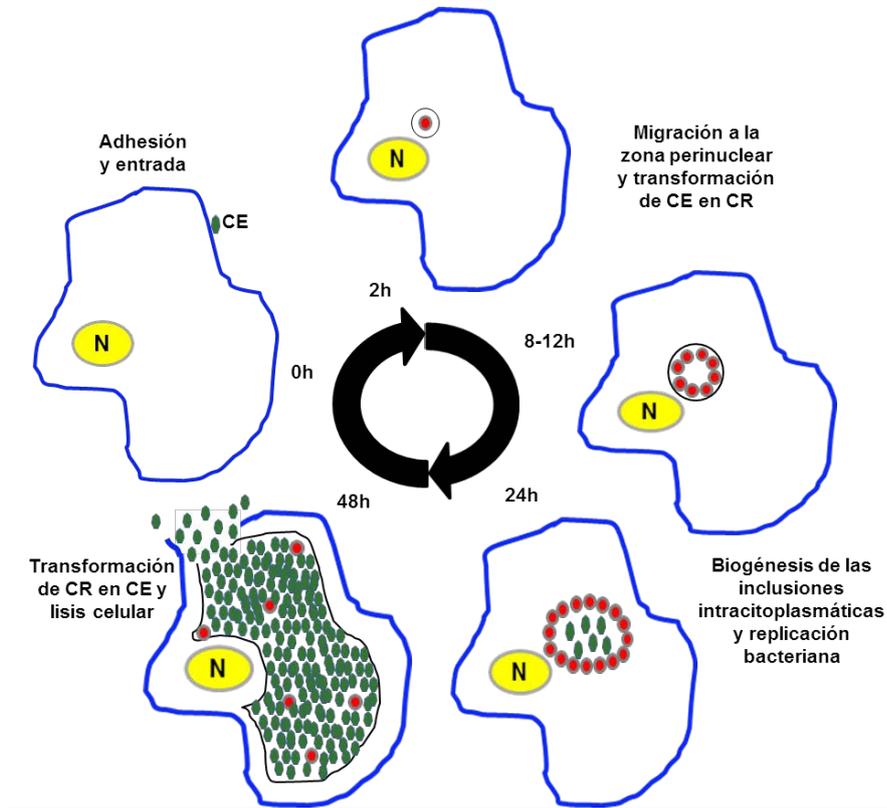
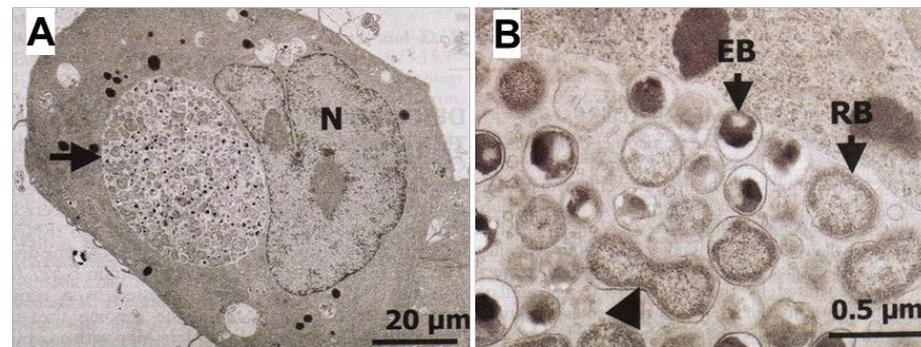


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica (obtenidas de Jorgensen et al, Manual of Clinical Microbiology 11ª edición). Inclusión intracitoplasmática presionando el núcleo de una célula infectada (A) y rellena de cuerpos elementales (EB) y cuerpos reticulados (RB) a las 60 horas postinfección (B); el vértice del triángulo indica un cuerpo reticulado en división.



Introducción

Tabla 2. Diferencias entre el cuerpo elemental y el cuerpo reticulado de *C. trachomatis*.

Propiedades	Cuerpo elemental	Cuerpo reticulado
Tamaño	200 - 400 nm	600 - 1000 nm
ADN	nucleoide	disperso
Induce fagocitosis	+	-
Infectividad	+	-
Pared celular rígida	+	-
Estabilidad extracelular	+	-
Antígenos serotipo-específicos	+	-
Antígenos especie-específicos	-	+
Replicación	-	+
Actividad metabólica	-	+

1.3. Epidemiología

1.3.1. Transmisión

La transmisión de la infección por *C. trachomatis* se produce a través del contacto directo entre las membranas mucosas de dos individuos durante la actividad sexual o a través del canal del parto infectado. Debido a las características anatómicas del tracto genital femenino, el riesgo de contraer una ITS es mayor en las mujeres que en los hombres.

Como sucede en otras ITS, el riesgo de transmisión de *C. trachomatis* está directamente relacionado con ciertas características de la conducta sexual, como el inicio temprano de las relaciones, su frecuencia, un cambio reciente de pareja, y especialmente con relaciones de riesgo, como la actividad sexual sin protección o con un incorrecto uso del preservativo, múltiples parejas sexuales y promiscuidad. Otros factores de riesgo son una historia de contacto con pacientes infectados con *C. trachomatis* u otra ITS, una ITS previa, etc.

En los últimos años, la incidencia de esta infección ha crecido, en parte debido a una falsa sensación de seguridad creada por la terapia antiviral frente al VIH en algunos sectores de la población, lo que ha conducido a un descuido en la utilización de métodos preventivos durante las relaciones sexuales, facilitando así la transmisión y expansión de las ITS. Se ha descrito un mayor riesgo de infección en personas con un nivel socioeconómico bajo y en las que abusan de sustancias tóxicas, debido a una menor conciencia y cumplimiento de las medidas preventivas en ese grupo de población. Los adolescentes son el grupo más propenso a involucrarse en conductas de alto riesgo, como el sexo sin protección, especialmente cuando están bajo la influencia de drogas o alcohol.

Una característica importante de la epidemiología de la infección por *C. trachomatis* es el alto porcentaje de la población infectada que puede ser asintomática, a menudo durante varios meses. Se estima que un 50% de los hombres pueden tener una infección asintomática, mientras que en las mujeres este porcentaje puede alcanzar el 70-80%^(26, 27). Los individuos infectados asintóticamente pueden diseminar la infección no diagnosticada entre la población sexualmente activa. Por ello, para mejorar el control de la infección por *C. trachomatis*, en muchos países se han recomendado estrategias de cribado en la población con mayor prevalencia, además del tratamiento de los casos y el control de los contactos para prevenir reinfecciones.

La transmisión de la infección por *C. trachomatis* entre la población también puede ser facilitada por la emergencia de cepas mutadas, como ocurrió en Suecia en 2006 con la nueva variante de *C. trachomatis* (nvCT) con una delección de 377 pb en el plásmido críptico y perteneciente al genotipo E, que no fue detectada en algunas regiones que utilizaban para su diagnóstico técnicas moleculares que empleaban esa única diana⁽²⁸⁾. La nvCT causó muchos falsos negativos diagnósticos, permitiendo su diseminación a

Introducción

otros países del norte de Europa ⁽²⁹⁾. Afortunadamente, su propagación más allá de estos países ha sido limitada ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

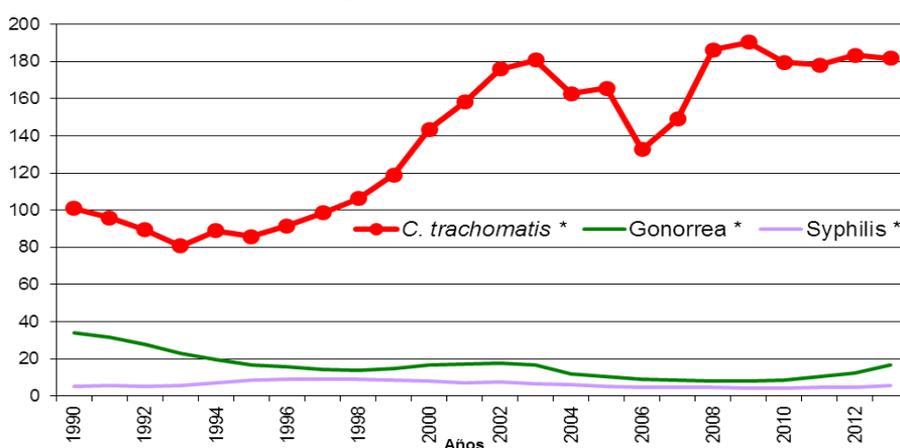
Es importante destacar que otros microorganismos que causan ITS (papilomavirus humano, VIH, virus de la hepatitis B, virus herpes simplex, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*...) pueden ser transmitidos en el mismo episodio que la infección por *C. trachomatis*. Además, en individuos infectados por *C. trachomatis* existe un mayor riesgo de adquirir y, en caso de coinfección, transmitir otras ITS debido a las alteraciones inflamatorias producidas en las membranas mucosas genitales afectadas ⁽³⁵⁾.

1.3.2. Incidencia

La OMS ha estimado recientemente para el 2008, que en cualquier momento del año, más de 100 millones de adultos en el mundo estaban infectados por *C. trachomatis* y que cada año se producen 105,7 millones de nuevas infecciones ⁽³⁶⁾. En Estados Unidos, se declararon en 2013 más de 1,4 millones de casos nuevos, una tasa de 447/100.000 habitantes, siendo las más frecuentemente afectadas mujeres jóvenes de raza negra de 15-24 años de edad ⁽³⁷⁾. En Europa, se declararon también en 2013 384.555 casos de infección por *C. trachomatis*, con una tasa global de 182/100.000 habitantes, siendo la incidencia mayor en mujeres (207/100.000) y especialmente en las de 20-24 años (1.717/100.000) ⁽³⁸⁾. Los datos reales probablemente serán mayores, ya que es posible que exista una subdeclaración de casos debido a las marcadas diferencias entre los sistemas nacionales de vigilancia y declaración. De hecho, algunos países europeos no aportan datos, otros declaran tasas de incidencia muy bajas (<1/100.000 habitantes), mientras que, por el contrario, otros como los países nórdicos o Gran Bretaña (quien

aporta el 62% de todos los casos) declaran tasas de incidencia elevada (>250/100.000 habitantes). Por todo ello, los datos declarados deben ser interpretados con precaución: una tasa baja puede subestimar la incidencia real si las medidas diagnósticas y los sistemas de declaración son inadecuados; pero por otra parte, una tasa creciente puede no reflejar una mayor transmisión de la infección en aquellos países que están implementando programas de cribado capaces de detectar casos asintomáticos. No obstante, las tendencias en los datos de varios países muestran que la incidencia declarada de infección por *C. trachomatis* se ha incrementado considerablemente en los últimos años (figura 6). Este incremento puede ser debido a la suma de múltiples factores: aumento de los comportamientos sexuales de riesgo, disminución del cumplimiento de las medidas preventivas, mejor conocimiento y conciencia de la infección por *C. trachomatis* que permite aumentar el diagnóstico de casos, mayor sensibilidad de los métodos diagnósticos, y mejora en los sistemas de declaración, entre otros factores.

Figura 6. Tasa de incidencia por 100.000 habitantes de *C. trachomatis* y otras infecciones de transmisión sexual en Europa (datos de los European Centre for Disease Prevention and Control hasta 2015).



1.3.3. Prevalencia

En los últimos años, numerosos estudios epidemiológicos se han propuesto determinar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en la población general, con especial interés en gestantes, personas jóvenes y grupos con prácticas de riesgo, un paso esencial para el diseño de programas de control de la infección apropiados en distintas áreas geográficas (Tablas 3 y 4). Los resultados de estos trabajos están influenciados por las características sociodemográficas de la población estudiada, como edad, composición de la población analizada, factores de riesgo, etc., así como por el tipo de muestra y el método diagnóstico utilizado. Actualmente, los métodos de elección en estos estudios se basan en TAAN, y la prevalencia obtenida oscila entre el 1 y 10%, encontrándose la más alta entre las gestantes jóvenes y solteras. Específicamente, la prevalencia en mujeres menores de 20-22 años fue >10% en estudios realizados en países tan distantes como Botswana, Brasil, Alemania, EEUU e Irlanda.

Tabla 3. Prevalencia de infección por *C. trachomatis* detectada mediante TAAN en estudios realizados en gestantes (servicios de asistencia antenatal) o puérperas en todo el mundo (si no especificado, estudios observacionales prospectivos transversales).

Autor (ref.), país, periodo de estudio	Muestra	Población	Mujeres analizadas (prevalencia)	Factores asociados a mayor prevalencia
Chen XS (39), China (Fuzhou, Fujian), Jul-Sep/02	Cervix	Gestantes (primera visita prenatal)	504 (10,1%)	Jóvenes (18% en ≤25 años), mayores ingresos mensuales
Pinto (40), Brasil (EN), Mar-Nov/09	Orina	Puérperas 15-24 años	2.071 (9,8%)	Jóvenes (13% en <20 años), primera relación sexual <15 años, >1 pareja/año
Romoren (41), Bostwana (Gaberone), Oct/00-Feb/01	Cervix	Gestantes	703 (8%)	Jóvenes (<20 años), solteras, <1 año de relación
Kilmarx (42), Thailandia (Bangkok y Chiang Rai), Jun-Dec/96	Orina	Gestantes (primera visita prenatal)	1.021 (5,7%)	Jóvenes (13% en <20 años), mayor edad gestacional
Silveira (43), USA (Baltimore, Maryland), Jul/05-Feb/08 (ER)	No descrito	Puérperas con información disponible sobre cuidado antenatal	2.127 (4,7%)	Jóvenes (12% en <20 años), etnia (negra), solteras, fumar, NG durante gestación
Roberts (44), USA (Dallas, Texas), May-Sep/09	Cervix y orina	Gestantes 35-37 semanas	2.018 (cervix: 4,3%) (orina: 4,1%)	No descrito
Rours (45), Países Bajos (Rotterdam), Feb/03-Ene/05	Orina	Gestantes que asisten a la preparación al parto	4.055 (3,9%)	Jóvenes (13% en <21 años), etnia (16% en antillanos), solteras (12%)
McMillan (46), Irlanda (Dublin), Jun/03-May/04	Orina	Gestantes asintomáticas	783 (3,8%)	Jóvenes (8,7% en <25 años) y solteras
Chen MY (47), Australia (Melbourne), Oct/06-Jul/07	Orina	Gestantes 16-25 años	987 (3,2%)	>1 pareja sexual en el último año (12%)
Böhm (48), Alemania (EN), Abr-Dic/08 (ER)	Cervix (grupo 1), orina (grupo 2)	Gestantes asintomáticas (g1 y 2) o sintomáticas (g 3)	51.164 (3,1%) g1: 31.856 (3,3%) g2: 18.169 (2,9%) g3: 1.139 (2,0%)	Jóvenes (10% en ≤20 años)
Oakeshott (49), Reino Unido (sur de Londres), Jun/98-Jul/00	Vaginal (auto-toma), orina	Gestantes <10 semanas (MG y clínica de planificación familiar)	1.216 (2,4%)	Jóvenes (9% en <25 años, 14% en adolescentes), etnia (9% en negras)
Peuchant (50), Francia (Burdeos), Ene-Jun/11	Vaginal	Gestantes 34-38 semanas >18 años	1.004 (2,5%)	Jóvenes (7,9% en <25 años), solteras (9,4%), múltiples parejas

EN: estudio nacional; NG: *Neisseria gonorrhoeae*; ER: estudio retrospectivo; MG: medicina general.

Introducción

Tabla 4. Prevalencia de infección por *C. trachomatis* detectada mediante TAAN en estudios realizados en población general (no gestantes) sexualmente activa.

Autor (ref.), país, periodo de estudio	Muestra	Población	Número analizado (prevalencia)	Factores asociados a mayor prevalencia
Goulet (51), Francia (EN), Oct/05-Mar/06	Orina (♂), autotoma vaginal (♀)	♂ y ♀ de 18-44 años	2.580 (1,7%): 1.135 ♂ (1,3%) y 1.445 ♀ (1,9%)	Jóvenes (2,0% en ♂ <30 años, 3,2% en ♀ <25 años)
van Bergen (52), Países Bajos (Amsterdam, Rotterdam, South Limburg), Abr/08-Feb/09	Orina (♂), orina y/o autotoma vaginal (♀)	♂ y ♀ de 16-29 años	41.638 (4,2%): 13.020 ♂ (3,8%), 28.618 ♀ (4,4%)	Jóvenes (7,3% en 15-19 años, 4,7% en 20-24 y 3,0% en 25-29)
Fenton (53), Gran Bretaña (EN), May/99-Feb/01	Orina	♂ y ♀ de 18-44 años	7.058 (1,8%): 3.278 ♂ (2,2%), 3.780 ♀ (1,5%)	Jóvenes, solteros, múltiples parejas
Klavns (54), Eslovenia, Nov/99-Feb/01	Orina	♂ y ♀ de 18-49 años	1.447 (2,2%): 683 ♂ (3,0%), 764 ♀ (1,6%)	Jóvenes (4,7% en 18-24 años)
Klovstad (55), Noruega (Rogaland), Feb-May/06	Orina	♂ y ♀ de 18-25 años	1.535 (5,5%): 605 ♂ (5,1%) y 930 ♀ (5,8%)	Múltiples parejas en el último año
Datta (56), USA (EN), 2007-2008	Orina	♂ y ♀ de 14-39 años	2.667 (1,6%): ♂ (1,1%), ♀ (2,2%)	Jóvenes (2,8% en 20-25 años), etnia (6,7% en negros)
Torrone (57), USA (EN), 2007-2012	Orina	♂ y ♀ de 14-39 años	8.330 (1,7%): ♂ (1,4%), ♀ (2,0%)	Jóvenes (4,7% en <25 años, y 13,5% en ♀ negras)
Lewis (58), Australia (EN), 1997-2011	Orina y otras (uretra, cervix, recto...)	♂ <30 años y ♀ <25 años	Revisión meta-análisis de 76 estudios: ♂ (3,9%), ♀ (5,0)	Jóvenes, etnia (indígenas australianos)
Imai (59), Japan (Miyazaki), Ene/04-Mar/06	Orina	♂ y ♀ de 18-39 años (82% ≤22 años)	6.598 (8,4%): 2.595 ♂ (6,7%), 4.003 ♀ (9,5%)	Jóvenes, múltiples parejas, mal uso del preservativo
Parish (60), China (EN), Ago/99-Ago/00	Orina	♂ y ♀ de 20-64 años	2.363 (%): 1.138 ♂ (2,1%), 1.235 ♀ (2,6%)	Escasa formación, ♂ 25-34 años, ♀ 35-44 años
Joyee (61), India (Tamil Nadu), periodo no descrito	Orina	♂ y ♀ de 15-45 años	1.444 (1,1%): 603 ♂ (1,1%), 841 ♀ (1,2%)	♂ de 31-45 años y ♀ de 31-35 años
Obasi (62), Tanzania (Mwanza), Nov/97-May/98	Orina	♂ y ♀ de 15-19 años	9.435 (1,8%): 4.749 ♂ (1,0%), 4.686 ♀ (2,4%)	

EN: estudio nacional; ♂: hombres; ♀: mujeres

1.3.4. Datos en España

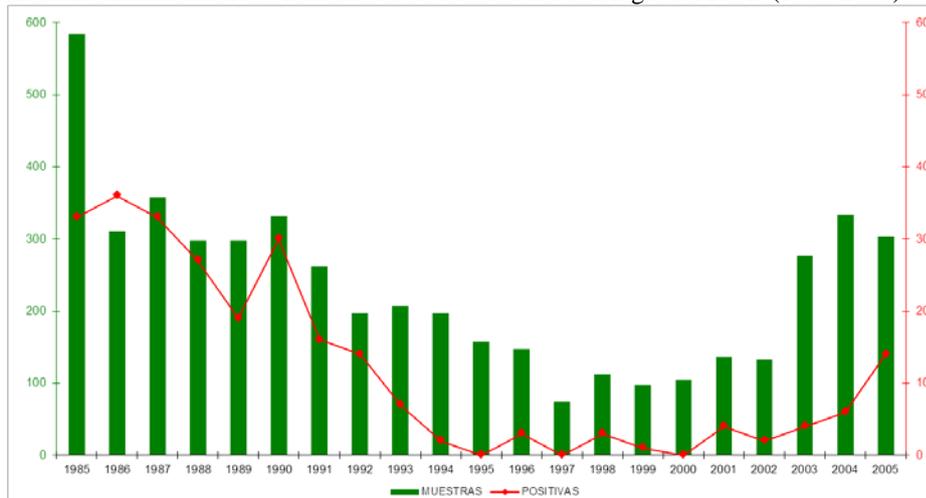
En España los datos epidemiológicos sobre la infección por *C. trachomatis* son escasos. A diferencia de otros países europeos, no existe un sistema de vigilancia y declaración obligatoria o sistematizada, y la declaración voluntaria de casos se realiza a través del Sistema de Información Microbiológica (SIM). El SIM no refleja la realidad por haber una subdeclaración importante: por ejemplo, los 212 casos declarados en Gipuzkoa en 2012 constituyen el 21% de los 1.033 declarados al SIM en toda España^(63,64), siendo su población tan solo el 1,5%⁽⁶⁵⁾. Además, con el número de casos declarados se estimaría una incidencia de 2,2/100.000 habitantes en España, siendo la incidencia real estimada en Gipuzkoa al menos diez veces mayor (ver Resultados apartado 5.2.2).

Por otra parte, hay varios estudios en España efectuados en poblaciones de riesgo (consultas de ITS) y/o en pacientes sintomáticos, que reflejan la importancia de *C. trachomatis* como agente causante de ITS en España, aunque con diferentes resultados⁽⁶⁶⁻⁷⁶⁾. Al analizar estos resultados, hay que tener en cuenta que las diferencias pueden deberse a los distintos periodos de estudio, técnicas diagnósticas empleadas, formas de selección de la muestra (casos sintomáticos y/o población de riesgo) y edad de la población analizada (en algunos de estos estudios no se especifica la edad de la población estudiada y en otros la edad media es unos 10 años superior a la esperada de mayor incidencia). En un estudio realizado en Asturias en población de riesgo, se constató un descenso continuado en los casos de infección por *C. trachomatis* desde el año 1986 (16,2%) hasta el 2000 (4,7%) a pesar de emplearse en el primer periodo como método de diagnóstico el cultivo y en el último TAAN, reflejando probablemente un descenso real⁽⁷¹⁾. Entre los trabajos que emplean TAAN como método de detección, a partir del año 2000 entre el 0,75 y 6% de los casos analizados fueron positivos^(70,72,74,75), siendo las cifras mayores en inmigrantes y jóvenes^(70,75).

Introducción

En datos no publicados de nuestro laboratorio, entre 1985 y 2005, empleando la inmunofluorescencia directa con Ac monoclonales como técnica diagnóstica, se observó asimismo un descenso continuado del número de casos hasta el año 2000, probablemente en relación a la intensificación en las medidas preventivas para controlar la transmisión del VIH que también repercutió en otras ITS, produciéndose desde 2001 un incremento de la demanda diagnóstica antes de la utilización de TAAN a partir de 2006 (figura 7).

Figura 7. Número de muestras procesadas y muestras positivas a *C. trachomatis* mediante inmunofluorescencia en el Servicio de Microbiología del HUD (1985-2005).



Pero los estudios anteriores no permiten efectuar estimaciones sobre la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en la población general española, que hasta el momento es prácticamente desconocida. En un trabajo de base poblacional realizado en mujeres sexualmente activas no gestantes de 15-44 años residentes en el área metropolitana de Barcelona, para determinar la prevalencia de papilomavirus en muestras de cérvix previamente congeladas, se empleó el ADN sobrante para analizar la presencia de *C.*

trachomatis y *N. gonorrhoeae* utilizando técnicas moleculares ⁽⁷⁷⁾. Se analizaron muestras obtenidas entre octubre de 1998 y junio de 2000 de 484 mujeres (157 de 15-24 años y 327 de 25-44 años). Solo se detectó un caso positivo a *C. trachomatis* en el grupo de 15-24 años, obteniéndose una prevalencia global del 0,2%. Esta cifra tan baja en comparación con lo descrito en otros trabajos podría deberse a alguna limitación por la manipulación de las muestras, a que la muestra no sea representativa de la población, o a que el estudio se realizó en una época en la que la circulación de *C. trachomatis* era escasa. En otro estudio, entre noviembre de 2010 y diciembre de 2011 se analizaron mediante TAAN muestras de orina de 487 jóvenes de 15-24 años de una zona rural de Asturias ⁽⁷⁸⁾. La prevalencia global fue 4,1% (4,0% en mujeres y 4,3% en hombres), siendo mayor en el grupo de 20-24 años (4,7%: 4,8% en mujeres y 4,5% en hombres) que en el de 15-19 (3,0%: 2,3% en mujeres y 3,9% en hombres).

Por lo tanto, son necesarios más estudios y más amplios de la prevalencia real en la población general que detallen convenientemente los resultados por sexo y edad, para que su análisis riguroso permita decidir las medidas preventivas más convenientes para cada grupo en cada área geográfica y en cada momento.

1.4. Clínica, etiopatogenia y secuelas

1.4.1. Historia natural y expresión clínica de la infección

La principal diana de *C. trachomatis* son las células epiteliales columnares, particularmente en cérvix y uretra, así como en el recto, faringe y conjuntiva; en mujeres adultas, el epitelio escamoso de la vagina es poco receptivo a la infección. El riesgo de transmisión de la infección tras un episodio de contacto sexual se ha estimado

Introducción

en un 10-20% ^(79,80); debido a la alta sensibilidad de las TAAN, es posible detectar ADN de *C. trachomatis* en espermatozoides obtenidos de una proporción de muestras del tracto genital femenino en mujeres pasivamente infectadas, siendo negativas a las dos semanas sin ser tratadas ^(81,82). La mayoría de las infecciones en mujeres comienzan en el endocervix y la principal manifestación clínica en infecciones sintomáticas es la cervicitis, a veces con uretritis, sangrado intermenstrual o postcoital y/o dispareunia; en hombres el síntoma principal es la uretritis. Los síntomas comienzan habitualmente 2 a 6 semanas después de la infección. La secreción vaginal está presente en el 50% de las mujeres y la secreción uretral en el 80% de los hombres; la secreción normalmente es mucosa y menos abundante y purulenta que en la infección por *N. gonorrhoeae*. En mujeres, disuria y polaquiuria son infrecuentes, pero en hombres pueden estar presentes hasta en un 50% de los casos, por lo que ante una piuria con urocultivo negativo en un individuo sexualmente activo es conveniente descartar una infección uretral por *C. trachomatis* ⁽⁸³⁾. En los hombres puede aparecer un dolor irradiado a epidídimo, y en mujeres con dolor hipogástrico se debe sospechar y descartar EIP. Dependiendo de las prácticas sexuales, pueden estar presentes otros síntomas locales (faríngeos, rectales). Sin un diagnóstico preciso y rápido, las infecciones no tratadas (sintomáticas o asintomáticas), pueden diseminarse entre la población sexualmente activa y ocasionar complicaciones y secuelas.

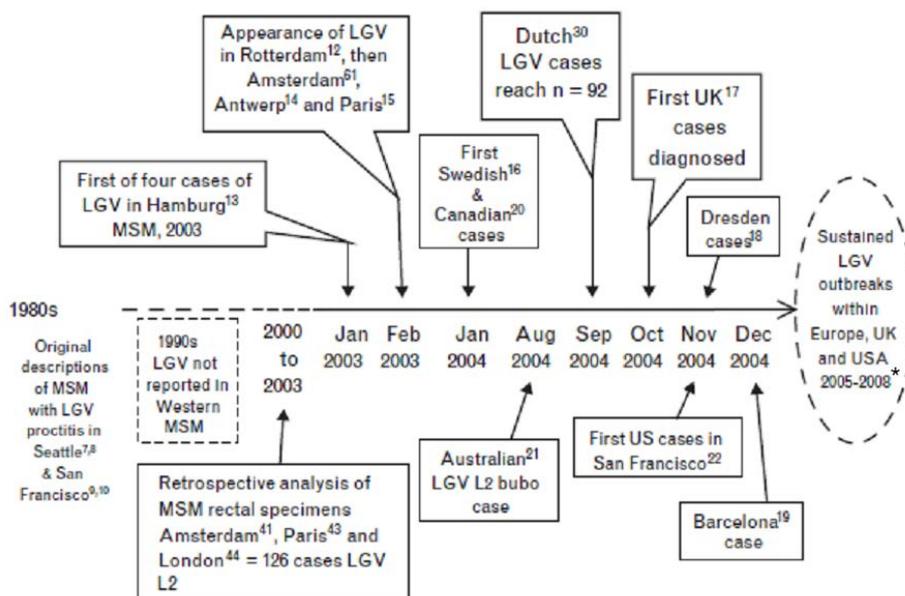
Tabla 5. Manifestaciones clínicas de la infección por *C. trachomatis*.

Genotipos	Clínica	Hombres	Mujeres
D-K	Asintomática	≈50%	≈70-80%
	Secreción	Uretral (80%)	Vaginitis, cervicitis (50%)
	Uretritis, cervicitis	Irritación distal y/o meato	Sangrado intermenstrual o postcoital, dispareunia
	Dolor	Irradiado a epidídimo	Abdominal hipogástrico, sospechar EIP
	Disuria, polaquiuria	50% (descartar uretritis en individuo sexualmente activo con piuria y urocultivo negativo)	Poco común
	Conjuntivitis	Por transmisión directa genital	
	Otros	Síntomas ano-rectales (dolor, tenesmo) en práctica de coito anal, síntomas faríngeos inespecíficos en práctica de sexo oral; infección diseminada: artritis...	
LGV I-III	Linfogranuloma Venéreo	Países tropicales y subtropicales	
	Uretritis, rectitis, proctitis	Brotos en HSH desde 2003	Escasos casos
A-C	Tracoma	Transmisión por contacto directo asociada a malas condiciones higiénicas, endémica en el África subsahariana	
	Infección genital	Universal, aunque poco frecuente	

El LGV es una ITS que invade los tejidos linfoides, es endémico de África, India, Sudamérica o el Caribe. El LGV “clásico” se caracteriza por un síndrome inflamatorio inespecífico (uretritis o cervicitis) que progresa hacia linfadenopatías inguinales. Hasta principios del siglo XXI, los casos detectados en Occidente se consideraban importados de estas regiones. Desde 2003 se ha expandido una nueva presentación de la enfermedad y descrito varios brotes fundamentalmente entre HSH en Europa y Norteamérica (figura 8) ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾. La característica en común en estos casos es la presencia de proctitis, y es considerada hoy en día un problema de Salud Pública, especialmente por la estrecha asociación entre el LGV y el VIH ⁽⁸⁷⁾.

Introducción

Figura 8. Cronograma de casos de infección por linfogranuloma venéreo en hombres que tienen sexo con hombres publicados desde 1981 (obtenido de White, Curr Opin Infect Dis 2009;22:57–66).



* Desde 2008 continúan describiéndose otros brotes; MSM: hombres que tienen sexo con hombres; LGV: linfogranuloma venéreo.

La infección por *C. trachomatis* al ascender por el tracto genital puede ocasionar graves consecuencias para la salud reproductiva. Además, las infecciones asintomáticas y/o no tratadas pueden persistir durante varios meses, pudiéndose aclarar espontáneamente como consecuencia de la respuesta inmune en torno a un 50% al cabo de un año⁽⁸⁸⁾ (promedio de duración estimado en un reciente trabajo de 1,3 años)⁽²⁷⁾, favoreciendo el desarrollo de la infección crónica y sus complicaciones. En el hombre puede ocasionar prostatitis, vesiculitis, epididimitis, epidídimo-orquitis y finalmente esterilidad. En la mujer este patógeno puede extenderse desde el endocérvix, posiblemente debido a la unión a espermatozoides o a mecanismos de transporte pasivo del tracto genital, causando endometritis, salpingitis o EIP, la cual puede conducir a secuelas en un 10-20% de las pacientes, principalmente infertilidad y embarazo ectópico⁽⁸⁹⁾. El riesgo de

EIP está aumentado en mujeres con infección por *C. trachomatis* sometidas a instrumentación uterina, lo que puede reactivar la bacteria o provocar su extensión ascendente ⁽⁹⁰⁾. Además, *C. trachomatis* puede causar ocasionalmente síndrome de Reiter (artritis reactiva asociada a HLA-B27, acompañada a veces de sintomatología ocular y/o dérmica) y síndrome de Fitz-Hugh-Curtis (perihepatitis post-peritonitis bacteriana ascendente). Otra complicación de la infección por *C. trachomatis* es su posible papel como co-factor carcinogénico en el desarrollo de neoplasias cervicales causadas por genotipos de papilomavirus humanos asociados con alto riesgo ⁽⁹¹⁾.

Durante la gestación, estas infecciones se han asociado con RPM, parto prematuro, bajo peso del recién nacido y aborto. Las mujeres pueden infectar al neonato a través del canal del parto, causando conjuntivitis, nasofaringitis y neumonía. La endometritis postparto también puede estar asociada con la infección por *C. trachomatis*.

Tabla 6. Posibles complicaciones de la infección por *C. trachomatis*.

MUJERES		HOMBRES
Eventualmente	En el embarazo	
EIP (10-20%)	Aborto	Epididimitis
Infertilidad (Tras EIP 15-25%)	Ruptura prematura de membranas	Epidídimo-orquitis
Embarazo ectópico (Tras EIP, riesgo x 6-10)	Parto prematuro, bajo peso al nacer	Artritis reactiva
Artritis reactiva, enfermedad diseminada...	Transmisión vertical: conjuntivitis, neumonía...	Enfermedad diseminada

EIP: enfermedad inflamatoria pélvica.

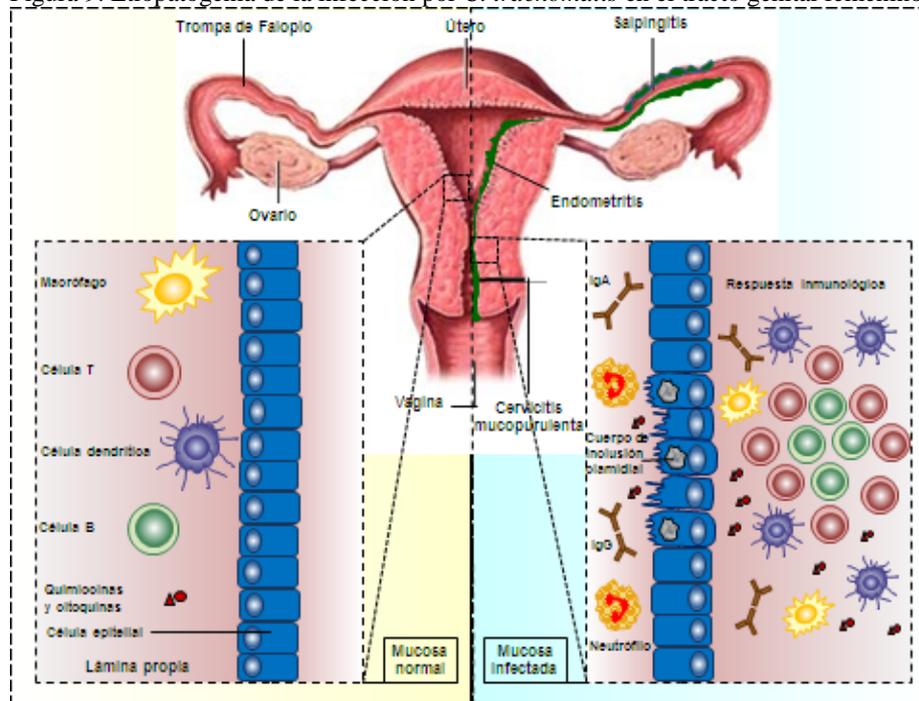
1.4.2. Mecanismos etiopatogénicos

El conocimiento de la etiopatogénesis y los mecanismos de interacción entre los microorganismos y sus huéspedes es importante para adoptar las estrategias más apropiadas de prevención y control, y ayudará en el desarrollo de futuras vacunas.

Introducción

Paradójicamente, en algunos pacientes, los mecanismos de defensa frente a la infección por *C. trachomatis* – principalmente las respuestas inflamatoria e inmune adaptativa – podrían ser perjudiciales para los tejidos (figura 9). Las lesiones tisulares responsables de las secuelas podrían deberse a un mecanismo inmunopatológico más que a la acción directa de la bacteria.

Figura 9. Etiopatogenia de la infección por *C. trachomatis* en el tracto genital femenino.



Las células epiteliales constituyen la primera barrera de defensa frente a la infección por *C. trachomatis*. Cuando son infectadas, estas células segregan quimiocinas y citoquinas que estimulan la respuesta celular inflamatoria (leucocitos, células natural-killer, células dendríticas...). La liberación continuada de algunas de estas citoquinas (interleuquina [IL]-1, IL-8...), especialmente durante infecciones crónicas o repetidas, pueden causar daño tisular directo y cicatrización ^(92,93).

Además, poco después de la infección por *C. trachomatis*, se produce una respuesta inmune celular mediada fundamentalmente por células T CD4⁺ con producción de citoquinas tipo Th1, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferón (INF)- γ , que inhibe la replicación intracelular de chlamydia ⁽⁹⁴⁾. Si la infección no se erradica y persiste, o en infecciones repetidas, se puede producir una respuesta inmune adaptativa de células T frente a antígenos de *C. trachomatis*, que podría contribuir colateralmente al desarrollo de secuelas inflamatorias mediante mecanismos de hipersensibilidad retardada o autoinmune aún no bien conocidos ⁽⁹²⁾. En modelos animales experimentales, en infecciones repetidas, el aumento de la respuesta inflamatoria puede ser mediada por células T citotóxicas CD8⁺ inducidas por la proteína clamidial de choque térmico 60 (cHSP60), produciendo una destrucción y fibrosis tisular mayor que en la infección inicial, incrementándose este riesgo con cada reinfección adicional ^(95,96). Los anticuerpos IgA e IgG séricos de la mucosa genital frente a proteínas específicas de *C. trachomatis* como cHSP y frente a los cuerpos elementales de *Chlamydia* son habitualmente detectados durante la infección activa en mujeres ⁽⁸⁸⁾, pero su papel exacto en la resolución de la infección aún no está claro.

Estudios realizados *in vitro* han revelado que el peculiar ciclo metabólico de *C. trachomatis* puede ser alterado por el INF- γ y otros inductores. En un ciclo normal, los cuerpos elementales (extracelulares, metabólicamente inactivos) infectan las células, donde se diferencian en cuerpos reticulados (no infecciosos, pero metabólicamente activos) que se multiplican por fisión binaria dentro de las vacuolas. A su vez, estos cuerpos reticulados evolucionan transformándose de nuevo en cuerpos elementales que son eliminados al medio extracelular. En el ciclo alterado, se encuentran cuerpos reticulados morfológicamente alargados, aberrantes y no divisibles en un estado viable pero no cultivable ⁽⁹⁷⁾. Este mecanismo puede contribuir a la persistencia de la infección

Introducción

por *C. trachomatis* en humanos, eludiendo al sistema inmune e induciendo una respuesta inmunopatogénica. Sin embargo, la cuestión de si estos cuerpos reticulares alterados aparecen *in vivo* y están involucrados en el desarrollo de secuelas aún está por determinar.

Otros factores determinantes en el desarrollo de EIP y secuelas pueden ser la duración natural de la infección por *C. trachomatis* no tratada en el huésped y el número de infecciones adquiridas. Aproximadamente la mitad de las infecciones se resuelven espontáneamente en el primer año tras el diagnóstico inicial, pero en algunas mujeres las infecciones pueden persistir varios años. La duración de la infección y la carga bacteriana en infecciones repetidas parece ser menor que en la primera infección, sugiriendo la existencia de cierto grado de inmunidad parcial ⁽⁸⁸⁾. Sin embargo, las infecciones repetidas son frecuentes y están asociadas con un mayor riesgo de EIP y secuelas ⁽⁹⁸⁾. Cuanto antes se detecta una infección, menor oportunidad tiene el microorganismo para ascender el tracto genital y menor es el tiempo de acción de los mecanismos inmunopatológicos involucrados en el desarrollo de secuelas.

Solo una minoría de los individuos infectados desarrolla alteraciones reproductivas, debido a diferencias en numerosos factores como el tipo de células dendríticas, expresión de moléculas co-estimuladoras, el patrón de secreción de citoquinas y los niveles de hormonas ⁽⁹⁹⁾. Por lo tanto, puede haber una mayor predisposición genética ligada a la expresión de receptores celulares específicos de *C. trachomatis*, así como mecanismos diferenciados en la respuesta inmunológica (HLA variantes clase I y II y polimorfismos funcionales en citoquinas) que determinan el resultado de la infección en el huésped y sus potenciales consecuencias ^(100,101).

Aunque el gen *ompA* de *C. trachomatis* evoluciona más rápidamente que el genoma restante, y su producto (MOMP) está expuesto en la superficie de los cuerpos elementales, no hay evidencia de que ninguna variedad genotípica de *C. trachomatis* (serovariedades MOMP) tenga una mayor capacidad que otras variantes de diseminarse o eludir la respuesta inmune y producir mayor gravedad clínica ^(102,103). Actualmente están siendo estudiados los posibles papeles de otros biomarcadores de *C. trachomatis*, como la familia polimórfica de proteínas autotransportadoras de membrana externa ⁽¹⁰⁴⁾, los efectores del sistema secretor tipo III ⁽¹⁰⁵⁾, la putative large cytotoxin (gran citotoxina putativa) ⁽¹⁰⁶⁾, y otros antígenos que podrían permitir diferenciar entre una infección no complicada del tracto genital inferior y la patología del tracto genital superior ⁽¹⁰⁷⁾. Estos biomarcadores podrían ayudar a identificar cepas variantes con distintas características patogénicas. Son necesarios nuevos estudios que analicen el comportamiento fenotípico de este microorganismo, junto con las características clínicas y epidemiológicas de la población estudiada. Además, los nuevos estudios deberían tratar de obtener un mayor conocimiento sobre la epidemiología molecular de las cepas involucradas mediante técnicas que permitan una alta discriminación genotípica, como el secuenciotipado MLST (multilocus sequence typing), el número variable de repetición en tándem VNTR (variable number tandem repeat)...

1.4.3. Complicaciones y secuelas de la infección en la mujer

1.4.3.1. Enfermedad inflamatoria pélvica

La EIP incluye varios trastornos del tracto genital femenino, como endometritis, salpingitis, absceso tubo-ovárico y peritonitis pélvica. Para que se produzca una EIP, *C.*

Introducción

trachomatis, *N. gonorrhoeae*, u otro microorganismo debe extenderse en sentido ascendente desde el tracto genital inferior, infectando y causando inflamación del útero, las trompas de Falopio y los ovarios. La infección genital por *C. trachomatis* es la causa más frecuente de EIP, y estudios en mujeres con EIP probada laparoscópicamente han descrito una prevalencia del 10-60% ⁽¹⁰⁸⁾. Sin embargo, el riesgo de desarrollar EIP entre mujeres infectadas por *C. trachomatis* no es bien conocido, ya que se han realizado pocos estudios prospectivos y el número de casos incluidos ha sido generalmente pequeño ^(109,27). Además, los datos pueden variar dependiendo de la técnica de detección empleada, de si la población analizada era inicialmente sintomática, asintomática o ambas, del período de seguimiento, etc. ⁽¹¹⁰⁾. A pesar de estas limitaciones, el riesgo parece ser alto: los resultados de un ensayo clínico aleatorizado realizado en Gran Bretaña que incluyó 75 mujeres con infección asintomática por *C. trachomatis* no tratada, encontró que un 9,5% (95% IC 4,7%-18,3%) desarrolló EIP a lo largo de un año ⁽⁴⁹⁾. Los recientes datos obtenidos del Programa de Cribado Nacional de Chlamydia en Inglaterra estiman un 20% (95%IC 6%-38%) de casos de EIP en mujeres de 16-44 años atribuibles a infección por *C. trachomatis* ⁽²⁷⁾; este mismo estudio estima que un 15-17% de las infecciones progresan a una EIP. Aunque los datos actuales son limitados, el riesgo de desarrollar EIP parece ser mayor en las primeras semanas de la infección y el retraso en su diagnóstico puede empeorar sus consecuencias ^(98,111).

La principal manifestación clínica de la EIP es el dolor abdominal. Sin embargo, sobre todo inicialmente, una EIP puede cursar con síntomas inespecíficos como secreción anormal, sangrado intermenstrual o postcoital, fiebre, polaquiuria, dolor hipogástrico, náusea/vómitos, etc., y pueden ser necesarias varias consultas para alcanzar un

diagnóstico ⁽¹¹¹⁾. Después de una EIP – que puede ser sintomática o subclínica – pueden aparecer secuelas ginecológicas y reproductivas, como infertilidad (15-20%), embarazo ectópico (riesgo 6-10 veces superior) y dolor pélvico crónico, como resultado de alteraciones en los cilios que revisten las trompas de Falopio, destrucción de células ciliadas, oclusión tubárica, cicatrices o formación de adherencias entre los órganos pélvicos (figura 10). Sin embargo, el riesgo de desarrollar secuelas tras una EIP causada por *C. trachomatis* y la causada por otras etiologías parece ser similar ⁽⁹⁸⁾. Estudios genéticos sobre factores inmunopatogénicos individuales han sugerido que el polimorfismo de un único nucleótido en el inflammasoma NLRP3 está relacionado con la gravedad de la infección por *C. trachomatis* ⁽¹¹²⁾.

Figura 10. Alteraciones en las células epiteliales de las trompas de Falopio tras una enfermedad inflamatoria pélvica (obtenido de Brunham et al., N Engl J Med 2015;372(21):2039-40).

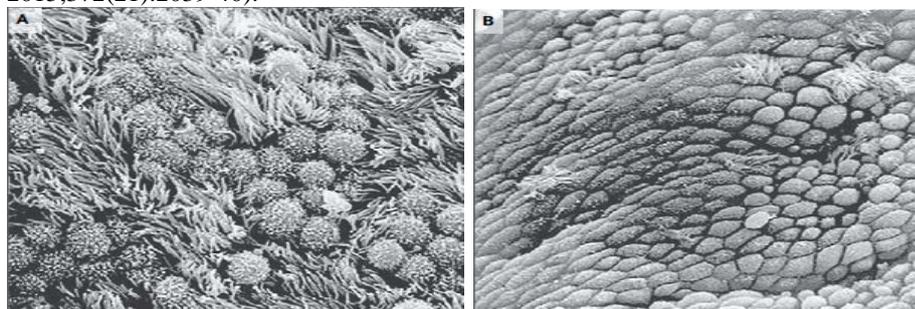


Imagen de microscopía electrónica que muestra células epiteliales de trompas de Falopio humanas normales (A) y tras una EIP (B) causando una pérdida selectiva de células epiteliales ciliadas que interfiere con el transporte intratubárico del óvulo ocasionando infertilidad o embarazo ectópico.

Aproximadamente un 60% de las EIP ocurren en mujeres mayores de 25 años ⁽²⁷⁾.

Aunque el cribado y tratamiento de la infección por *Chlamydia* pueden reducir durante un año el riesgo de desarrollar una EIP un 30-50% ^(49,111,113), como se revisará en el apartado de prevención, algunos autores han cuestionado la costo-eficacia del cribado en la prevención de secuelas.

1.4.3.2. Infertilidad tubárica

Se estima que un 5-15% de mujeres en edad reproductiva son infértiles, representando un importante problema para más de 70 millones de parejas en el mundo ⁽¹¹⁴⁾. Según la OMS, el daño en las trompas de Falopio tras la infección por *C. trachomatis* puede causar un 30–40% de los casos de infertilidad femenina ⁽¹¹⁵⁾, siendo la EIP la causa más común.

Múltiples mecanismos pueden contribuir en el desarrollo de esta severa repercusión de la infección por *C. trachomatis*. Estudios en el modelo murino han demostrado que las células intersticiales de Cajal (CIC), que forman una densa red asociada con las células musculares lisas del oviducto, son la fuente de la actividad eléctrica marcapasos responsable de la motilidad del oviducto y del transporte del huevo, y que estas células son dañadas por la respuesta inflamatoria liberada por la infección por *Chlamydia*. La destrucción de las redes de CIC del oviducto podría contribuir a la estasis y pseudo-obstrucción del oviducto, bloqueo funcional del transporte del oocito y retención de secreciones, que podría progresar a fibrosis, oclusión tubárica y finalmente infertilidad ⁽¹¹⁶⁾. El hidrosalpinx, un resultado de la obstrucción tubárica, está presente en alrededor de un 30% de mujeres con infertilidad tubárica, y el líquido puede refluir en la cavidad uterina, inhibiendo la implantación de embriones en el endometrio. Además, un canal transmembrana de cloruro activado por AMP (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [CFTR]), que regula electrolitos epiteliales y la secreción de fluidos y cuya expresión está elevada en el tracto reproductor de mujeres infectadas por *C. trachomatis*, ha sido implicado en la patogénesis de la formación de hidrosalpinx ⁽¹¹⁷⁾. Por otra parte, la expresión de CFTR tiene otro efecto sobre la fertilidad en el útero, dado que esta molécula juega un papel en la regulación del balance entre el

volumen líquido en la membrana mucosa endometrial durante el ciclo reproductivo ovárico, que está involucrado en la implantación del blastocisto. En el modelo murino, la sobreexpresión de CFTR inducida por la liberación de citoquinas durante la infección por *C. trachomatis* conlleva una acumulación anormal de fluido en el útero y a una reducida tasa de implantación ⁽¹¹⁸⁾.

Además, variaciones genéticas individuales pueden jugar un importante papel en la respuesta inmune a *C. trachomatis* y en la patogénesis de complicaciones y secuelas. Más específicamente, polimorfismos funcionales en genes específicos de citoquinas y otros componentes de la respuesta inmune y proinflamatoria del huésped (IL-10, IL-12, TNF- α , NRLP3...) están implicados en la regulación de la respuesta inmune y contribuyen a las distintas manifestaciones de la enfermedad y sus consecuencias ⁽⁹¹⁾. Por último, la similitud compartida entre la secuencia de las proteínas cHSP60 de *Chlamydia* y HSP60 humana (48,5%) ha sido tradicionalmente considerada responsable de causar reactividad cruzada y consecuentemente autoinmunidad, que podría jugar un papel en la patogénesis de la infertilidad tubárica. Sin embargo, la infertilidad tubárica ha sido recientemente asociada con anticuerpos frente a la proteína cHSP60, pero no frente a la HSP60 humana, indicando hacia una inflamación infecciosa en lugar de autoinmune y sugiriendo la detección de anticuerpos como suplemento en el diagnóstico de la infertilidad tubárica ⁽¹¹⁹⁾.

1.4.3.3. Embarazo ectópico

Aproximadamente 1-2% de los embarazos son ectópicos, y 97-98% se dan en las trompas de Falopio, representando la principal causa de muerte materna en el primer trimestre de gestación ⁽¹²⁰⁾. El riesgo de embarazo ectópico es mayor en mujeres con

Introducción

daño en las trompas de Falopio debido a infecciones pélvicas principalmente por *C. trachomatis* (aproximadamente un 5%)⁽²⁷⁾ o cirugía pélvica, embarazo ectópico previo, hábito tabáquico y fertilización *in vitro*. Por ello, la mayoría de los mecanismos etiopatogénicos de la infertilidad tubárica anteriormente citados pueden también causar un embarazo ectópico.

El embarazo ectópico tubárico está causado por una combinación de factores que permiten la retención del embrión en la trompa de Falopio debido a limitaciones en el transporte tubárico y/o alteraciones en el entorno que favorecen la implantación temprana del huevo. Las trompas de Falopio en mujeres con embarazos ectópicos muestran una expresión alterada de receptores proquinetina (PROKRs), una molécula involucrada en el control de la contractilidad del músculo liso. Mediante la unión del receptor tubárico Toll-like 2 y la activación del Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa NFκB (nuclear factor kappa-light-chain enhancer de células B activadas), la infección por *C. trachomatis* ocasiona un incremento de PROKR2 tubárico, predisponiendo probablemente el microambiente tubárico a una implantación ectópica⁽¹²¹⁾. Además, se ha observado un aumento en la expresión de activinas y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) dentro de las trompas de Falopio humanas de pacientes con embarazos ectópicos y anticuerpos frente a *C. trachomatis*, sugiriendo que estas proteínas pueden estar implicadas en la respuesta inmune desencadenada por el microorganismo que contribuye al daño tubárico y al embarazo ectópico⁽¹²²⁾. La producción de óxido nítrico se considera parte de la respuesta inmune innata (siendo bactericida para patógenos intracelulares como *C. trachomatis*), pero infecciones crónicas por *Chlamydia* pueden ocasionar un exceso de óxido nítrico derivado de la iNOS, dañando las células epiteliales tubáricas y provocando posiblemente un embarazo

ectópico ⁽¹²³⁾. Por último, la molécula elafina, que se encuentra en varias membranas mucosas humanas como las del tracto genital femenino, tiene propiedades anti-proteasa, anti-microbiana, anti-inflamatoria y de defensa inmune innata, y su expresión está aumentada en las trompas de Falopio de mujeres con embarazo ectópico. La elafina también está regulada positivamente en un modelo *in-vitro* en respuesta a la infección por *C. trachomatis* ⁽¹²⁴⁾.

1.4.3.4. Complicaciones gestacionales

La infección por *C. trachomatis* durante la gestación ha sido asociada con complicaciones como la RPM, parto prematuro, bajo peso del recién nacido y aborto. Sin embargo, los resultados de estudios sobre este tema han sido a menudo distintos e incluso contradictorios. Muchas de estas publicaciones han incluido un pequeño número de mujeres y empleado métodos serológicos inapropiados para distinguir entre una infección actual y una pasada.

Dos amplios estudios poblacionales (alrededor de 4.000 mujeres cada uno) han arrojado una nueva visión del papel potencial de *C. trachomatis* en este contexto. Un estudio poblacional retrospectivo de cohortes realizado en el Estado de Washington (USA) utilizando datos de certificados de nacimiento encontró que las mujeres infectadas por *Chlamydia* tenían un mayor riesgo de parto prematuro y RPM que el grupo de control no infectado ⁽¹²⁵⁾. El parto prematuro (<37 semanas) ocurre en el 9,6% de todos los nacimientos en el mundo y puede deberse a múltiples factores, estando un 30% relacionados con la RPM ⁽¹²⁶⁾. El mecanismo mediante el cual *Chlamydia* causa la RPM no es bien conocido, pero podría estar producido por una inflamación coriódécidual y la corioamnionitis generada a través de algunos de los mecanismos etiopatogénicos

Introducción

anteriormente mencionados. Curiosamente, se ha descrito que ese riesgo decrece en pacientes tratados con éxito, ya que la frecuencia de RPM fue menor que en pacientes que fueron tratadas pero que tuvieron una infección por *Chlamydia* persistente o recurrente al final de la gestación; más aún, el riesgo no fue significativamente diferente del de aquellas mujeres en las que no se detectó *C. trachomatis* en la gestación⁽¹²⁷⁾. En el segundo estudio poblacional de cohortes, un análisis prospectivo y no intervencionista durante la gestación realizado en Holanda, la infección por *C. trachomatis* detectada con TAAN fue significativamente asociada con prematuridad antes de las 35 semanas de gestación, siendo este riesgo superior antes de las 32 semanas⁽¹²⁸⁾. De los partos antes de las 32 y 35 semanas de gestación, 14,9% y 7,4%, respectivamente, fueron asociados con infección por *C. trachomatis*, sugiriendo que *Chlamydia* contribuye más a la prematuridad temprana que a la tardía. En este estudio, la gestación fue más corta en mujeres positivas a *Chlamydia*. Ninguno de estos dos estudios poblacionales encontraron que el bajo peso al nacer (<2.500 g) o el pequeño tamaño para la edad gestacional del neonato, o el aborto estuvieran asociados con la infección materna por *C. trachomatis*. Finalmente, en un reciente estudio retrospectivo multicéntrico realizado durante 2012 en China con alrededor de 14.000 casos de RPM y 94.000 controles se observó una mayor incidencia de infección por *C. trachomatis* en el grupo de casos (6,91% vs. 0,73% respectivamente, $p < 0,001$)⁽¹²⁹⁾.

Dos estudios en Polonia y Suiza encontraron que la prevalencia de *C. trachomatis* detectada por TAAN y serología fue mayor en mujeres que abortaron que en otras gestantes, sugiriendo que la infección por *Chlamydia* puede causar aborto espontáneo^(130,131). Otro reciente estudio realizado a finales de 2012 con TAAN en Irán en 109 casos de aborto espontáneo y 109 controles macheados por edad, edad gestacional y

número de gestaciones, encontró un 22,9% de casos con infección con *C. trachomatis* en el grupo con aborto frente a un 11,9% en el grupo control ($p=0,031$)⁽¹³²⁾. Sin embargo, faltan más estudios diseñados para analizar el posible papel de *C. trachomatis* en el aborto y este asunto continúa siendo controvertido. Finalmente, la endometritis postparto es una complicación común en mujeres infectadas por *C. trachomatis*.

1.4.3.5. Neoplasia cervical

La neoplasia cervical es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en el mundo, siendo la principal causa la infección persistente con papilomavirus humano (PVH) de alto riesgo. Sin embargo, solo una pequeña proporción de infecciones por PVH son persistentes y progresan a cáncer cervical, sugiriendo que determinados co-factores pueden también estar involucrados en su carcinogénesis. Algunos estudios seroepidemiológicos han asociado *C. trachomatis* con el desarrollo de carcinoma celular escamoso cervical, e incluso se ha sugerido que esta asociación podría ser mayor con serotipos específicos (G, I, D y B)^(133,134). Los resultados de dos grandes ensayos clínicos multinacionales (8.441 mujeres), que evaluaron la seguridad y eficacia de una vacuna frente al PVH, sugirieron que *C. trachomatis* es un co-factor independiente pero moderado para el desarrollo de neoplasia cervical. Además, *C. trachomatis* parece estar implicada solo en los estadios iniciales de la carcinogénesis cervical, ya que no se encontró ningún riesgo incrementado asociado con *C. trachomatis* para CIN-3⁽⁹⁵⁾.

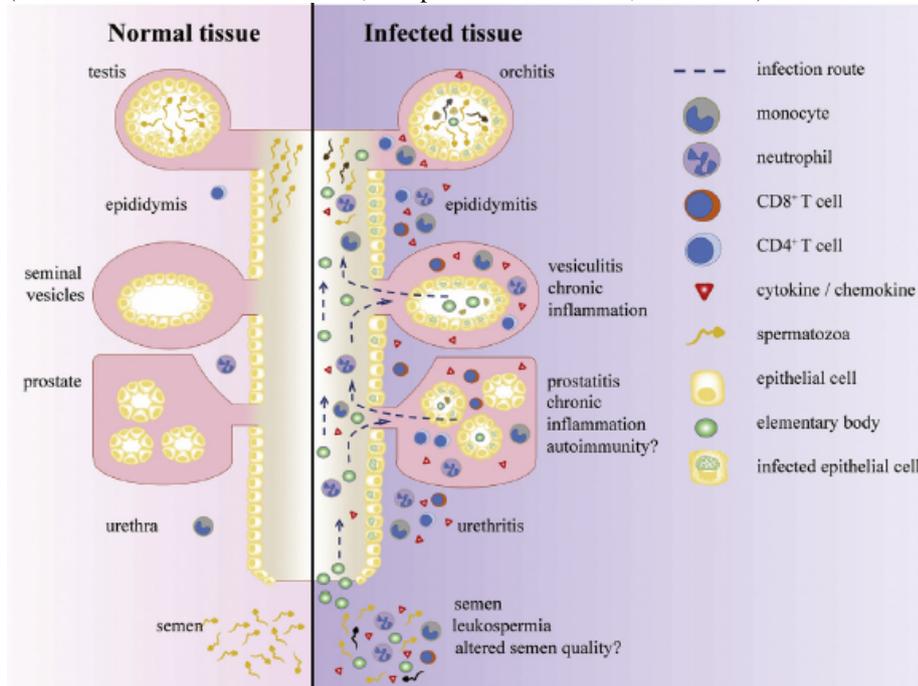
Los mecanismos causantes de esta asociación son desconocidos. *C. trachomatis* modula la respuesta inmune del huésped e inhibe la apoptosis, lo que podría favorecer la persistencia de células infectadas por PVH. Además, *C. trachomatis* induce inflamación y metaplasia cervical, favoreciendo el acceso y propagación de PVH, ya que las células

metaplásicas son potenciales dianas para PVH. La infección por *Chlamydia* puede aumentar el acceso del PVH al epitelio basal y aumenta la carga viral de PVH ⁽⁹¹⁾. Por eso, algunos autores argumentan que las asociaciones entre *C. trachomatis* y lesiones cervicales premalignas podrían ser causadas, en parte, por una susceptibilidad aumentada a la infección por PVH ⁽¹³⁵⁾. En cambio, una nueva evidencia molecular sugiere ahora que el factor de *Chlamydia* con actividad tipo proteasa induce amplificación del centrosoma, lo que ayudaría a explicar el papel de *Chlamydia* en la carcinogénesis cervical ⁽¹³⁶⁾.

1.4.4. Complicaciones y secuelas de la infección en el hombre

La infección por *C. trachomatis* desde la uretra puede ascender por el tracto genital masculino alcanzando la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los testículos. La infección en estos órganos puede ser sintomática (prostatitis, vesiculitis, epidídimo-orquitis) o asintomática y cronificarse (figura 11). Debido a la alteración que puede ocasionar en la calidad del espermatozoides, se ha propuesto como un posible factor de riesgo para la infertilidad masculina, la cual afecta a un 5% de los hombres y cuya causa se desconoce en el 55% de los casos ⁽¹³⁷⁾.

Figura 11. Reproducción de la infección del tracto genital masculino por *C. trachomatis* (obtenida de Mackern-Oberti et al, J Reprod Immunol 2013; 100: 37-53).



1.4.4.1. Prostatitis, vesiculitis y epidídimo-orquitis

C. trachomatis se une en las células epiteliales de la glándula prostática a receptores específicos (toll-like receptor) activando una respuesta inflamatoria e inmune. La inflamación producida por la infección en el tejido prostático puede alterar el funcionamiento de la glándula, cuyas secreciones suponen más del 60% del volumen seminal, siendo sus proteínas y componentes esenciales para la motilidad de los espermatozoides y la fertilización. *C. trachomatis* ha sido detectada en un 8,3-27% de pacientes con prostatitis crónica y/o síndrome de dolor pélvico crónico ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾. La infección puede persistir de forma crónica evitando la respuesta inmune del huésped y favoreciendo la continua transmisión de la infección ⁽¹⁴¹⁾.

Introducción

C. trachomatis ha sido descrita como el patógeno más frecuentemente detectado en el fluido de la vesícula seminal ⁽¹⁴²⁾. La infección puede ocasionar una dilatación en la vesícula seminal y una epididimitis ipsilateral a veces dolorosa que desaparece tras el tratamiento antibiótico.

1.4.4.2. Calidad del esperma y esterilidad

La asociación entre la infección por *C. trachomatis* y la baja calidad del esperma ha sido estudiada por diversos trabajos con resultados contradictorios que hasta el momento no permiten establecer una clara relación. Algunos detectan un descenso en la concentración y motilidad de los espermatozoides, así como una alteración en el pH y una disminución en el volumen del semen ^(143,144). Y existen estudios in vitro que han demostrado la capacidad de *C. trachomatis* para interferir en la función de las células del esperma induciendo su apoptosis ⁽¹⁴⁵⁾. Sin embargo, otros estudios in vivo no corroboran tal asociación ^(146,147).

1.4.5. Complicaciones y secuelas de la infección en el recién nacido

C. trachomatis se puede transmitir verticalmente de una puérpera infectada al recién nacido a través del canal del parto. Las maniobras habituales (antibioterapia tópica conjuntival al recién nacido) para prevenir la transmisión vertical de *N. gonorrhoeae* no han demostrado la misma eficacia frente a *C. trachomatis* ⁽¹⁴⁸⁾. En los recién nacidos lo más frecuente es que la infección adquirida perinatalmente se localice en la nasofaringe y curse de modo asintomático y autolimitado, pero también puede manifestarse como conjuntivitis (frecuentemente asociada a infección nasofaríngea), y/o neumonía

neonatales. Esta transmisión podría evitarse con un adecuado control de la infección gestacional mediante cribados.

Existen pocos trabajos recientes empleando TAAN en la detección de *C. trachomatis* que hayan estudiado el porcentaje de recién nacidos infectados durante el parto a partir de sus madres y sus resultados son muy variables, oscilando entre el 24% y el 75%^(149,150). Estos estudios presentan importantes limitaciones entre las que destacan: incluir pocas parejas madre/hijo, no ser prospectivos, o estudiar subgrupos especiales como partos prematuros. Por tanto, en conjunto es difícil obtener conclusiones fiables de estos estudios y sus resultados deben valorarse con precaución.

1.4.5.1. Conjuntivitis neonatal

El riesgo de transmisión vertical de *C. trachomatis* que causa conjuntivitis neonatal se ha estimado entre el 20-50% y la enfermedad aparece habitualmente 5-12 días tras el parto⁽¹⁵¹⁾. Se considera la causa bacteriana más frecuente de conjuntivitis neonatal⁽¹⁵²⁾. Su diagnóstico etiológico es importante porque la sintomatología no se diferencia de la causada por otros microorganismos y los tratamientos habituales administrados pueden no ser eficaces frente a *C. trachomatis*. Por este motivo, es conveniente en las zonas donde no existan cribados gestacionales de infección por *C. trachomatis* tener en cuenta esta etiología en el diagnóstico diferencial de los casos de conjuntivitis neonatales que persistan tras 72 horas con tratamientos que no incluyan un macrólido.

1.4.5.2. Neumonía infantil

El riesgo de transmisión vertical de *C. trachomatis* en los casos de neumonía se ha estimado entre el 10-20%⁽¹⁵¹⁾. En algunos estudios se ha encontrado como una causa

Introducción

relativamente frecuente de infección respiratoria en el periodo infantil, fundamentalmente entre el primer y tercer mes de vida, que sin embargo es poco tenida en cuenta como sospecha etiológica en el diagnóstico diferencial ⁽¹⁵³⁾. La sintomatología puede ser variable y afebril, y la imagen radiológica mostrar una afectación pulmonar bilateral con infiltrados intersticiales difusos y alveolares parcheados.

1.5. Diagnóstico microbiológico

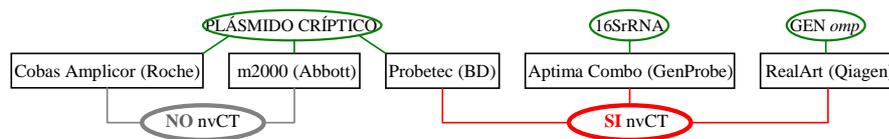
Se consideran muestras apropiadas para la detección de *C. trachomatis* los exudados uretrales y cervicales, así como los frotis vaginales y la orina. Dependiendo de los síntomas, también se pueden obtener exudados conjuntivales, faríngeos y rectales, así como otras muestras en casos específicos. Los exudados cervicales deben ser obtenidos por un ginecólogo. Los frotis vaginales pueden ser obtenidos por un médico o por la propia paciente mediante auto-tomas, sin que se hayan observado diferencias en la sensibilidad o especificidad ⁽¹⁵⁴⁾. Las muestras de orina deben proceder de la primera parte de la micción (10-30 primeros mL), sin haber orinado el paciente al menos en las dos horas previas. Las auto-tomas vaginales y la primera evacuación de orina son muestras bien aceptadas por las mujeres ⁽¹⁵⁵⁾, y pueden ser obtenidas en el propio domicilio y enviadas a los laboratorios, facilitando así estudios epidemiológicos y programas de cribado en mujeres asintomáticas. Además, las muestras de orina pueden ser combinadas en grupos o “pools” de muestras, aumentando así la costo-efectividad de los estudios, con escasa reducción en la sensibilidad ⁽⁴⁵⁾. Un amplio estudio alemán, empleando grupos o “pools” de 5 muestras de orina, obtuvo un valor predictivo negativo de 98,1% para este sistema de agrupado de muestras ⁽⁴⁸⁾.

Existe una amplia variedad de técnicas disponibles para la detección de *C. trachomatis*. El cultivo celular (células McCoy, HeLa, etc.), los métodos basados en la detección de antígenos (fluorescencia directa, inmunocromatografía, enzimoimmunoensayo), y las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos han sido ampliamente utilizadas en los laboratorios clínicos. Debido a su baja sensibilidad, todas estas técnicas están siendo sustituidas por TAAN, que aumentan la detección en un 20-40% y son las técnicas actualmente recomendadas. Sin embargo, las TAAN son caras y su introducción para la detección de *C. trachomatis* puede ser difícil en algunos laboratorios. La carga bacteriana de *Chlamydia* es menor en la orina que en los frotis vaginales y en éstos menor que en los exudados endocervicales ⁽¹⁵⁶⁾. Por eso, los frotis vaginales y la orina deberían ser solo analizadas mediante métodos de amplificación molecular. Estas distintas cargas de *Chlamydia* probablemente explican la menor sensibilidad encontrada por algunos autores al emplear orina de la primera evacuación en lugar de exudados vaginales o endocervicales ⁽⁴⁸⁾, aunque esta diferencia no ha sido encontrada en todos los estudios ⁽⁴⁴⁾. La introducción en los laboratorios de modernos equipos que automatizan la extracción de ácidos nucleicos ha mejorado la sensibilidad y robustez del proceso de extracción en relación a las técnicas que realizan una extracción manual ⁽¹⁵⁷⁾. Las TAAN más recientes emplean cebadores y sondas específicos que detectan dos fragmentos del plásmido críptico o un fragmento del plásmido críptico y otro fragmento del gen *ompA*. Estas nuevas TAAN permiten detectar variantes carentes del plásmido críptico o con deleciones en él como la nueva variante sueca de *C. trachomatis* (nvCT), detectada por primera vez en 2006 al observarse que en algunas regiones de Suecia la incidencia de casos de infección nuevos no guardaba relación con la detectada en otras regiones y que en ambos grupos las TAAN empleadas eran diferentes ⁽²⁸⁾. Al describirse una deleción de 377-pb en el plásmido críptico de esta nvCT se confirmó que en las

Introducción

regiones que empleaban TAAN con una diana en dicho fragmento se produjeron casos falsamente negativos al no ser detectados (Figura 12).

Figura 12. Dianas de las TAAN utilizadas en 2006 para la detección de *C. trachomatis*.



Para la detección de *C. trachomatis* han sido diseñadas numerosas pruebas denominadas comúnmente de “point-of-care”, basadas en métodos inmunológicos, que proporcionan un diagnóstico rápido. Pero actualmente la sensibilidad de estas pruebas se considera aun insuficiente (generalmente inferior al 50%), así como su especificidad, ya que la mayoría se basan en la detección del lipopolisacárido, que a menudo presenta reacción cruzada con el lipopolisacárido de bacterias gramnegativas, con posibilidad de resultados falsamente positivos ⁽¹⁵⁸⁾. Por este motivo, el desarrollo de pruebas de point-of-care que detecten *C. trachomatis* con suficiente sensibilidad (>90%) es actualmente una necesidad apremiante ⁽¹⁵⁹⁾. Recientemente, nuevas pruebas basadas en sistemas de amplificación de señal han mostrado una mayor sensibilidad, en torno al 80% ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶³⁾.

Los métodos serológicos no son útiles en el diagnóstico de la infección no complicada por *C. trachomatis*. El perfil de anticuerpos generado en la infección aguda y crónica no es bien conocido. Por otra parte, la respuesta serológica puede ser inconsistente o débil, ya que la infección se limita generalmente a la superficie de la mucosa. No obstante, la detección de anticuerpos se considera importante en mujeres con infertilidad tubárica, ya que la evidencia serológica de una infección previa está asociada con un riesgo

significativamente aumentado de mujeres que sufren infertilidad tubárica ⁽⁹⁰⁾. Del mismo modo, los métodos serológicos son útiles en estudios epidemiológicos ⁽¹⁶⁴⁾.

El tipado de *C. trachomatis* puede ser realizado mediante serotipado con anticuerpos monoclonales frente a la proteína MOMP o genotipado del gen *ompA*, mediante secuenciación o el análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) ⁽¹⁶⁵⁾. El genotipado mediante secuenciación es más fácil de implementar en laboratorios clínicos y puede ser realizado directamente de la muestra clínica, lo que explica su creciente uso. Esta técnica está permitiendo determinar la distribución mundial de los distintos genotipos, sus posibles peculiaridades geográficas y comparar su evolución temporal ⁽¹⁶⁶⁾. En los últimos años se están desarrollando otras técnicas como la “multi-locus sequence typing” (MLST), la “variable number tandem repeat” (VNTR), o la más reciente combinación de ambas “multi-locus VNTR análisis (MLVA) que aporta una mayor discriminación y diferenciación entre cepas permitiendo la monitorización de casos de reinfección tras el tratamiento y el análisis de la trazabilidad de contactos o de redes de contactos sexuales de riesgo ⁽¹⁶⁷⁾. Estas nuevas técnicas, aún laboriosas y costosas, al alcance de escasos laboratorios especializados, irán desarrollándose y contribuirán a mejorar la comprensión de la historia natural de la infección y las diferencias que se observan en las epidemiologías locales, facilitando el desarrollo de estudios clínico-epidemiológicos detallados y el diseño de vacunas.

Una consideración general en el diagnóstico de las ITS es que otros microorganismos que podrían causar una coinfección deberían ser siempre investigados. Consecuentemente, otras causas como *N. gonorrhoeae* y *Trichomonas vaginalis*, entre otras, deben ser excluidas. Además, se debe solicitar una muestra de suero para investigar una infección por VIH, virus hepatitis B y C y sífilis. Obviamente, esta práctica no se aplica en la mayoría de los programas de cribado.

1.6. Tratamiento

Además de un diagnóstico preciso y un tratamiento antibiótico adecuado, el manejo de la infección por *C. trachomatis* no complicada también requiere consejo y tratamiento de la(s) pareja(s) sexual(es), lo que disminuye la posibilidad de reinfección de la pareja original y la infección de otras posibles parejas, reduciendo así la transmisión dentro de la comunidad.

1.6.1. Susceptibilidad antimicrobiana

C. trachomatis es habitualmente susceptible a tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, amoxicilina, rifampicina y sulfonamidas, entre otros antibióticos. Con raras excepciones, como rifampicina, el género *Chlamydiae* no desarrolla fácilmente resistencias a antibióticos y, como estos microorganismos son bacterias intracelulares obligadas es improbable que adquieran genes de resistencia de otras bacterias mediante transmisión horizontal ⁽¹⁶⁸⁾. Aunque hay pocos estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana en *C. trachomatis*, las publicaciones de aislamientos en pacientes con cepas resistentes son escasas, y en la mayoría de ellas, esos aislamientos presentan características de resistencia heterotípica. Este tipo de resistencia fenotípica afecta solo a una pequeña parte (<1-10%) de la población bacteriana que es capaz de expresar la resistencia en algún momento, y que a menudo desaparece con la propagación de las bacterias ⁽¹⁶⁹⁾. Sin embargo, una resistencia heterotípica podría causar fallo de tratamiento en pacientes con una alta carga de *Chlamydia* ⁽¹⁷⁰⁾. Un reciente estudio europeo que incluía aislamientos de *C. trachomatis* de todas las serovariedades genitales (D a K, n=45) encontró que todas las cepas eran sensibles a los

antimicrobianos testados: levofloxacina, eritromicina, doxiciclina, claritromicina y azitromicina ⁽¹⁷¹⁾. No obstante, en India, se ha descrito una susceptibilidad antibiótica disminuida a azitromicina y doxiciclina en el 38% de las cepas aisladas en pacientes con infecciones recurrentes ⁽¹⁷²⁾. La conveniencia de monitorizar el desarrollo de resistencias en *C. trachomatis* se ve obstaculizada por la falta de pruebas estandarizadas de susceptibilidad antimicrobiana, que en la actualidad requieren cultivos celulares. Para poder detectar posibles resistencias antimicrobianas sin necesidad de realizar cultivo, se ha desarrollado alguna técnica molecular capaz de analizar la actividad antibiótica en el crecimiento y viabilidad de *C. trachomatis* mediante la cuantificación de su DNA y RNA, con resultados prometedores ⁽¹⁷³⁾.

1.6.2. Pautas de antibioticoterapia

Las pautas estándar de tratamiento para infecciones no complicadas del tracto genital inferior son una dosis de azitromicina o dos dosis diarias de doxiciclina durante 7 días (Tabla 7). Ambos regímenes han mostrado una eficacia superior al 95% en la cura microbiana de *C. trachomatis*, y aunque la pauta con doxiciclina puede ser algo más eficaz, su cumplimiento también es menor ^(174,175). En este sentido, se ha publicado que el tratamiento con doxiciclina durante 7 días en una pauta de 200 mg (una dosis/día) podría tener una eficacia y seguridad comparables a la pauta habitual de 100 mg/12 horas, pudiendo mejorar el cumplimiento del tratamiento ⁽¹⁷⁶⁾. Una dosis única de azitromicina debería ser el tratamiento de elección en personas que puedan no ser capaces de cumplir las pautas de tratamiento más largas. Otras alternativas son eritromicina, que está asociada con una mayor tasa de efectos adversos, y ofloxacina y levofloxacina, que son más caras. El tratamiento de pacientes infectados con VIH es

Introducción

similar. El tratamiento debe iniciarse cuanto antes, especialmente en pacientes con uretritis o cervicitis con secreción clara y/o más de 5 leucocitos por campo en la tinción de Gram, incluso si el diagnóstico etiológico aún no está disponible. En estos pacientes, el tratamiento empírico recomendado incluye una dosis oral de azitromicina y una dosis intramuscular de ceftriaxona para cubrir una posible infección o coinfección con *N. gonorrhoeae*. Tras iniciar el tratamiento, los pacientes deben abstenerse de mantener contactos sexuales durante 7 días.

Tabla 7. Pautas de tratamiento antibiótico recomendadas en infecciones por *C. trachomatis* (Workowski et al, MMWR 2010; 59(RR-12): 1-110).

Infección	Tratamiento antibiótico
Uretritis/cervicitis	Azitromicina 1 g vo 1 dosis Doxiciclina 100 mg/12h vo 7 días
Linfogranuloma venéreo	Doxiciclina 100 mg/12h vo 21 días
EIP	Cefoxitina 2 g/6h iv + doxiciclina 100 mg/12h vo Clindamicina 900 mg/8h iv + gentamicina 1,5 mg/kg/8h im/iv
Embarazo	Azitromicina 1 g vo 1 dosis Amoxicilina 500 mg/8h vo 7 días
Ophthalmia neonatorum	Eritromicina base o etilsuccinato 50 mg/kg/día (4 dosis) vo 14 días Azitromicina 20 mg/kg/día (1 dosis) vo 3 días
Neumonía infantil	Eritromicina base o etilsuccinato 50 mg/kg/día (4 dosis) vo 14 días Azitromicina 20 mg/kg/día (1 dosis) vo 3 días

Los test de cura no están rutinariamente recomendados si el tratamiento del caso índice ha sido adecuado, pero sí se recomiendan en gestantes y cuando existan dudas sobre el cumplimiento del tratamiento, sospechas de reinfección o persistencia de síntomas. Cuando se realice un test de cura, se deben emplear TAAN 3-5 semanas después de finalizar el tratamiento, ya que los ácidos nucleicos de *C. trachomatis* pueden persistir en las células hasta 3 semanas⁽¹⁴⁸⁾. Sin embargo, como la reinfección es frecuente en personas con infección previa por *C. trachomatis*⁽¹⁷⁷⁾, se recomienda un nuevo test de

control para detección de *C. trachomatis* aproximadamente 3 meses tras finalizar el tratamiento ⁽¹⁴⁸⁾.

En el embarazo, las tetraciclinas y las fluoroquinolonas están contraindicadas. Los antibióticos recomendados son azitromicina, amoxicilina y eritromicina y la primera elección actualmente es una dosis oral de 1 gramo de azitromicina. La eritromicina produce una mayor frecuencia de efectos adversos gastrointestinales, requiriendo la suspensión del tratamiento; además, en mujeres embarazadas, el aclaramiento hepático de este fármaco está incrementado, lo que podría reducir su concentración plasmática y aumentar así el riesgo de fracaso terapéutico ⁽⁹¹⁾. Debido a la menor eficacia de los antimicrobianos en el embarazo, junto a los posibles complicaciones de la infección en el curso de la gestación y la posibilidad de transmisión neonatal, se recomienda un test de cura 3-5 semanas tras la finalización del tratamiento, así como un análisis posterior a los 3 meses para excluir la reinfección. En embarazadas con factores de riesgo, como edad ≤ 25 años o aquellas con múltiples parejas sexuales o con una nueva pareja sexual, se debe realizar otra prueba de detección adicional en el tercer trimestre de gestación ⁽¹⁴⁸⁾.

Los tratamientos recomendados en otras situaciones se muestran en la tabla 7. La etiología de la EIP suele ser polimicrobiana, pero *C. trachomatis* es una de sus causas más frecuentes, por lo que en todos los casos debe estar cubierta en el tratamiento antimicrobiano, aunque su diagnóstico pueda ser complejo, especialmente en ausencia de muestras del tracto genital superior.

Por último, no está recomendada la profilaxis o el tratamiento específico en neonatos de madres con infección genital por *C. trachomatis* ⁽¹⁴⁸⁾. En estos neonatos se debe realizar un seguimiento clínico que permita realizar el diagnóstico microbiológico y el

tratamiento si desarrollan síntomas. El seguimiento debe prolongarse al menos un mes para conjuntivitis y tres para neumonías.

1.6.3. Control de contactos

Una parte fundamental del tratamiento es el control de contactos. Esta tarea puede ser ardua, pero resulta esencial advertir y aconsejar a los pacientes que informen a sus parejas sexuales y que éstas sean examinadas. Deben ser diagnosticadas y tratadas todas las parejas sexuales en los últimos 60 días previos al inicio de los síntomas del caso índice, o el último contacto si han pasado más de 60 días. Cuando se considere que la asistencia a las parejas sexuales va a ser poco probable, se puede optar por una práctica conocida como “terapia de pareja facilitada (expedited partner therapy)”, que consiste en proporcionar el tratamiento al paciente índice para que este se lo entregue/facilite a su pareja y que resulta más sencillo si se emplea azitromicina (una sola dosis oral). La falta del control de contactos es habitualmente la causa más frecuente de reinfección, y la terapia de pareja facilitada se ha mostrado útil en asegurar el tratamiento de la pareja entre los hombres y en reducir las infecciones de repetición entre las mujeres⁽¹⁷⁸⁾.

1.7. Prevención

Además de ser fácilmente tratable con antibióticos, la infección por *C. trachomatis* es prevenible. Debido a las crecientes tasas de incidencia de esta infección, el alto porcentaje de la población que puede tener una infección asintomática, y la gravedad de sus potenciales secuelas, se han desarrollado diferentes programas de control. En el

control de la infección por *C. trachomatis* existen cuatro niveles de intervención, como describe el ECDC ⁽¹⁷⁹⁾: A) prevención primaria: promoción e información sobre salud sexual; B) manejo de casos: pautas para el diagnóstico clínico y microbiológico, así como para el tratamiento del paciente, que incluye el control de contactos, y un sistema de declaración de casos; C) pruebas “oportunistas”: cribado en personas asintomáticas de grupos específicos considerados de riesgo para detectar casos nuevos, principalmente en jóvenes y/o aquellos con múltiples parejas sexuales cuando acuden a los servicios de salud por otros motivos; y D) cribado proactivo sistemático poblacional, dirigido a cubrir una parte sustancial de una población definida para reducir la prevalencia de la infección. Aunque la mayoría de los países europeos cumplen los dos primeros niveles, pocos tienen experiencia y conocimiento sobre el tercer y cuarto niveles. En este contexto, no se ha encontrado una asociación consistente entre los recursos económicos de un país y la intensidad de las medidas de control de *Chlamydia* ⁽¹⁸⁰⁾. En sus pautas, el ECDC reconocía en 2009 que no había suficiente información epidemiológica para la toma de decisiones y proponía como objetivo obtener datos suficientes para 2010-11. En febrero de 2014 el ECDC publicó una revisión bibliográfica con los datos obtenidos en esos años, sin obtener resultados claramente concluyentes ⁽¹¹⁰⁾.

El aumento en los últimos años en las tasas de incidencia de varias ITS como la infección por *C. trachomatis* pone de relieve la necesidad de mantener y, si es posible, intensificar la prevención primaria a través de la educación sanitaria y campañas de sexo seguro, como el uso correcto y consistente de preservativos. Las campañas de información son esenciales para aumentar la conciencia de las ITS no solo entre los jóvenes sino también entre sus padres e incluso los médicos involucrados en el tratamiento de estas infecciones ⁽¹⁸¹⁾, ya que el estigma comúnmente asociado con las ITS suele suponer un obstáculo para su manejo y para la adhesión a los programas de

Introducción

prevención. La prevención primaria de la infección por *C. trachomatis* mediante la vacunación aun no es factible. La compleja estructura antigénica de este patógeno y el todavía insuficiente conocimiento de los antígenos protectores de *C. trachomatis* involucrados en la respuesta inmune han supuesto hasta ahora una barrera para el desarrollo de vacunas eficaces.

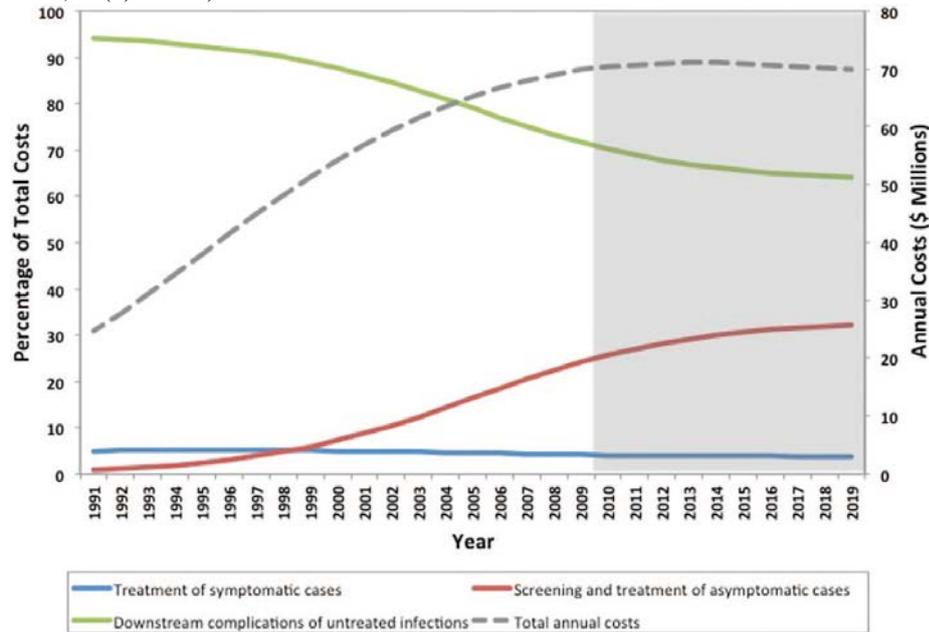
La prevención secundaria mediante el cribado oportunista o sistemático continúa siendo de momento la intervención más importante para limitar los efectos adversos de la infección por *C. trachomatis* en la salud reproductiva ⁽⁹¹⁾. Los CDC en EEUU recomiendan un cribado anual de *Chlamydia* en todas las mujeres sexualmente activas ≤ 25 años y en mayores de esa edad con factores de riesgo. También se recomienda el cribado de todas las mujeres embarazadas ⁽¹⁴⁸⁾. El cribado de *Chlamydia* en mujeres < 25 años ha sido descrito como uno de los servicios preventivos más beneficioso y costo-eficaces que se pueden ofrecer en la práctica médica ⁽¹⁸²⁾, y ha sido considerado como una medida preventiva con un grado de recomendación A (recomendación más fuerte) ⁽¹⁸³⁾. El cribado en hombres no ha demostrado ser costo-eficaz y, aunque esta práctica podría prevenir muchas infecciones en mujeres, su impacto en la carga de la enfermedad en mujeres mediante el análisis en hombres jóvenes o grupos específicos de riesgo es controvertido ^(184,185).

Las estrategias preventivas deben centrarse especialmente en los jóvenes, ya que las tasas de incidencia de infección son mucho más altas en este grupo poblacional y el incremento observado en la última década ha afectado principalmente a este grupo de edad, con escasa variación en otros grupos ^(38,186). Para cumplir con los objetivos de los programas de salud pública y poder reducir la transmisión entre la población, son esenciales tanto una amplia aceptación entre la población diana como una cobertura alta

y regular ⁽¹⁶⁴⁾. Desafortunadamente, las tasas de cobertura de los cribados no suelen superar el 60%, en parte debido al desconocimiento entre los jóvenes de la necesidad y beneficios del cribado y al estigma social asociado a las ITS ^(110,182,187). La tasa de respuesta ideal en estos programas de cribado debería alcanzar el 80%, siendo aceptables cifras >70% si tanto los participantes como los no participantes presentan similares características socio-demográficas ⁽¹⁸⁸⁾. Además de la cobertura de los cribados, para mejorar su eficacia es fundamental no solo que se traten los casos positivos sino que también se realice un adecuado control de sus contactos y un control a los 3 meses para detectar reinfecciones y cortar las cadenas de transmisión de la infección. Campañas de publicidad y estrategias como “analízate tú mismo (Get Yourself Tested)” (disponible en <http://www.gytnow.org>) pretenden mejorar estos resultados y evitar la formación de grupos de riesgo con altas tasas de reinfección, como mujeres adolescentes sexualmente activas o hombres jóvenes con historia previa de ITS ^(91,189-191). Las diferentes modalidades de cribado han contribuido al incremento en el número de casos detectados, sin que este incremento represente un aumento real en la incidencia, puesto que esencialmente revela infecciones asintomáticas no detectadas previamente. Por otra parte, recientes estudios con modelos matemáticos sugieren que el cribado reduce la prevalencia de la infección ^(185,192), si bien otros detectan un aumento en la prevalencia pero acompañado de una estabilización en los costes atribuidos a esta infección al aumentar los debidos al tratamiento inicial de los casos asintomáticos detectados y disminuir los debidos a sus consecuencias (Figura 13) ⁽¹⁹³⁾.

Introducción

Figura 13. Estimación de los costes anuales totales (eje derecho y línea discontinua) atribuidos al diagnóstico y tratamiento de la infección por *C. trachomatis* en Canadá y su evolución (sombreado previsión a diez años), teniendo en cuenta la influencia relativa (eje izquierdo y líneas continuas) tanto de los casos sintomáticos, como la de los asintomáticos detectados mediante cribado (obtenido de Tuite et al, Sex Transm Dis 2012; 39(4): 260-7).



Los cribados oportunistas persiguen detener la propagación de la infección y evitar sus secuelas mediante la detección de casos nuevos en grupos de riesgo infectados asintomáticamente. Los grupos diana más comunes suelen ser personas jóvenes sexualmente activas, especialmente aquellos con frecuentes cambios de pareja, mujeres embarazadas, mujeres que buscan la interrupción del embarazo, y las sometidas a instrumentación del útero. En varios países como EEUU, Canadá, Australia, Japón, Taiwan, Corea del Sur, Reino Unido, Bélgica, Luxemburgo, Dinamarca, Estonia, Islandia, Letonia, Lituania, Noruega y Suecia se han realizado puntualmente o están en marcha diferentes políticas y estrategias, en parte debido a diferencias en la

epidemiología local y la carga de enfermedad, aunque en algún caso no tienen carácter nacional y solo están implantados en determinadas regiones ^(89,110,180,185,194). Las mujeres suelen estar más dispuestas que los hombres a someterse a pruebas de diagnóstico para ITS. Por ejemplo, en Suecia, menos de un 30% de todas las personas analizadas para *Chlamydia* son hombres ⁽¹⁹⁵⁾. Desde 2003 en Estocolmo y actualmente en otros condados del país, existe un cribado oportunista llamado “Chlamydia Monday”, porque la campaña se realiza anualmente un lunes del mes de septiembre. Todos los años, el número de casos declarados por *Chlamydia* en Suecia es mayor en septiembre y octubre, ya que en verano aumentan las oportunidades de encontrar una nueva pareja sexual e infectarse. Durante la campaña, los medios de comunicación proporcionan información y promocionan el uso del condón para prevenir ITS, además de fomentar la realización de una prueba diagnóstica para *Chlamydia* con el objetivo de reclutar particularmente hombres jóvenes que suelen solicitar la prueba menos que las mujeres. “Chlamydia Monday” contribuye a concienciar a la opinión pública sobre la trascendencia de las ITS y resulta una intervención costo-eficaz para disminuir la prevalencia de *Chlamydia* y sus complicaciones en Suecia, alcanzando la prueba tanto a hombres (por encima del 40%) como a mujeres ⁽¹⁹⁶⁾.

En Europa solo dos países cuentan con un programa de cribado de *C. trachomatis* organizado, Inglaterra y los Países Bajos ^(27,197). En Inglaterra se ofrece anualmente y tras un cambio de pareja a hombres y mujeres menores de 25 años sexualmente activos que acuden a las consultas de Atención Primaria y otros servicios, alcanzando una escasa cobertura del 35% en mujeres y del 16% en hombres. En los Países Bajos se ofreció a la población de 16-29 años de edad utilizando internet y kits de auto-toma de muestras, y sus resultados (impacto sobre la prevalencia en la población, evaluación de la costo-eficacia) permitirán valorar la conveniencia de implementar un cribado

Introducción

nacional de *Chlamydia* y la estrategia más óptima. La cobertura de este cribado domiciliario también fue baja (<20%). En una encuesta realizada a las personas a las que se ofreció el cribado, entre los que participaron en el mismo el 63% respondió haberlo hecho por su salud ⁽¹⁹⁸⁾. Sin embargo, sigue siendo difícil aumentar la respuesta entre la apreciable proporción de no participantes, entre los que el 40% respondieron no haberlo hecho por no percibir riesgo de infección. Estrategias innovadoras como las usadas en este programa que conjuguen confidencialidad, sencillez y percepción de beneficio pueden incrementar la participación conseguida en los cribados oportunistas, lo que resulta esencial para asegurar una mayor efectividad de los mismos.

El conocimiento del impacto del cribado de *Chlamydia* en los individuos y en la salud pública es limitado ^(94,110,164). Es posible que los beneficios en la salud y la costo-eficacia obtenidos por los programas de cribado de *C. trachomatis* hayan sido sobreestimados, especialmente en aquellos estudios epidemiológicos que emplearon técnicas serológicas. El efecto de los cribados en la reducción del riesgo de desarrollar complicaciones y secuelas se ha analizado en algunos estudios que han llegado a distintas conclusiones, siendo difícil su comparación debido a sus respectivas y diferentes limitaciones (tipo y duración del estudio, grupos de edad analizados, causas multifactoriales de las secuelas...). En un amplio estudio de cohortes no aleatorizado en mujeres reclutas del ejército de EEUU no se encontraron diferencias en hospitalizaciones por EIP entre mujeres que participaron en el cribado y las que no lo hicieron ⁽¹⁹⁹⁾. Tampoco se encontraron diferencias en un estudio aleatorizado con seguimiento de 9 años en mujeres de 21-23 años realizado en Dinamarca que consideró como resultados las tasas de EIP y los riesgos a largo plazo de complicaciones reproductivas ⁽²⁰⁰⁾. Por el contrario, en dos ensayos aleatorizados comparando un grupo

de mujeres jóvenes con cribado de *Chlamydia* frente a un grupo control sin cribado, se observó una reducción del 50% de EIP durante el siguiente año ^(113,201). En otro ensayo aleatorizado se obtuvo limitada evidencia sugiriendo que el cribado de *Chlamydia* reduce las tasas de EIP: 10% de mujeres infectadas asintóticamente no tratadas desarrollaron EIP en un año, frente a 2% de las mujeres cribadas y tratadas ⁽⁴⁹⁾. Los datos procedentes del Programa Nacional de Cribado de *Chlamydia* en Inglaterra publicados recientemente estiman que el cribado anual a mujeres de 16-24 años puede prevenir el 61% de las EIP debidas a *C. trachomatis* y el 22% de todas las EIP en ese rango de edad ⁽²⁷⁾. Claramente, es preciso realizar nuevos estudios enfocados en valorar la efectividad de los cribados de *Chlamydia*.

El riesgo de complicaciones a largo plazo en la salud reproductiva (infertilidad, embarazo ectópico...) es bajo tras el tratamiento de un episodio aislado ^(91,202), pero como ya se ha comentado, el desarrollo de secuelas está influenciado por los cambios inmunopatológicos que se producen tras sucesivas reinfecciones y por la duración de la infección ⁽⁹⁴⁾. Por ello, actualmente se estima que la frecuencia óptima para realizar la prueba es al menos una vez al año o con cada cambio de pareja. En este sentido, un adecuado diagnóstico y tratamiento (prevención terciaria) permiten acortar la duración de la infección, debiendo incluir el control de los contactos sexuales para evitar la cadena de transmisión y las reinfecciones.

En países con una alta prevalencia de infección por *C. trachomatis*, el cribado en mujeres gestantes o puérperas aumenta el control de la infección al incluir una proporción sustancial de la población diana. Además, se ha encontrado evidencia de mejores resultados en la gestación y el parto de mujeres tratadas para *Chlamydia*, por lo que los CDC han recomendado realizar el cribado en todas las mujeres durante la primera consulta prenatal y repetirlo en el tercer trimestre en aquellas mujeres con

Introducción

mayor riesgo (casos positivos, ≤ 25 años y mujeres con una nueva o más de una pareja sexual)⁽¹⁸⁷⁾.

En resumen, la mayor parte de las infecciones por *Chlamydia* no son detectadas y por tanto no se previenen las complicaciones y secuelas a que pueden dar lugar. Es probable que en los próximos años, gracias a los conocimientos que se están generando, la mejora de los programas de cribado permitirá potenciar, además del beneficio individual, su impacto en la salud pública.

2. HIPÓTESIS

La infección por *C. trachomatis* supone un problema creciente de salud pública a nivel mundial, cuya epidemiología ha sido poco estudiada hasta el momento en el sur de Europa. La incidencia y prevalencia de la infección, excepto en ciertos grupos de riesgo, son desconocidas tanto en la población de nuestro entorno como en la española en general, así como en la de la mayor parte de los países mediterráneos. Sin embargo, su conocimiento es importante para valorar la necesidad de introducir medidas de prevención (ej. cribados oportunistas en los grupos de mayor riesgo, cribados poblacionales...), habiendo sido un objetivo del ECDC para los años 2010-11 insuficientemente alcanzado en su revisión del 2014.

En estudios realizados en algunos países europeos se ha estimado una prevalencia de infección por *C. trachomatis* entre 1,4-3,0% en la población general de 18-44 años, y de 2-6% en los menores de 30 años sexualmente activos, observándose las cifras más altas en mujeres menores de 25 años. Debido a los cambios en las costumbres y modos de vida que ha experimentado nuestra sociedad en las últimas décadas, especialmente entre los jóvenes, estimamos que la incidencia y prevalencia de la infección por *C. trachomatis* han aumentado. En concreto, *C. trachomatis* será actualmente el primer agente bacteriano responsable de ITS en nuestro medio (uretritis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica...). La prevalencia en los jóvenes de nuestro entorno será elevada y parecida a la que se ha comunicado recientemente en otros países europeos (>1%, y >5% en mujeres menores de 25 años), con tendencia creciente. Las gestantes que acuden a un hospital a dar a luz o por complicaciones de su embarazo, constituyen un grupo que representa homogéneamente una franja de edad de la población susceptible

Hipótesis

de adquirir ITS y fácil de controlar en el momento de su ingreso hospitalario. En este grupo la detección mediante TAAN de la infección por este microorganismo en orina, muestra sencilla de obtener, permitirá conocer su prevalencia por grupos de edad, siendo la información obtenida un reflejo de la circulación de *C. trachomatis* en la población joven sexualmente activa.

Por otra parte, aspectos de la epidemiología molecular de *C. trachomatis*, como la distribución de sus genotipos, son mal conocidos en España. El presente estudio, al disponer para análisis de un elevado número de muestras permitirá investigar la variedad de genotipos circulantes en nuestro medio, su evolución en el tiempo y su distribución en distintos grupos de la población, así como conocer la posible presencia de la nvCT.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es evaluar en Gipuzkoa entre los años 2006 y 2015 la prevalencia, incidencia e impacto de la infección por *Chlamydia trachomatis* en dos grupos de personas: mujeres sanas al término de su embarazo (puérperas) y enfermos con infecciones genitales, así como describir las características moleculares de sus cepas.

3.2. Objetivos principales

1. Analizar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en mujeres al final de su embarazo, así como su distribución por grupos de edad y nacionalidad.
2. Estimar la incidencia mínima de nuevos casos (por 100.000 habitantes y año) y compararlos con los datos comunicados en España (declaración voluntaria mediante el Sistema de Información Microbiológica) y en Europa (datos del ECDC).
3. Estudiar las características de la infección por *C. trachomatis* en dos grupos de pacientes con enfermedades de transmisión sexual: varones con sintomatología de uretritis (2013) y mujeres con enfermedad inflamatoria pélvica (2009-2013). En ambos grupos se comparará el papel causal de *C. trachomatis* con el de otros agentes causantes de ITS, especialmente, *N. gonorrhoeae*.

Objetivos

4. Como consecuencia de la infección en mujeres embarazadas, estimar el porcentaje de recién nacidos que se infectan por vía vertical.
5. En función de la prevalencia observada, valorar la conveniencia de implementar intervenciones preventivas como: a) cribado oportunista en el conjunto de gestantes/puérperas o en las de determinados subgrupos de edad y/u otras características, que contribuya al control de la infección y disminuya significativamente la transmisión vertical, o incluso b) cribado poblacional a mujeres de grupos de edad con prevalencia elevada.
6. Describir los genotipos circulantes de *C. trachomatis* y su evolución temporal en Gipuzkoa, así como en otras zonas geográficas distantes de España (Gipuzkoa, Sevilla y Las Palmas de Gran Canaria), relacionándolos con variables demográficas y de comportamiento sexual. Paralelamente, estudiar la posible presencia de cepas causantes de linfogranuloma venéreo. Finalmente, analizar la diversidad genética mediante secuenciotipado de alguna de las cepas con mayor interés epidemiológico.

3.3. Objetivos secundarios

7. Ante el elevado número de personas de nacionalidad escandinava que viaja a nuestro país, estudiar la posible introducción de la nueva variante de *C. trachomatis* mediante su búsqueda en las áreas geográficas previamente citadas.
8. Ante la ausencia de validación para la técnica diagnóstica molecular empleada (Cobas 4800, Roche) del frotis uretral como muestra para detectar la infección por *C. trachomatis* en varones, comparar la rentabilidad de las muestras uretral y orina

Objetivos

de primera parte de la micción (muestra esta última ya validada) obtenidas consecutivamente y en paralelo en varones con uretritis aguda.

Objetivos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

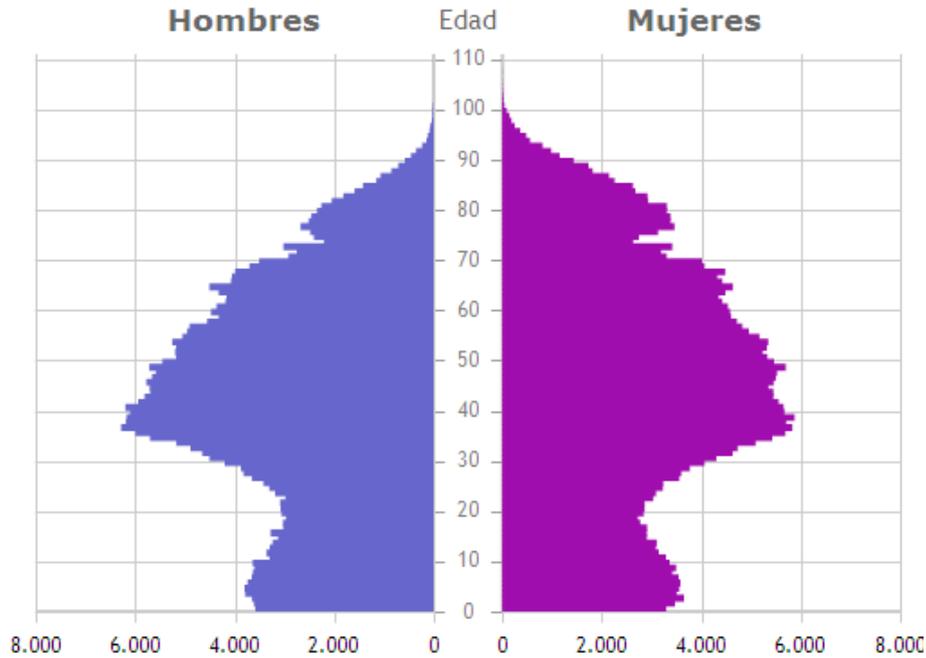
Estudio retrospectivo y descriptivo de las características clínico-epidemiológicas y moleculares de la infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa (periodo 2006-2015), y estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo de la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en puérperas atendidas en el HUD (entre 2011 y junio de 2015).

4.2. Ámbito geográfico del estudio

4.2.1. Descripción de Gipuzkoa y su población

La provincia de Gipuzkoa pertenece a la Comunidad Autónoma del País Vasco y se sitúa geográficamente en el extremo norte de la Península Ibérica limítrofe a Francia (figura 14). Su pequeño tamaño (1.909 km²) y su especial orografía montañosa condicionan que la población esté distribuida en numerosos núcleos (88 municipios) cercanos entre sí. La densidad de la población es elevada (371 habitantes/km²).

Figura 15. Pirámide poblacional por sexo y edad de la población censada en Gipuzkoa.



4.2.2. Ámbito territorial del área de salud de Gipuzkoa

El área de salud de Gipuzkoa está dividida en una “comarca Gipuzkoa” con un hospital terciario (HUD) y cuatro Organizaciones Sanitarias Integradas (OSI) con sus respectivos hospitales comarcales (figura 16): OSI Bidasoa (H. Bidasoa), OSI Bajo Deba (H. Mendaro), OSI Goierri – Alto Urola (H. Zumarraga) y OSI Alto Deba (H. Alto Deba).

Figura 16. Comarca sanitaria de Gipuzkoa (obtenida de la intranet de Osakidetza).



Para el diagnóstico de ITS se analizaron en nuestro laboratorio las muestras clínicas recibidas en los Servicios de Microbiología del HUD y de los Hospitales Comarcales de Bidasoa, Zumárraga y Mendaro, que atienden a sus respectivos Servicios Clínicos receptores de pacientes con posibles ITS, tanto en consultas clínicas como en plantas de hospitalización (Servicios de Ginecología, Urología, Urgencias Generales, Dermatología, etc.), y a sus correspondientes Unidades de Atención Primaria (UAP) (tabla 8). La OSI Alto Deba, aunque geográficamente pertenece a Gipuzkoa, sanitariamente está adscrita a Álava por proximidad, por lo que no ha sido incluida en este estudio.

Por otra parte, en el Servicio de Microbiología del HUD se reciben las muestras obtenidas en la consulta del Plan del SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual que Osakidetza tiene en Gipuzkoa (Edificio de Sanidad, Avda. de Navarra, San Sebastián),

en la que dos días a la semana se atiende anónimamente a los pacientes que acuden por presentar síntomas de ITS, a las personas asintomáticas que acuden para la realización de controles por contacto con casos positivos, y a otras personas de colectivos concretos con factores de riesgo, como prostitución o promiscuidad sexual. Finalmente, en el propio Servicio de Microbiología se dispone de una consulta para facilitar la atención y toma de muestras a pacientes con sospecha de ITS y sus contactos, derivados por los médicos de atención primaria y otros servicios del hospital.

Tabla 8. Organización sanitaria de Gipuzkoa (excepto Alto Deba), población y habitantes objeto de estudio (censo 2011).

Área de Salud	Hospital	UAPs	Población	Habitantes
Comarca Gipuzkoa	HUD	Comarca Ekialde	Donostia, Astigarraga, Hernani, Lasarte, Zarautz, Urnieta, Usurbil, Orío, Aia, Zumaia, Zestoa, Aizarnazabal, Getari, Pasai Antxo, Pasai San Pedro, Lezo, Errenteria, Oiartzun	320.917
		Tolosa	Tolosa	47.036
		Andoain	Andoain	
		Villabona	Villabona, Aduna, Zizurkil, Asteasu, Hernialde, Anoeta, Irura, Alkiza	
		Ibarra	Ibarra, Belaunza, Berrobi, Berastegi, Elduaen, Lizartza, Oresa, Leaburu-Gaztelu, Txaramo	
Alegi	Alegi, Altzo, Ikaztegieta, Orendain, Amezketa, Abaltzisketa, Legorreta, Baliarrain, Bidegoian, Albistur, Beizana, Bedaño, Aldaba			
OSI Bidasoa	H. Bidasoa	Irun	Irun	75.575
		Hondarribia	Hondarribia	
OSI Goierri-Alto Urola	H. Zumarraga	Azpeitia	Azpeitia, Errezil, Urrestilla	139.712
		Azkoitia	Azkoitia	
		Legazpi	Legazpi	
		Zumarraga	Zumarraga, Urretxu, Gabiria, Ezkio-Itsaso	
		Lazkao	Lazkao, Ataun San Martín, Ataun San Gregorio, Olaberria	
		Ordizia	Ordizia, Itsasondo, Zaldibia, Altzaga, Arama, Gaintza	
OSI Bajo Deba	H. Mendaro	Ermua	Ermua, Mallabia	54.452
		Eibar	Eibar	
		Torrekua		
		Elgoibar	Elgoibar, Mendaro, Soraluze	
		Deba	Deba, Deba-Itziar, Mutriku	
Total				637.692

OSI: Organizaciones Sanitarias Integradas; UAP: Unidad de Atención Primaria

4.3. Población objeto de estudio

4.3.1. Cribado de la infección en puérperas (entre 2011 y junio de 2015): prevalencia, complicaciones gestacionales y transmisión vertical

Si bien el estudio comenzó en octubre de 2010 y finalizó en septiembre de 2015, para el cálculo de la prevalencia se valoraron los resultados de la detección de *C. trachomatis* en las puérperas atendidas en el HUD entre enero de 2011 y junio de 2015, para por una parte evitar sesgos de mala recogida iniales y finales en el estudio y por otra para poder realizar los cálculos anuales ajustando los denominadores. Esta determinación fue incluida en un programa de prevención de ETS en nuestro hospital, que incluyó la detección serológica de anticuerpos frente a *Treponema pallidum* y virus de la inmunodeficiencia humana así como del antígeno Australia del virus de la hepatitis B. Tras dar a luz, se informó a las mujeres sobre la infección por *C. trachomatis* y se les indicó que se les realizaría la prueba antes de ser dadas de alta salvo que la rechazaran, para lo que se les solicitaría una muestra de orina. Se obtuvo muestra de orina de primera parte de la micción durante la mañana siguiente al parto (en la mayor parte de los casos), excepto en las que no dieron su consentimiento. El HUD atiende anualmente unos 4.000 partos, representando un 62% de los partos de Gipuzkoa. Otros hospitales públicos atienden un 25% de los partos y solo un 13% de las puérperas no están representadas por dar a luz en centros privados. En los casos positivos a *C. trachomatis* se citó a la paciente en la consulta de Ginecología a los 7-10 días del parto para explicar el resultado del análisis, administrar el tratamiento, recomendar control de sus contactos sexuales (en los últimos 60 días o el último tras ese periodo), y realizar una encuesta clínico-epidemiológica con datos demográficos (edad, nacionalidad, residencia),

antecedentes personales (gestaciones, partos y abortos previos, ITS previas...) y características de la gestación actual (semana gestacional en el momento del parto, RPM, antibióticoterapia previa, peso del recién nacido...). También se derivó al recién nacido a la Consulta de Pediatría para evaluar la transmisión vertical mediante obtención de muestras a los 7-10 días del nacimiento y seguimiento clínico durante 3 meses, tratando a los casos positivos.

Para estimar la prevalencia en función del origen geográfico de las mujeres (españolas o inmigrantes), se obtuvo individualmente del registro de datos demográficos del HUD el país de nacimiento de todas las mujeres *C. trachomatis*-positivas, así como el de una muestra de las parturientas habidas en el hospital durante el período de estudio, cuya distribución por país y grupo de edad se extrapoló a la población de mujeres en las que se investigó la presencia de infección por *C. trachomatis*. La muestra se seleccionó mediante muestreo estratificado aleatorio en cuatro grupos de edad: <25 años, 25-29 años, 30-34 años y ≥ 35 años, estableciéndose los tamaños muestrales con una precisión de 5% y un intervalo de confianza del 95% (en referencia a la distribución en los correspondientes grupos de edad de las parturientas de Gipuzkoa). Las prevalencias globales obtenidas en este estudio fueron ajustadas por edad en relación a la distribución por edad del total de parturientas en Gipuzkoa, así como a la de este grupo de población dividido en función del país de nacimiento (España u otros) (Instituto Vasco de Estadística - EUSTAT, consulta nº 8604-2015).

Para valorar la asociación de la infección por *C. trachomatis* con ciertas complicaciones potenciales relacionadas con ella (parto pretérmino y recién nacido de bajo peso), estos datos se recogieron prospectivamente en los casos con infección de la historia clínica realizada personalmente por los ginecólogos y retrospectivamente en un grupo control sin infección entre octubre de 2010 y abril de 2012 de la historia clínica mecanizada. La

Material y métodos

edad gestacional se calculó a partir de la fecha de la última regla, considerándose parto postérmino cuando la edad gestacional fue ≥ 42 semanas y pretérmino < 37 semanas; a su vez, la prematuridad del recién nacido se subdividió en: extremo prematuro (< 28 semanas), gran prematuro (28-31 semanas), prematuro (32-33 semanas) y prematuro tardío (34-36 semanas).

4.3.2. Impacto e incidencia de la infección en Gipuzkoa (2006-2015)

Se incluyeron todos los casos sospechosos y confirmados de infección por *C. trachomatis* en el período de estudio en relación a la población atendida (anexo I), obtenidos por los canales sanitarios especificados previamente (ver punto 4.2.2). Para facilitar un análisis pormenorizado se realizarán los siguientes subgrupos: consulta anónima de ETS, pacientes de Atención Primaria, muestras de Ginecología, cribado gestacional y otros. Estos subgrupos representan circuitos de atención sanitaria diferenciados, que recogen grupos de pacientes con diferencias desde un punto de vista epidemiológico, que pueden estar sujetos a diferente evolución temporal.

4.3.3. Papel de *C. trachomatis* en cuadros de enfermedades de transmisión sexual y en relación a otros agentes causantes de infecciones de transmisión sexual

4.3.3.1 Varones con síndrome uretral (2013)

Este estudio se realizó en dos subgrupos: uno formado por pacientes en los que hubo sospecha clínica de la enfermedad, de los que se obtuvieron muestras para diagnóstico

microbiológico; y otro por pacientes con probable uretritis no sospechada inicialmente, a los que por sospecha de infección urinaria (síntoma principal disuria) se solicitó urocultivo presentando leucocituria (>14 leucocitos/ μ l en orina, citómetro UF-1000i-Sysmex) con urocultivo negativo. Los pacientes de ambos subgrupos fueron citados en el Servicio de Microbiología para la obtención de una muestra de exudado uretral y de primera fracción de la orina para la investigación de *C. trachomatis* y otros microorganismos relacionados con ITS (ver apartado métodos diagnósticos). A los pacientes que acudieron se les realizó una encuesta clínico-epidemiológica (ITS previas o síntomas compatibles, posibles contactos sexuales, conductas de riesgo de adquirir ITS...) y una exploración física (descartar infección en otras localizaciones, otras posibles causas de uretritis no infecciosas...). En los casos positivos se administró el tratamiento adecuado (o se realizó un informe para su médico), aconsejando el control de sus contactos sexuales y seguimiento para acudir de nuevo en caso de persistencia o recurrencia de los síntomas.

4.3.3.2. Mujeres con enfermedad inflamatoria pélvica (2009-2013)

Este grupo estuvo formado por las mujeres de 15-45 años de edad atendidas en consultas ambulatorias de Ginecología y en el HUD (en el Servicio de Urgencias y/o ingresadas en el Servicio de Ginecología) con diagnóstico de dolor abdominal de probable origen ginecológico a las que se les realizó petición de detección de *C. trachomatis* (posible causa de EIP). Las pacientes hospitalizadas en el HUD son dadas de alta indicándose en su historia clínica los códigos de la Clasificación Internacional de Enfermedades 9ª revisión -modificación clínica- (CIE-9-MC) que corresponden con el diagnóstico clínico adjudicado. Debido a la inespecificidad de los síntomas y la

Material y métodos

dificultad en diagnosticar esta entidad clínica, se analizaron los datos en su conjunto (pacientes ambulatorias, ingresadas en urgencias y hospitalizadas), y por estos grupos, teniendo en cuenta en las pacientes hospitalizadas de las que se recibió muestra para descartar *C. trachomatis* los códigos CIE-9-MC relacionados con la EIP (tabla 9) siguiendo estudios previos de referencia ^(203,204). Asimismo se obtuvo del Servicio de Documentación Clínica del HUD un listado de mujeres de este grupo de edad que tuvieran al alta alguno de dichos códigos para cotejar las pacientes de las que se recibió muestra y de las que no.

Tabla 9. Descripción de los códigos CIE-9-MC diagnósticos de EIP empleados en este estudio.

Código	Descripción
098.10	Gonorrea aguda del TGU superior, localización sin especificar
098.16	Endometritis aguda gonocócica
098.17	Salpingitis aguda gonocócica
098.19	Gonorrea aguda del TGU superior, otra localización
098.86	Peritonitis aguda gonocócica
099.56	Peritonitis aguda por <i>Chlamydia</i>
614.0	Salpingo-ooforitis aguda
614.2	Salpingitis/ooforitis, no aguda o crónica
614.3	Parametritis aguda/EIP
614.5	Peritonitis pélvica aguda o sin especificar
614.8	Otra enfermedad inflamatoria especificada, órganos pélvicos femeninos
614.9	Enfermedad inflamatoria sin especificar, órganos pélvicos femeninos
615.0	Enfermedad inflamatoria del útero, excepto cérvix
615.9	Enfermedad inflamatoria del útero sin especificar

TGU: tracto genitourinario

EIP: enfermedad inflamatoria pélvica

4.3.4. Epidemiología molecular: genotipos *ompA*, detección de la nueva variante de

C. trachomatis y Multilocus Sequence Typing

Se efectuó el genotipado de las muestras *C. trachomatis*-positivas detectadas en el Servicio de Microbiología del HUD entre 2006 y 2014. Asimismo, debido a la escasez

de conocimientos sobre los genotipos circulantes en España, se investigaron en los años 2011-12 los genotipos de las cepas de *C. trachomatis* detectadas en las Palmas de Gran Canaria (Hospital Universitario Dr. Negrín) y Sevilla (Hospital Universitario Valme), con el fin de comparar las cepas circulantes en tres áreas geográficamente alejadas de España. En los tres centros, las muestras se obtuvieron de forma consecutiva, sin selección previa, durante la rutina asistencial de pacientes sintomáticos, asintomáticos con factores de riesgo de ITS y mujeres que dieron a luz en el caso del HUD. Las muestras obtenidas a un mismo paciente en el transcurso de seis meses se consideraron como un mismo episodio, excepto si en ese periodo ocurrieron dos episodios sintomáticos separados por una muestra con resultado negativo o si se detectaron dos muestras con genotipo diferente (reinfección). En cada caso se registraron el tipo de muestra y los datos clínico-epidemiológicos correspondientes: sexo, edad, origen (español o extranjero), área geográfica de residencia, conducta sexual en hombres (clasificado como hombres que tienen sexo con hombres [HSH] o heterosexuales [HTS]) y síntomas. Por razones de confidencialidad, en algunos casos no se pudieron obtener todos estos datos.

La presencia de la nvCT se investigó en todas las cepas del grupo anterior que pertenecieron al genotipo E, dado que la nvCT se ha detectado solo en cepas de este genotipo. En algunas muestras de interés epidemiológico especial (pacientes con linfogranuloma venéreo, pacientes con genotipos inusuales como el B) así como, debido a la ausencia de datos en España, en una selección de cepas con genotipos habituales, se realizó la prueba de Multilocus Sequence Typing (MLST).

4.4. Muestras clínicas

Se obtuvieron diferentes muestras clínicas según las posibles localizaciones de la infección por *C. trachomatis* (tabla 10). Las muestras fueron recogidas en dos tipos de contenedores: un contenedor estéril de 100 mL (Krape ref GOSS-072004A, España) para las muestras de orina, líquido amniótico, pus de abscesos y biopsias (en el último caso en solución salina), y un medio de transporte viral (Universal Transport Medium, Mini UTM kit 3 mL, Copan Diagnostics Inc.) para el resto (tabla 10 y figura 17). Para la obtención de muestras con buen rendimiento hay que tener en cuenta las características del ciclo vital de *C. trachomatis* (microorganismo con fases de vida intra y extracelular), por lo que es importante la recolección de células epiteliales. Por ello, siguiendo los procedimientos habituales, se recogió en el caso de la orina, la primera fracción de la micción (emitida tras al menos 2-3 horas sin orinar), y en las muestras obtenidas a partir de mucosas, hisopos con los que tratar de obtener la máxima descamación (figura 18).

Tabla 10. Muestras y medios de transporte utilizados según la localización de la infección.

Infección	Muestra	Medio de transporte
Uretritis	Exudado uretral y/o orina	MTV y/o anaclín
Proctitis/LGV	Exudado rectal	MTV
Adenopatía inguinal/LGV	Biopsia ganglionar	Anaclín
Cervicitis/vaginitis	Exudado cervical/vaginal +/- orina	MTV +/- anaclín
Salpingitis/Anexitis	Absceso y/o biopsia +/- exudado cervical	Anaclín +/- MTV
EIP	Líquido amniótico +/- exudado cervical	Anaclín +/- MTV
Conjuntivitis	Exudado conjuntival	MTV
Faringitis/neumonía neonatal	Exudado faríngeo	MTV

MTV: medio de transporte viral; LGV: linfogranuloma venéreo; EIP: enfermedad inflamatoria pélvica.

Figura 17. Medio de transporte viral y diferentes hisopos empleados en la obtención de muestras.

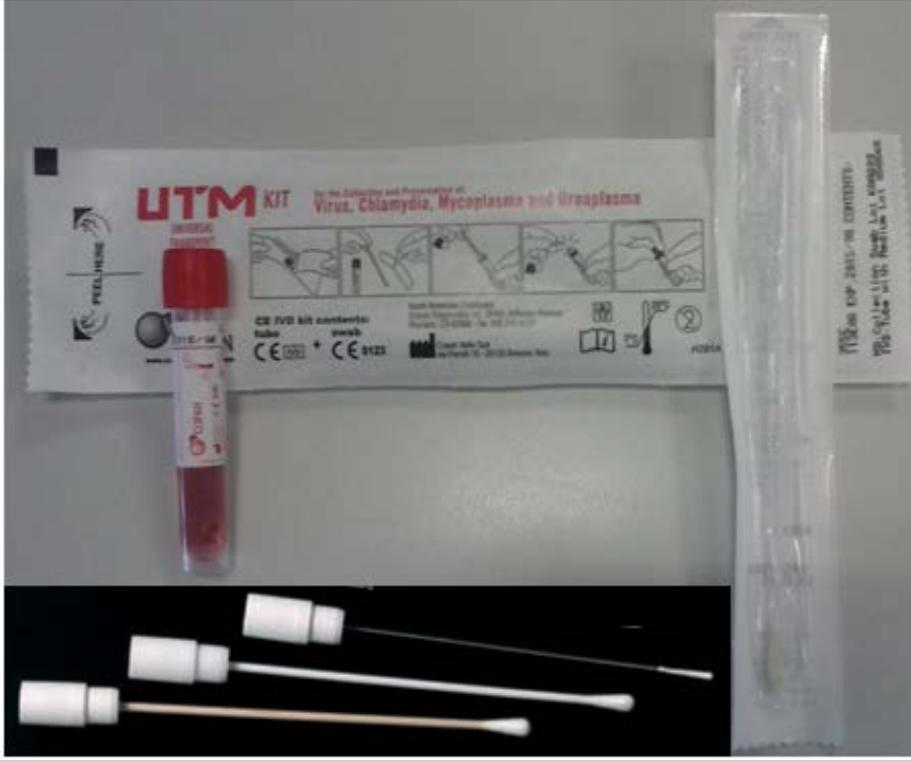
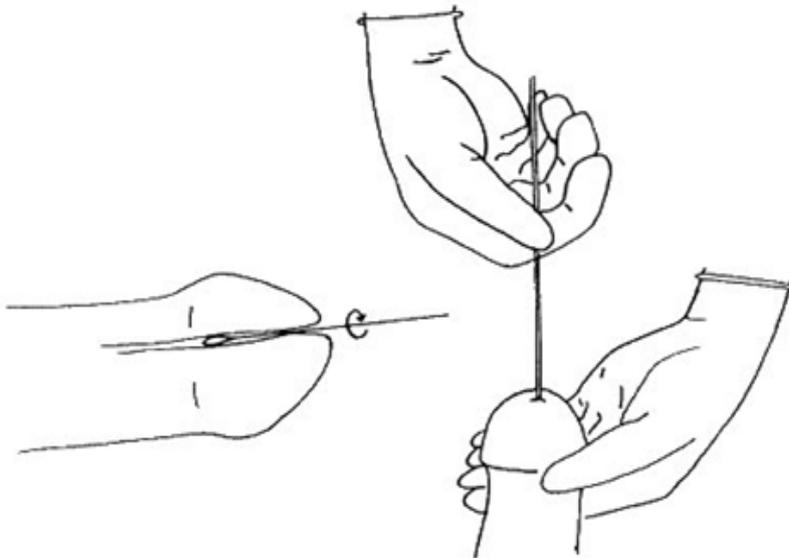


Figura 18. Ejemplo de toma de muestra. Toma de muestra de exudado uretral.



Material y métodos

La toma de muestra uretral debe realizarse idealmente a primera hora de la mañana antes de haber orinado el paciente. Es necesario emplear un hisopo fino con aplicador metálico, introducirlo en la uretra 2-3 cm rotándolo 360° unos segundos y después en el MTV.

Las muestras obtenidas fuera del laboratorio llegan a éste habitualmente en la mañana de su obtención, siendo refrigeradas en el centro extractor a 4°C en el caso de que se remitan al día siguiente. En el laboratorio son procesadas en el día de llegada (<4h) o refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento, el cual se realiza normalmente en las siguientes 24 horas (algún fin de semana hasta 48 horas).

La presencia de leucocitos se estudió en orina mediante una técnica de citometría de flujo (Sysmex UF-1000i, Roche) y en otras muestras (cérvix, uretrales, etc.) mediante la observación directa en microscopio tras tinción de Gram. Para la realización de algunas técnicas diagnósticas es necesario añadir la muestra clínica a un contenedor o medio de transporte secundario previamente a la realización de la prueba (ej. Cobas 4800, Roche). Las muestras positivas a *C. trachomatis* y su ADN extraído se mantuvieron refrigeradas durante una semana para el análisis de los genotipos y de la presencia de la nvCT, siendo posteriormente congeladas a -80°C para su conservación.

4.5. Métodos diagnósticos

Para la confirmación diagnóstica de *C. trachomatis* en nuestro laboratorio se emplearon desde 2006 tres TAAN comerciales (Roche): COBAS TaqMan CT Test (ene/06 – nov/08), COBAS TaqMan CT Test v2.0 (dic/08 – sep/10) y Cobas 4800-CT/NG test (desde oct/10). Estas técnicas poseen marcado CE y están validadas por la FDA para

analizar muestras de endocérvix y orina, aunque su uso está también recomendado para otras muestras, dada su alta sensibilidad y especificidad ⁽¹⁴⁸⁾.

Tanto para el genotipado de los casos positivos, como para la identificación de la nvCT y del genotipo LGV, se emplearon otras TAAN utilizando cebadores y sondas específicos previamente descritos por otros autores, pero optimizando las condiciones a nuestro laboratorio (tabla 11).

Tabla 11. Cebadores y sonda empleados para el genotipado de *C. trachomatis*, la identificación de la nvCT y la detección rápida del genotipo LGV.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Diana (pb)	Utilidad	Referencia (nº)
PI-F	ATGAAAAAACTCTTCAAATCGG	<i>ompA</i> (1.120)	Genotipado	Lysén (205)
OMP2-R	ACTGTAACTGCGTATTTGTCTG			
MOMP87-F	TGAACCAAGCCTTATGATCGACGGA			
RVS1059-R	GCAATACCGCAAGATTTTCTAGATTTCATC	<i>ompA</i> (990)		
CTP200	TCCGGATAGTGAATTATAGAGACT	Plásmido críptico (161 nvCT, 537 wCT)	Identificación nvCT	Ripa (206)
CTP201	CCTAAAAGTGTTTTTCTGGC			
LGV-F	CTGTGCCAACCTCATCATCAA	<i>pmpH</i> (61)	Detección rápida LGV	Morré (207)
LGV-R	AGACCCTTCCGAGCATCACT			
Sonda LGV	6-FAM-CCTGCTCCAACAGT			

pb: pares de bases; nvCT: nueva variante sueca de *C. trachomatis*; wCT: cepa salvaje de *C. trachomatis*

En un grupo de pacientes con síndrome uretral durante 2013, para la identificación de otros microorganismos causantes de ITS como *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Trichomonas vaginalis* se empleó la técnica molecular Anyplex™ II STI-7 de Seegene Inc. (Seoul, Corea), que además detecta *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*. En este mismo grupo, la detección de anticuerpos frente a *T. pallidum* y VIH (entre un mes antes y un mes después del síndrome uretral) se realizó con un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente (CMIA, *chemiluminescent microparticle immunoassay*) (reactivos Architect Syphilis TP y Architect HIV Ag/Ab Combo, Abbott Laboratories, Wiesbaden,

Material y métodos

Germany). Las muestras *Treponema* CMIA-positivas fueron reanalizadas mediante absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) (Bio-Mérieux, Marcy l'Étoile, France) y pruebas TPHA (Treponemal passive hemagglutination assay) y VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) (Siemens, Marburg, Germany).

4.5.1. Extracción de ácidos nucleicos

Preparación manual: Este proceso se realizó hasta noviembre de 2007 con el equipo AmpliCor CT/NG Specimen Preparation (Roche). Este sistema se basa en una lisis celular química con una solución detergente (buffer tris-HCl, <1% solubilizador y 0,09% azida sódica) y posterior exposición del ADN. La preparación manual es sencilla y dura media hora, pero tras un estudio prospectivo comparando en paralelo esta técnica con una extracción automatizada, se decidió su sustitución, ya que la extracción automática mejoraba el rendimiento del trabajo (detección en ciclos de amplificación más tempranos y un 30% más de positivos) y requiere menor manipulación, lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada y permite mayor reproducibilidad ⁽¹⁵⁷⁾.

Extracción automatizada: Este proceso se realizó desde diciembre de 2007, hasta septiembre de 2010 empleando el biorobot EasyMag (figura 19) con el equipo NucliSens (BioMérieux), y desde octubre de 2010 con la plataforma Cobas 4800 (Roche) que cuenta con su propio extractor de ácidos nucleicos. Este método realiza una lisis celular con un agente caotrópico (hidrocloruro de guanidina), tras la que los ácidos nucleicos liberados se atrapan mediante absorción en una matriz inmunomagnética de sílice, posteriormente se purifican y separan de las partículas magnéticas mediante una serie de lavados, obteniéndose finalmente un producto (eluído) concentrado ⁽²⁰⁸⁾.

Figura 19. Extractor de ácidos nucleicos EasyMag (BioMérieux).



4.5.2. Amplificación y detección de ácidos nucleicos

Las tres técnicas utilizadas para detectar la infección de *C. trachomatis* cuentan con marcado CE, y realizan una amplificación y detección en tiempo real empleando cebadores y sondas específicos. La alta especificidad de estas técnicas se ve reforzada por la utilización de: a) un control interno (ADN plasmídico recombinante no infeccioso de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, cada uno con regiones de unión para cebadores idénticas a las de las secuencias genómicas objetivo) para descartar la presencia de inhibidores y monitorizar el proceso (en los equipos COBAS TaqMan CT Test desde la amplificación, y en el equipo Cobas 4800 desde la extracción); b) controles positivo y negativo incluidos en cada serie para validar los resultados; c) enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) que permite la amplificación selectiva de los ácidos nucleicos objetivo de la muestra al reconocer y catalizar la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina (pero no del ADN natural que contiene desoxitimidina y

Material y métodos

carece de desoxiuridina) antes de la amplificación del ADN objetivo, controlando la posibilidad de contaminación debida al arrastre de amplicones generados en amplificaciones precedentes (que contendrían desoxiuridina debido al empleo de trifosfato de desoxiuridina en lugar de trifosfato de timidina como uno de los dNTP del reactivo de mezcla maestra).

En cuanto a la sensibilidad, están diseñadas para detectar entre 1/mL (en orina) y 3/mL (en torunda) unidades formadoras de inclusión. El equipo COBAS TaqMan CT Test empleaba como única diana un fragmento del plásmido críptico de *C. trachomatis*, siendo sustituido en diciembre de 2008 por el equipo COBAS TaqMan CT Test v2.0 que incluía una doble diana (ADN del plásmido críptico y ADN genómico del gen *ompA*), pudiendo detectar así también la nvCT descrita en Suecia en 2006 y otras cepas mutadas carentes de plásmido críptico. El equipo Cobas 4800 detecta, además de la doble diana de *C. trachomatis*, el ADN normal y la variante de ADN para *N. gonorrhoeae* en la región DR-9.

Las técnicas COBAS TaqMan requieren la preparación manual de una placa de PCR con la mezcla de los reactivos (junto con el control interno), a la que se añade el ADN extraído de cada muestra, además de un control positivo y negativo. La placa se introduce en un analizador (figura 20) que realiza la amplificación y detección en tiempo real. La plataforma Cobas 4800 (figura 21) consta de un módulo (cobas x 480) que realiza la extracción automática de ácidos nucleicos y prepara automáticamente una placa de PCR con los reactivos y el ADN extraído, y de un analizador (cobas z 480) en el que tras introducir la placa de PCR realiza la amplificación y detección en tiempo real.

Figura 20. Analizador COBAS TaqMan 48.



Figura 21. Plataforma Cobas 4800-CT/NG (Roche).



Material y métodos

Al final del proceso proporcionan un resultado cualitativo como “no detectable” o “positivo” (junto con el ciclo de amplificación) o “inválido” (si existe inhibición del control interno). En el analizador COBAS TaqMan se puede observar una gráfica con la intensidad de fluorescencia en cada ciclo de amplificación de cada muestra (y controles positivo y negativo) junto con su control interno, y en el cobas z 480 se puede ver la curva de amplificación de los controles aportándose en los casos positivos el número del ciclo de amplificación. Este análisis semicuantitativo permite deducir la mayor o menor carga bacteriana en la muestra (mayor carga a menor ciclo). Se consideraron como positivos aquellos casos con un ciclo de amplificación ≤ 40 . Un resultado es inválido si el control interno no amplifica por la presencia de inhibidores (por ejemplo, muestras con muchos hematíes o leucocitos). En estos casos, se repitió el análisis tras diluir la muestra 1/3 en un medio de transporte y vortearla repetidamente durante más de un minuto. Si tras repetir el análisis el resultado continuó siendo “inválido” se informó como “no valorable”.

4.5.3. Identificación de genotipos de *C. trachomatis*

En los casos en que se detectó ADN de *C. trachomatis*, se investigó el genotipo mediante una PCR convencional anidada que amplifica un fragmento del gen *ompA* ⁽²⁰⁵⁾. El primer paso de la PCR se realizó sobre un volumen final de 50 μl , añadiendo 10 μl del ADN a 40 μl de la mezcla de reactivos: 1 μl de los cebadores P1-F (nucleótidos 1-22) y OMP2-R (nucleótidos 1.124-1.103) 20 μM , 1 μl de deoxinucleósido-trifosfatos 200 μM , 4 μl de MgCl_2 25 mM, 5 μL de buffer Gold 10x y 0,3 μl de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), en 28 μl de dH_2O . La PCR se realizó en un

termociclador convencional Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) (figura 22) con las siguientes condiciones: activación inicial de la polimerasa a 95°C 10 minutos; 40 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 90 segundos; elongación final a 72°C 7 minutos y guardar a 4°C. La detección se realizó en un gel de agarosa al 2% empleando SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) para teñir el ADN tras una electroforesis de una hora a 120 voltios (figura 23), identificándose amplificados de 1.120 pb al compararlos con un marcador de peso molecular (TrackIt, Invitrogen) en un lector de geles (Bio-Rad) (figura 24). En los casos en que no se observó una banda positiva, se realizó una segunda PCR anidada añadiendo 3 µl del primer amplificado a 47 µl de la mezcla de reactivos antes descrita en 35 µl de dH₂O empleando los cebadores MOMP87-F (nucleótidos 87-111) y RVS1059-R (nucleótidos 1.079-1.050). Las condiciones de esta PCR fueron como las anteriores, pero con una temperatura de annealing de 60°C. La detección se realizó en un gel de agarosa al 2%, identificándose amplificados de 990 pb.

Figura 22. Termociclador convencional.

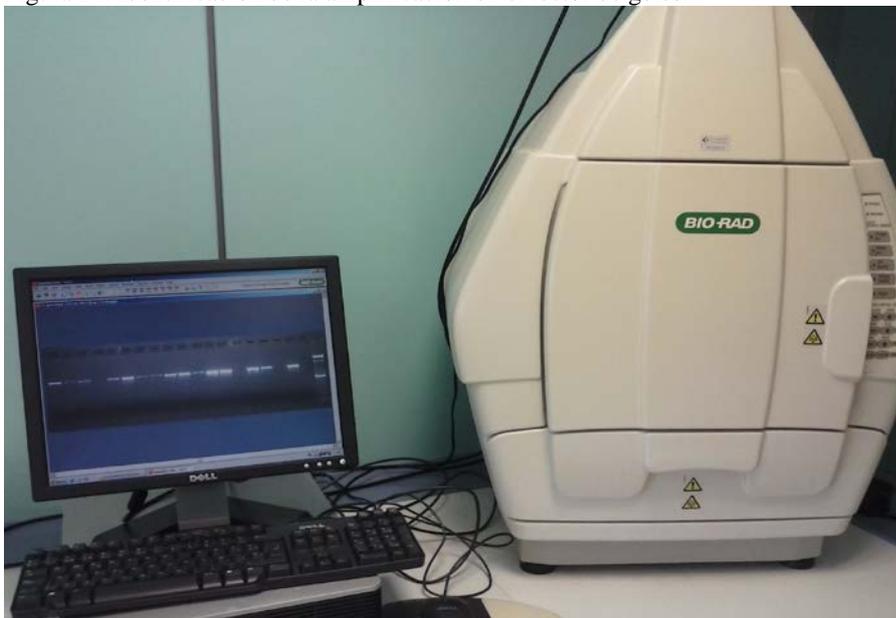


Material y métodos

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa.



Figura 24. Identificación de la amplificación en el lector de geles.



Los amplicones se secuenciaron utilizando el cebador MOMP87 en un ABIPRISM-3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de nucleótidos se analizaron mediante comparación en bases de datos internacionales (BLAST) para conocer el genotipo.

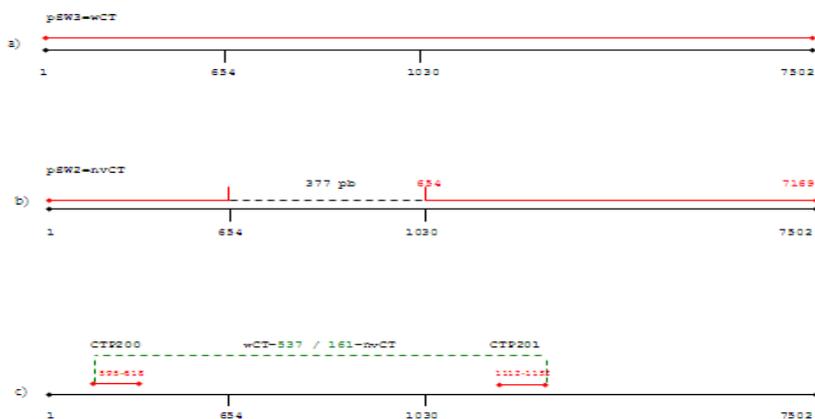
4.5.4. Identificación de la nueva variante de *C. trachomatis*

En los casos positivos a *C. trachomatis* que pertenecieron al genotipo E se realizó una búsqueda de la nvCT. Para ello se utilizó una PCR en tiempo real que amplifica un fragmento del ADN del plásmido críptico (figura 25) en un LightCycler 2.0 (Roche) (figura 26), empleando cebadores previamente descritos ⁽²⁰⁶⁾. La PCR, optimizada a nuestro laboratorio, se realizó sobre un volumen final de 20 µl, añadiendo 5 µl del ADN a 15 µl de la mezcla de reactivos: 0,5 µl de los cebadores CTP200 y CTP201 10 µM, 1,6 µl de MgCl₂ 25 mM y 2 µl de Master SYBR Green I (Roche), en 10,4 µl de dH₂O. Para la amplificación se emplearon las siguientes condiciones: activación inicial de la polimerasa a 95°C 10 minutos; 50 ciclos de 95°C 15 segundos, 58°C 10 segundos, 72°C 15 segundos. Al no utilizar sondas, la detección se realizó mediante un análisis de las curvas de melting para identificar y diferenciar la nvCT (aproximadamente 78°C) de la cepa salvaje (aproximadamente 81°C). Además del análisis de la temperatura de melting, para la diferenciación de las dos cepas, la detección se realizó en un gel de agarosa al 2%, identificándose amplificadores de 537 pb (cepa salvaje) y 161 pb (nvCT) en un lector de geles (Bio-Rad). En todas las series de análisis se utilizó como control positivo ADN purificado del genoma de una nvCT previamente secuenciada (cepa Sweden 2, cedida por el Dr. Magnus Unemo, National Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden). Los amplicones con 161 pb se

Material y métodos

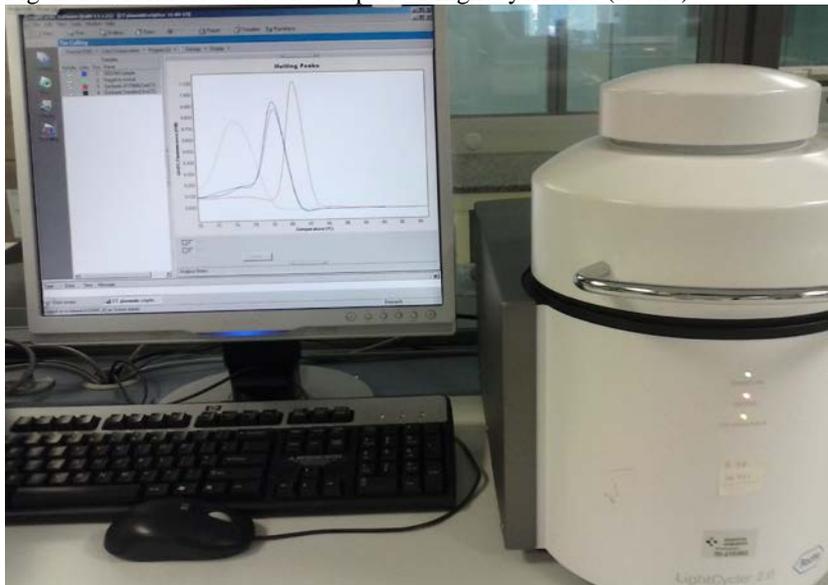
secuenciaron utilizando el cebador CTP200 en un ABIPRISM-3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de nucleótidos se analizaron mediante comparación en bases de datos internacionales (BLAST) para confirmar si se trataban de cepas nvCT.

Figura 25. Representación gráfica del ADN del plásmido críptico de *C. trachomatis*:



a) cepa salvaje (wCT) con 7.502 pb; b) nueva variante (nvCT) con 7.169 pb por la delección de 377 pb; c) cebadores CTP200 (nucleótidos 595-618) y CTP201 (nucleótidos 1.112-1.132) empleados en la PCR que detecta y diferencia ambas cepas, la wCT con 537 pb y la nvCT con 161 pb.

Figura 26. Termociclador en tiempo real LightCycler 2.0 (Roche).



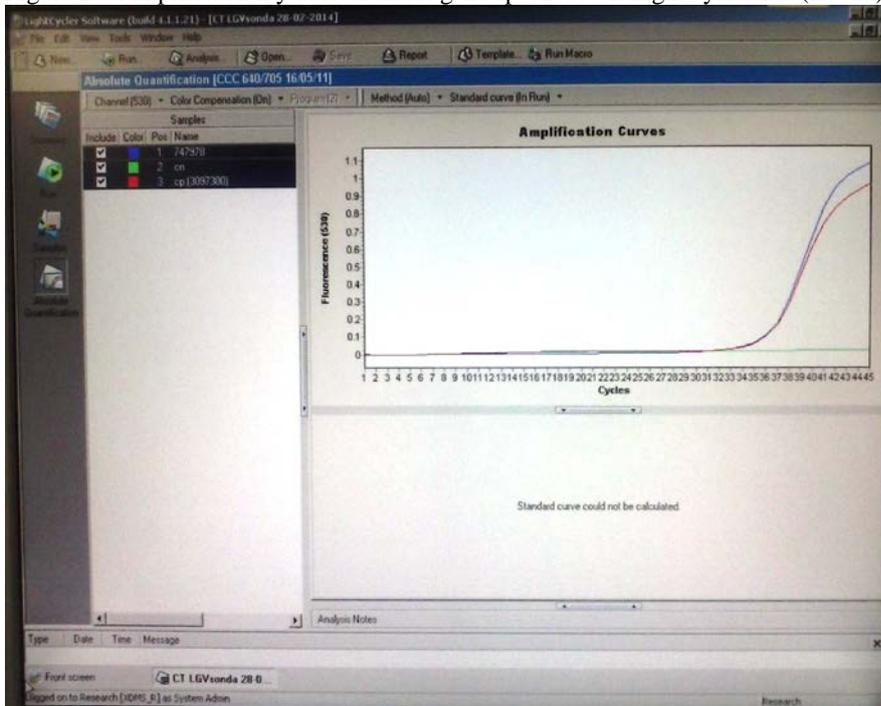
4.5.5. Detección e identificación rápida del genotipo LGV

La detección del genotipo LGV tiene trascendencia no solo epidemiológica, dado que su tratamiento antibiótico es diferente al del resto de genotipos de *C. trachomatis*. Por tanto, su identificación rápida es importante para iniciar pronto el tratamiento adecuado y realizar el control de contactos que permita prevenir un brote. En casos de sospecha clínica de linfogranuloma venéreo con adenopatías inguinales o en exudados rectales de varones en los que se había detectado *C. trachomatis*, se descartó la presencia del genotipo LGV mediante una PCR en tiempo real que amplifica un fragmento del gen *pmpH* (proteína de membrana polimórfica) empleando cebadores y sonda específicos descritos previamente ⁽²⁰⁷⁾.

La PCR, optimizada a nuestro laboratorio, se realizó en un LightCycler 2.0 (Roche) sobre un volumen final de 20 µl, añadiendo 2 µl del ADN a 18 µl de la mezcla de reactivos: 0,5 µl de los cebadores LGV-F y LGV-R 10 µM, 1,6 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de la sonda FAM-LGV 2 µM y 2 µl de DNA Master Mix (Roche), en 11,4 µl de dH₂O. Para la amplificación se emplearon las siguientes condiciones: 50°C 2 minutos y 95°C 10 minutos; 45 ciclos de 95°C 15 segundos y 58°C 60 segundos. El análisis se realizó mediante cuantificación absoluta en el canal 530 (figura 27).

Esta técnica permitió identificar en menos de 24 horas el genotipo LVG, que posteriormente fue confirmado mediante la técnica descrita anteriormente (amplificación y secuenciación de un fragmento del gen *ompA*).

Figura 27. Amplificación y detección del genotipo LGV en LightCycler 2.0 (Roche).



4.5.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

En algunos de los casos detectados con infección por *C. trachomatis*, como se ha referido previamente (punto 4.3.4.), se realizó un MLST utilizando una técnica de secuenciotipado previamente descrita por otros autores ⁽²⁰⁹⁾. Mediante una PCR convencional anidada se amplificó un fragmento de 5 regiones (*hctB*, CT058, CT144, CT172, *pbpB*) del ADN de *C. trachomatis*. El primer paso de la PCR se realizó sobre un volumen final de 25 μ l, añadiendo 2 μ l del ADN a 23 μ l de la mezcla de reactivos: 0,5 μ l de los cebadores 1-F y 1-R 20 μ M de cada región, 1 μ l de deoxinucleósido-trifosfatos 12,5 mM, 3 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2,5 μ L de buffer Gold 10x y 0,2 μ l de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), en 16 μ l de dH₂O. La PCR se realizó en un

termociclador convencional Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: activación inicial de la polimerasa a 94°C 3 minutos; 35 ciclos de 93°C 30 segundos, 59°C 30 segundos, 72°C 60 segundos; elongación final a 72°C 5 minutos y guardar a 4°C. La segunda PCR anidada se realizó añadiendo 2 µl del primer amplificado a 23 µl de la mezcla de reactivos antes descrita en 16 µl de dH₂O empleando los cebadores 2-F y 2-R de cada región. Las condiciones de esta PCR fueron similares a las de la anterior, pero con temperatura de annealing de 57°C y 30 ciclos. La detección se realizó en un gel de agarosa al 2%, identificándose amplificadores de 663 pb (*hctB*), 622 pb (CT058), 480 pb (CT144), 402 pb (CT172) y 645 pb (*pbpB*). Los amplicones se secuenciaron utilizando el cebador 2-F en un ABIPRISM-3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de nucleótidos se insertaron en la base de datos <http://mlstdb.bmc.uu.se/> para la identificación de los alelos correspondientes a cada secuenciotipo.

4.6. Soporte informático

Procesador: Ordenador personal modelo Intel (R) Core (TM) i5-3470S con 4 GB de memoria RAM y 2,90 GHz de velocidad.

Programas informáticos:

- Programas del paquete Microsoft Office 2010 (Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel, Microsoft Access y programa de manejo de imágenes Microsoft Office 2010)

Material y métodos

- Sistema informático del Servicio de Microbiología (Omega 3000, Roche, Mannheim, Alemania) y programas de búsquedas informáticas de resultados (InfOMEGA, Omnium)
- Sistema de búsqueda clínica informática del HUD (Osabide Global)
- Sistema de búsqueda bibliográfica Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- Bases de datos para comparación de secuencias Basic Local Alignment and Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)
- Programa de la Universidad de Uppsala (Suecia) para el análisis de la diversidad genética de las cepas de *C. trachomatis* (<http://mlstdb.bmc.uu.se/>)
- Programa de análisis estadístico (SPSS Statistics versión 22, IBM, Chicago, IL, USA)

4.7. Análisis estadístico

Se construyó una base de datos tipo Access en la que se introdujeron los resultados microbiológicos junto con los datos demográficos, epidemiológicos y clínicos. El análisis estadístico se efectuó en el paquete estadístico SPSS Statistics versión 22, IBM, Chicago, IL, USA.

4.7.1. Estadística descriptiva

Para el análisis de variables categóricas se determinaron los porcentajes y su intervalo de confianza 95% (IC 95%). Para el estudio de variables continuas se calcularon medias o medianas (en función de si la distribución es o no normal), así como la desviación

estándar. Los datos obtenidos se representaron en forma de tablas o histogramas. Para efectuar estimaciones de la incidencia (de infecciones por *Chlamydia*, de EIP, etc.) se utilizó como denominador el número de habitantes de la población general residente en las áreas objeto de estudio en cada Objetivo, obtenido de los últimos censos publicados (censos de 2006 y 2011, para los períodos 2006-2010 y 2011-2015, respectivamente), siendo calculado el IC 95%. Para el cálculo de la prevalencia de infección por *C. trachomatis* en puérperas de Gipuzkoa en función de su origen (español o extranjero), y debido a que este dato no fue recogido individualmente más que en las mujeres *C. trachomatis*-positivo, se obtuvo el origen de las parturientas atendidas en Gipuzkoa en 2011-2013 (Instituto Vasco de Estadística), en forma de datos agregados por edad (ej. 15-19 años, 20-24 años...), siendo los correspondientes porcentajes extrapolados a las parturientas del estudio *C. trachomatis*-negativo.

4.7.2. Estadística analítica

Se usaron pruebas de Chi-cuadrado para la comparación de proporciones (variables cualitativas), aplicando la corrección de Fisher de dos colas en caso necesario, y pruebas de comparación de medias paramétricas y no paramétricas (análisis de la varianza, U de Mann-Whitney) para variables cuantitativas (ej. edad), considerándose significativos valores de $p < 0,05$.

Para analizar la relación entre el rendimiento del genotipado y su asociación con las variables estudiadas (ciclo de amplificación, tipo de muestra...), aquellas variables que en el análisis univariante obtuvieron un valor de $p < 0,20$ fueron introducidas en un análisis multivariante mediante regresión logística binomial. Una estrategia similar se empleó para analizar la relación entre la distribución de genotipos y su asociación con

Material y métodos

las variables estudiadas, utilizando el análisis de regresión logística multinomial. El análisis multivariante se realizó en la Unidad de Apoyo Estadístico del Instituto de Investigación Biodonostia. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4.8. Ética

Los estudios de prevalencia de infección por *C. trachomatis* en gestantes y de genotipado fueron autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Donostia (Actas 9/2010 de fecha 20 de octubre de 2010 y 10/2013 de fecha 20 de noviembre de 2013, respectivamente). El resto de los datos obtenidos en esta tesis provienen de la rutina diagnóstica del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia.

5. RESULTADOS

5.1. Cribado de la infección en puérperas de Gipuzkoa (entre 2011 y junio de 2015)

5.1.1. Datos de prevalencia globales, por periodos, grupos de edad y país de origen

5.1.1.1. Características de la muestra de la población seleccionada

Se obtuvieron muestras de 13.629 puérperas (mediana de edad 33 años, rango 14-54), lo que representó el 76,3% de las puérperas atendidas en nuestro hospital durante el periodo de estudio (n=17.862). La tasa de respuesta del estudio fue 54% en 2011 debido a dificultades en la puesta en marcha del protocolo (formación del personal de todos los turnos, coordinación...) y 83,2% el periodo restante. La principal causa de no participación en el estudio se debió a muestras directamente rechazadas en la planta por ser muy hematóricas sin tiempo para recoger una segunda muestra en mujeres que se iban de alta en menos de 48 horas tras el parto. El resultado fue inválido en 596/13.629 (4,4%) de las muestras finalmente remitidas al laboratorio, fundamentalmente por inhibición del control interno en muestras de orina con hematíes, a pesar de repetir la muestra diluida.

5.1.1.2. Resultados de prevalencia

C. trachomatis fue detectada en 132/13.033 (1,0%) mujeres, prevalencia global estandarizada por edad 0,9% (IC95% 0,8-1,1%) (tabla 12). La mediana de edad en las

Resultados

mujeres *C. trachomatis* positivas fue de 28 años, rango 17-43. La prevalencia detectada a lo largo de los años de estudio fue similar (sin diferencias significativas): 1,2% (27/2.175) en el primer año, 1,0% (34/3.433) en el segundo, 0,8% (25/3.021) en el tercero, 1,1% (35/3.058) en el cuarto, y 0,8 (11/1.346) en el quinto (Chi cuadrado con 4 grados de libertad, $p=0,52$).

Tabla 12. Prevalencia de infección por *C. trachomatis* en puérperas de Gipuzkoa (2011-15), según la edad y país de nacimiento.

Edad (años)	Total			Nativas			Inmigrantes			p
	Nº	CT+ (%)	(IC 95%)	Nº ^(a)	CT+ (%)	(IC 95%)	Nº ^(a)	CT+ (%)	(IC 95%)	
<25	666	39 (5,9) ^(b)	(4,3-7,9)	276	15 (5,4)	(3,2-8,8)	390	24 (6,2)	(4,2-9,0)	0,697
25-29	1.995	38 (1,9)	(1,4-2,6)	1.291	16 (1,2)	(0,8-2,0)	704	22 (3,1)	(2,1-4,7)	0,003
30-34	5.234	31 (0,6)	(0,4-0,8)	4.517	23 (0,5)	(0,3-0,8)	717	8 (1,1)	(0,6-2,2)	0,049
≥35	5.138	24 (0,5)	(0,3-0,7)	4.568	18 (0,4)	(0,3-0,6)	570	6 (1,1)	(0,5-2,2)	0,030
Total	13.033	132 (1,0) ^(c)	(0,8-1,2)	10.652	72 (0,7) ^(c)	(0,5-0,9)	2.381	60 (2,5) ^(c)	(2,0-3,2)	<0,001

CT+: puérperas *C. trachomatis*-positivas

^(a) El número de mujeres nacidas en España (nativas) o en otros países (inmigrantes) fue estimado en base a un muestreo estratificado aleatorio efectuado entre las que dieron a luz en el Hospital Universitario Donostia durante el periodo de estudio (ver detalles en el apartado 4.3.1.). El origen de las mujeres *Chlamydia* positivas fue obtenido en la consulta personal realizada para la obtención de datos clínico-epidemiológicos, tratamiento y consejo de control de los recién nacidos y sus contactos.

^(b) Prevalencia 9,1% (IC95% 5,4-14,9%) (13/143) en <20 años y 5,0% (IC95% 3,4-7,2%) (26/523) en las de 20-24 años.

^(c) Prevalencia ajustada por edad 0,9% (IC95% 0,8-1,1%) para el grupo total, siendo de 0,6% (IC95% 0,5-0,8%) y 2,6% (IC95% 1,9-3,2%) para las mujeres nacidas en España (nativas) y en otros países (inmigrantes), respectivamente (Chi cuadrado = 25,39; $p<0,001$).

Por edad, la prevalencia de infección fue mayor en las mujeres más jóvenes, siendo 5,9% en las menores de 25 años (9,1% en las <20 y 5,0% en las de 20-24), y descendiendo al aumentar la edad: 1,9% en las de 25-29 años y 0,5% en mujeres de 30 o más años de edad ($p<0,001$). Las mujeres de menos de 25 y menos de 30 años de edad supusieron el 5,1% y el 20,4% de las puérperas, pero representaron el 29,5% y el 58,3% de los casos detectados respectivamente. La prevalencia fue mayor en mujeres de origen extranjero que en españolas en general (2,5% versus 0,7%, $p<0,001$) y en todos los grupos de edad (tabla 12). El grupo principal de mujeres inmigrantes fue el de origen

latinoamericano, que estimamos representó el 7,9% del total de mujeres estudiadas y el 43% de las de origen extranjero, y supuso el 36,4% y 80% (n=48) de las mujeres positivas a *C. trachomatis* de ambos grupos, respectivamente (tabla 13). No se detectó en ninguna puerpera infección por *Neisseria gonorrhoeae* ni *Treponema pallidum*, aunque 32 mujeres (0,2%) (una de ellas *Chlamydia* positiva) tenía una historia de sífilis (CMIA/FTA-Abs positivo). Nueve mujeres (0,05%) tuvieron infección por VIH pero ninguna de las cuales estuvo coinfectada con *C. trachomatis*. Durante el periodo de estudio 585 mujeres tuvieron más de un parto, presentando cinco de ellas infección por *C. trachomatis*: tres de ellas estaban infectadas en el primer parto, pero no en el segundo, en la cuarta se detectó la infección en el segundo parto, y en la quinta la infección se detectó en los dos embarazos, que fueron no controlados y no habiendo acudido la paciente para recibir su tratamiento ni para el control y seguimiento neonatal tras el primer parto.

Tabla 13. Prevalencia estimada de infección por *C. trachomatis* en puérperas de Gipuzkoa (2011-2015), según el país de nacimiento.

Nacimiento	Nº	CT+	(%)	(IC 95%)	p
Latinoamérica	1.024	48	4,7	3,6-6,2	<0,001
Otros países*	1.358	12	0,9	0,5-1,5	
España	10.652	72	0,7	0,5-0,9	
Total	13.033	132	1,0	0,8-1,2	

CT+: puérperas *C. trachomatis*-positivas

La mediana de edad fue 25 años en mujeres latinoamericanas y 30 años en mujeres españolas y de otros países

* En puérperas norteafricanas, principal grupo de mujeres de origen extranjero si excluimos las latinoamericanas, la prevalencia estimada fue 0,8% (4/471, IC95% 0,3-2,2%)

Resultados

5.1.2. Características clínico-epidemiológicas de los casos positivos

Entre las principales características clínico-epidemiológicas analizadas (tabla 14), destaca que solo dos puérperas *C. trachomatis* positivas tuvieron síntomas atribuibles a la infección durante la gestación (una mujer con cervicitis en la semana 25 y otra con disuria, leucocituria y urocultivo negativo en la semana 36). Otras cuatro mujeres presentaron síntomas inespecíficos de dudosa interpretación (prurito vulvovaginal y/o secreción vaginal).

Tabla 14. Características clínico epidemiológicas de las 132 puérperas con infección por *C. trachomatis* detectadas en el HUD (2011-15).

VARIABLES	Nº (%)
Origen español	72 (54,5)
Origen extranjero	60 (45,5)
- Origen latino	48 (36,4)
- Otros orígenes	12 (9,1)
Primíparas	68 (51,5)
Antecedente aborto	40 (30,3)
Síntomas ITS durante gestación	2-6 (1,5-4,5)
Rotura prematura de membranas	40 (30,3)
Parto pretérmino (<37sem)*	9 (6,9)
Parto postérmino (≥42 semanas)*	5 (3,8)
Recién nacidos de bajo peso (<2.500g)*	7 (5,4)

*Excluidos 2 partos gemelares

5.1.3. Complicaciones gestacionales

Entre octubre de 2010 y abril de 2012 se investigó en 3.318 partos (excluyendo partos gemelares) la asociación entre prematuridad y bajo peso al nacer con la infección por *C. trachomatis* (tabla 15). Fueron pretérmino 193 (5,8%) partos (6,1% prematuridad referida por EUSTAT en la CAPV en 2013) y 150 (4,2%) recién nacidos tuvieron bajo peso. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el bajo peso al nacer ni la prematuridad en general (parto antes de la semana 37 de gestación), pero se

obtuvo significación estadística entre la infección por *C. trachomatis* y los partos de prematuros menores de 35 semanas ($p=0,05$), debido a la diferencia existente en el grupo de 33-34 semanas ($p=0,015$).

Tabla 15. Análisis de la asociación entre la infección por *C. trachomatis* y complicaciones gestacionales (prematuridad y recién nacido de bajo peso).

Complicación gestacional	Infección por <i>C. trachomatis</i>		Prueba exacta de Fisher (p)
	Sí	No	
Prematuridad (semana gestacional):			
<37	4	189	0,331
≥37	41	3084	
<35	3	60	0,053*
≥35	42	3213	
<32	0	17	1
≥32	45	3256	
33-34	3	36	0,015**
resto	42	3237	
Recién nacido de bajo peso (gramos):			
<2.500	1	149	0,721
≥2.500	44	3124	

*, **: odds ratio 3,83 (IC95% 0,74-12,50) y 6,42 (IC95% 1,22-21,59), respectivamente

Otras complicaciones gestacionales no pudieron ser analizadas adecuadamente por la heterogeneidad en la recogida de datos clínico-epidemiológicos durante el periodo de estudio (atribución de código de alta, diferencias de criterio entre facultativos en la definición de la complicación, etc.).

5.1.4. Transmisión vertical

Acudieron a la revisión pediátrica 103 niños, detectándose *C. trachomatis* en 11 (10,7%), cinco varones y seis mujeres (tabla 16). El porcentaje de transmisión vertical fue del 15,5% (11/71) si se excluyen partos por cesárea y/o que recibieron tratamiento antibiótico en las 48 horas previas con betalactámicos (por fiebre intraparto o profilaxis

Resultados

en portadoras de *S. agalactiae*), con actividad frente a *Chlamydia*. Pese a la profilaxis de Credé realizada por protocolo en todos los recién nacidos (hidrocloruro de clortetraciclina o tobramicina en nuestro hospital), cuatro de los 11 niños infectados (3,9% del total de vigilados) presentaron conjuntivitis (en uno de ellos asociada a un cuadro catarral), que se resolvió en tres de ellos tempranamente tras el tratamiento antibiótico. En el cuarto caso, la sintomatología fue persistente, detectándose *C. trachomatis* durante dos meses. Ninguno de los niños infectados nació por cesárea, ni era pretérmino (<35 semanas) ni de bajo peso (<2.500 g), ni su madre durante el parto o en el mes previo recibió tratamiento antibiótico por otras causas (vs 30/92, p=0,03) (tabla 16). No se observó mayor transmisión perinatal en púerperas más jóvenes, ni en primíparas, ni en partos con RPM o atendidos con fórceps o ventosa. La distribución de los genotipos en las madres fue similar a la referida en la población (predominio del genotipo E, seguido de D y F) y ninguno se asoció a una mayor transmisión vertical. Un análisis semicuantitativo de la carga bacteriana en orina en función de los ciclos de amplificación no encontró diferencias entre las madres que transmitieron *C. trachomatis* a sus hijos y las que no (ciclo medio $33,5 \pm 3,4$ vs $34,7 \pm 3,4$, U de Mann-Whitney p=0,29).

Por otra parte, durante 2013 y 2014, para descartar posibles infecciones sintomáticas que pudieran haber escapado al cribado de infección vertical, se investigó la presencia de *C. trachomatis* en 152/380 exudados conjuntivales de niños menores de 1 mes con conjuntivitis recibidos en nuestro laboratorio, mayoritariamente negativos para los patógenos bacterianos habituales, no detectándose ningún caso positivo.

Resultados

Tabla 16. Características clínicas en la transmisión vertical de *C. trachomatis*: 103 casos de exposición, HUD (oct/2010-sep/2015).

Características clínicas	Transmisión vertical		Prueba exacta de Fisher (p)
	Si	No	
<u>Antibióterapia preparto*:</u>			0,03**
Si	0	30	
No	11	62	
<u>Parto:</u>			0,35
Cesárea	0	13	
Vaginal	11	79	
<u>Semana gestacional:</u>			1
<35	0	4	
≥35	11	88	
<u>Peso recién nacido:</u>			0,60
<2.500g	0	7	
≥2.500g	11	85	
<u>Edad puérperas:</u>			0,35
<25	6	36	
≥25	5	56	
<u>Primípara (1):</u>			0,45
Si	4	49	
No	7	43	
<u>Rotura prematura membranas (2):</u>			0,28
Si	1	26	
No	10	66	
<u>Parto fórceps/ventosa (3):</u>			1
Si	1	10	
No	10	82	
<u>(1)/(2)/(3):</u>			0,19
Si	5	62	
No	6	30	
<u>Genotipos:</u>			
E	5	34	1
F	2	10	0,64
D	0	9	0,36
J	0	7	0,59
G	1	6	1
Resto	2	5	0,21

* Betalactámico <48 horas preparto

** p = 0,11 si se excluyen partos por cesárea (0/20 vs 11/59)

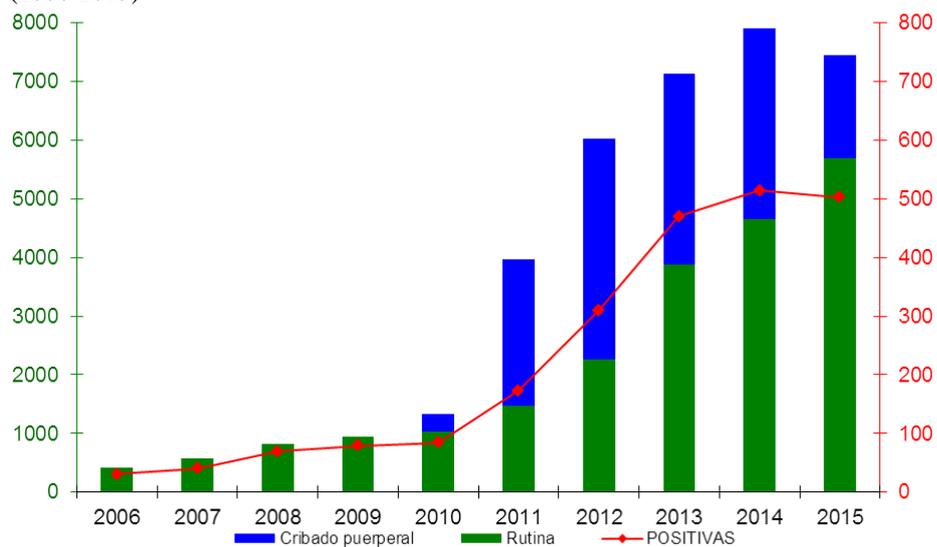
5.2. Impacto e incidencia de la infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa

5.2.1. Análisis de la demanda diagnóstica

5.2.1.1. Demanda diagnóstica por periodos

En Gipuzkoa, la demanda diagnóstica para la detección de *C. trachomatis* en pacientes con cuadros clínicos sospechosos de ITS o condiciones de riesgo para estas infecciones ha experimentado un notable incremento desde la introducción de métodos moleculares para su diagnóstico en nuestro laboratorio, observándose un salto importante en el año 2011 en que se añadió a la rutina diagnóstica (ya en ascenso) el cribado de la infección en puérperas (figura 28).

Figura 28. Número de muestras procesadas (rutina y cribado puerperal) y muestras positivas a *C. trachomatis* mediante TAAN en el Servicio de Microbiología del HUD (2006-2015).



Resultados

De 2006 a 2015, se procesaron un total de 36.529 muestras correspondientes a 28.662 episodios de infección (tabla 17), registrándose un total de 2.266 (6,2%) muestras y 1.578 (5,5%) episodios positivos, respectivamente. Se consideró un mismo episodio a muestras de un paciente obtenidas en el plazo de 6 meses, salvo que en ese plazo un paciente tuviera inicialmente una muestra negativa y posteriormente otra positiva, o dos positivas con genotipos distintos, en que se atribuyó a un episodio diferente.

Tabla 17. Muestras y episodios analizados y positivos (número y porcentaje) a *C. trachomatis* en el Servicio de Microbiología del HUD (2006-2015).

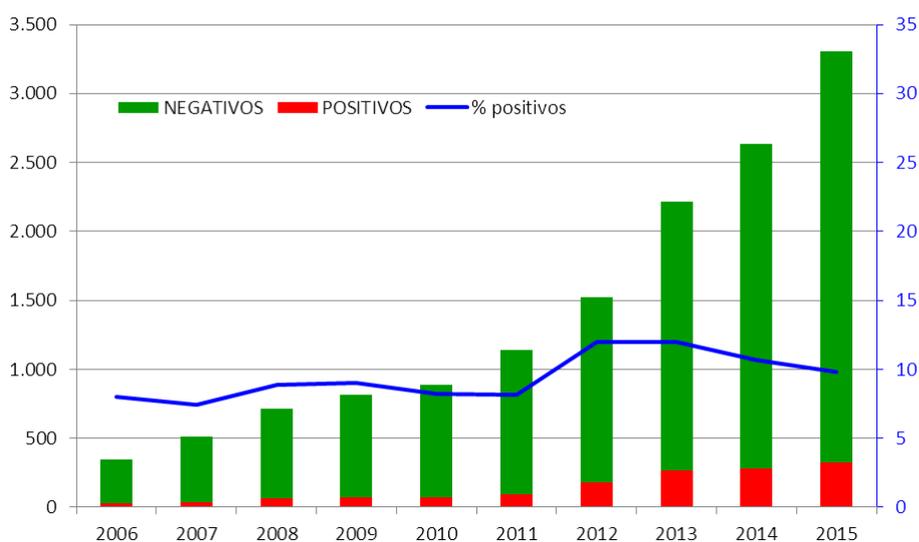
Años	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Muestras (n°)	409	576	819	944	1.344	3.967	6.019	7.136	7.913	7.412	36.529
Positivas (n°)	31	40	69	79	84	173	310	470	514	496	2.266
Positivas (%)	7,6	6,9	8,4	8,4	6,3	4,4	5,2	6,6	6,5	6,7	6,2
Episodios (n°)	349	511	712	812	1.180	3.553	5.235	5.410	5.838	5.062	28.662
Positivos (n°)	28	38	63	73	76	125	219	293	322	341	1.578
Positivos (%)	8,0	7,4	8,8	9,0	6,4	3,5	4,2	5,4	5,5	6,7	5,5

El incremento en el número de muestras y/o episodios analizados ha repercutido en el porcentaje de positivos, siendo conveniente, para tener una mejor visión de la evolución de la demanda diagnóstica, analizar la variación en el origen de las muestras por servicios, tipo de muestra, sexo y edad de los pacientes, etc. En general, el porcentaje de episodios positivos procedentes de la rutina diagnóstica (excluyendo el cribado puerperal) osciló poco en 2006-2011 (entre el 7,4% y el 9,0%; $p=0,3$) y en 2012-2014 (entre el 10,7% y el 12,0%; $p=0,03$), observándose una diferencia entre ambos periodos ($p<0,001$) debida a la introducción desde 2012 en la rutina diagnóstica de la búsqueda de *C. trachomatis* en orina de varones con probable uretritis diagnosticadas presuntivamente como ITU en Atención Primaria (figura 29 y 30), ya que la diferencia en el porcentaje de positivos en Atención Primaria entre los dos periodos fue estadísticamente significativa (17,5% vs 22,7%; $p=0,04$) mientras que en el resto de

Resultados

especialidades no (7,6% vs 8,0%; $p=0,45$). En 2015 el porcentaje de episodios positivos en los pacientes procedentes de Atención Primaria y atendidos en el Servicio de Microbiología descendió del 20% (2014) al 15% (2015) debido al aumento en el número de pacientes infectados que acudieron al control a los 4 meses (representando un 9% vs 19% de los estudiados en ambos años, respectivamente) para comprobar la erradicación de la infección y la ausencia de reinfección.

Figura 29. Número de episodios con sospecha de infección por *C. trachomatis* de la rutina diagnóstica analizados (eje principal) y porcentaje de positivos (eje secundario), HUD (2006-15).



5.2.1.2. Demanda diagnóstica por servicios peticionarios

Si analizamos la demanda en función del Servicio que realiza la petición, se observa un aumento en todos ellos (tabla 18). El incremento de la demanda en el periodo 2011-2015 fue el 45% en las consultas de ETS, el 348% en Ginecología, el 1.370% en Atención Primaria y el 373% en el resto de especialidades.

Resultados

Tabla 18. Número de episodios con sospecha de infección o exposición a *C. trachomatis* analizados por servicio peticionario, HUD (2006-15).

Episodios	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Consulta ETS	188	309	442	483	501	453	497	642	577	618	4.710
Ginecología	95	113	175	213	247	433	577	803	922	1.042	4.620
Atención Primaria	20	27	33	49	58	144	266	480	742	1.117	2.936
Resto especialidades	46	62	62	67	83	107	184	287	392	532	1.822
Cribado gestacional	0	0	0	0	291	2.416	3.711	3.198	3.205	1.753	14.574
Total	349	511	712	812	1.180	3.553	5.235	5.410	5.838	5.062	28.662

Además, el inicio del cribado de infección por *C. trachomatis* en gestantes que acudían a dar a luz al HUD desde octubre de 2010 ha supuesto un considerable incremento adicional, representando un 54% de los episodios analizados en 2014. Otro aspecto que ha contribuido al aumento global de la demanda en la rutina diagnóstica de los últimos años es el mayor número de muestras obtenidas por episodio, que ha pasado de 1,2 en el periodo 2006-09 a 1,7 en el 2013-15 (tabla 19).

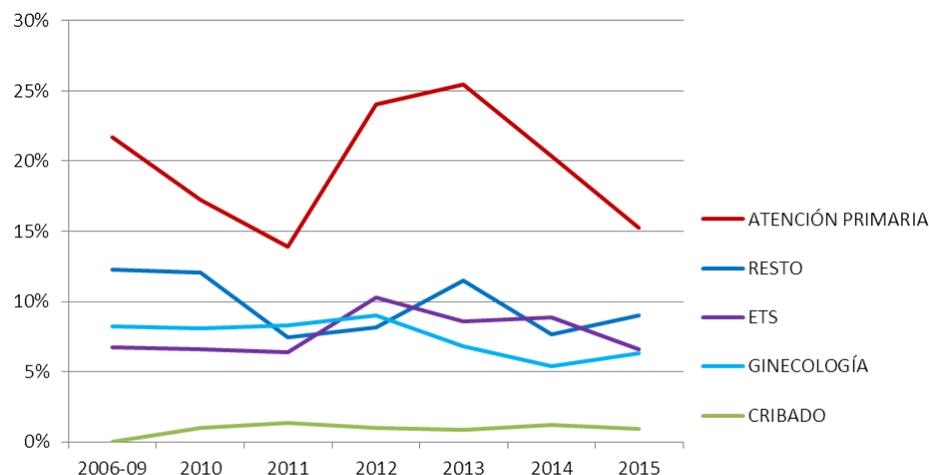
Tabla 19. Número de muestras analizadas por episodio de sospecha de infección por *C. trachomatis* en la rutina diagnóstica, HUD (2006-15).

Muestras/episodio	2006-09	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Atención Primaria	1,1	1,2	1,7	2,1	2,5	2,5	2,1	2,2
Consulta ETS	1,2	1,2	1,3	1,6	2,1	2,1	2,1	1,6
Resto especialidades	1,1	1,1	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,3
Ginecología	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1
Total	1,2	1,2	1,3	1,5	1,8	1,8	1,7	1,5

El porcentaje de episodios positivos fue diferente en función del grupo de servicios peticionarios, desde el 1% en el cribado gestacional al 15-25% en Atención Primaria (consultas que derivan principalmente varones con sospecha de ETS), siendo del 6-12% en las demás especialidades (principalmente consultas de ETS, Ginecología y Urología), en las que con frecuencia también se solicita esta prueba ante sospecha de exposición o factores de riesgo (figura 30).

Resultados

Figura 30. Porcentaje de episodios *C. trachomatis* positivos por servicio peticionario, HUD (2006-15).



5.2.1.3. Demanda diagnóstica por tipo de muestra

Para el diagnóstico de la infección por *C. trachomatis* se procesaron varios tipos de muestras según la probable localización anatómica de la infección, o como complemento de la valoración de pacientes con posible exposición a *C. trachomatis* (ej. toma faríngea, conjuntival, rectal...) (tabla 20).

Tabla 20. Total muestras analizadas (sospecha de infección y cribado gestacional). Número estudiado y positivas por localización anatómica, HUD (2006-2015).

Muestras	Número	Positivas (n°)	Positivas (%)
Genital ♀*	8.474	699	8,2
Genital ♂**	6.209	696	11,2
Orina (excepto cribado gestacional)***	2.658	551	20,7
Rectal	1.253	87	6,9
Conjuntival	503	26	5,2
Faríngea	2.848	61	2,1
Biopsia/absceso	114	6	5,3
Orina (cribado gestacional)	14.470	140	1,0
Total	36.529	2.266	6,2 (9,6% sin cribado)

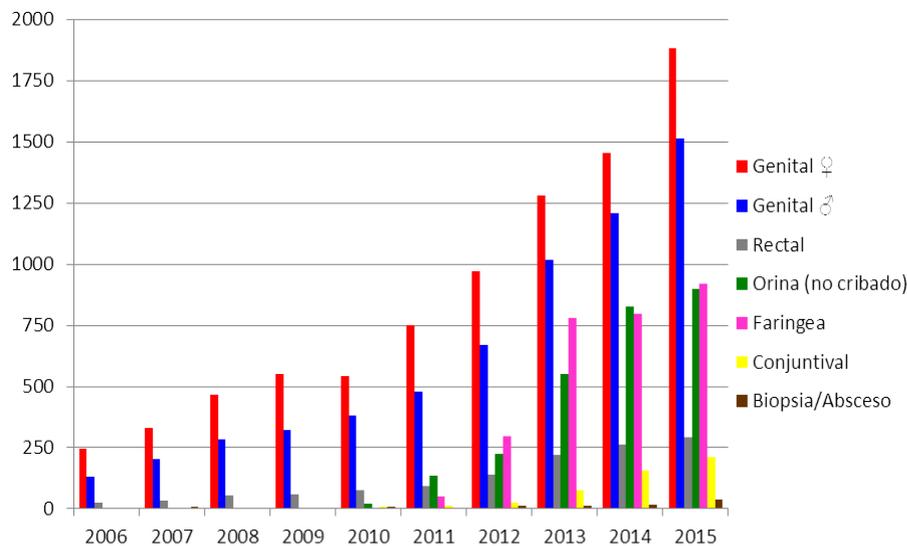
* Cervical (80%), vaginal (19,2%), DIU (0,6%), vulvar (0,2%)

** Uretral (90,7%), semen (8,6%), balanoprepucial (0,7%)

*** En su mayor parte (75%) varones con uretritis procedentes de Atención Primaria

Excluyendo las muestras de orina procedentes del cribado gestacional (octubre/10 – septiembre/15), se observa que a lo largo de los años de estudio el incremento en el número de muestras procesadas de todos los tipos es gradual, si bien en los años 2013-15 hay un aumento marcado en el número de muestras de orina y faríngeas (figura 31).

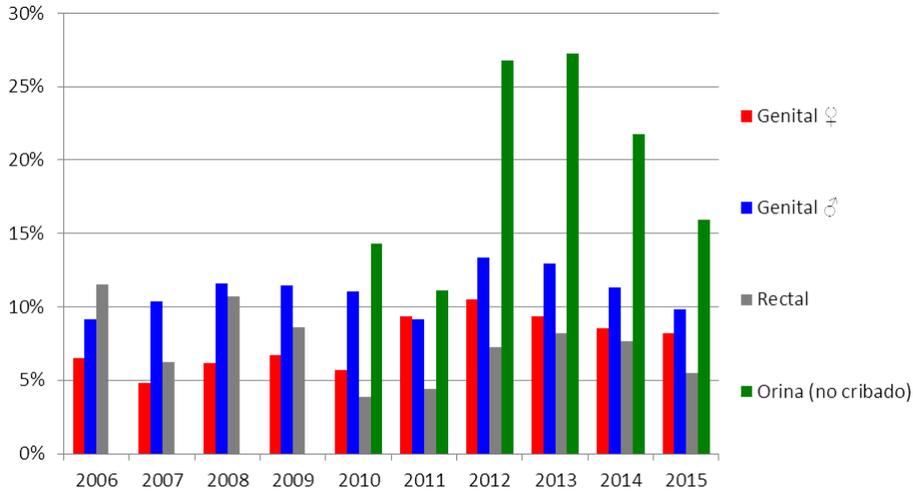
Figura 31. Número de muestras según el tipo de muestra procesadas con sospecha de infección por *C. trachomatis*, HUD (2006-2015).



El porcentaje de muestras positivas ha sido similar a lo largo de los años, entre el 6-12% según los principales tipos de muestra analizada. La introducción de la muestra orina para la detección de *C. trachomatis* en el 2010 (excluyendo las del cribado gestacional) y fundamentalmente su búsqueda activa en varones con piuria y urocultivo negativo, a partir del 2012, ha contribuido al aumento en el porcentaje de muestras positivas (figura 32).

Resultados

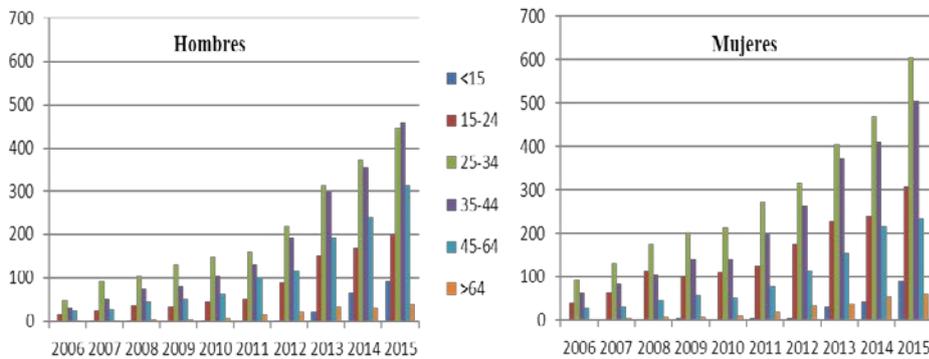
Figura 32. Porcentaje de muestras positivas según los principales tipos de muestras analizadas con sospecha de infección por *C. trachomatis*, HUD (2006-2015).



5.2.1.4. Demanda diagnóstica por sexo y edad

A lo largo de los años de estudio se observó un aumento progresivo del número de muestras analizadas de pacientes con sospecha de infección por *C. trachomatis*, independientemente del sexo y grupos de edades, siendo mayor el número de muestras analizadas en mujeres y en los grupos de edad de 25-34 y 35-44 años (figura 33).

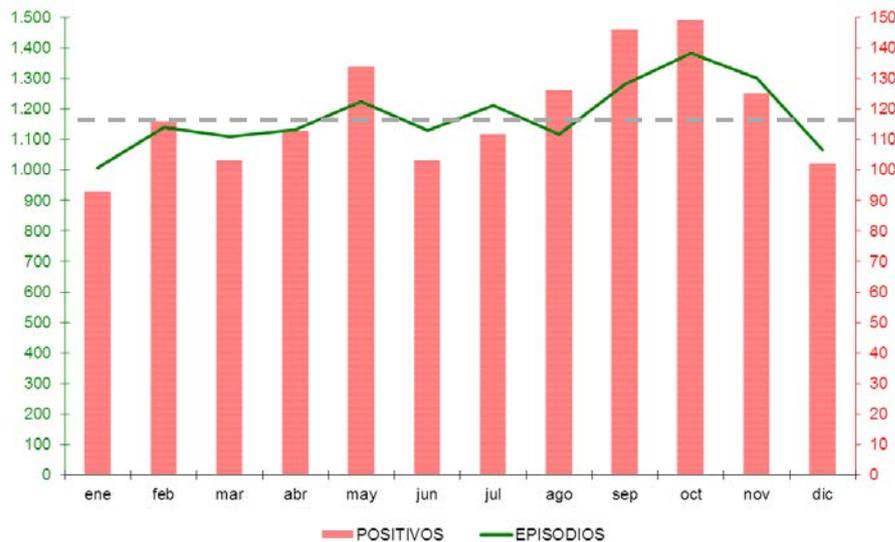
Figura 33. Número de muestras por sexo y grupos de edad analizadas con sospecha de infección por *C. trachomatis*, HUD (2006-2015).



5.2.1.5. Estacionalidad de la demanda (n° de muestras analizadas y positivas por mes)

El número de episodios analizados por sospecha de infección y el de *C. trachomatis*-positivos fue mayor en los meses de febrero, mayo, y agosto-noviembre, sugiriendo una mayor estacionalidad de la infección en los meses vacacionales (figura 34).

Figura 34. Número de episodios por meses con sospecha de infección por *C. trachomatis* analizados (eje principal) y positivos (eje secundario)*, HUD (2006-2015).



* La línea gris representa la media mensual de episodios positivos

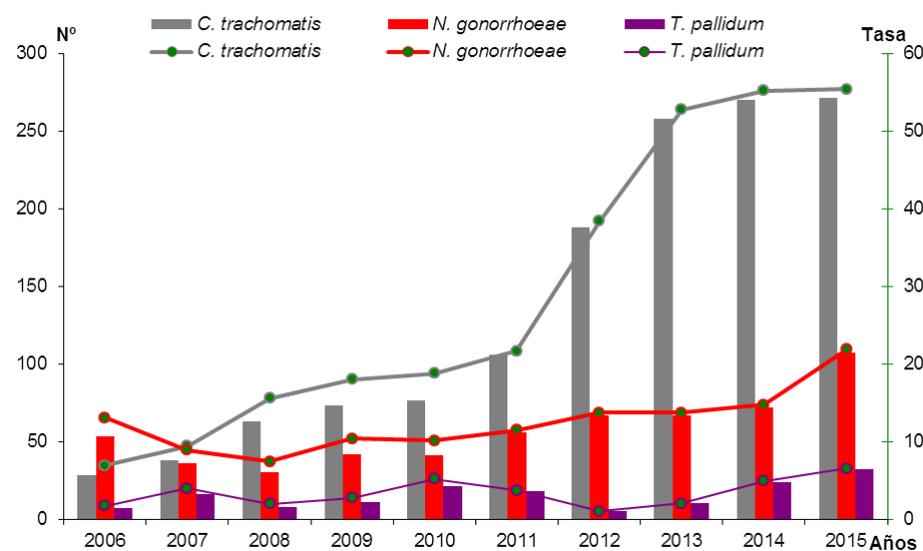
5.2.2. Análisis de la incidencia (casos nuevos/100.000 habitantes) de infección por *C. trachomatis* en la población objeto de estudio por sexo y grupos de edad, periodos y comarcas

En el conjunto de muestras analizadas por sospecha de ITS debida a *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* o *T. pallidum* en pacientes atendidos por el HUD entre los años 2006-15 se

Resultados

observó que *C. trachomatis* fue el agente que presentó mayor incidencia y en el que ésta sufrió un mayor incremento los últimos años (figura 35).

Figura 35. Incidencia de infección por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum* en el HUD*: n° casos y tasa/100.000 (2006-15).



* Datos referidos a la OSI Donostialdea

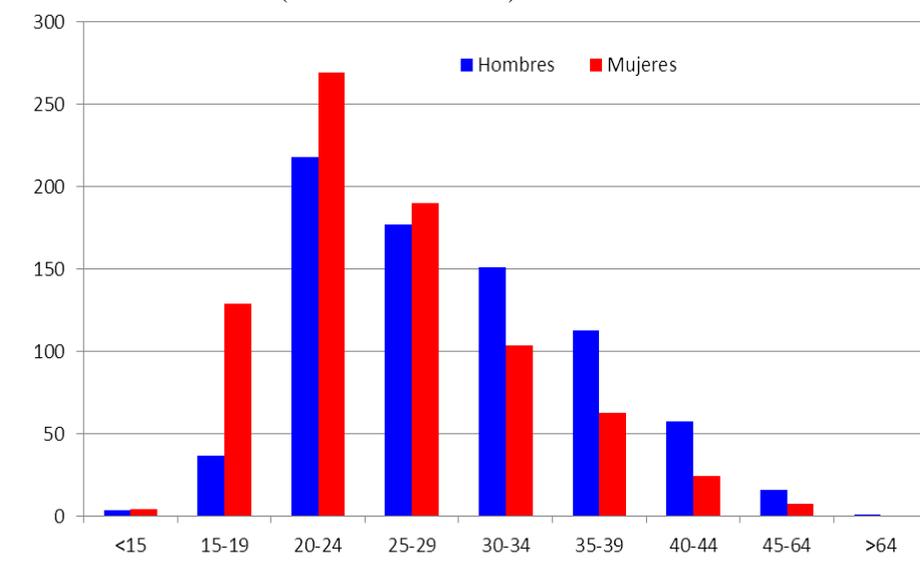
Referido a la población objeto de estudio (Gipuzkoa excluyendo la OSI Alto Deba), la incidencia media anual de infección por *C. trachomatis* en los tres últimos años de estudio (2013-15) fue de 50,0 casos nuevos/100.000 habitantes (tabla 21). En general, fue mayor en hombres (55,2/100.000) que en mujeres (45,0/100.000) y en población con menos de 30 años de edad (88,9/100.000) que en mayores de 30 años (34,0/100.000).

Tabla 21. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por grupos de edad y sexo: casos/100.000 habitantes (media anual 2013-15).

Edad (años)	Hombres	Mujeres	Total
<30	76,6	101,8	88,9
≥30	45,8	23,1	34,0
Total	55,2	45,0	50,0

Por sexos, hasta los 30 años de edad la incidencia fue mayor en mujeres (101,8/100.000) que en hombres (76,6/100.000); pero a partir de los 30 años, la incidencia fue mayor en hombres (45,8/100.000) que en mujeres (23,1/100.000). Por edades, la máxima incidencia se observó en el grupo de 20-24 años (269,3/100.000 en mujeres y 218,2/100.000 en hombres). A partir de los 25 años la incidencia descendió con la edad en ambos sexos (figura 36).

Figura 36. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por grupos de edad y sexo: casos/100.000 habitantes (media anual 2013-15).

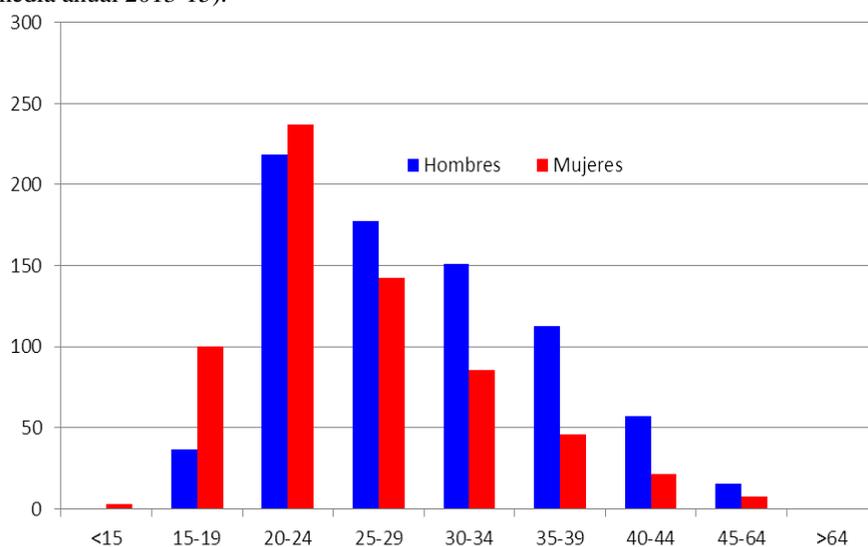


El cribado de infección realizado en puérperas permitió detectar casos asintomáticos, sin lo cual la incidencia observada en mujeres hubiera sido algo menor, aunque sin llegar a

Resultados

alterar la distribución mencionada en la tabla 21: en menores de 30 años 78,6/100.000, más elevada en mujeres (82,3/100.000 vs. 75,1/100.000 en hombres); y en mayores de 30 años 31,9/100.000, más elevada en varones (45,8/100.000 vs. 19,1/100.000 en mujeres). En este caso la incidencia es mayor en hombres que en mujeres a partir de los 25 años (figura 37).

Figura 37. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por grupos de edad y sexo excluyendo los casos detectados en el cribado puerperal: casos/100.000 habitantes (media anual 2013-15).



Por periodos, a lo largo del estudio la incidencia fue aumentando progresivamente y especialmente en los últimos 3-4 años en los grupos de edad jóvenes (figura 38) y en hombres respecto a mujeres (figura 39).

Figura 38. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por grupos de edad: casos/100.000 habitantes (2006-2015).

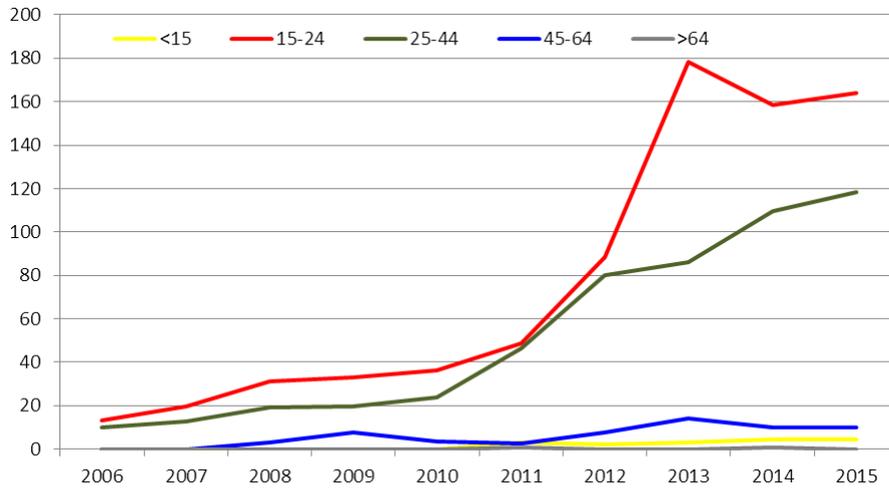
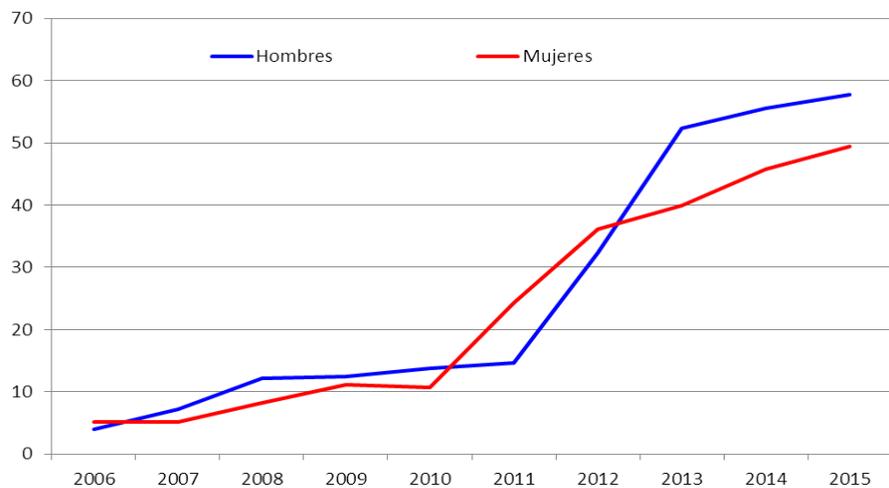


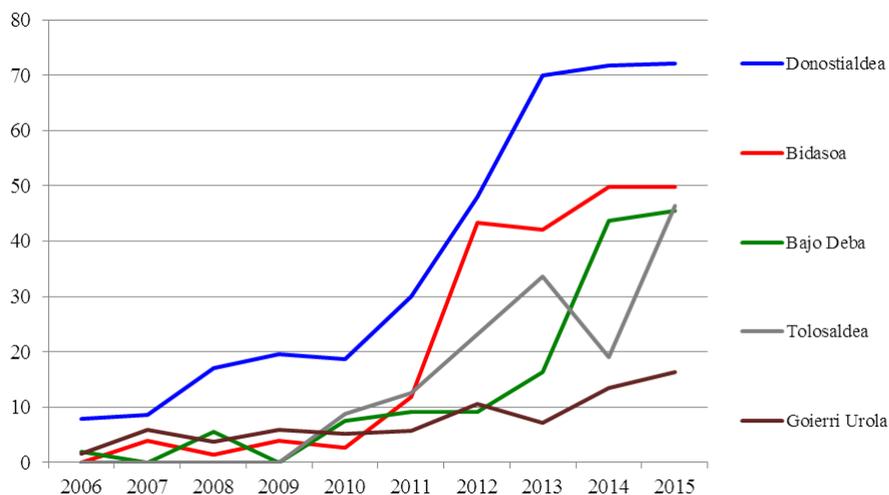
Figura 39. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por sexo: casos/100.000 habitantes (2006-2015).



Por comarcas, también se observa un incremento generalizado en la incidencia (figura 40), siendo más elevada en Donostialdea con una media anual en 2013-15 de 71,2 casos/100.000, mayor en varones (81,5 casos/100.000) que en mujeres (61,8/100.000), y máxima en mujeres de 20-24 años (405,9/100.000).

Resultados

Figura 40. Infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa por comarcas: casos/100.000 habitantes (2006-2015).



5.3. Papel de *C. trachomatis* en cuadros de enfermedades de transmisión sexual y en relación a otros agentes causantes de infecciones de transmisión sexual

5.3.1. Varones con síndrome uretral

5.3.1.1. Síndrome uretral sospechado clínicamente

Durante 2013, se analizó prospectivamente la presencia de ADN de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (Cobas 4800-CT/NG, Roche) en 122 episodios de sospecha clínica de síndrome uretral ocurridos en 113 varones (mediana de edad 34 años, rango 16-74). Se investigó además en todos ellos la presencia de bacterias como *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus* spp, *Gardnerella vaginalis*, etc. mediante cultivo convencional en medios habituales de crecimiento. En 69 casos (59 con presencia de leucocitos en la tinción de

gram) se dispuso de material sobrante, analizándose retrospectivamente mediante otra TAAN (AnyplexII STI-7, Seegene) la presencia de ADN de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Trichomonas vaginalis*. En función de la historia y la sintomatología en cada caso, se estudió la presencia de otros patógenos potenciales causantes de ITS utilizando las técnicas disponibles en el laboratorio: papilomavirus humano, virus herpes simplex, adenovirus...

De los 122 episodios con sospecha clínica de síndrome uretral (tabla 22), en 32 (26,2%) no se observaron leucocitos en la tinción de Gram del exudado uretral ni en el sedimento de la primera fracción de la micción a pesar de haberse obtenido las muestras adecuadamente. Tras la valoración de la historia clínica, exploración física y resultados de las pruebas realizadas, la sintomatología en una amplia mayoría de estos casos fue finalmente atribuida a una variedad de causas no infecciosas o no filiadas entre las que destacaron: control de uretritis previas con persistencia o recurrencia de síntomas (n=10), litiasis (n=6), alteraciones anatómicas del TGU (n=3) y venereofobia (n=3). Solo en uno de los 32 pacientes (3%) se detectó algún microorganismo considerado patógeno reconocido del TGU, concretamente en un caso virus herpes simplex tipo 1; además se detectaron tres microorganismos ocasionalmente relacionados con uretritis infecciosa: *Gardnerella vaginalis* (dos casos) y *Actinomyces urogenitalis* (un caso).

Tabla 22. Episodios con sospecha clínica de síndrome uretral, HUD (2013).

Etiología	Leucocitos		Total (%)
	Presencia	Ausencia	
Infecciosa	77*	4	81 (66,4)
No infecciosa	0	12	12 (9,8)
Sin filiar	13	16	29 (23,8)
Total	90	32	122

* 6 casos por microorganismos causantes de ITU

Resultados

Los restantes 90 casos, en los que además de la sintomatología de síndrome uretral se detectaron leucocitos en el exudado uretral y/o en el sedimento urinario, conformaron el grupo considerado de probable uretritis infecciosa y sus resultados se ofrecen a continuación (tabla 23). En conjunto, en 77 (85,6%) episodios se detectó algún microorganismo considerado como reconocido o potencial causante de uretritis. Entre los reconocidos patógenos asociados con uretritis infecciosa en el varón, *C. trachomatis* fue el más frecuente (31,1%, 23% del total de episodios con sospecha clínica inicial de síndrome uretral [28/122]), seguido de *N. gonorrhoeae* (14,4%) y *M. genitalium* (13,6%). Por otra parte, *U. urealyticum*, considerado como causa potencial de uretritis se detectó en 11/59 (18,6%) casos. Además, se detectaron otros microorganismos que han sido considerados con anterioridad causantes ocasionales de cuadros de uretritis, destacando entre ellos los del género *Haemophilus* (*H. parainfluenzae* 7; *H. influenzae* 3). Cuatro de los diez aislamientos de este género fueron considerados causantes del cuadro en base a los hallazgos de la tinción de Gram, cultivo abundante y ausencia de otros patógenos. En 14/59 (23,7%) episodios del grupo de probable uretritis infecciosa cuya etiología se estudió en profundidad, no se detectó ningún reconocido patógeno de uretritis infecciosa en varones (considerando *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y también *U. urealyticum*) y en 8/59 (13,6%) tampoco ninguno potencialmente causante del cuadro clínico (*Haemophilus* spp., etc.). La tinción de gram permitió la detección de *N. gonorrhoeae* en 11/13 (84,6%) pacientes y la instauración rápida del tratamiento antibiótico tras la visualización de los diplococos gramnegativos. Las coinfecciones por dos o más microorganismos asociados a ITS fueron frecuentes (15/59, 25,4%). Entre los 28 casos positivos a *C. trachomatis* se detectó al menos otro microorganismo causante de uretritis en cuatro (14,3%), correspondiendo dos de ellos a *N. gonorrhoeae* y otros dos a *U. urealyticum* (uno de ellos asociado a virus herpes

simplex tipo 1). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de episodios en el que se detectó *C. trachomatis* por grupos de edad, siendo 22,2% (6/27) en menores de 30 años y 35,5% (22/62) en mayores de esa edad (chi cuadrado, $p=0,22$). Solo un 3,7% (3/81) y un 1,1% (1/81) de los episodios de uretritis analizados mostraron evidencia de infección por *Treponema pallidum* y VIH, respectivamente.

Tabla 23. Microorganismos detectados en 90 episodios de probable uretritis infecciosa en varones, HUD (2013).

Microorganismo	Nº pos. (%)	Nº infecciones mixtas (%): microorganismos*
Cobas4800 (N=89):		
<i>C. trachomatis</i>	28 (31,1)	5 (17,9): 2NG, 2UURE (1+VHS), 1HPV
<i>N. gonorrhoeae</i>	13 (14,4)	6 (46,2): 2CT, 3HPV, 1HPAR
AnyplexSTI7 (N=59):		
<i>U. urealyticum</i>	11 (18,6)	7 (63,6): 3GVAG, 2CT (1+VHS), 1Act**, 1Cor**
<i>M. genitalium</i>	8 (13,6)	2 (25): 2HPAR
Otros microorganismos:		
<i>H. parainfluenzae</i>	7	
<i>G. vaginalis</i>	7	
Papilomavirus	5	
<i>H. influenzae</i>	3	
Virus herpes simplex	2	
<i>T. vaginalis</i>	1	
<i>A. turicensis</i>	1	
<i>C. glucuronolyticum</i>	1	
<i>S. agalactiae</i>	1	
<i>C. albicans</i>	1	

* NG: *N. gonorrhoeae*; UURE: *U. urealyticum*; VHS: virus herpes simplex; HPV: papilomavirus; CT: *C. trachomatis*; HPAR: *H. parainfluenzae*; GVAG: *G. vaginalis*. Microorganismos en negrita reconocidos patógenos asociados con uretritis en varones.

** *Actinomyces turicensis*, *Corynebacterium glucuronolyticum*

5.3.1.2. Uretritis no sospechada inicialmente (disuria y leucocituria con urocultivo negativo)

Un 6,3% de los urocultivos procesados durante 2013 en el Servicio de Microbiología del Hospital Donostia correspondieron a muestras de orina (fracción media) de varones de 15-49 años enviadas para descartar ITU, grupo en el que las infecciones urinarias son

Resultados

poco frecuentes. En un 11,4% de las muestras de ese grupo se detectó en el urocultivo algún microorganismo responsable de ITU. Entre los casos negativos se conformó un grupo de 134 pacientes atendidos en las consultas de Atención Primaria en los que, sin sospecha inicial de uretritis, se detectó leucocituria (>14 leucocitos/ μ l) descartándose por la historia clínica otros motivos que a priori pudieran justificarla. En estas muestras de orina se analizó la presencia de ADN de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (plataforma Cobas 4800-CT/NG, Roche), siendo el médico solicitante informado de la conveniencia de descartar una uretritis, y ofreciéndole la posibilidad de derivar el paciente al Servicio de Microbiología para la obtención de una muestra uretral y de orina (primera fracción) en las que repetir el análisis.

En las muestras iniciales de fracción media de la orina, se detectó en 48/134 (35,8%) *C. trachomatis* y en 6/134 (4,5%) *N. gonorrhoeae* (2 infecciones mixtas).

Acudieron al Servicio de Microbiología 84/134 (62,7%) pacientes (mediana de edad 31 años, rango 16-49) que pudieron ser estudiados en detalle, a los que se realizó una encuesta clínico-epidemiológica y una exploración física para descartar infección en otras localizaciones u otras posibles causas no infecciosas de uretritis, describiéndose a continuación los resultados (tabla 24). Para analizar otras posibles causas infecciosas, también se investigó retrospectivamente en los episodios en que no se habían detectado ni *C. trachomatis* ni *N. gonorrhoeae* la presencia de ADN de *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, y *Trichomonas vaginalis* mediante otra TAAN (AnyplexII STI-7, Seegene). Otros microorganismos fueron investigados individualizadamente mediante cultivo y/o otras TAAN (ver apartado anterior).

Tabla 24. Investigación de posibles causas de uretritis en 84 varones sexualmente activos con leucocituria y urocultivo negativo, HUD (2013).

Causas	Número	% total	% subgrupo
Infeciosas*	61	72,6	100
<i>C. trachomatis</i>	37	44,0	60,7
<i>M. genitalium</i>	8	9,5	13,1
<i>U. urealyticum</i>	7	8,3	11,5
<i>N. gonorrhoeae</i>	2	2,4	3,3
Otros**	13	15,5	21,3
No infecciosas***	11	13,1	100
Sin filiar****	12	14,3	100

* En 8 casos infección mixta por más de un microorganismo

** *Gardnerella vaginalis* (n=3), *Haemophilus parainfluenzae* (n=2), *H. influenzae* (n=1), *Actinomyces turicensis* (n=2), *A. neuii* (n=2), *A. urogenitalis* (n=1), *Corynebacterium glucuronolyticum* (n=1), *C. simulans* (n=1), *Streptococcus anginosus* (n=1), un caso con infección mixta

*** En 7 casos litiasis y en 4 causas anatómicas

**** En 3 episodios no se dispuso de muestra para investigar *Mycoplasma* spp y *Ureaplasma* spp.

En conjunto, se identificó una causa infecciosa en 61/84 (72,6%) episodios (tabla 24).

C. trachomatis fue la principal causa (37 casos, 44% en conjunto, 60,7% de las causas infecciosas), seguida por *M. genitalium* y *U. urealyticum* (9,5% y 8,3%, respectivamente del grupo global). *N. gonorrhoeae* se detectó solo en dos (2,4%) casos.

En un 15,5% de los casos se detectaron otros microorganismos que fueron valorados como posibles causantes del episodio. En 8 casos la infección fue mixta por más de un microorganismo.

Finalmente, en el 27,4% restante o bien se identificó una causa no infecciosa (11 casos) como probable responsable de la sintomatología (litiasis y otras alteraciones anatómicas del TGU), o bien el episodio no se pudo filiar (12 casos).

Por grupos de edad, *C. trachomatis* se detectó en 57,9% (22/38) de los <30 años y en 32,6% (15/46) de aquellos con ≥ 30 años (chi cuadrado, $p=0,02$), mientras que las causas no infecciosas o sin filiar supusieron el 13,2% (5/38) y 39,1% (18/46) respectivamente (chi cuadrado, $p<0,01$).

Resultados

5.3.2. Mujeres con diagnóstico de enfermedad inflamatoria pélvica

Entre 2009 y 2013 se analizaron muestras de 547 mujeres (mediana de edad 33 años, rango 15-45 años) correspondientes a 573 episodios (tabla 25) con síntomas compatibles con probable EIP atendidas ambulatoriamente en consultas de Ginecología (n=157) y hospitalariamente, tanto en urgencias con posterior alta domiciliaria (n=264), como hospitalizadas (n=152; 79 según criterios CIE-9 relacionados con EIP y 73 más con síntomas de dolor abdominal de probable origen ginecológico con otros códigos CIE-9). Se detectó *C. trachomatis* en 95 (16,6%) episodios (mediana de edad 29 años), de los que 77 fueron atendidos en el hospital (42 en urgencias hospitalarias con posterior alta domiciliaria pero 35 requirieron ingreso) y 18 en consultas ambulatorias.

Por grupos de edad, *C. trachomatis* se detectó en el 24,1% (51/212) de las mujeres <30 años (27% en <25 años y 20,8% en 25-29 años) y 12,2% (44/361) de las ≥ 30 años (Chi cuadrado $p < 0,001$). Por ámbito asistencial, *C. trachomatis* se detectó en el 18,5% (77/416) de las atendidas en el hospital y en el 11,5% (18/157) de las atendidas ambulatoriamente (Chi cuadrado $p = 0,043$), siendo la edad media de ambos grupos similar ($31,9 \pm 7,5$ vs $32,5 \pm 6,8$). Al menos en 18 de los 95 episodios positivos a *C. trachomatis* las mujeres habían presentado otros episodios con síntomas similares. Las mujeres con resultado positivo que inicialmente no fueron tratadas o recibieron un tratamiento antibiótico inadecuado fueron avisadas para la administración de una nueva pauta.

Entre las 152 mujeres de este grupo que requirieron ingreso, *C. trachomatis* se detectó en 26/79 (32,9%) que en el diagnóstico al alta presentaron criterios CIE-9 de EIP y en 9/73 (12,3%) que presentaron otros códigos CIE-9 (Chi cuadrado $p = 0,003$). *N. gonorrhoeae* fue investigada en los 573 episodios, detectándose tan solo en 4 (0,7%).

Además hubo 55 pacientes con criterios diagnósticos de EIP CIE-9 ingresadas en el hospital a las que no se solicitó investigación de *C. trachomatis* ni *N. gonorrhoeae*.

Tabla 25. Detección de *C. trachomatis* en mujeres de 15-45 años con síntomas compatibles con enfermedad inflamatoria pélvica (2009-2013).

Casos	Total	Ámbito asistencial*			Código CIE9** relacionado con EIP	
		AMB	URG	ING	SI	NO
Analizados	573	157	264	152	79	73
Positivos (nº)	95	18	42	35	26	9
Positivos (%)	16,6	11,5	15,9	23,0	32,9	12,3
Edad media	29,3	29,3	28,2	30,5	30,9	29,4

*AMB: Atención ambulatoria; URG: urgencias hospitalarias; ING: ingresos hospitalarios

** Distribución de las 152 mujeres hospitalizadas; EIP: enfermedad inflamatoria pélvica

5.4. Epidemiología molecular

5.4.1. Genotipos *ompA* de *C. trachomatis*

5.4.1.1. Análisis de la variedad, distribución y evolución temporal por periodos (Gipuzkoa, 2006-2014)

Entre 2006 y 2014 se pudo analizar el genotipo de *C. trachomatis* en 1.221 episodios de infección correspondientes a 1.761 muestras de 1.161 pacientes. El genotipo se identificó en el 91,2% (1.113/1.221) de los casos, que correspondieron al 88,3% de las muestras (1.249/1.415) en las que se realizó. El ciclo de amplificación de la técnica de detección se registró en 1.167 casos (tabla 26) y 1.357 muestras (tabla 27). El genotipo se obtuvo en el 99,4% (889/894) de los episodios con un ciclo de amplificación <35 y en el 63,4% (173/273) de los casos con ciclos ≥ 35 (Chi cuadrado=332,33, $p < 0,001$). En

Resultados

813 (73%) episodios se pudo secuenciar el amplicón obtenido en la primera PCR y en 300 (27%) episodios fue necesario realizar la PCR anidada.

Tabla 26. Rentabilidad de la técnica de genotipado en función de la carga bacteriana medida por los ciclos de amplificación en episodios de infección por *C. trachomatis*.

Ciclo de amplificación	Casos positivos		Casos tipados	
	Nº	%	nº	%
<25	45	3,9	45	100
25-29	358	30,7	357	99,7
30-34	491	42,1	487	99,2
≥35	273	23,4	173	63,4
Total	1.167	100	1.062	91,0

La rentabilidad de la técnica de genotipado fue diferente según el tipo de muestra, observándose una relación con la carga bacteriana semicuantificable media, valorada en cada tipo en función del ciclo de amplificación (tabla 27).

Tabla 27. Rentabilidad de la técnica de genotipado en distintos tipos de muestras y carga bacteriana medida por los ciclos de amplificación medios en cada uno de ellos.

Tipo de muestra	Muestras positivas		Muestras tipadas		Ciclo medio de amplificación
	Nº	%	nº	%	
Biopsia/absceso	5	0,4	4	80,0	33,0
Conjuntival	17	1,3	15	88,2	28,5
Frotis faríngeo	29	2,1	24	82,8	33,3
Genital ♀	486	35,8	438	90,1	29,3
Genital ♂	410	30,2	366	89,3	31,2
Orina ♀	144	10,6	110	76,4	32,9
Orina ♂	205	15,1	188	91,7	30,9
Rectal	61	4,5	50	82,0	34,1
Total	1.357	100	1.195	88,1	30,7

Se identificaron 11 genotipos diferentes (tabla 28), siendo marcadamente el más frecuente el genotipo E (41,6%). Le siguieron en frecuencia los genotipos D, F y G (43,5% en conjunto). Los restantes genotipos (J, I, K, H, L2, B y A) se detectaron con menor frecuencia (14,9% en conjunto). Al analizarse la evolución de la distribución de los genotipos en tres periodos (2006-2008, 2009-2011 y 2012-2014), se observó que: el

genotipo E siempre fue el más frecuente; entre los genotipos D, F y G hubo algunas variaciones, siendo estadísticamente significativo el aumento progresivo en la frecuencia del genotipo D (11,6% en 2006-2008 y 20,9% en 2012-2014, $p=0,04$); y entre los genotipos menos frecuentes también fue estadísticamente significativa la variación en el genotipo I, debido a la menor prevalencia observada en el periodo intermedio de estudio.

Tabla 28. Distribución y evolución temporal de genotipos de *C. trachomatis* en Gipuzkoa (2006-2014).

Genotipo	Total n° (%)	Periodo			* Diferencias estadísticas (p)
		2006-2008	2009-2011	2012-2014	
E	463 (41,6)	55 (50,5)	94 (38,4)	314 (41,4)	0,101 #
D	214 (19,2)	12 (11,0)	43 (17,6)	159 (20,9)	0,036*
F	168 (15,1)	10 (9,2)	46 (18,8)	112 (14,8)	0,060 #
G	102 (9,2)	14 (12,8)	25 (10,2)	63 (8,3)	0,250
J	60 (5,4)	6 (5,5)	18 (7,3)	36 (4,7)	0,292
I	44 (4,0)	8 (7,3)	3 (1,2)	33 (4,3)	0,015*
K	29 (2,6)	2 (1,8)	4 (1,6)	23 (3,0)	0,425
H	18 (1,6)	1 (0,9)	6 (2,4)	11 (1,4)	†
L2	8 (0,7)	0	3 (1,2)	5 (0,7)	†
B	5 (0,4)	1 (0,9)	1 (0,4)	3 (0,4)	†
A	2 (0,2)	0	2 (0,8)	0	†
Total	1.113	109	245	759	

* Chi cuadrado con dos grados de libertad

No se observan diferencias analizando los 3 periodos, pero sí en el análisis de dos de ellos

† No se realizó análisis estadístico por el escaso número de episodios

5.4.1.2. Análisis de variables clínico-epidemiológicas y geográficas (estudio colaborativo en Gipuzkoa, Sevilla y Gran Canaria, 2011-2012)

Entre enero de 2011 y septiembre de 2012 se comparó la distribución de genotipos de *C. trachomatis* en Gipuzkoa con la de otras dos áreas geográficas de España distantes (Sevilla y Gran Canaria) y se estudiaron las posibles diferencias en función de la edad, el sexo y el comportamiento sexual. Se analizaron 624 episodios de infección por *C.*

Resultados

trachomatis correspondientes a 616 pacientes (tabla 29), de los que se obtuvo el genotipo en 565 (tabla 30).

Tabla 29. Principales características de 624 episodios de infección por *C. trachomatis* y su distribución por provincias (Gipuzkoa, Sevilla y Gran Canaria, 2011-2012).

	Total	Gipuzkoa	Sevilla	Gran Canaria	Diferencias estadísticas (p) [*]
Nº de episodios	624	286	220	118	
Edad media±DS ^a	29,6 ± 8,4	30,7 ± 8,3	28,9 ± 8,3	28,3 ± 8,8	p=0,01 ^{**}
Sexo (%)					
Hombres	345 (55,3)	117 (40,9)	150 (68,2)	78 (66,1)	p<0,01
Mujeres	279 (44,7)	169 (59,1)	70 (31,8)	40 (33,9)	
Origen (%)	594 datos	272 datos	220 datos	102 datos	
Español	478 (80,5)	181 (66,5)	205 (93,2)	92 (90,2)	p<0,01
Inmigrante	116 (19,5)	91 (33,5)	15 (6,8)	10 (9,8)	
Conducta sexual en hombres (%)	232 datos	86 datos	144 datos	2 datos	
HSH ^b	92 (39,7)	23 (26,7)	67 (46,5)	2	p<0,01
HTS ^b	140 (60,3)	63 (73,3)	77 (53,5)	-	
Síntomas (%)	563 datos	280 datos	211 datos	72 datos	
Sintomáticos	321 (57,0)	180 (64,3)	72 (34,1)	69 (95,8)	p<0,01
Asintomáticos	242 (43,0)	100 (35,7)	139 (65,9)	3 (4,2)	
Tipo de muestra ^c (%)					
Cervix/vagina	207 (33,2)	107 (37,4)	66 (30,0)	34 (28,8)	p<0,01
Orina	164 (26,3)	63 (22,0)	94 (42,7)	7 (5,9)	p<0,01
Uretral	164 (26,3)	86 (30,1)	11 (5,0)	67 (56,8)	p<0,01
Rectal	64 (10,3)	14 (4,9)	48 (21,8)	2 (1,7)	p<0,01
Conjuntival	14 (2,2)	6 (2,1)	0	8 (6,8)	NR ^d
Faríngea	10 (1,6)	9 (3,1)	1 (0,5)	0	NR ^d
Adenopatía inguinal	1(0,2)	1 (0,3)	0	0	NR ^d

* Chi cuadrado con dos grados de libertad salvo otro especificado

** Análisis de la varianza

^a Excluyendo niños <1 año (n=9) y pacientes de edad desconocida (n=3)

^b HSH = hombres que tienen sexo con hombres; HTS = heterosexual

^c Muestra en la que fue obtenido el genotipo

^d NR: no realizado (debido al pequeño número de episodios)

Distribución geográfica. De los once genotipos identificados, nueve (entre ellos el genotipo L2) se detectaron en las tres provincias estudiadas. Aunque el genotipo E fue el más frecuente en las tres áreas, se detectó con mayor frecuencia en Gran Canaria (p=0,046). También se encontraron diferencias en la distribución del genotipo F en Gipuzkoa (p=0,001) y G en Sevilla (p<0,001). Se detectaron en muestras urogenitales dos cepas inusuales del genotipo A (un hombre y una mujer asintomáticos) y una del B (una mujer con un absceso tubo-ovárico y EIP), registrados en GenBank con los

números de acceso KF154357 (A), KF154358 (A) y KF154359 (B). Durante el periodo estudiado, se observaron 7 episodios de repetición y en 5 de ellos se constató una reinfección con diferente genotipo.

Distribución por sexo y conducta sexual (HSH vs HTS). El análisis de la distribución de genotipos por sexo mostró que los genotipos G ($p=0,031$), J ($p=0,021$) y L2 ($p=0,002$) fueron más frecuentes en varones y los genotipos E ($p=0,037$) y F ($p=0,013$) en mujeres. Al analizar entre los hombres la distribución de genotipos en relación al comportamiento sexual (conocido en 219/316), se observaron diferencias en la distribución de los genotipos J y L2, más frecuentes en HSH ($p<0,001$ para ambos genotipos) y del genotipo E, más frecuente en HTS ($p<0,001$). Las once muestras detectadas del genotipo L2 (todas genovariedad L2b) correspondieron a HSH (ocho coinfectados con el VIH), de los que seis presentaron proctitis, otro una adenopatía inguinal y cuatro fueron asintomáticos. Por otra parte, la distribución de genotipos fue similar en varones heterosexuales y en mujeres, con excepción del genotipo G, más frecuente en varones ($p=0,024$).

Distribución por edad, país de nacimiento, síntomas y tipo de muestra. No se encontraron diferencias en relación a la edad con excepción de los genotipos L2, detectado solo en mayores de 30 años de edad ($p=0,001$), ni en la distribución de genotipos en pacientes de origen nacional o extranjero. Se encontró una asociación entre infección por genotipo D y sujetos sintomáticos ($p=0,038$) y entre genotipo G y asintomáticos ($p=0,039$). Finalmente, se observaron algunas diferencias en la distribución de algunos genotipos en determinadas muestras. En concreto, los genotipos J y L2 fueron detectados con mayor frecuencia en muestras rectales ($p=0,002$ y $<0,001$, respectivamente) y el genotipo E en menor frecuencia en esta localización ($p<0,001$).

Resultados

Análisis multivariante. Los resultados del análisis de regresión logística multinomial, analizando la distribución de genotipos por edad, sexo, origen (español o inmigrante) y síntomas, usando como referencia el genotipo E, mantuvieron las diferencias en la distribución de los genotipos G ($p=0,003$) y J ($p=0,007$) en varones. Posteriormente se realizó un análisis solo en varones añadiendo la variable comportamiento sexual (HSH vs HTS), lo que confirmó la asociación entre HSH y el genotipo J ($p<0,001$, OR=18,1, 95%CI 5,84-58,82) pero puso también de manifiesto una asociación entre HSH y los genotipos D ($p<0,001$, OR=4,54, 95%CI 1,84-11,23) y G ($p=0,007$, OR=3,89, 95%CI 1,45-10,41), no detectadas en el análisis univariante. El análisis multivariante no reveló diferencias entre los genotipos E y F, ni encontró diferencias en la asociación entre genotipos y edad, origen y presencia o ausencia de síntomas.

Tabla 30. Distribución de genotipos de *C. trachomatis* en tres áreas geográficas de España en función de las características clínico-epidemiológicas estudiadas (porcentajes crudos). Análisis univariante (diferencias estadísticamente significativas en negrita*).

Resultados

Genotipos		E		D		F		G		J		L2		Otros ^a	
Característica	Total	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p
Provincia:															
Gran Canaria	104	53 (51,0)		21 (20,2)		7 (6,7)		5 (4,8)		5 (4,8)		2 (1,9)		11 (10,6)	
Sevilla	208	76 (36,5)	0,046	43 (20,7)	0,78	18 (8,7)	0,001	36 (17,3)	<0,001	14 (6,7)	0,41	5 (2,4)	NS	16 (7,7)	0,81
Gipuzkoa	253	100 (39,5)		46 (18,2)		46 (18,2)		20 (7,9)		22 (8,7)		4 (1,6)		15 (5,9)	
Total	565	229 (40,5)		110 (19,5)		71 (12,6)		61 (10,8)		41 (7,3)		11 (1,9)		42 (7,5)	
Edad-(años)^b:															
16-29	315	133 (42,2)	0,31	55 (17,5)	0,14	41 (13,0)	0,63	36 (11,4)	0,74	22 (7,0)	0,55	1 (0,3)	0,001**	27 (8,6)	0,30
≥30	240	91 (37,9)		54 (22,5)		28 (11,7)		22 (9,2)		20 (8,3)		10 (4,2)		15 (6,2)	
Total	555	224 (40,4)		109 (19,6)		69 (12,4)		58 (10,5)		42 (7,6)		11 (2,0)		42 (7,5)	
Sexo:															
Hombres	316	116 (36,7)	0,037	64 (20,2)	0,60	30 (9,5)	0,013	42 (13,3)	0,031	30 (9,5)	0,021	11 (3,5)	0,002**	23 (7,3)	0,87
Mujeres	249	113 (45,4)		46 (18,5)		41 (16,5)		19 (7,6)		11 (4,4)		0		19 (7,6)	
Total	565	229 (40,5)		110 (19,5)		71 (12,6)		61 (10,8)		41 (7,3)		11 (1,9)		42 (7,5)	
Conducta sexual:^c															
HSH ^c	85	11 (12,9)	<0,001	23 (27,1)	0,14	4 (4,7)	0,07	14 (16,5)	0,76	21 (24,7)	<0,001	11 (12,9)	<0,001**	1 (1,2)	0,008
HTS ^c	134	53 (39,6)		25 (18,7)		16 (11,9)		20 (14,9)		6 (4,5)		0		14 (10,4)	
Total	219	64 (29,2)		48 (21,9)		20 (9,1)		34 (15,5)		27 (12,3)		11 (5,0)		15 (6,9)	
Origen:															
Español	435	175 (40,2)	0,83	88 (20,2)	0,37	49 (11,3)	0,13	50 (11,5)	0,40	31 (7,1)	0,84	10 (2,3)	0,70**	32 (7,4)	0,90
Inmigrante	104	43 (41,3)		17 (16,3)		18 (17,3)		9 (8,7)		8 (7,7)		1 (1,0)		8 (7,7)	
Total	539	218 (40,4)		105 (19,5)		67 (12,4)		59 (10,9)		39 (7,2)		11 (2,0)		40 (7,4)	
Síntomas:															
Sintomáticos	301	120 (39,9)	0,69	70 (23,3)	0,038	38 (12,6)	0,98	26 (8,6)	0,039	19 (6,3)	0,21	7 (2,3)	0,77**	21 (6,9)	0,69
Asintomáticos	215	82 (38,1)		34 (15,8)		27 (12,6)		31 (14,4)		20 (9,3)		4 (1,9)		17 (7,9)	
Total	516	202 (39,1)		104 (20,2)		65 (12,6)		57 (11,0)		39 (7,6)		11 (2,1)		38 (7,4)	
Muestra:															
Cervix/vagina	195	86 (44,1)		41 (21,0)		29 (14,9)		16 (8,2)		6 (3,1)		0		17 (8,7)	
Orina	138	50 (36,2)		24 (17,4)		21 (15,2)		19 (13,8)		13 (9,4)		0		11 (8,0)	
Uretra	149	73 (49,0)	<0,001	28 (18,8)	0,46	16 (10,7)	0,14	15 (10,1)	0,42	9 (6,0)	0,002	0	<0,001	8 (5,4)	0,18
Recto	60	11 (18,3)		15 (25,0)		2 (3,3)		9 (15,0)		11 (18,3)		10 (16,7)		2 (3,3)	
Otros	23	9 (39,1)		2 (8,7)		3 (13,0)		2 (8,7)		2 (8,7)		1 (4,3) ^d		4 (17,4)	
Total	565	229 (40,5)		110 (19,5)		71 (12,6)		61 (10,8)		41 (7,3)		11 (1,9)		42 (7,5)	

Resultados

* Chi cuadrado, o ** test de Fisher si fue necesario.

a. Otros genotipos: Gran Canaria I (n=3), K (n=7), H (n=1); Sevilla I (n=9), K (n=5), H (n=1), A (n=1); Gipuzkoa I (n=5), K (n=5), H (n=3), A (n=1), B (n=1).

b. Excluyendo niños <1 año (n=8) y pacientes de edad desconocida (n=2); edad media ($\pm 95\%$ IC): genotipo E 28.6 (27.7-29.6), D 30.8 (29.0-32.7), F 30.1 (28.1-32.1), G 27.6 (26.1-29.1), J 31.8 (28.1-35.5), L2 41.7 (35.3-48.1), otros 29.1 (26.6-31.7).

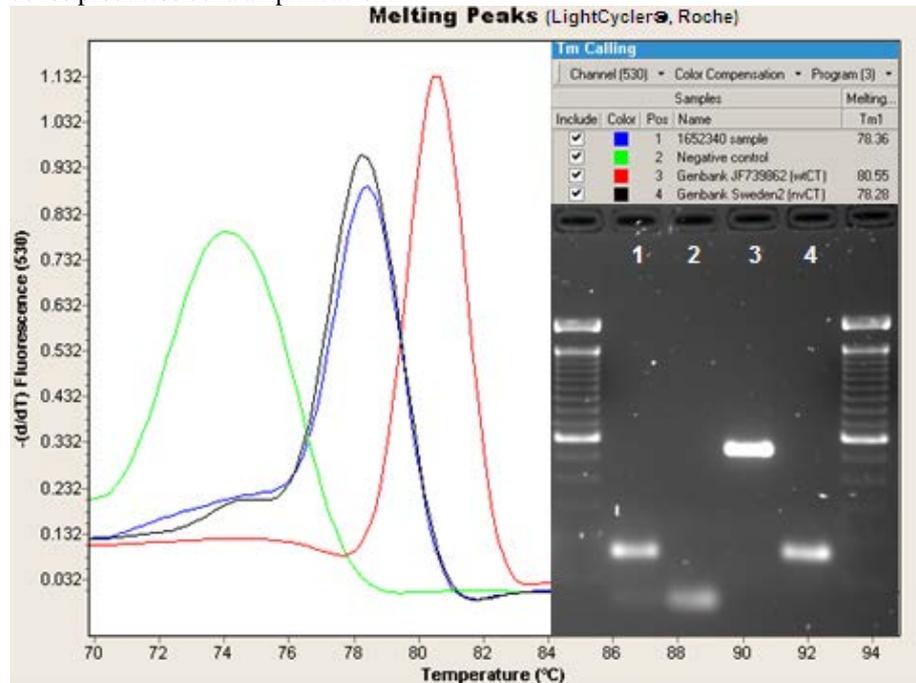
c. HSH = hombres que tienen sexo con hombres; HTS = heterosexual.

d. Genotipo L2 en una adenopatía inguinal (biopsia).

5.4.2. Análisis de la posible introducción de la nueva variante de *C. trachomatis* en tres áreas geográficas distantes de España

Entre las cepas pertenecientes al genotipo E estudiadas entre enero de 2011 y septiembre de 2012 en Gipuzkoa, Sevilla y Gran Canaria se investigó la presencia de la nvCT. La presencia de la nvCT también fue investigada en Gipuzkoa desde diciembre de 2008 (fecha en que se introdujo la técnica diagnóstica capaz de detectarla) hasta 2010 y desde octubre de 2012 hasta diciembre de 2014, completando 6 años de vigilancia en Gipuzkoa. Se analizaron en total 602 muestras con ADN de *C. trachomatis* genotipo E, 466 de Gipuzkoa, 79 de Sevilla y 57 de Gran Canaria. Se detectó una cepa con la delección de 377pb descrita en el plásmido críptico asociada a la nueva variante sueca de *C. trachomatis* (figura 41) en una muestra de orina perteneciente a un paciente HSH de Sevilla con múltiples parejas sexuales al que no fue posible realizar una trazabilidad de sus contactos. La identificación de la cepa se confirmó mediante secuenciación mostrando una homología del 100% con otras secuencias publicadas de la nvCT (plásmido pSW2 de *C. trachomatis*, cepa Sweden2, genotipo E).

Figura 41. Análisis de la curva de melting en una PCR en tiempo real para detectar el plásmido críptico de *C. trachomatis* y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación.



1. Línea azul: nueva variante (nvCT) cepa 1652340, obtenida de una muestra de orina de un paciente de Sevilla en 2012; 2. Línea verde: agua como control negativo; 3. Línea roja: cepa salvaje (wCT) GenBank JF739862; 4. Línea negra: nvCT cepa de referencia Sweden2.

El amplificado de la nvCT tiene un pico de melting a 78,3°C representando la banda de 161pb, y la wCT a 80,5°C con una banda de 537pb.

5.4.3. Multilocus Sequence Typing

En algunas de las cepas de *C. trachomatis* detectadas se analizó su diversidad genética mediante una técnica de secuenciotipado (MLST), materia sobre la que hasta la fecha no existen datos en España. La muestra no se seleccionó al azar, sino buscando aspectos epidemiológicos y técnicos como: representación de cepas de los 11 genotipos *ompA* detectados; cepas de las tres provincias (Gipuzkoa, Sevilla y Gran Canaria); cepas de pacientes con distinta conducta sexual (HTS y HSH); muestras de un mismo paciente en un mismo episodio (para confirmar la reproducibilidad de la técnica) o en episodios

Resultados

distintos (para discriminar entre infecciones nuevas por cepas diferentes o reinfecciones por la misma cepa); y parejas de casos y contactos conocidos (para analizar la trazabilidad en la transmisión de la infección).

Se analizaron 139 cepas (tabla 31), pudiéndose obtener un secuenciotipo previamente descrito finalmente en 80 (58%). En el resto de muestras no se obtuvo un secuenciotipo definitivo por no obtenerse un amplificado suficiente en alguno de los cinco alelos estudiados (a pesar de repetirse el análisis en todos los casos, n=55) o por corresponder a un secuenciotipo no previamente identificado (cuatro cepas, ver texto más adelante).

La media de los ciclos de amplificación en que había sido detectado el ADN de *C. trachomatis* en las cepas en que se obtuvo un secuenciotipo fue 30,5 vs 32,1 en las que no se obtuvo ($p=0,063$ prueba U de Mann-Whitney). Otro factor a considerar para bajo rendimiento pareció ser en este estudio el análisis de ciertos genotipos *ompA* inusuales como los A, H, I y K, en los que se obtuvo un secuenciotipo en menos del 35% de las muestras analizadas. Sin embargo, el bajo número de muestras analizadas al subdividir la muestra en función de los genotipos *ompA* impide obtener conclusiones robustas sobre los factores que afectaron al rendimiento de la técnica.

En las 80 cepas finalmente secuenciadas se identificaron 27 secuenciotipos diferentes, distribuidos en los diferentes genotipos *ompA*. De hecho, todos los genotipos *ompA* en los que se obtuvo el secuenciotipo de más de 4 cepas (E, F, G, J) y algunos de 4 o menos (D, I) presentaron al menos 2 secuenciotipos, con la llamativa excepción del genotipo L2, del que todas las cepas analizadas (n=15) correspondieron al secuenciotipo ST58, y en menor medida el B, perteneciendo las cuatro cepas estudiadas al secuenciotipo ST138. Del genotipo *ompA* E, el más frecuente en este estudio y a nivel mundial, se detectaron 13 secuenciotipos entre 26 cepas, no perteneciendo más de 4 cepas a un mismo secuenciotipo. Por el contrario, en los genotipos J y G las cepas

parecieron agruparse más en ciertos secuenciotipos como el ST108 (6/8 cepas estudiadas del genotipo J) y ST52 (5/7 cepas estudiadas del genotipo G) (prueba exacta de Fisher $p=0,003$ E vs J y $p=0,008$ E vs G), si bien estos resultados deben valorarse con precaución dado que la selección de la muestra a secuenciar no permite un análisis estadístico robusto. La distribución de los ST en este estudio fue diferente en HSH (29 cepas con ST, 7 ST detectados) y HTS (11 cepas con ST, 9 ST detectados), predominando en los primeros los ST52 (n=5), ST58 (n=15) y ST108 (n=6), mientras que en los segundos no se observaron secuenciotipos predominantes si bien el número de cepas secuenciadas es pequeño para esta finalidad. Los secuenciotipos fueron específicos de diferentes genotipos *ompA*, con la excepción del secuenciotipo ST12, que se detectó en dos distintos (D y F). En dos casos, la técnica no discriminó entre los ST 73 y 214 pertenecientes al genotipo *ompA* E, y en cuatro casos de genotipo *ompA* A a pesar de amplificar e identificarse los cinco alelos y ser idénticos, su código (8-8-2-7-8) no se identificó con ningún ST previamente descrito.

En tres casos con muestras de pacientes correspondientes a un mismo episodio se detectó el mismo secuenciotipo. En cuatro casos con muestras de pacientes correspondientes a diferentes episodios se detectó el mismo secuenciotipo. En cinco casos de contactos sexuales conocidos y en un caso de transmisión perinatal de la infección se detectó el mismo secuenciotipo.

Resultados

Tabla 31. Análisis molecular comparativo (*ompA* y MLST) de 139 cepas de *C. trachomatis*.

Genotipado <i>ompA</i>		Secuenciotipado MLST		
Genotipo	Nº analizados	nº (%) tipados	nº/ST	Tipo ST
A	5	* 4 (0/80)	4	*
B	4	4 (100)	4	138
D	6	4 (66,7)	2	12
			2	35
E	39	26 (66,7)	4	3
			1	70
			1	86
			1	87
			4	147
			2	153
			3	158
			2	159
			1	162
			3	184
			1	263
			1	334
			2	73/214
F	13	10 (76,9)	4	12
			6	91
G	14	7 (50)	5	52
			1	128
			1	265
H	9	1 (11,1)	1	284
I	9	3 (33,3)	2	100
			1	279
J	18	8 (44,4)	1	105
			6	108
			1	281
K	7	2 (28,6)	2	32
L2	15	15 (100)	15	58
Total	139	**80-84 (58-60)	84	27

ST: secuenciotipo

* En los cuatro casos se identificaron los 5 alelos y fueron iguales en los cuatro (8-8-2-7-8), no habiendo sido referida esta combinación. Solo 3/5 alelos correspondían a ST descritos, concretamente ST 74/111 solo asociados hasta ahora a los genotipos B y H. Las cepas podrían corresponder a un secuenciotipo no previamente descrito. ** Incluyendo estas cuatro cepas la rentabilidad de la técnica sería 60%.

5.5. Comparación del rendimiento diagnóstico de la muestra de orina y uretral

Entre octubre de 2010 y diciembre de 2014 se investigó prospectivamente en paralelo la presencia de *C. trachomatis* en muestras de la primera fracción de la orina y uretrales (exudados, muestra esta última no validada en la TAAN de detección empleada), obtenidas en hombres con sospecha de ITS (o controles posteriores) en la misma visita para comparar el rendimiento diagnóstico de ambas muestras. Se obtuvieron las dos muestras en 1.046 episodios (tabla 32) de 876 pacientes, siendo 226 (21,6%) positivos. *C. trachomatis* fue detectada en orina en 221 episodios (21,1% del total, 97,8% de los positivos) y en uretra en 211 (20,2% del total, 93,4% de los positivos), siendo su rendimiento diagnóstico 4,5% superior en orina que en uretra (test de McNemar $p=0,042$).

Tabla 32. Comparación entre las muestras de orina y uretra en la detección (Cobas4800, Roche) de 1.046 episodios con sospecha o control de infección por *C. trachomatis*, HUD (octubre/2010-diciembre/2014).

<i>C. trachomatis</i>	Uretra+	Uretra-	(inválido)	Total
Orina+	206	15	(0)	221
Orina-	4	810	(1)	815
(inválido)	(1)	(9)	(0)	(10)
Total	211	834	(1)	1.046

Los resultados fueron concordantes en el 97,1% (1.016/1.046) de los episodios. En 19 (1,8%) episodios las dos muestras tuvieron un resultado discordante, 17 de los cuales (89%) se confirmaron como positivos empleando una segunda TAAN que detecta el gen *ompA*. De los dos restantes uno se consideró también verdadero positivo, ya que era un control (positivo en el ciclo 38) de una infección detectada cuatro semanas antes en ambas muestras, quedando el último caso (positivo en el ciclo 40) en duda, aunque los síntomas desaparecieron tras el tratamiento antibiótico. Además, en 11 (1,1%) episodios

Resultados

alguna de las dos muestras tuvo un resultado inválido por inhibición del control interno, a pesar de repetir la muestra diluida. El resultado fue inválido en el 0,5% (11/2.092) de las muestras, 1% (10/1.046) en orinas y 0,1% (1/1.046) en uretrales ($p < 0,001$).

En los casos positivos, se realizó un análisis semicuantitativo de la carga bacteriana en función de los ciclos de amplificación (Ct, cycle threshold), mostrando mejores resultados la muestra de orina que la uretral: Ct medio 30,9 en orina y 32,0 en uretra (prueba U de Mann-Whitney $p < 0,001$); en los 206 episodios en que fueron positivas ambas muestras, en 114 el Ct fue menor en orina que en uretra, en 35 igual y en 57 mayor.

6. DISCUSIÓN

6.1. Cribado de la infección en puérperas de Gipuzkoa

6.1.1. Prevalencia

El conocimiento de la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en la población y el análisis de su evolución pueden aportar una perspectiva más real del comportamiento epidemiológico de la infección que los estudios de incidencia dadas sus importantes limitaciones, y su estudio en cada zona geográfica ha sido recomendado por el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades Europeo ⁽¹⁷⁹⁾. Pocos estudios epidemiológicos han analizado la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en gestantes o puérperas no seleccionadas (figura 42) y, aunque la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en embarazadas no puede extrapolarse directamente a las mujeres sexualmente activas de la población general, esos estudios son un importante paso previo para poder diseñar adecuados programas de control de la infección en cada zona geográfica.

Es esperable que los resultados de estos estudios estén influenciados por características sociodemográficas como la edad y el origen de la población analizada ⁽²¹⁰⁾. En Alemania, en un estudio de base poblacional en adolescentes, la prevalencia fue mayor en gestantes ⁽²¹¹⁾. Además, la prevalencia en las mujeres ≤ 20 años de edad fue más de 40% mayor en gestantes que no gestantes, aunque no se observaron diferencias en los grupos de edades superiores ⁽⁴⁸⁾. Estos hallazgos no son inesperados, dado que probablemente una proporción elevada de los embarazos en adolescentes son no deseados y por tanto estas mujeres pueden ser un grupo de riesgo para ITS. El embarazo

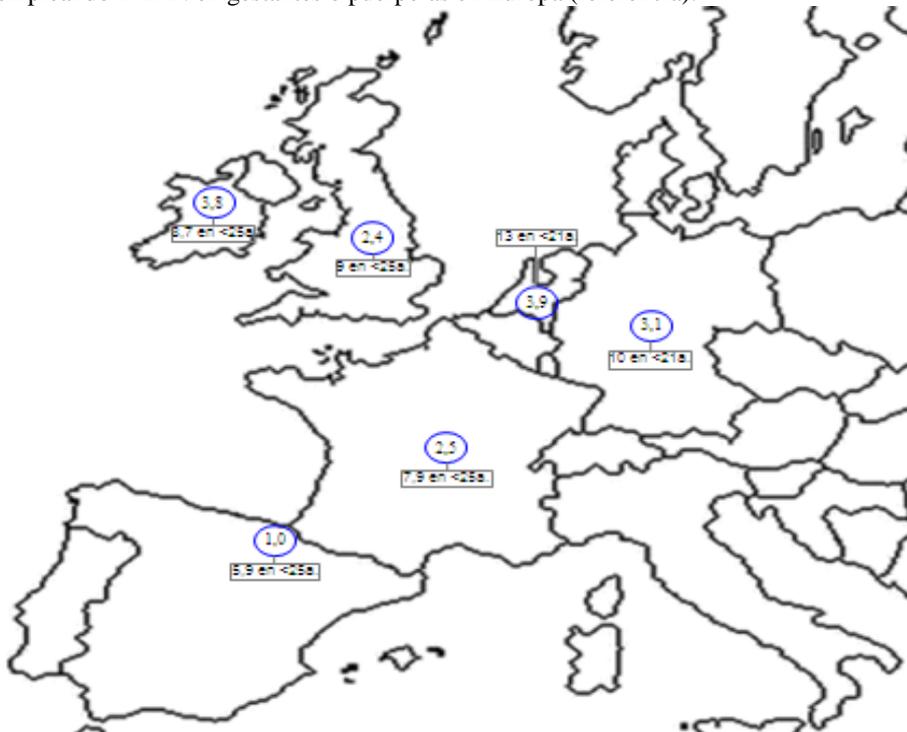
Discusión

a edad joven y bajo nivel de educación son factores relacionados con la infección por *C. trachomatis* y entre sí^(51,212). A pesar de esta limitación, las gestantes pueden constituir una población centinela para monitorizar tendencias de la prevalencia de infección por *C. trachomatis* en la población⁽²¹³⁾. Las gestantes constituyen una población fácil de alcanzar, siendo más constantes a lo largo del tiempo en su aproximación al sistema sanitario que las personas de otros grupos de población y predispuestas favorablemente a la realización de pruebas diagnósticas que puedan llevar a evitar resultados adversos para el embarazo. El presente estudio se realizó en púerperas, población que permite en el País Vasco ofrecer la prueba a la mayoría de las gestantes. De hecho, sólo las mujeres atendidas en la Sanidad Privada, que representan apenas un 13% del total de parturientas de la región, y aquellas cuyo embarazo no llegó a término, no tuvieron oportunidad de participar en este estudio.

Considerando estudios que usaron TAAN, la prevalencia global de infección por *C. trachomatis* en púerperas de Gipuzkoa (1%) fue inferior a la observada en gestantes de países del norte y centro de Europa, como Irlanda (3,8% en mujeres asintomáticas atendidas en clínicas prenatales)⁽⁴⁶⁾, Reino Unido (2,2-2,4% en gestantes <10 semanas)^(214,215), Países Bajos (3,9% en un estudio de base poblacional en gestantes)⁽¹²⁸⁾, y Alemania (2,0%-3,3% gestantes en un programa de cribado nacional)⁽⁴⁸⁾, así como a la obtenida en un reciente estudio realizado en Francia (2,5% gestantes durante una visita antenatal)⁽⁵⁰⁾ (figura 42). Sin embargo, estas comparaciones deben ser valoradas con precaución dadas las diferencias existentes en las características de las poblaciones analizadas (edad, distribución étnica, características socio-demográficas...) en los distintos estudios. Además, estos estudios fueron realizados en gestantes, en algún caso al comienzo del embarazo^(214,215), mientras que el presente estudio se efectuó en mujeres postparto en las que la prevalencia podría ser menor por tener durante la

gestación menos parejas sexuales y/o una conducta sexual diferente, aunque posiblemente la diferencia en la prevalencia por este motivo será pequeña. A continuación, y con el fin de facilitar la lectura de esta compleja discusión, se ha subdividido en epígrafes por temas.

Figura 42. Prevalencia general (y en jóvenes) de infección por *C. trachomatis* empleando TAA en gestantes o puérperas en Europa (referencia).



Irlanda (McMillan et al, Sex Transm Infect. 2006;82:503-5), Reino Unido (Oakeshott et al, Br J Gen Pract. 2002;52:830-2), Países Bajos (Rours et al, Eur J Epidemiol. 2011;26:493-502), Alemania (Böhm et al, J Clin Virol. 2009;46 Suppl 3:S27-32), Francia (Peuchant et al, Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;S0732-8893(15)00030-9), España (datos de la presente tesis doctoral)

6.1.1.1. Prevalencia y grupos de edad

Diferencias en la edad de las mujeres estudiadas pueden ser parcialmente responsables de diferencias en la prevalencia global obtenida en los estudios, dado que un hallazgo

Discusión

común de diversos trabajos es que la prevalencia de la infección es mayor en las gestantes de menor edad ^(40,46,48,50,51,128,214-216). Por tanto, la comparación por grupos de edad es más fiel a la realidad. En este sentido, la edad media de las mujeres del presente estudio (33 años) fue mayor que la referida en otros, siendo menores de 30 años solo un 20% de las parturientas. La prevalencia de infección por *C. trachomatis* fue particularmente elevada en las mujeres más jóvenes: 5,9% en las <25 años (9,1% en <20 años y 5,0% en 20-24 años) y 1,9 en las de 25-29 años de edad. Centrándonos en el contexto europeo, estos valores están próximos a los obtenidos en grandes cohortes de gestantes de Alemania (5,8-6,4% y 1,6-2,4%, respectivamente en <26 y 26-30 años de edad) ⁽⁴⁸⁾, siendo ligeramente inferiores a los registrados en gestantes de Francia (7,9% en <25 años) ⁽⁵⁰⁾ y Portugal (11,8% en <20 años) ⁽²¹⁷⁾. La prevalencia en este estudio en ≥ 25 años fue de 0,75% y en los tramos de edad de 30-34 y ≥ 35 , 0,6% y 0,5% respectivamente, claramente inferiores a las observadas en mujeres más jóvenes y ligeramente inferiores o similares a las referidas en los dos grandes estudios antes citados: 0,9%-1,8% y 0,8-1,2% en Alemania (31-35 y ≥ 36 años de edad) ⁽⁴⁸⁾ y 1,4% en Francia (≥ 25 años, no diferenciando entre los tramos de 25-29 y ≥ 30) ⁽⁵⁰⁾, respectivamente. Esta menor prevalencia en las mujeres de más edad puede ser parcialmente consecuencia del menor riesgo en sus prácticas sexuales, así como menor número de parejas y contactos sexuales que las más jóvenes.

6.1.1.2. Prevalencia y país de origen

Además de la edad, el origen étnico y/o el país de origen están entre los factores más referidos en relación a diferencias de prevalencia en la infección por *C. trachomatis*, tanto en estudios en gestantes como en la población general. La prevalencia de la infección fue, en el presente estudio, mayor en mujeres de origen inmigrante, las cuales

representaron un 18,3% del total de puérperas pero un 45,5% de los casos *Chlamydia*-positivo (tabla 12). Aunque parte de esta diferencia es debida a la menor edad media de las parturientas de origen inmigrante (estimamos que el 59% de las puérperas menores de 25 años fueron de origen inmigrante), la prevalencia de infección por *C. trachomatis* fue significativamente mayor también en mujeres inmigrantes ≥ 30 años de edad. En otros estudios en gestantes también se ha descrito una mayor prevalencia en mujeres de etnia negra ^(43,214) y antillana ⁽¹²⁸⁾. El origen extranjero ha sido considerado un factor de riesgo independiente para infección por *C. trachomatis* en estudios efectuados en España en otras poblaciones ⁽⁷⁵⁾, lo que probablemente está en relación con tasas de la infección más altas en los países de origen, debido posiblemente a una menor accesibilidad al diagnóstico y tratamiento, así como a factores socio-culturales (nivel educativo, situación socioeconómica...) asociados con un mayor riesgo de infección (menor seguridad en sus prácticas sexuales, múltiples parejas, incorrecta utilización del preservativo...) ⁽²¹⁸⁾. Aunque esta afirmación solo es una hipótesis debido a la escasez de datos sobre prevalencia de infección por *C. trachomatis* tanto en España ^(78,216) como en América Central y del Sur ⁽¹⁰²⁾, estudios recientes sugieren una prevalencia elevada en algunos países de América Latina ^(40,219,220). A pesar de que la inmigración en Gipuzkoa es un hecho relativamente reciente, en el presente estudio el 80% (48/60) de las inmigrantes *C. trachomatis* positivas procedían de América Latina, un 36,4% (48/132) del total de puérperas infectadas, siendo específicamente en este grupo de inmigrantes en el que se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia en relación a las mujeres guipuzcoanas (tabla 13). En población general de EEUU también se han constatado diferencias en la infección por *C. trachomatis* según las etnias, siendo la incidencia con respecto a blancos 6,4 veces mayor en negros, 3,9 en indios americanos/nativos de Alaska, 2,1 en hispanos y 3,5 en nativos hawaianos/otros

isleños del pacífico, pero menor en asiáticos ⁽³⁷⁾. Estas diferencias étnicas también han sido descritas en varias publicaciones europeas ^(51,221,222).

6.1.1.3. Comparación con otros estudios en España

En España la información existente sobre la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en la población general es muy escasa. Solo se ha realizado en el periodo 2000-2015 un estudio que tiene base poblacional en un municipio de Asturias y que ha analizado la población de 15-24 años de edad ⁽⁷⁸⁾. En este estudio la prevalencia obtenida en mujeres de 15-24 años de edad (4,1%) fue ligeramente inferior a la obtenida en gestantes en Gipuzkoa (5,9%), posiblemente en relación a que las mujeres del estudio de Asturias son fundamentalmente no gestantes y de un entorno rural. Existe otro trabajo diseñado en el contexto de un estudio sobre papilomavirus que incluye datos de una pequeña muestra de casos en mujeres de 15-44 años en Barcelona a finales del siglo pasado (484 en 1998-2000) cuyos resultados son discutibles, al obtener una prevalencia global de 0,2% (1/157 [0,6%] en el grupo de 15-24 años y ningún caso detectado en el grupo de 25-44años), probablemente debido a limitaciones en el procedimiento (muestras descongeladas) o en la selección de una muestra representativa por edades (edad media del estudio inicial de 43 años en 973 mujeres de 15-65 años) ⁽⁷⁷⁾. En nuestro conocimiento, el presente es el primer estudio de prevalencia efectuado en gestantes en España.

6.1.1.4. Coinfección por *Chlamydia* y otras causas de infección de transmisión sexual

Ninguna de las mujeres infectadas con *C. trachomatis* en el presente estudio estaba coinfectada con VIH, *N. gonorrhoeae*, ni *T. pallidum*, lo que sugiere para la infección por *C. trachomatis* circulación de ámbito comunitario en Gipuzkoa, mientras que sífilis

y gonorrea se asocian actualmente más a grupos concretos de población (HSH, prostitución...). En este sentido, se ha señalado en un estudio nacional de base poblacional efectuado en Perú, que entre los varones estudiados, HSM y hombres que practicaron sexo sin protección en el último año con trabajadoras sexuales (representando un 13% de los hombres estudiados) supusieron un 65% de las infecciones con VIH, 61% de los casos de sífilis, y 72% de las infecciones con *N. gonorrhoeae*, pero solo el 15% de infecciones por *C. trachomatis* ⁽²¹⁹⁾. Llama la atención la bajísima prevalencia de la infección por *N. gonorrhoeae* en esta población de puérperas españolas (<0,01%). *N. gonorrhoeae* es en nuestro entorno la segunda causa bacteriana de ITS después de *C. trachomatis*, pero su infección es sintomática con más frecuencia por lo que de haber habido algún caso podría haber sido detectado durante las revisiones gestacionales. Este hecho también ha sido referido en Francia (ningún caso detectado en 1.004 gestantes analizadas) ⁽⁵⁰⁾, con cifras en otros países entre 0,07% (Hitti et al.) y 7,7% (Labbé et al.) ^(39,41,217,223,224).

6.1.1.5. Expresión clínica de las gestantes infectadas detectadas en el embarazo

La mayor parte de las mujeres *C. trachomatis* infectadas en este estudio no habían presentado durante el embarazo síntomas sugestivos de la infección (95%), por lo que no hubieran sido detectadas sin un cribado gestacional. En los estudios previamente citados la infección en las gestantes analizadas ha sido referida genéricamente como mayoritariamente asintomática (en referencia a sintomatología urogenital), siendo cuantificada la cifra de mujeres asintomáticas en el embarazo en el reciente trabajo de Peuchant et al. en Francia en un 96% (24/25) ⁽⁵⁰⁾.

6.1.1.6. Implicación de los hallazgos de prevalencia en relación al establecimiento de cribados poblacionales

En EEUU se recomienda el cribado para *C. trachomatis* a todas las embarazadas durante la primera visita prenatal, y aquellas con 25 años de edad o menos o en riesgo aumentado para la infección deben ser reanalizadas en el tercer trimestre ⁽¹⁴⁸⁾. Otros países europeos (Reino Unido, Alemania...) están realizando cribados de infección gestacional por *C. trachomatis* ^(110,225). No obstante, el cribado en gestantes y otros cribados poblacionales siguen estando en discusión, dado que persisten incertidumbres sobre su efectividad ^(121,226). No existen estudios que valoren la efectividad del cribado en gestantes >25 años, pero podría prevenir efectos adversos en la gestación y la transmisión vertical. Por estas razones, se suele considerar el cribado universal en el embarazo hasta que puedan ser validados otros criterios selectivos como la prevalencia por grupos de edad ⁽⁴³⁾. Un aspecto fundamental para que los cribados tengan efectividad es que su cobertura sea elevada (>70-80%), cifra que no parece difícil de alcanzar si el personal sanitario se implica, dado que la tasa de respuesta en el último periodo del presente estudio fue 83,2%. Habitualmente las mujeres tienen escasa conciencia sobre la transmisión y los efectos de la infección por *Chlamydia* antes de la prueba, y la alta aceptación del cribado constatada en gestantes jóvenes a las que previamente se les informa sobre las secuelas de la infección y sus posibles consecuencias sobre la salud de sus recién nacidos será esencial para la captación del cribado de *Chlamydia* en futuras estrategias de cribado prenatal ⁽²²⁷⁾. Por el contrario, los cribados realizados en población joven, en la que esta medida preventiva está más indicada por la mayor prevalencia de la infección, la cobertura no suele alcanzar las cifras deseadas ⁽¹¹⁰⁾; en este sentido, conviene tener en cuenta que a menor cobertura

mayor puede ser la prevalencia en ellos registrada debido al posible sesgo de mayor participación relativa en ellos de la población con mayor riesgo.

Basándose en los resultados de este estudio, y aplicando criterios de costo-eficacia (tabla 34), la elevada prevalencia encontrada en las menores de 25 años (5,9%) aconseja ofrecer en el País Vasco la prueba al menos a todas las gestantes menores de esa edad. Esta elevada cifra aconseja asimismo considerar el cribado de todas las mujeres <25 años sexualmente activas, anualmente previo a la gestación (por ejemplo, cribado oportunista al acudir a una revisión ginecológica). Además, en el contexto del embarazo, parece apropiado extender la medida a las gestantes menores de 30 años de edad (prevalencia 2,9% vs 0,5% en ≥ 30 años), dado que el cribado de esta población, que representó un 20% de las parturientas, permitiría detectar el 58% de las infectadas (vs 30% si solo se estudian las <25 años). Por otra parte, al tratarse de las mujeres más jóvenes es probable que la infección tenga más consecuencias desde el punto de vista de la salud reproductiva (infertilidad con mayor pérdida en hijos futuros). Ha sido descrito que el cribado de infección por *C. trachomatis* puede ser costo-eficaz en la prevención de EIP si la prevalencia es >3%, y que podría suponer un ahorro de costes (pruebas en exceso de mujeres sintomáticas) con prevalencias >1% ⁽²²⁸⁾. Con todos estos datos, en nuestra Área Sanitaria se ha planteado realizar el cribado en la primera visita gestacional durante el primer trimestre en menores de 30 años y mujeres de cualquier edad con factores de riesgo, reanalizándose en el tercer trimestre las infecciones detectadas y de nuevo a las mujeres con factores de riesgo (nueva pareja, etc...), ya que si el cribado se realiza solo al inicio de la gestación existe el riesgo de no prevenir posibles reinfecciones, y si se realiza solo al final podrían no evitarse algunas de las complicaciones de la infección durante el embarazo. Como medida adicional, dado que la prevalencia en mujeres de origen extranjero de ≥ 30 años de edad fue >1% y

Discusión

significativamente mayor que en las de origen nacional, se podría valorar ofrecer la prueba a estas gestantes, especialmente a las de origen latinoamericano en las que la prevalencia fue mayor (tablas 12 y 13); de esta forma cribando el 30% de las gestantes (o 25% si se ofrece solo a inmigrantes latinas) se estima que se detectarían el 69% (o 64% si solo inmigrantes latinas) de las infecciones esperadas (vs 20% y 58%, respectivamente, sin tener en cuenta el país de nacimiento).

Tabla 34. Prevalencia de infección por *C. trachomatis*, porcentaje de población cubierta, porcentaje de casos positivos y costes de su detección por tramos de edades.

Edad	<35	<34	<33	<32	<31	<30	<29	<25	Estimación anual
nº	7.895	6.725	5.577	4.533	3.496	2.661	1.942	666	3.800
pos	108	104	100	88	81	77	70	39	38
Preval. (%)	1,4	1,5	1,8	1,9	2,3	2,9	3,6	5,9	1,0
*% población	61	52	43	35	27	20	15	5	100
*% pos totales	82	79	76	67	61	58	53	30	100
**Euros/año (solo reactivo)	35.090	29.890	24.785	20.145	15.540	11.825	8.630	2.960	76.000
**Euros/pos (solo reactivo)	1.460	1.295	1.115	1.030	865	690	555	340	2.000

* Total puérperas analizadas en el periodo 2011-2015 = 13.033, total positivos = 132

** Precio/determinación CT/NG = 20€ (18€ IVA incluido + 10% controles); coste/año = total (2011-junio2015)/4,5

Cribado gestacional a las <30 años: coste estimado = 15.200€ (20% de 3.800 x 20€determinación); ahorro estimado vs cribado universal = 61.000€/año (76.000 – 15.200)

HUD ≈62% gestaciones de Gipuzkoa; ampliación del cribado a los hospitales comarcales (+ ≈25%)

6.1.1.7. Limitaciones del estudio de prevalencia

La principal fortaleza de este estudio es su carácter de base poblacional, dado que su población diana fueron las parturientas de un área geográfica, atendidas consecutivamente por el sistema público de Salud. Sin embargo, el estudio presenta varias limitaciones por lo que los resultados obtenidos deben ser manejados con

precaución. En primer lugar, no alcanzó a las mujeres asistidas por el Sistema de Salud Privado en las que es esperable una prevalencia de infección por *C. trachomatis* menor, debido a que atiende mujeres de nivel socioeconómico en general más alto ⁽²²⁹⁾. Sin embargo, estimamos que estas mujeres representan solo un 13% del total de parturientas del territorio (EUSTAT- Instituto Vasco de Estadística), por lo que el efecto de su ausencia en los resultados del estudio es pequeño. Además, esta limitación es parcialmente corregida por el cálculo de prevalencias ajustadas por edad en relación a la población de parturientas de Gipuzkoa. En segundo lugar, la cobertura global fue 76%. Aunque no registramos las causas de este problema, la mayor parte de las mujeres no testadas no lo fueron porque en determinados períodos, especialmente en el primer año del estudio, y en períodos vacacionales, no se dispuso de suficiente personal entrenado para ofrecerles la prueba. De hecho, tras el primer año de estudio la cobertura trimestral osciló entre el 80-90%. Otra causa fue que aquellas orinas muy hematóricas fueron descartadas en la planta hospitalaria, no llegando al laboratorio otra muestra al ser dadas pronto de alta las puérperas. Sin embargo, estos problemas afectaron por igual a las mujeres, independientemente de su riesgo de infección con *Chlamydia*. Por otra parte, aunque estimamos que fue pequeño (<5%), desconocemos el porcentaje de mujeres que no aceptaron realizar la prueba y no se recogió ninguna información específica sobre no-respondedoras. En tercer lugar, el estudio no incluyó a mujeres atendidas por aborto voluntario, grupo en el que la prevalencia de la infección es presumiblemente elevada ⁽²³⁰⁾, ni por aborto espontáneo por lo que los datos obtenidos no pueden ser extrapolados directamente a la totalidad de las mujeres embarazadas.

6.1.2. Infección por *C. trachomatis* y prematuridad

En cuanto a las complicaciones gestacionales asociadas con la infección por *C. trachomatis*, recientemente, Rours et al., en un estudio prospectivo de cohortes y base poblacional que incluyó 3.913 gestantes con una prevalencia de infección por *C. trachomatis* de 3,9% asociaron esta infección con parto pretérmino antes de las 32 y 35 semanas (14,9% [IC95% 4,5-39,5] y 7,4% [IC95% 2,5-20,1], respectivamente), pero no con bajo peso del recién nacido ⁽¹²⁸⁾. Blas et al. en USA, en otro amplio estudio retrospectivo de base poblacional encontraron también una asociación entre prematuridad e infección por *C. trachomatis* ⁽¹²⁵⁾. Los resultados observados en el presente estudio, prospectivo y de base poblacional, apoyan esta asociación, dado que las mujeres infectadas con *C. trachomatis* tuvieron un riesgo mayor de dar a luz niños prematuros (4,8% infección [IC95% 1,7-13,1] en <35 semanas vs 1,3% [IC95% 1,0-1,7] en ≥35semanas, p=0,05, riesgo relativo=3,69), aunque no niños con bajo peso al nacer (tabla 15). Los resultados de estos y otros estudios ^(231,232) apoyan la importancia de detectar y tratar las gestantes con infección por *C. trachomatis*.

Entre las limitaciones de este estudio habría que tener en cuenta que la medición de la edad gestacional se realizó en función de la fecha de la última regla (y no mediante ecografía de perímetro craneal, más precisa), así como la posibilidad de que infecciones sintomáticas por *C. trachomatis* hayan podido ser diagnosticadas y tratadas durante la gestación, y otras infecciones/factores asociados a prematuridad no descartados en el grupo de no infectadas. Por último, la asociación entre infección por *C. trachomatis* y prematuridad observada en el análisis univariante, no pudo ser analizada en un análisis multivariante en el que se tuviera en cuenta la posible asociación de la variable con la edad de la madre, debido al pequeño número de casos.

6.1.3. Transmisión vertical

La transmisión vertical de la infección por *C. trachomatis* ha sido poco estudiada y existen escasas publicaciones recientes empleando TAAN que hayan investigado el porcentaje de recién nacidos infectados durante el parto a partir de sus madres ^(149,150,233). Los resultados de estos trabajos son muy variables, oscilando el porcentaje de neonatos infectados entre el 24% y el 75%, y resulta difícil compararlos y obtener conclusiones por presentar importantes limitaciones como incluir pocas parejas madre/hijo, no ser prospectivos, utilizar distintos criterios de inclusión y/o exclusión (partos vaginales o por cesárea, tratamiento antibiótico en el parto...), obtener la muestra en diferentes momentos, o estudiar subgrupos especiales como partos prematuros. Estos estudios están realizados aparentemente sin haber sido administrada profilaxis antibiótica tópica a los recién nacidos ⁽²³³⁾.

La profilaxis antibiótica tópica para prevenir la *ophthalmia neonatorum*, descrita por Credé en 1881, consiguió a lo largo del pasado siglo reducir las tasas de transmisión vertical de esta infección y la ceguera producida en ocasiones por la misma, fundamentalmente debida a *N. gonorrhoeae* (por progresar ésta más rápidamente y ser en épocas anteriores la incidencia de su infección mayor que la de *C. trachomatis*). Con los años, la mejora en la detección y tratamiento de las infecciones por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en mujeres sintomáticas o asintomáticas controladas en programas de cribado, ocasionó un importante descenso en la incidencia de la *ophthalmia neonatorum*, lo que junto con la posibilidad de detectarla y atenderla adecuadamente en controles neonatales motivó que algunos países abandonaran su práctica ⁽²³⁴⁾. Actualmente, la tasa de *ophthalmia neonatorum* debida a *C. trachomatis* es mayor que la de *N. gonorrhoeae* al ser su incidencia y prevalencia también mayor en las gestantes. Aunque la profilaxis antibiótica tópica ha mostrado menor eficacia frente a *C. trachomatis* que frente a *N.*

Discusión

gonorrhoeae ^(148,235), Hammerschlag et al. describieron en recién nacidos de madres infectadas por *C. trachomatis* (excluyendo partos por cesárea y madres que recibieron tratamiento antibiótico preparto) una tasa de *ophthalmia neonatorum* (infección sintomática o asintomática detectada mediante cultivo) menor en los niños que recibieron profilaxis que en los que no (11-20% según el antibiótico administrado vs 33%, respectivamente) ⁽²³⁶⁾.

En el presente trabajo no se detectó *N. gonorrhoeae* en ninguna púérpera y, a pesar de la realización sistemática de la maniobra de Credé con hidrocloreuro de clortetraciclina o tobramicina a todos los recién nacidos, se constató una transmisión vertical de *C. trachomatis* en el 10,7% (11/103) de los casos, presentando conjuntivitis un 3,9% (4/103). En base a estos datos estimamos que, en el País Vasco, ~1/1.000 recién nacidos es infectado por *C. trachomatis* en el parto y que al año por este motivo (~20.000 nacimientos) podrían producirse ≈8 conjuntivitis neonatales a pesar de la profilaxis antibiótica tópica universal frente a la *ophthalmia neonatorum*. La cifra de transmisión vertical ascendería a 15,5% (11/71) si se excluyen partos por cesárea y casos en que la madre haya recibido tratamiento antibiótico previo o durante el parto, cifras similares a las descritas por Hammerschlag et al. (aunque empleando una técnica de diagnóstico más sensible, TAAN vs cultivo).

Ninguno de los niños infectados nació por cesárea, ni era pretérmino ni de bajo peso, ni su madre durante el parto o en el mes previo recibió tratamiento antibiótico por otras causas (tabla 16). Casi un 30% (30/103) de las madres habían recibido durante o en las 48 horas previas al parto tratamiento antibiótico con beta-lactámicos (por ser portadoras de *Streptococcus agalactiae*, presentar fiebre intraparto, etc), hecho que pudo prevenir la transmisión vertical de *C. trachomatis* (0/30 vs 11/62, p=0,03). En España se han publicado tasas de colonización por *S. agalactiae* en embarazadas del 12-20%, estando

recomendado la administración de profilaxis antibiótica intraparto (penicilina o ampicilina) a todas las gestantes colonizadas para prevenir la sepsis neonatal precoz por este microorganismo ^(237,238). Por tanto, es esperable que por éste u otros motivos (por ejemplo una reciente infección urinaria, partos por cesárea, etc.) un porcentaje significativo de las gestantes hayan recibido en fechas próximas al parto o durante el mismo un tratamiento antibiótico con actividad frente a *C. trachomatis*. Podemos especular que en algunos casos, el tratamiento antibiótico intercurrente intraparto o cercano al mismo eliminará la infección materna, pero el ADN de *C. trachomatis* sigue siendo detectable mediante TAAN aún unos días/semanas ⁽²⁰⁾. En otros disminuirá transitoriamente la carga bacteriana materna y por tanto las oportunidades de transmisión vertical. Por último, el neonato puede recibir una concentración de antibiótico vía cordón que dificulte su colonización y por tanto posterior infección inmediatamente tras el parto.

Es posible que en la probabilidad de transmisión perinatal de *C. trachomatis* concurren varios factores entre los que se incluyan aquellos que ocasionen un mayor o más duradero contacto entre las mucosas maternas infectadas y las del recién nacido durante el parto ⁽²³⁹⁾, así como una mayor carga bacteriana en la madre. Pero en el presente estudio no se encontraron diferencias en la transmisión vertical en primíparas, partos con RPM previa o realizados con fórceps o ventosa (tabla 16). Tampoco se encontraron diferencias en un análisis semicuantitativo de la carga bacteriana en función de los ciclos de amplificación entre las madres que transmitieron la infección a sus hijos y las que no. Sin embargo, este cálculo se realizó sobre muestras de orina obtenidas tras el parto y no en muestras de cérvix inmediatamente antes del parto como hubiera sido ideal para valorar y analizar con mayor precisión este dato. A pesar de haber sido referida una mayor probabilidad de conjuntivitis neonatal por el genotipo E de *C. trachomatis* ⁽²⁴⁰⁾,

Discusión

en el presente estudio no se constató ninguna diferencia en la distribución de los genotipos asociada a una mayor transmisión vertical.

En el momento de realizarse la toma de muestra faríngea y/o conjuntival para el control de la infección, aproximadamente 7-10 días tras el parto, siete niños infectados fueron asintomáticos y cuatro presentaban conjuntivitis. Todos los casos fueron tratados resolviéndose la infección y no detectándose durante el seguimiento clínico ninguna infección oftalmológica ni respiratoria. Rours et al. han referido que *C. trachomatis* es una causa frecuente de conjuntivitis neonatal (61-64%, primera causa) y neumonía infantil (7%, segunda causa tras virus respiratorio sincitial) en niños menores de 3-6 meses en ausencia del cribado de la infección gestacional y de la profilaxis antibiótica tópica neonatal, siendo su diagnóstico clínico indiferenciable de otras etiologías y con una susceptibilidad antibiótica diferente a los tratamientos empíricos habitualmente empleados ^(152,153). En nuestra área sanitaria no se diagnosticó ningún caso aparte de los detectados mediante el cribado y control de la infección en puérperas y sus recién nacidos durante los años de este estudio, lo que indica que el cribado (y posterior vigilancia de neonatos potencialmente infectados) permitió detectar la práctica totalidad de estos casos.

En conjunto, estos datos indican que además del control de infección por *C. trachomatis* en puérperas, los recién nacidos de madres infectadas pueden beneficiarse del control de su transmisión vertical, ya que la maniobra de Credé solo es parcialmente eficaz. Asimismo, la realización de un cribado gestacional de la infección permitiría cuestionarse la posibilidad de eliminar la profilaxis de Credé, ya que la infección sería controlada antes del parto.

6.2. Impacto e incidencia de la infección por *C. trachomatis* en Gipuzkoa

6.2.1. Demanda diagnóstica

El impacto de la infección por *C. trachomatis* para el Sistema Sanitario en Gipuzkoa ha sido creciente en los últimos quince años, coincidiendo con lo referido en otras partes del mundo ^(36,110). Este incremento se ha producido por múltiples factores que han ocasionado un aumento de la demanda diagnóstica y, probablemente también, por un aumento simultáneo en la incidencia de la infección. Pero para comprobar si entre estos factores también se podría incluir la posibilidad de una mayor transmisión o difusión de la infección, debidos principalmente a cambios en el comportamiento sexual entre la población, sería necesario analizar la evolución de la prevalencia de la infección en la población general o al menos en determinados grupos.

Entre los factores que han influido en una mayor demanda diagnóstica destacan las progresivas mejoras de las técnicas de detección de *C. trachomatis* (introducción de TAAN), junto con el mejor conocimiento de la infección por médicos y pacientes, nuevas necesidades de diagnóstico clínico, mayor número de muestras analizadas por episodio, y utilización de más variedad de muestras. Las TAAN han aportado mayor sensibilidad, especificidad y rapidez que las técnicas precedentes basadas en la detección de antígeno, un mayor nivel de automatización y la posibilidad de analizar diferentes tipos de muestras, todo lo cual las ha convertido en el método diagnóstico de elección ⁽²⁰⁾. Ello ha permitido detectar un mayor número de casos y comunicarlos más rápidamente, contribuyendo a un mayor conocimiento de la infección y de su expresión clínica tanto por parte de los médicos solicitantes de diagnóstico como incluso de los propios pacientes que pueden demandarlo tras una relación sexual de riesgo. La mejora

Discusión

en el manejo diagnóstico de la infección ha generado nuevas rutinas diagnósticas que han contribuido a su vez a incrementar la demanda: inclusión de la sospecha diagnóstica en un mayor número de entidades clínicas, búsqueda más exhaustiva de posibles casos (mayor concienciación de la necesidad de efectuar un control de contactos, análisis de muestras de más localizaciones anatómicas ante posibles casos...), introducción de cribados en grupos con mayor riesgo y/o costo-eficacia de su detección, etc.

Así, a lo largo del presente estudio, se observó que en todos los grupos de Servicios Asistenciales peticionarios este aumento fue progresivo. Además, la introducción en nuestra comarca del cribado de infección en gestantes y en menor medida la aparición de nuevas demandas diagnósticas (ej: búsqueda de casos de uretritis en varones procedentes de Atención Primaria con sospecha clínica inicial de infección urinaria, con leucocituria y urocultivo negativo) han contribuido al incremento de episodios analizados. El número de muestras procesadas por episodio en la rutina diagnóstica (1,5 de media) también ha aumentado a lo largo de los años, especialmente en pacientes con sospecha de ITS procedentes tanto de Atención Primaria (1,1 en 2006-09 y 2,3 en 2013-15) como de la consulta de ETS (1,2 en 2006-09 y 2,1 en 2013-15). Por ello, en los últimos años de estudio, y fruto de un mejor manejo de las ITS (mayor y mejor dirigida sospecha diagnóstica, anamnesis más detallada, etc.), se constató un aumento en el número de muestras procesadas en más localizaciones posibles de la infección, como muestras faríngeas, conjuntivales, rectales, etc. El porcentaje de episodios positivos se ha situado entre el 6-12% en la mayor parte de los grupos de servicios peticionarios, siendo del 1% en las muestras del cribado gestacional (mayoritariamente casos asintomáticos) y del 15-25% en Atención Primaria al incluir este grupo esencialmente casos sintomáticos de posibles ITS (especialmente desde 2012 en que además se

rescatan casos positivos en varones con sospecha inicial de ITU pero con urocultivo negativo y leucocituria).

La orina, en nuestra experiencia, constituye una muestra adecuada no solo para la detección de *C. trachomatis* en cribados de la infección en población mayoritariamente asintomática (1% positivos), sino también para el diagnóstico de casos sintomáticos (21% positivos), especialmente en hombres, pudiendo sustituir en algunos casos a otras muestras de más difícil obtención. En su conjunto, la rentabilidad diagnóstica de las muestras genitales de los hombres (11,2%) fue mayor que las de las mujeres (8,2%), lo que puede ser debido a que la infección es más sintomática en los hombres que en las mujeres ⁽²⁶⁾ y por tanto su probabilidad diagnóstica entre los que acuden a la consulta por una sospecha de ITS mayor. El número de muestras procesadas por años aumentó de manera similar en hombres y en mujeres, siendo mayor el número de muestras procesadas en las mujeres de 25-44 años.

La detección de casos de infección en muestras faríngeas no fue frecuente (2,1% positivas, 1,7% si se excluyen las del control de transmisión vertical en hijos de puérperas del cribado), pero aportó valor añadido a los diagnósticos, ya que contribuyó a detectar algunos casos en contactos asintomáticos de pacientes infectados y otros casos asintomáticos con prácticas sexuales de riesgo, permitiendo mejorar el control de la diseminación de la infección y evitando reinfecciones en sus parejas. En el mismo sentido, las muestras rectales (6,9% positivas) permitieron completar epidemiológicamente algunos diagnósticos y detectar casos de LGV. También en los tres últimos años se procesaron más muestras conjuntivales (5,2% positivas) procedentes del control neonatal de la infección en casos positivos de puérperas del cribado, de niños menores de tres meses con conjuntivitis, y de pacientes con

Discusión

conjuntivitis foliculares con fracaso a los tratamientos antibióticos habitualmente empleados empíricamente (15% de episodios positivos, 14/95).

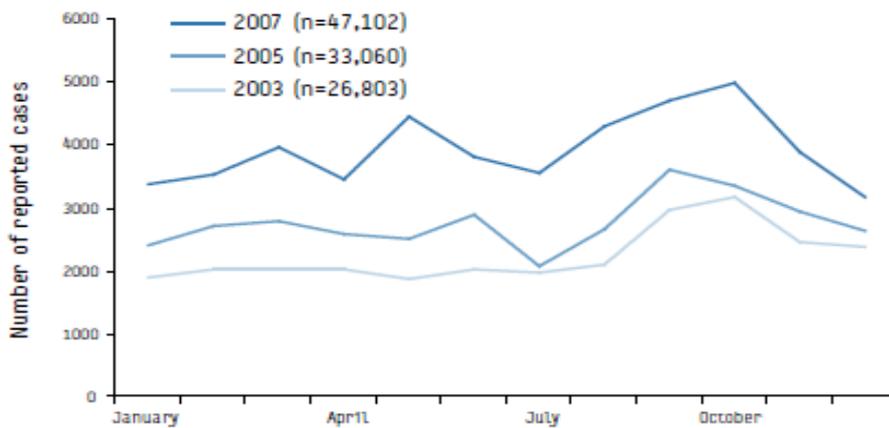
Si bien la introducción de métodos moleculares de diagnóstico en el Servicio de Microbiología del HUD en 2006 se vio acompañada de un incremento paulatino en el número de muestras procesadas cada año, ese aumento ya se había constatado en el quinquenio 2001-2005, en el que aún se empleaban los mismos métodos serológicos de diagnóstico que en las décadas precedentes (detección de antígeno de *C. trachomatis* mediante IFD con Ac monoclonales). Este repunte de principios de siglo también se constató en otras ITS en nuestro país ⁽²⁴¹⁾. Previamente, desde los años 80 hasta finales del siglo pasado, el número de muestras y de casos positivos había sido descendente, coincidiendo con las campañas de prevención instauradas y mantenidas para combatir la transmisión del VIH, habiendo sido ampliamente documentado este descenso en el resto de ITS en los países desarrollados, incluyendo España ⁽²⁴¹⁻²⁴³⁾. Sin embargo, tanto el importante descenso en la incidencia de ITS ocurrido al final del siglo pasado como el desarrollo de nuevas terapias más efectivas frente al VIH pudieron contribuir a una relajación en el cumplimiento individual de dichas medidas preventivas, sobre todo en determinados grupos de riesgo, favoreciendo el resurgimiento de las ITS desde principios del presente siglo.

En este estudio se observó una cierta estacionalidad en la mayor demanda diagnóstica en periodos post-vacacionales, hecho que ya ha sido referido en Suecia (figura 43) ⁽¹⁹⁵⁾.

Los meses con mayor número de muestras procesadas y positivas fueron febrero, mayo, y de agosto a noviembre (figura 35). Si suponemos que en periodos vacacionales de navidad, semana santa y verano, se produce un mayor número de contactos sexuales y contamos con un periodo de incubación y aparición de síntomas para acudir a los

servicios médicos para su diagnóstico de 2-6 semanas, los aumentos referidos se corresponden con los meses mencionados.

Figura 43. Número de casos *C. trachomatis* positivos declarados en Suecia en los años 2003, 2005 y 2007 (obtenido de Hansdotter et al, Euro Surveill 2008;13:18984).



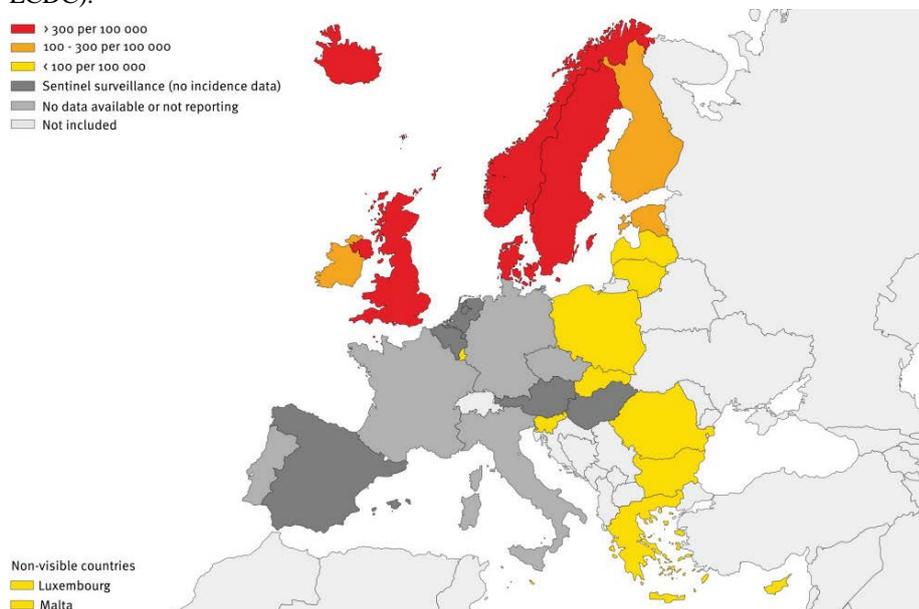
6.2.2. Incidencia de nuevos casos de infección

C. trachomatis es la primera causa bacteriana de ITS, estimándose que se producen más de 100 millones de nuevas infecciones al año en el mundo ⁽³⁶⁾. La incidencia de infección declarada en los últimos años en varios países europeos muestra una tendencia ascendente (figura 6), hecho que también se observó en el presente estudio (figuras 35 y 39) y que, como se ha desarrollado en el apartado anterior, puede ser debido a múltiples causas (mejores técnicas diagnósticas, mejor conocimiento de la infección, etc.) a las que habría que añadir una mejora en los sistemas de declaración. En cualquier caso, la comparación de la incidencia de infección por *C. trachomatis* entre países es difícil, dadas las diferencias existentes entre los Sistemas Nacionales de Vigilancia y Declaración (figura 44). Una baja tasa puede estar subestimando la incidencia real si existe una incorrecta declaración o si las medidas diagnósticas son inadecuadas y se

Discusión

detectan pocos casos. Por otra parte, una tasa elevada no significa necesariamente una mayor transmisión de la infección en países que estén incorporando programas de cribado y otras rutinas diagnósticas capaces detectar un mayor número de casos, en muchas ocasiones asintomáticos.

Figura 44. Infección por *C. trachomatis*: número de casos/100.000 habitantes declarados en Europa (obtenido de Sexually transmitted infections in Europe 2011, ECDC).



En este sentido, con respecto a los datos más recientes sobre la infección por *C. trachomatis* en Europa, detallados por países y relativos al año 2012 ⁽²⁴⁴⁾, se puede observar cómo de los 384.105 casos declarados, 237.675 (62%) corresponden sólo al Reino Unido y si se añade además los casos de Noruega, Suecia y Finlandia (tres países del norte de Europa) suman el 80% del total de casos declarados por 25 países. En estos cuatro países se observan las tasas de incidencia más elevadas de Europa (374, 431, 388 y 245/100.000 habitantes, respectivamente) junto con las observadas en Islandia y

Dinamarca (tasas de 600 y 473/100.000, respectivamente). Estos datos contrastan con los aportados por cinco países (Bulgaria, Chipre, Luxemburgo, Polonia y Rumanía) que declaran tasas $<2/100.000$ habitantes, lo que sugiere una importante subdeclaración de casos. En otros países como Bélgica, Francia, Italia, Países Bajos y España, se declaran casos pero no se pueden calcular tasas de incidencia ya que no están referidos a toda la población nacional. Finalmente, otro grupo de países como Austria, República Checa, Alemania, Portugal y Liechtenstein no aportan datos. Las diferencias observadas entre unos y otros países son muy grandes y no parece que se correspondan con la realidad. Por tanto, la vigilancia y declaración de casos de infección por *C. trachomatis* en Europa debe mejorar y ser más homogénea para poder comparar las posibles diferencias en la incidencia entre países.

En lo que respecta a España, la declaración de casos de infección por *C. trachomatis* es voluntaria y se realiza a través del Sistema de Información Microbiológica (SIM). En la última publicación del SIM en julio de 2014 refiriendo los datos de 2013, se notificaron a nivel nacional 1.410 ITS por *C. trachomatis* procedentes de 34 laboratorios de 7 Comunidades Autónomas, 300 de ellas (21%) del País Vasco (tabla 33) ⁽²⁴⁵⁾. Sin embargo, en base a los 293 casos detectados ese año en nuestro laboratorio para una población estudiada de 637.000 habitantes en Gipuzkoa, y suponiendo una incidencia con pocas variaciones entre Comunidades Autónomas, se podría estimar en España un número de casos 15 veces mayor (mínimo de 21.500). Además de la falta de declaración, otra limitación que se observa al analizar en detalle los datos de incidencia es que la información entre los distintos Sistemas de Vigilancia no fluye adecuadamente y parece perderse en parte, encontrándose diferencias en los datos referidos a la misma población y año en cada uno de ellos. Así por ejemplo, mientras en 2013 el SIM de España notificó 300 casos correspondientes a todo el País Vasco ⁽²⁴⁵⁾, sólo la Unidad de

Discusión

Epidemiología de Gipuzkoa notificó 279 casos ⁽²⁴⁶⁾. Globalmente estos datos indican una importante subdeclaración de la infección por *C. trachomatis* a nivel de España y que, en lo que respecta a la vigilancia de esta infección, el flujo de información debe ser mejorado y realizado con criterios uniformes. Esta carencia, que se observaba también en otras enfermedades transmisibles, ha llevado a modificar en marzo de 2015 la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en España en la que la infección por *C. trachomatis* se ha incluido entre las enfermedades de declaración obligatoria (EDO), lo que permitirá que la información obtenida sea representativa de la población general y comparable a los datos de otros países o entre Comunidades Autónomas, como sucede con otras ITS con menor incidencia y carga asistencial como gonorrea o sífilis ^(247,248).

Tabla 33. Distribución por Comunidad Autónoma de las infecciones de transmisión sexual por *C. trachomatis*, Sistema de Información Microbiológica (España 2013).

Comunidad Autónoma	Nº de infecciones
Aragón	42
Canarias	70
Cataluña	868
Ceuta	3
Extremadura	40
Navarra	87
País Vasco	300
Total	1.410

La incidencia global de infección por *C. trachomatis* obtenida en este estudio (Gipuzkoa) en el periodo 2013-15 fue de 50,0/100.000 habitantes, sensiblemente inferior a la registrada en 2013 en el conjunto de Europa (181,7/100.000) ⁽³⁸⁾ y EEUU (446,6/100.000) ⁽³⁷⁾. Aunque con valores también inferiores, la distribución por sexo y edades de la incidencia fue similar a la declarada en Europa y EEUU. La incidencia más elevada en Gipuzkoa se registró en el grupo de 20-24 años de edad (243,5/100.000 habitantes) y especialmente en mujeres (269,3/100.000). En Europa (figura 45) y en

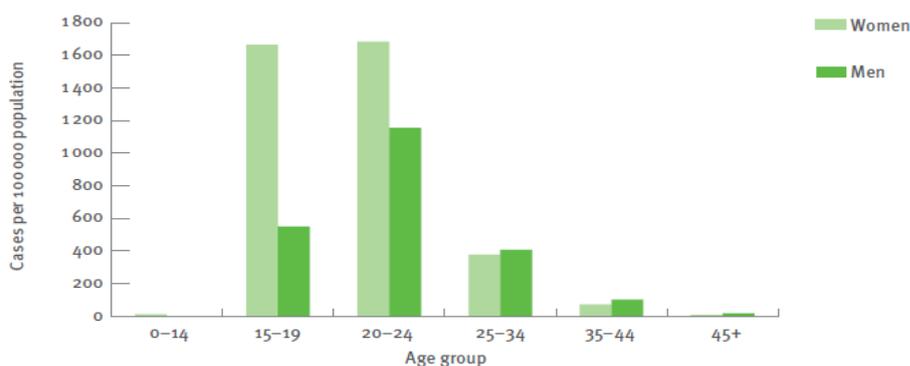
EEUU la máxima incidencia también se declaró en ese grupo de edad (1.438 y 2.452/100.000, respectivamente), siendo también mayor en mujeres (1.717 y 3.621/100.000, respectivamente) ^(37,38). En EEUU, la incidencia más elevada (7.343/100.000) se observa en las mujeres de raza negra de 20-24 años de edad ⁽³⁷⁾. Asimismo, es de destacar que el incremento registrado en la incidencia de la infección en los últimos años se ha producido más claramente en la población más joven (figura 38) ⁽¹⁸⁶⁾, si bien este dato puede estar sobreestimado en los países que han implementado cribados de la infección en menores de 25 años ⁽³⁸⁾.

Por sexos, apenas se observaron diferencias a lo largo de los años del presente estudio excepto en los tres últimos, en que aumentaron los casos detectados en hombres respecto a las mujeres, debido principalmente a la incorporación a la rutina diagnóstica de la infección por *C. trachomatis* en varones con leucocituria y urocultivo negativo (figura 39); en esos tres años (2013-15), el ratio hombres/mujeres fue 1:0,9, siendo la incidencia global mayor en hombres (55,2/100.00) que en mujeres (45,0/100.000). En algunos países europeos y en EEUU (figura 46) la incidencia descrita es en conjunto mayor en mujeres (ratio hombres/mujeres 0,7:1 y 0,4:1, respectivamente), aunque en estos entornos es frecuente la realización de cribados de infección, cuya diana son fundamentalmente mujeres ^(37,38). En el presente estudio la incidencia fue mayor en mujeres que en hombres hasta los 29 años de edad (101,8 vs 76,6/100.000), pero mayor en hombres que en mujeres a partir de los 30 (45,8 vs 23,1/100.000), lo que coincide *a grosso modo* con lo referido por el ECDC quien señala un cambio a mayor incidencia en varones a partir del grupo de 25-34 años ⁽³⁸⁾. Esta mayor incidencia en mujeres jóvenes puede tener varias explicaciones: inicio anterior a los hombres en sus relaciones sexuales, existencia de recomendaciones en ciertos países para efectuar cribados de la infección en mujeres (principalmente circunscritos a menores de 25 años), escaso

Discusión

control de contactos sexuales de mujeres infectadas (varones que no se analizan salvo si presentan síntomas), etc. Por otra parte, la mayor incidencia a partir de 25-30 años en hombres que en mujeres puede deberse a: diferencia de edad en las parejas heterosexuales (habitualmente los hombres se relacionan con mujeres más jóvenes), mayor promiscuidad en hombres que en mujeres en esas edades, mayor número de relaciones sexuales de riesgo en HSH, etc.

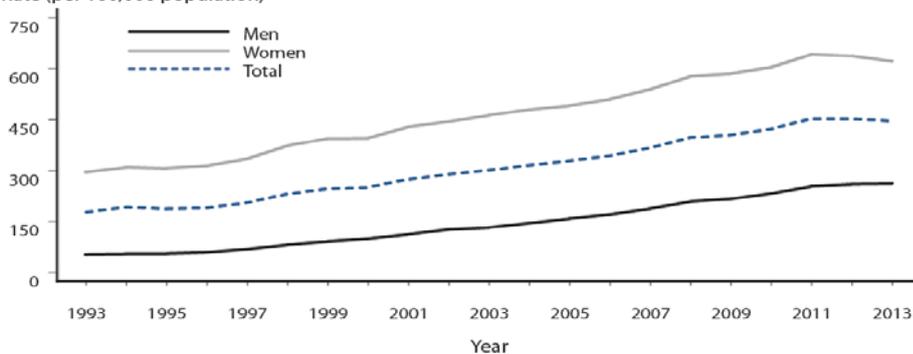
Figura 45. Distribución por sexo y edad de la infección por *C. trachomatis* en Europa*: casos/100.000 habitantes en 2013 (obtenido de European Centre for Disease Prevention and Control, 2015).



* Fuente: datos declarados por Bulgaria, Chipre, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, Finlandia, Grecia, Irlanda, Islandia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Reino Unido, Rumanía, y Suecia.

Figura 46. Evolución anual (1993-2013) de la incidencia de infección por *C. trachomatis* global y por sexo en EEUU (obtenido de Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

Rate (per 100,000 population)



6.3. Incidencia y papel de *C. trachomatis* en relación a otros agentes de infecciones de transmisión sexual

6.3.1. Varones con síndrome uretral

En los varones con síndrome uretral, la obtención de muestras de exudado uretral y primera fracción de la orina permite realizar una tinción de gram, cultivo en medios de crecimiento bacteriano y pruebas de diagnóstico molecular para investigar su posible etiología infecciosa. En estos casos, la presencia de leucocitos en el gram (>3-5/campo x1000) sugiere una posible etiología infecciosa, estando recomendado hasta disponer de los resultados del análisis iniciar un tratamiento empírico con azitromicina, que debe incluir ceftriaxona ante la visualización de diplococos gramnegativos intracelulares (diagnóstico rápido de uretritis gonocócica). Además, está indicado realizar una serología de otras posibles ITS como VIH, sífilis y hepatitis.

C. trachomatis fue en este estudio la principal causa de uretritis infecciosas en varones (31,1%, 23% del total de episodios con sospecha clínica de síndrome uretral), seguido de *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium* (18,6%, 14,4% y 13,6%, respectivamente). Los resultados obtenidos en este estudio (tabla 18) son similares a los descritos en publicaciones contemporáneas de otros países, en las que empleando métodos moleculares de detección, *C. trachomatis* es el principal patógeno causante del 20-50% de las uretritis no gonocócicas masculinas⁽²⁴⁹⁻²⁵³⁾. Sin embargo, los resultados de este estudio contrastan fuertemente con los encontrados en España a finales del siglo pasado⁽²⁵⁴⁾. Varela et al, entre 1995 y 2000, analizando 1.116 episodios de uretritis en Asturias (a partir de 1997 mediante técnicas de PCR o LCR), detectaron *C. trachomatis* en un 3,9% de las muestras. A pesar del empleo de métodos moleculares solo en algo

Discusión

más de la segunda parte del período de estudio, y de que es difícil comparar los grupos de pacientes empleados en ambos estudios, la gran diferencia observada (3,9% en Asturias versus 31,1% en el presente estudio) sugiere un importante incremento en la incidencia y prevalencia de la infección por *C. trachomatis* a lo largo del siglo XXI en España.

N. gonorrhoeae se detectó, como *M. genitalium*, en un 14% de los casos de uretritis infecciosas. Habitualmente causa uretritis con secreción más abundante, purulenta y sintomática que otros microorganismos. En el presente estudio, en la tinción de gram se observaron leucocitos en cantidad “abundante (+++)” en más ocasiones (92% en uretra y/o orina, 77% en uretra) que los demás microorganismos (*C. trachomatis*, *M. genitalium* y *U. urealyticum* en conjunto: 55% en uretra y/o orina y 17% en uretra, $p=0,014$ y $p<0,001$ respectivamente). La tinción de gram además permite un diagnóstico rápido de la uretritis gonocócica y la instauración inmediata de su tratamiento antibiótico tras la visualización de diplococos gramnegativos con una alta sensibilidad en uretritis masculinas (85% en nuestro estudio) ⁽²⁴⁹⁾. Aunque la detección de *N. gonorrhoeae* puede realizarse hoy en día con TAAN, no debe abandonarse su detección mediante cultivo para conocer la evolución de la susceptibilidad antibiótica en cada área geográfica. En los últimos años ha sido descrita la disminución de la susceptibilidad y la aparición de resistencias a cefalosporinas frente a *N. gonorrhoeae* ^(255,256), si bien en España aun son excepcionales ⁽²⁵⁷⁾ y en nuestro entorno no han sido detectadas.

M. genitalium es un patógeno reconocido de uretritis agudas (considerado principal responsable de recidivas y uretritis no resueltas), causante del 10-30% de las uretritis no gonocócicas masculinas ^(249-253,258,259), siendo en nuestro estudio el segundo patógeno en frecuencia (14%) junto con *N. gonorrhoeae*. Su importancia en los últimos años está cobrando una relevancia ascendente, por lo que debe ser tenido en cuenta en la rutina

diagnóstica de las uretritis en varones, entre los que ocasionalmente ha llegado a ser referido incluso como causa más frecuente de infecciones sintomáticas que *C. trachomatis* ⁽²⁵²⁾. Su diagnóstico debe realizarse mediante técnicas moleculares, disponibles en el ámbito comercial solo desde hace pocos años, mucho más rápidas y sensibles que los métodos clásicos basados en el cultivo. Su detección tiene además interés terapéutico, dado que han sido referidas tasas inadecuadas de cura con las pautas clásicas de tratamiento empírico (una dosis oral única de 1 gramo de azitromicina, alternativa doxiciclina 100 mg/12h una semana), concretamente de hasta el 60% y 30% respectivamente para azitromicina y doxiciclina, lo que puede inducir la selección de cepas resistentes y hace necesario en estos casos un retratamiento diferente ^(253,260). La identificación de resistencias a macrólidos en *M. genitalium* puede realizarse también mediante TAAN ⁽²⁶¹⁾. Si el tratamiento antibiótico no estaba instaurado antes del diagnóstico microbiológico, puede iniciarse una pauta con azitromicina 500 mg en una dosis inicial seguida de 250 mg/día durante cuatro días ^(262,263). Asimismo, la pauta con moxifloxacino 400 mg/día durante una semana se ha empleado con éxito en pacientes con fallos previos de tratamiento a *M. genitalium* ^(262,264).

U. urealyticum es considerado causante potencial de uretritis masculinas, aunque su papel es controvertido ya que puede detectarse colonizando la uretra de pacientes asintomáticos. Ha sido descrito que una carga bacteriana elevada (≥ 5.000 copias/ml de primera fracción de la orina) se asocia con la presencia de síntomas de uretritis y un mayor recuento de leucocitos en orina de primera fracción ^(259,265). En el presente trabajo se detectó en el 18,6% (11/59) de los casos considerados como probables uretritis infecciosas por presentar además de síntomas uretrales leucocitos en la tinción de gram, aunque el 64% de ellos junto a otros microorganismos (18% causantes reconocidos de uretritis).

Discusión

T. vaginalis es una causa de uretritis poco frecuente en Europa Occidental ⁽²⁶⁶⁾, que en el presente estudio se detectó en solo un caso. Está recomendado realizar su detección mediante TAAN ⁽²⁴⁹⁾, y debe ser tenido siempre en cuenta en el diagnóstico diferencial de uretritis recidivantes, ya que su tratamiento (metronidazol 2 gr en una dosis oral) es diferente al empleado en las pautas de tratamiento empírico de las uretritis.

Hay otros microorganismos que pueden detectarse en ITS, cuya asociación con uretritis es inconsistente. Su valoración clínica debe ser cuestionada, requiriendo en la práctica asistencial criterios microbiológicos claros (visualización en la tinción de gram, cultivo abundante y en ausencia de otros patógenos) y un seguimiento individualizado de la evolución de la infección (aspectos epidemiológicos, diagnóstico diferencial, respuesta clínica al tratamiento...). *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* pueden ser transmitidos a través de relaciones sexuales orales sin protección y pueden asociarse aisladamente a casos de uretritis, 6,8% en un reciente estudio en nuestro país ⁽²⁶⁷⁾; en el presente estudio se detectaron en 10/122 casos, pero solo en cuatro (3,3%) de ellos como único patógeno y con presencia de leucocitos en el gram, considerándose en los otros 6 casos como colonizantes. *G. vaginalis* se detecta ocasionalmente en varones con uretritis (10 casos en esta serie) y excepcionalmente también pueden identificarse otras bacterias asociadas a la vaginosis bacteriana menos conocidas (*Actinomyces turicensis*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Lactobacillus iners*...). *U. parvum* y *M. hominis* no son considerados patógenos causantes de uretritis masculinas ⁽²⁴⁹⁾ y no se han ofrecido datos sobre ellos en esta serie.

En ocasiones la clínica persiste y en estos casos, además de asegurarse del correcto cumplimiento del tratamiento y de descartar reinfecciones por incumplimiento en el control de contactos, es necesario valorar y/o investigar la presencia de infecciones mixtas, así como de otros posibles patógenos como *Candida* spp., adenovirus (que

puede ir asociado con conjuntivitis), virus herpes simplex, etc. Las infecciones mixtas por estos y/o otros microorganismos presentes en ITS (tabla 23) son frecuentes (25% en nuestro estudio) y deben ser tenidas en cuenta, ya que en ocasiones puede ser necesario modificar la pauta antibiótica administrada.

En el presente estudio, de los 122 episodios con síndrome uretral (tabla 22), 90 (74%) presentaron leucocitos en la tinción de gram y fueron considerados como posibles uretritis infecciosas, detectándose en 77 (86%) de ellos algún microorganismo potencialmente causante de uretritis. Entre los 32 episodios sin leucocitos en la tinción de gram tan solo uno (3%) fue considerado patógeno causante de ITS (virus herpes simplex tipo 1) y en otros tres se detectó algún microorganismo ocasionalmente relacionado con uretritis infecciosas (*G. vaginalis* en dos casos y *Actinomyces urogenitalis*), lo que indica que la ausencia de leucocitos en secreción genital hace poco probable la presencia de uretritis infecciosa de transmisión sexual. La presencia de leucocitos fue más frecuente en los casos en que se detectaron microorganismos considerados patógenos de uretritis en varones, y semicuantitativamente mayor en las uretritis gonocócicas. Las uretritis causadas por *C. trachomatis*, *M. genitalium* y *U. urealyticum* presentaron leucocitos en todos los episodios, si bien en cantidad “abundante (+++)” sobre todo en orina (51%, frente al 17% en uretra), lo que explica la secreción habitualmente menos purulenta que en las uretritis gonocócicas y la utilidad de la muestra de orina en su diagnóstico.

Finalmente, hay que tener en cuenta que el síndrome uretral (tabla 22) puede tener también causas no infecciosas (9,8% en el presente estudio) como litiasis, alteraciones anatómicas del TGU (hipospadias...), fobia a padecer ITS, etc., y que a pesar de un adecuado manejo clínico y microbiológico de los casos, un porcentaje significativo de los episodios (23,8% en este estudio) quedaron sin filiar (sin causa infecciosa ni no

Discusión

infecciosa objetivable), la mayor parte de ellos sin presencia de leucocitos en la tinción de gram, dato muy similar al publicado recientemente (24%) en un estudio de casos y controles sobre patógenos de uretritis en orina de varones en Suecia ⁽²⁵⁹⁾.

6.3.2. Varones con uretritis no sospechada clínicamente

Se considera que la infección por *C. trachomatis* en varones se presenta de forma asintomática hasta en el 50% de los casos ⁽²⁶⁾. Otra parte de los infectados pueden presentar síntomas leves o difíciles de identificar, siendo confundidos con una ITU, la cual en hombres jóvenes es poco frecuente (solo el 6% de los urocultivos procesados en 2013 en este estudio correspondieron a varones de 15-49 años, y de ellos solo el 11% presentaron un resultado positivo). Por ese motivo, algunos autores han recomendado descartar una infección por *C. trachomatis* en varones con clínica sospechosa de ITU que tengan leucocituria y urocultivo negativo ^(83,268), práctica que no es habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. A pesar de este conocimiento, son pocos los estudios que han abordado la posible confusión diagnóstica entre ITU y uretritis en el varón.

En el presente estudio, se detectó una etiología infecciosa asociada con uretritis en el 72,6% de los varones estudiados con sospecha clínica inicial de ITU con leucocituria y urocultivo negativo (tabla 24). *C. trachomatis* fue el microorganismo detectado con más frecuencia (44% del total de casos, 60,7% de las causas infecciosas). Nassar et al. en Palestina (2006-07) e Ito et al. en Japón (2006-12) detectaron *C. trachomatis* en el 11,5% y el 42,4% de los casos investigados, respectivamente ^(268,269), habiendo probablemente influido en las diferencias observadas las diferentes características de la población estudiada (sintomatología, grupos de riesgo, edad...). Otros microorganismos

que se consideraron causantes de la sintomatología y que no hubieran sido detectados en un urocultivo habitual fueron *M. genitalium* y *U. urealyticum* (9,5% y 8,3% de los casos, respectivamente). Por tanto, la investigación mediante TAAN de *C. trachomatis* y otros microorganismos causantes de ITS permitió filiar un 62% (52/84) de casos sospechosos de ITU en varones con leucocituria pero urocultivo negativo, que hubieran sido subdiagnosticados e incorrectamente tratados de forma empírica con antibióticos indicados en ITU que no son eficaces frente a éstos. *N. gonorrhoeae* se detectó solo en 2 casos, probablemente porque habitualmente esta infección cursa de forma sintomática en el hombre y la uretritis puede ser más fácilmente sospechada clínicamente. Además, la exploración y manejo individualizado de los casos permitió detectar otras causas no infecciosas de la leucocituria (más frecuentes en el grupo de los mayores de 30 años).

Los resultados de este estudio indican que la infección por *C. trachomatis* debe ser sistemáticamente investigada en varones jóvenes sexualmente activos con sospecha de ITU, leucocituria y urocultivo negativo, que no presenten otros factores asociados que pudieran causarla (litiasis, alteraciones anatómicas del TGU...). La elevada rentabilidad de esta experiencia aconseja su inclusión en la rutina diagnóstica de los servicios de Microbiología Clínica para descartar probables uretritis. El aumento de la incidencia de las ITS en el presente siglo, y en particular de las infecciones por *C. trachomatis*, hace más conveniente las recomendaciones anteriores. La coordinación entre los servicios que atienden al paciente es fundamental para el diagnóstico y tratamiento de estas infecciones ^(270,271), que además de afectar a su salud individual, tienen implicaciones epidemiológicas que exigen la búsqueda, estudio y tratamiento de los contactos, imprescindible para el control de las ITS.

6.3.3. Mujeres con sospecha clínica de enfermedad inflamatoria pélvica

El riesgo de desarrollar EIP entre mujeres infectadas por *C. trachomatis* y no tratadas se ha estimado en torno a un 15% ^(49,98,109). La inespecificidad de la sintomatología de la EIP hace que puedan ser necesarias varias consultas hasta alcanzar su diagnóstico ⁽¹¹¹⁾, y que algunos casos puedan quedar sin él ⁽²⁷²⁾. En estudios realizados en mujeres con EIP probada laparoscópicamente se ha detectado infección genital por *C. trachomatis* en un 10-60%, siendo su causa más frecuente ⁽¹⁰⁸⁾.

En el presente estudio se investigó la presencia de ADN de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en las muestras recibidas en nuestro laboratorio entre 2009-2013 de mujeres con diagnóstico de dolor abdominal de causa no filiada y origen presumiblemente ginecológico u otros considerados por el CIE-9 para la EIP. Los resultados obtenidos confirmaron la importancia de la infección por *C. trachomatis* en la etiología y gravedad de la EIP. Se detectó en el 16,6% de los casos con sospecha diagnóstica, siendo más frecuente en las mujeres más jóvenes (24,1% en <30 años vs 12,2% en ≥ 30 años, $p < 0,001$) debido probablemente a la mayor prevalencia de infección por *C. trachomatis* en ese grupo de la población general, y aumentando el porcentaje de positivos a mayor gravedad del cuadro clínico (11,5% en mujeres atendidas ambulatoriamente, 15,9% en las que acudieron a urgencias con posterior alta domiciliaria y 23% de las que requirieron ingreso, $p = 0,022$). En un reciente estudio realizado en Inglaterra, la tasa de diagnósticos de EIP en 2011 fue mayor en centros hospitalarios que en Atención Primaria (241 vs 176/100.000 habitantes), detectándose en pacientes <25 años más casos en Atención Primaria y en las mayores de esa edad en centros hospitalarios ⁽²⁷³⁾. En el presente estudio, el 81,1% de los casos con infección por *C. trachomatis* fueron detectados en el ámbito hospitalario (el 36,8% requirieron ingreso hospitalario y el otro 44,3% acudieron a urgencias con posterior alta

domiciliaria), no observándose diferencia de la gravedad en cuanto a la asistencia demandada en función de la edad (asistencia hospitalaria en el 80% de los <25 años y 81,5% de los mayores de esa edad).

En este estudio también se pudo comprobar que la EIP es una entidad clínica difícil de aquilatar desde el punto de vista diagnóstico. Por una parte, en al menos 19% de los episodios positivos se pudo constatar que las mujeres habían tenido más de un ingreso con síntomas similares, siendo la cifra en la realidad seguramente mayor al no poder tener en cuenta en el estudio los casos subdiagnosticados en que no se solicitó la prueba diagnóstica (incluso en 55 casos diagnosticados al alta con un código CIE-9 relacionado con EIP no se solicitó detección de *Chlamydia* ni gonococo). Por otra parte, los códigos diagnósticos CIE-9 relacionados con EIP fueron útiles, aunque probablemente insuficientes, ya que *C. trachomatis* se detectó en el 32,9% de los episodios que requirieron ingreso y fueron etiquetados por esos criterios, pero también en un 12,3% ($p=0,003$) de los episodios diagnosticados con otros códigos CIE-9 relacionados con otras causas de dolor abdominal.

Aunque el cribado y tratamiento de la infección por *C. trachomatis* podría prevenir en un 30-50% el desarrollo de una EIP en un año ^(49,111,113), su costo-eficacia aun es controvertida (ver apartado de prevención), siendo fundamental su sospecha y valoración en el diagnóstico diferencial para poder obtener un diagnóstico de certeza y un adecuado tratamiento y control de los contactos sexuales. Los datos de este estudio piloto sugieren que *C. trachomatis* es una importante causa de EIP en nuestro medio. Sin embargo, deben ser mirados con precaución, dado que tienen importantes limitaciones, en parte antes comentadas: a) dada la inespecificidad de la sintomatología clínica no todos los episodios de EIP son sospechados por los médicos, lo que llevaría a un subdiagnóstico; b) al ser un proceso multietiológico, no siempre de origen

Discusión

ginecológico, la detección de ADN de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* no se realiza sistemáticamente.

6.4. Epidemiología molecular

6.4.1. Genotipos *ompA* de *C. trachomatis*

La identificación de genotipos *ompA* facilita el estudio epidemiológico de la infección por *C. trachomatis* mediante el análisis de su variedad, distribución y evolución temporal, pudiéndolo asociar a variables clínico-epidemiológicas que permitan mejorar tanto el control general de la infección a través de la detección de brotes o redes de contactos sexuales con mayor riesgo en la transmisión de ITS como el control particular de casos (contactos, reinfecciones, etc).

Rentabilidad de la técnica de genotipado (Gipuzkoa 2006-2014). La TAAN utilizada para el genotipado de muestras no seleccionadas con ADN de *C. trachomatis* es una técnica sencilla (PCR anidada convencional), fácilmente reproducible en distintos laboratorios, que puede ofrecer resultados en 2-3 días, y la estrategia empleada en este trabajo tuvo una rentabilidad alta (91%). Esta rentabilidad no dependió del tipo de muestra analizada, sino de la carga bacteriana presente en la misma y semicuantificable en función del ciclo de amplificación obtenido en la TAAN empleada para la detección del ADN de *C. trachomatis* (tablas 26 y 27). Así por ejemplo, la técnica de genotipado en la muestra de orina tuvo una mayor rentabilidad en hombres que en mujeres (91,7% vs 76,4%) debido probablemente a la mayor carga bacteriana (ciclo de amplificación medio 30,9 vs 32,9) en relación a las diferencias anatómicas (longitud de uretra, etc.) y

de localización de la infección. De las 105 cepas que no pudieron ser genotipadas, 100 (95,2%) amplificaron en ciclos ≥ 35 . En este sentido, la utilización de técnicas de extracción de ácidos nucleicos con capacidad de obtener una mayor cantidad de ADN de *C. trachomatis* a partir de las muestras, puede permitir no solo mejorar la sensibilidad de la TAAN empleada en su detección ⁽¹⁵⁷⁾ sino también optimizar la rentabilidad de su posterior genotipado. Como limitación de esta técnica de genotipado se encuentra el que, al estar basada en la secuenciación del ADN amplificado (≈ 900 -1.000pb) en la TAAN de detección previa, detecta solo la cepa mayoritaria y no permite discriminar infecciones mixtas que han sido estimadas en otros estudios entre el 9-13% ^(274,275). Por otra parte, el análisis del gen completo (≈ 1.280 pb) hubiera permitido una resolución algo mayor en el tipado.

Variedad, distribución y evolución de genotipos (Gipuzkoa 2006-2014). La técnica de genotipado, además de su alta rentabilidad, permitió detectar y diferenciar una amplia variedad de genotipos (n=11), incluso los descritos menos frecuentemente, poniendo de manifiesto la validez del método y la capacidad de exportación geográfica de cepas de *C. trachomatis*. La distribución de los grupos genotipados fue similar a la descrita en otras partes del mundo, siendo el genotipo E el más frecuente (41,6%) en todos los periodos estudiados, con amplia diferencia. Tan solo en el sudeste asiático ha sido descrito el genotipo F con una similar o mayor frecuencia que el genotipo E ⁽²⁷⁶⁾.

En el presente trabajo, el genotipo E fue seguido en frecuencia por los genotipos D, F y G (43,5% en conjunto). Estos genotipos son los encontrados más frecuentemente en infecciones urogenitales tras el E en la mayoría de los estudios que analizan grupos de población general y en ambos sexos, aunque la frecuencia relativa entre ellos varía de unos a otros países ⁽²⁷⁷⁾. El genotipo D, segundo en el presente estudio (19,2%), fue

Discusión

relativamente infrecuente en otras regiones europeas ⁽²⁷⁸⁻²⁸¹⁾. Por el contrario, en la mayor parte de los estudios efectuados en Europa, el genotipo F fue el segundo en frecuencia, representando un 15-25% de los casos, mientras que en nuestro entorno fue el tercero con un 15,1% ^(32,205,277,278,280,281). Por otra parte, se ha comunicado una prevalencia elevada del genotipo G (23%) en algunos países del Sur de Europa como Italia o Grecia ^(282,283), aunque en países cercanos como Croacia ⁽²⁷⁸⁾ o Eslovenia ⁽²⁷⁹⁾ o en la Península Ibérica ^(34,277) ha sido claramente menor (<13%). Diferencias en las características clínico-epidemiológicas de los grupos de población analizados en estos estudios podrían contribuir a estas variaciones.

La distribución del resto de genotipos, que en conjunto supusieron un 14,9%, también ha sido referida como minoritaria en la mayor parte de los países, así como su persistencia en el tiempo en diferentes poblaciones ^(284,285). Porcentajes del genotipo K superiores al 10% solo se han observado en Alemania ⁽³²⁾ o Croacia ⁽²⁷⁸⁾, aunque el número de casos estudiado en estos estudios fue bajo.

Los genotipos A, B y C son los causantes del tracoma, infección ocular crónica que constituye una de las principales causas de ceguera en el mundo y que se distribuye fundamentalmente en África, Asia, América Central y del Sur y Australia. Cepas del genotipo B han sido detectadas esporádicamente en muestras urogenitales en numerosos estudios ^(282-284,286-289), siendo más rara la detección de cepas de los genotipos A o C ^(277,284,287). En el presente estudio también han sido detectados estos genotipos aisladamente en infecciones genitales: el genotipo B en 4 casos en pacientes extranjeros (una puérpera sudamericana asintomática, dos varones [uno del Este de Europa y otro marinerio portugués] con uretritis y una mujer contacto de uno de los anteriores con un absceso tubo-ovárico y EIP) y en un caso sin datos clínico-epidemiológicos por razones

de confidencialidad; y el genotipo A en un hombre con uretritis y una puérpera asintomática con antecedente de tres abortos.

En los tres periodos estudiados (2006-2008, 2009-2011 y 2012-2014) se observaron variaciones en la distribución relativa de algunos genotipos que fueron estadísticamente significativas en el genotipo D y en el I. Estas pequeñas variaciones pueden ser debidas a la mayor diseminación de un genotipo que circule en periodos concretos dentro de un grupo con mayor riesgo de transmisión de ITS por su conducta sexual (promiscuidad, no utilización de preservativo, etc).

Variedad y distribución de genotipos (España 2011-2012). En 2011-2012 se comparó la distribución de genotipos de *C. trachomatis* en Gipuzkoa con la de otras dos provincias del país (Sevilla y Gran Canaria) distantes y con distintas características (turismo, porcentaje de población extranjera, etc), para conocer si la distribución de genotipos es homogénea o no en el país y analizar en detalle si las posibles diferencias podían estar asociadas a variables geográficas y/o clínico-epidemiológicas ⁽³⁴⁾.

Distribución geográfica. Entre los 565 episodios genotipados (tabla 30), 9 de los 11 genotipos identificados se detectaron en las tres provincias, mostrando la capacidad de dispersión geográfica de *C. trachomatis*. Los dos genotipos más infrecuentes fueron el genotipo A (1 caso en Gipuzkoa y otro en Sevilla) y el genotipo B (1 caso en Gipuzkoa), que si bien están relacionados clásicamente con el tracoma, como se ha descrito en el apartado anterior también se han descrito eventualmente asociados a ITS. En las tres provincias el genotipo E fue el más frecuente y el D el segundo más frecuente. El tercer genotipo en frecuencia fue el F en Gipuzkoa (mismo número de casos que el D) y en Gran Canaria, mientras que el G lo fue en Sevilla. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante en la distribución de

Discusión

los genotipos E en Gran Canaria, F en Gipuzkoa y G en Sevilla, que podrían ser debidas a variaciones temporales en la distribución de un genotipo en cada zona asociadas a grupos con prácticas sexuales de mayor riesgo de diseminación de la infección y/o a las diferencias en la distribución de la población (tabla 29) asociadas a diferencias encontradas en la distribución de algunos genotipos en función del sexo y la conducta sexual como se comentará en el siguiente apartado. El resto de genotipos, incluido el L2, fueron menos frecuentes y se distribuyeron de forma similar en las tres provincias.

Distribución por sexo y conducta sexual. En los varones, la distribución de genotipos fue claramente diferente en HSH y HTS, siendo en estos últimos parecida a la observada en mujeres. El genotipo E fue el más frecuente entre los hombres HTS, mientras que los genotipos D, J, G y L2 lo fueron entre los HSH, representando el genotipo E en los HSH solo un 13% de las cepas de *C. trachomatis*. Recientemente se ha observado en estudios efectuados en países muy alejados entre sí (Australia, China, EEUU, Holanda, Suecia y España) que los genotipos D, J, G y en algunos casos L2b son predominantes en HSH ^(34,288-294). No es conocido si estas diferencias son debidas a un diferente tropismo celular de diferentes genotipos de *C. trachomatis* ^(295,296) o a la existencia de redes epidemiológicas que habrían facilitado la diseminación de determinados genotipos en función del comportamiento sexual ^(289-291,293,294). Sin embargo, se ha comunicado que la diversidad genética es menor en clusters de HSH que en clusters de HTS lo que apoya distintos patrones de transmisión entre ambos grupos ⁽²⁹²⁾. En el presente estudio el comportamiento sexual ha sido el factor más importante a la hora de establecer diferencias en la distribución de los diferentes genotipos en varones. Definir adecuadamente la población objeto de estudio, incluyendo el factor conducta sexual es determinante a la hora de valorar la prevalencia de los genotipos de *C. trachomatis* en una población.

Se detectaron once casos infectados con el genotipo L2b de *C. trachomatis*, causante de LGV, distribuidos en las tres regiones estudiadas. Todos fueron HSH mayores de 30 años de edad, seis con proctitis, estando ocho infectados con el VIH. En grandes ciudades de algunos países desarrollados se han referido a partir del 2003 clusters de esta enfermedad afectando principalmente a HSH, la mayoría infectados con el VIH, siendo proctitis la forma más frecuente de presentación ^(85,87). En España se han desarrollado desde al menos el 2007 importantes brotes en Barcelona y Madrid ^(86,297), habiéndose detectado algunos casos en el País Vasco ^(284,298). Se ha definido al LGV como una enfermedad oculta, a veces autotratada, en la que el diagnóstico erróneo o diferido es común ⁽⁸⁶⁾. Los médicos que atienden en sus consultas pacientes con posibles ITS deben ser conscientes de la presencia de esta enfermedad en Europa, especialmente en HSH, y de que pueden aparecer casos lejos de las grandes ciudades en las que se están desarrollando brotes, siendo importante la confirmación diagnóstica mediante genotipado debido a la diferente pauta de tratamiento antibiótico con respecto a los otros genotipos. Por este motivo, los laboratorios de Microbiología deben estar preparados para poder realizar TAAN en tiempo real capaces de identificar cepas de LGV en las muestras en que se detecte ADN de *C. trachomatis* tanto si existe sospecha clínica (linfogranuloma, adenopatías inguinales, proctitis...) como epidemiológica (por ejemplo muestras rectales de HSH), puesto que en ocasiones la infección puede ser asintomática y su no detección favorecería su diseminación ⁽²⁹⁹⁾.

Distribución por edad, país de nacimiento, síntomas y tipo de muestra. Solo se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos en relación a la edad en el genotipo L2, que fue detectado solo en mayores de 30 años, probablemente en relación a redes concretas de HSH, de algunos de los cuales se pudo conocer el dato

Discusión

epidemiológico de contactos ocasionales en Madrid y Barcelona donde han sido descrito brotes más amplios de LGV.

No se encontraron diferencias en la distribución de genotipos en función del país de nacimiento, si bien en este caso hubiera sido además necesario conocer el tiempo de residencia para poder diferenciar si la infección se adquirió en el país de origen o en el actual lugar de residencia. Llamó la atención que, en Gipuzkoa, la mayor parte de los casos detectados del genotipo B fueron de origen extranjero o contacto de personas de origen extranjero. Sin embargo el escaso número de muestras obtenido de este genotipo (n=5) impidió obtener conclusiones fiables.

En cuanto a los síntomas, se encontraron ligeras variaciones en el análisis univariante en la distribución del genotipo D en infecciones sintomáticas y del genotipo G en infecciones asintomáticas (p=0,038 y 0,039 respectivamente) que no se conservaron en el análisis multivariante. Es difícil valorar aisladamente si este dato puede ser significativo y si pudiera afectar a la carga y distribución relativa de los genotipos, ya que un genotipo que ocasione infecciones sintomáticas sería más eficazmente diagnosticado al acudir los pacientes a los servicios sanitarios, mientras que un genotipo que se asocie a infecciones asintomáticas se diseminaría con mayor facilidad aunque sería más difícilmente detectable en ausencia de programas de cribado.

Finalmente, la mayor detección de los genotipos J y L2 en muestras rectales, como ya se ha comentado, podría estar más relacionada con aspectos epidemiológicos de contactos en función de la conducta sexual ^(293,300) que con un no suficientemente demostrado tropismo celular ⁽²⁹⁵⁾.

6.4.2. Análisis de la posible introducción de la nueva variante de *C. trachomatis* en tres áreas geográficas distantes de España

En un mundo globalizado con intensos movimientos poblacionales (migraciones, comercio, turismo...), monitorizar la evolución molecular de los microorganismos patógenos es esencial para detectar la aparición y expansión de cepas variantes que modifiquen su comportamiento (*fitness*, virulencia, fenotipos de resistencia, detectabilidad con diferentes métodos diagnósticos, etc.) y poder adoptar las medidas preventivas, diagnósticas o terapéuticas oportunas. Tras la descripción de la nvCT en 2006 en Suecia y la disponibilidad en nuestro laboratorio desde 2008 de medios moleculares capaces de detectarla, se realizó un primer estudio entre diciembre de 2008 y diciembre de 2010 para investigar si dicha cepa se había introducido y diseminado en Gipuzkoa pudiendo ser una razón más que justificara el incremento de la demanda diagnóstica en aquellos años ⁽²⁸⁴⁾. Al no detectarse ninguna cepa, se continuó su monitorización en Gipuzkoa y se amplió el estudio a otras provincias distantes y con mayor afluencia de turistas de origen extranjero en vacaciones (Gran Canaria y Sevilla), un contexto en el que aumentan los contactos sexuales.

En el presente estudio solo se detectó una cepa de la nvCT entre las 602 cepas genotipo E estudiadas (0,2%) en un paciente de Sevilla del que no se pudo conocer sus contactos. Por tanto, la nvCT, muy prevalente en Suecia ^(301,302), no parece haberse diseminado en España, a pesar de la gran cantidad de turistas suecos que visitan España (>1.000.000/año), especialmente las islas Canarias y Andalucía (>600.000/año) y de los miles de españoles que viajan a Suecia (\approx 180.000/año). Esta cepa, presente al menos desde el 2003 en Suecia ⁽³⁰²⁾ se expandió rápidamente en aquel país porque no era detectada por algunas TAAN comerciales debido a una delección de 377 pb en el plásmido críptico, donde se situaba en aquellos años la única diana de algunos tests ⁽²⁰⁶⁾.

Discusión

Aunque son escasos aún los estudios que han analizado la presencia de la nvCT fuera de los países nórdicos, su diseminación, sorprendentemente, parece haber sido limitada en Europa, habiéndose comunicado solo la detección de cepas aisladas en Alemania ⁽³²⁾, Francia ⁽³⁰⁾, Escocia ⁽²⁹⁾, Irlanda ⁽²⁹⁾ o Rusia ⁽³¹⁾ y no habiendo sido detectada en otros países con los que los países Escandinavos tienen estrecha relación como USA ⁽³³⁾. Es posible que la nvCT se haya transmitido hasta ahora fundamentalmente entre redes sexuales de grupos de riesgo geográficamente localizados, principalmente jóvenes heterosexuales, dentro de Suecia y que por eso se haya diseminado poco a otros países. El hecho de que en este trabajo la nvCT haya sido detectada en un HSH promiscuo es de interés, dado que algunos HSH participan de redes sexuales que se extienden a través de las fronteras nacionales, lo que podría facilitar su expansión ⁽²⁹⁾.

La incorporación en 2008 de una técnica molecular nueva con una doble diana (plásmido críptico y ADN genómico de *C. trachomatis*) permitió además detectar cepas carentes de plásmido críptico, optimizando la sensibilidad de detección de la infección. Otros estudios han referido la escasa frecuencia de estas cepas, que parecen tener un “fitness” biológico reducido debido a su dificultad de acumular glicógeno en las inclusiones ⁽¹⁰³⁾. Es importante que los laboratorios dispongan de los métodos diagnósticos más adecuados en cada momento para detectar el mayor número posible de cepas (en el caso de *C. trachomatis*, la cepa salvaje, la nvCT y las cepas carentes plásmido críptico).

6.4.3. Multilocus Sequence Typing

Las técnicas disponibles para el tipado de alta resolución (MLST, MLVA, secuenciación del genoma completo) han sido empleadas en varios estudios científicos

de interés en la investigación y conocimiento más preciso de la epidemiología molecular de la infección por *C. trachomatis* ^(167,292,293,303). Han sido empleadas tanto para análisis filogenéticos y evolutivos como para estudios de trazabilidad de su transmisión (clusters, redes de contactos), que han permitido identificar la emergencia de nuevas cepas de LGV y nuevas variantes no detectadas previamente por las técnicas diagnósticas (nvCT), pudiendo además contribuir a discriminar -de modo más conciso que el genotipado basado en el gen *ompA*- casos de reinfección y fracasos del tratamiento antibiótico ⁽³⁰⁴⁾. Si la tasa de mutación es alta, el MLVA permite analizar diferencias en cortos periodos de tiempo (brotes, clusters...), y en casos en que se requiera aumentar el poder discriminatorio asociarlo al MLST, pero a diferencia del MLST pierde reproducibilidad al comparar cepas en una misma población separadas en el tiempo ^(167,209). Entre los métodos descritos de MLST también se han referido diferencias en función de las dianas investigadas y la distinta selección inmune a que estén sujetas en función de sus respectivas zonas de plasticidad ^(102,305). La técnica de MLST empleada en este estudio amplifica directamente a partir de la muestra (sin necesidad de cultivo previo) cinco loci genómicos altamente variables: *hctB*, CT058, CT144, CT172 y *pbpB* ⁽²⁰⁹⁾.

Hasta diciembre de 2013 han sido descritos por Herrmann et al. 459 ST entre 2.089 cepas de 16 países depositadas en la base de datos internacional de la Universidad de Uppsala, entre los que 255 ST se encontraron en una sola muestra y 122 en 2-9 muestras (33% en conjunto del total de muestras de esta base) ⁽³⁰⁶⁾. En el presente estudio se identificaron entre los 11 genotipos *ompA* 27 secuenciotipos diferentes (tabla 28), lo que demuestra la elevada variación genética de las cepas de *C. trachomatis* circulantes en España (2,5 secuenciotipos por cada genotipo en este estudio). Esta diversidad se observó en los diferentes genotipos *ompA*, con excepción del genotipo L2 (LGV) con un

Discusión

solo ST (ST58). Este resultado es coherente con la epidemiología de los brotes de LGV ocurridos en Europa en el último decenio mayoritariamente producidos por el ST 58⁽³⁰⁶⁾. En este estudio, el genotipo B también correspondió a un solo ST (ST138), pero solo se analizaron 4 muestras (dos de ellas de una pareja) y, además de este ST⁽²⁹²⁾, están descritos varios más⁽³⁰⁶⁾. El genotipo B es causante principalmente de tracoma, habiéndose descrito que las cepas de los genotipos causantes de tracoma (A-C) tienen menor diversidad genética que las de genotipos causantes de infecciones urogenitales⁽³⁰⁶⁾. Se ha referido que la posibilidad de aparición de nuevos ST es alta, debido a la capacidad de recombinación entre distintas cepas⁽¹⁶⁷⁾, como sucede en el secuenciotipo ST12 (uno de los descritos más frecuentemente), detectado en el presente trabajo en dos genotipos *ompA* distintos (D y F)^(303,306).

Esta mayor variabilidad genética aporta al MLST una mayor capacidad discriminatoria sobre el genotipado *ompA*, el cual presenta distribuciones de genotipos similares en diferentes localizaciones geográficas y evolución temporal independientemente de factores o grupos locales o puntuales de riesgo^(166,205,286). El MLST permite identificar varios ST en cada genotipo *ompA*, sobre todo en los más frecuentes (tabla 31), por lo que resulta de mayor utilidad en los estudios de trazabilidad y para diferenciar reinfecciones con el mismo ST (por incumplimiento de tratamiento o falta de control de contactos) de nuevas infecciones por un ST distinto del mismo genotipo (hecho que no podría discriminar el genotipado *ompA*), así como fallos de tratamientos (probable resistencia si el tratamiento se cumplió, si se realizó adecuadamente el control de contactos y si se descartaron otras posibles coinfecciones) que requieran un cambio de pauta. En este estudio se pudo constatar la reinfección por el mismo secuenciotipo en cuatro pacientes con dos episodios distintos de infección (primer episodio correctamente tratado), volviendo a tratar al paciente y reforzando el control de sus contactos sexuales

para evitar nuevas reinfecciones y la diseminación de la infección. Asimismo, en cinco casos de contactos sexuales conocidos y en un caso de transmisión vertical de la infección en que se pudo obtener el secuenciotipo se confirmó la trazabilidad entre estos contactos con el mismo ST.

Ha sido descrita la expansión geográfica y en el tiempo de los ST más frecuentes⁽³⁰⁶⁾ y distribuciones de ST distintas entre HTS (ST3, ST12, ST55 y ST56) y HSH (ST52, ST58, ST108 y ST109) debidas a las diferentes dinámicas de transmisión^(293,300,306). En este estudio, las características de la muestra analizada (pequeño tamaño y selección no aleatoria) y la limitada rentabilidad obtenida no permitieron analizar en detalle diferencias en la distribución de secuenciotipos en función de la localización geográfica (Gipuzkoa, Sevilla, Gran Canarias) ni identificar secuenciotipos claramente mayoritarios. Entre HTS, se encontraron solo dos de los cuatro secuenciotipos predominantes referidos a nivel mundial: los ST3 (genotipo E) y ST12 (genotipos D y F), posiblemente por la mayor diversidad genética esperable en HTS y el pequeño número de muestras estudiadas. Por otra parte, entre HSH aunque el número de cepas estudiadas y la diversidad de ST fue menor, se encontraron tres de los cuatro secuenciotipos predominantes referidos en la literatura: ST52 (genotipo G), ST58 (genotipo L2) y ST108 (genotipo J), siendo los más frecuentemente encontrados en cada genotipo (ST58 las 15 cepas del genotipo L2 analizadas). Las diferencias observadas apoyan la importancia de la conducta sexual en la epidemiología de la infección por *C. trachomatis*, constatándose una circulación más clonal de cepas entre HSH que reflejaría una transmisión de la infección entre redes más cerradas que entre HTS.

Con el método empleado en este estudio se obtuvo una rentabilidad entre el 58% (si se compara con ST previamente descritos) y el 60% (si tenemos en cuenta las cuatro cepas que pueden corresponder a un ST nuevo). Esta técnica se basa en una amplificación de

Discusión

ADN a partir de muestra directa (no de cepa tras cultivo), por lo que para mejorar su sensibilidad se realiza una PCR anidada. En otros trabajos se describen cifras que varían (55-80%) en función del método utilizado ^(209,293): cepa obtenida mediante cultivo vs muestra directa, PCR simple vs anidada, tamaño del amplificado de cada diana, secuenciado solo forward vs forward y reverse... Un inconveniente habitual es no poder obtener un secuenciotipo por no conseguirse un amplicón suficiente para su secuenciación correcta de las cinco dianas amplificadas, en lo que influye la carga de ADN de *C. trachomatis* en la muestra ^(209,293). Otra dificultad se plantea cuando a pesar de obtenerse amplificado en las cinco dianas, identificándose cada alelo con un ST conocido, esta serie no coincide con ningún secuenciotipo previamente descrito e incluido en las bases de datos internacionales empleadas para su comparación, pudiendo tratarse de cepas con ST nuevos. Si bien la sensibilidad de la técnica es limitada, su reproducibilidad fue muy buena. En tres pacientes con muestras de diferentes localizaciones anatómicas pertenecientes a un mismo episodio de infección se constató en cada uno de ellos el mismo secuenciotipo en las distintas localizaciones. Este resultado es esperable dado que amplias series de pacientes empleando técnicas de MLST, encontraron diferencias en la distribución de cepas en muestras rectales de mujeres y HSH que sugieren, más que tropismo diferente para genotipos distintos, redes de transmisión separadas ⁽³⁰⁰⁾.

En nuestra experiencia, a pesar del poder de obtener información epidemiológica de estas técnicas (MLST empleado en el presente estudio, MLVA) aún son poco útiles desde el punto de vista de la rutina asistencial en el estudio de la infección por *C. trachomatis*, debido a su laboriosidad (tanto en la realización como en el posterior análisis), lentitud, coste y limitada rentabilidad. Pero su utilidad es prometedora y probablemente la progresiva identificación de nuevos ST junto con el desarrollo de sistemas automatizados y más estandarizados faciliten su futura aplicación ⁽³⁰⁷⁾.

6.5. Comparación del rendimiento diagnóstico de la muestra de orina y uretral

Desde octubre de 2010 la TAAN empleada en nuestro laboratorio para la detección de *C. trachomatis* fue Cobas 4800 (Roche), técnica de PCR en tiempo real que incluye una doble diana de ADN plasmídico y cromosómico que permite detectar cepas salvajes, cepas carentes de plásmido críptico y la nvCT. Esta TAAN está validada por el fabricante para utilizar en muestras de orina y de cérvix. Con el fin de comprobar el comportamiento de la muestra uretral en la detección de *C. trachomatis* por esta TAAN y de compararla con la muestra de orina, hasta diciembre de 2014 se obtuvieron en paralelo y en la misma visita ambas muestras a varones con sospecha de ITS (o controles de ITS previas). La muestra de orina fue obtenida de la primera fracción y tras la obtención de la muestra uretral.

En este estudio la muestra de orina mostró un rendimiento 4,5% superior en la detección de *C. trachomatis* que la muestra uretral, permitiendo la detección respectivamente del 97,8% y 93,4% de los 226 episodios positivos (tabla 32) ($p=0,04$). Resultados similares que apoyan este mejor rendimiento han sido descritos en otros trabajos recientes ⁽³⁰⁸⁾. Este hecho puede ser debido a que el exudado uretral tan solo obtiene células de la parte distal de la uretra, mientras que la muestra de primera fracción de la orina puede arrastrar también otras células infectadas situadas a lo largo de toda la uretra (media y proximal) pudiendo obtener finalmente una mayor carga bacteriana. Esto se pudo confirmar semicuantitativamente comparando los ciclos de amplificación (Ct) en todos los casos en que ambas muestras fueron positivas, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$) a favor de la orina (ciclo medio menor). Parra et al., en un estudio comparativo de 26 casos de infección detectados en ambas muestras también encontraron Ct medios menores en orina (29) que en exudados uretrales (33) ⁽³⁰⁹⁾.

Discusión

En conjunto, para el diagnóstico de la infección, la utilización de la muestra de orina permitió detectar un 6,6% (15/226) más de positivos que si solo se hubiera empleado la muestra uretral, pero dejó de detectar un 2,2% (5/226) de los positivos, detectados solo en el exudado uretral. Sólo en el 1,1% episodios (0,5% muestras, 11/2.092) el resultado fue inválido por inhibición del control interno, aunque en su mayor parte se trataba de muestras de orina. Por tanto, globalmente ambas muestras (orina y frotis uretral) pueden ser útiles para el diagnóstico de la infección por *C. trachomatis* en varones con uretritis. El rendimiento diagnóstico parece ser ligeramente superior si se emplea la muestra de orina, pero dada la pequeña diferencia encontrada en el rendimiento de ambas, el empleo de una u otra dependerá más del entorno asistencial. La muestra de orina es más fácil de obtener y podría de ser de gran utilidad para diagnóstico en cribados o en situaciones en que no se pueda obtener un exudado uretral, pero esta última es también, en nuestra opinión, y específicamente empleando el Cobas 4800, una muestra válida para la detección de *C. trachomatis*. Aunque estos resultados fueron obtenidos con una plataforma concreta (Cobas 4800), probablemente son extensibles a otras plataformas que permiten la detección de ADN de *C. trachomatis* mediante PCR.

7. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* durante los últimos años en Gipuzkoa fue moderada (1% en puérperas sanas durante 2011-2015). Edad y origen (nacional o extranjero), fueron dos variables claramente relacionadas con la prevalencia. Las mujeres menores de 25 años presentaron una prevalencia 6 veces superior a la media de las puérperas y las de origen inmigrante 4 veces superior.
2. La incidencia de la infección aumentó progresivamente a lo largo del estudio, pese a lo cual las cifras no alcanzaron las de la mayoría de los países europeos. No obstante, debido a las tasas alcanzadas por la población más joven, no será de extrañar que en un futuro cercano las cifras globales se vean llamativamente incrementadas (las jóvenes de 20-24 años de edad superaron los 400 casos por 100.000 en época reciente).
3. Al analizar la incidencia por sexos destacó la diferencia observada entre jóvenes y mayores de 30 años. En los jóvenes, la incidencia fue mayor en las mujeres que en los hombres, pese a que la incidencia global fue mayor en los hombres.
4. Los sistemas de vigilancia de la infección por *C. trachomatis* en España basados en declaración voluntaria han sido insuficientemente sensibles, como constata la baja incidencia comunicada por dichos sistemas en relación a la obtenida en el presente estudio.
5. La infección por *C. trachomatis* fue la causa principal de síndrome uretral en varones, siendo responsable de casi un tercio de los casos, con una frecuencia superior al doble de la encontrada para *Neisseria gonorrhoeae* o *Mycoplasma genitalium*.

Conclusiones

6. En varones sexualmente activos con sospecha clínica de infección urinaria y leucocituria con urocultivo negativo, *C. trachomatis* fue una causa frecuente de uretritis habitualmente no sospechada en Atención Primaria.
7. En mujeres sexualmente activas con sospecha clínica de enfermedad inflamatoria pélvica, *C. trachomatis* fue detectada frecuentemente (17% de los casos en la presente serie).
8. A pesar de la profilaxis antibiótica de Credé, la infección por *C. trachomatis* se transmitió verticalmente en más del 10% de los recién nacidos de madre infectada, lo que supone al menos 1 por cada 1.000 recién nacidos en la Comunidad Autónoma del País Vasco.
9. La técnica de genotipado empleada en esta investigación presentó una alta rentabilidad y permitió comprobar la circulación de una amplia variedad de genotipos, observándose cómo la distribución de los más prevalentes en España coincidió con los encontrados en otras regiones europeas y cómo determinados grupos con conductas sexuales de riesgo presentaron mayor prevalencia de ciertos genotipos, y clonalidad de secuenciotipos. El genotipo L2 se detectó solo en hombres que tienen sexo con hombres, mayores de 30 años, la mayoría presentando proctitis y coinfección por el VIH. Es también de destacar que, afortunadamente, la nueva variante sueca de *C. trachomatis* perteneciente al genotipo E se detectó tan solo en una de las 602 muestras analizadas en tres provincias.
10. La muestra de primera fracción de la orina es muy útil para el diagnóstico, ya que en este estudio incluso mostró mayor sensibilidad que la muestra uretral en hombres.
11. Finalmente y como principal conclusión, los resultados de este trabajo sugieren la conveniencia de realizar un cribado gestacional de la infección por *C. trachomatis*

Conclusiones

en mujeres jóvenes (menores de 30 o 25 años, según recursos) no solo para poder controlar la transmisión entre adultos, sino para prevenir las posibles complicaciones gestacionales y la transmisión vertical.

Conclusiones

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mårdh PA, Paavonen J, Puolakkainen M. *Chlamydia*. 1989; ISBN 0-306-42965-9.
2. Evans S, Brachman PS. Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control. 1998; ISBN 0-306-45323-1.
3. Halberstaedter L, von Prowazek S. Zur Ätiologie des Trachoms. Med Wochenschr, 1907;33:1285-7.
4. Halberstaedter L, von Prowazek S. Ueber Chlamydozonenbefunde bei Blennorrhoe neonatorum non-gonorrhoeica. Klin Wochenschr, 1909;46:1839-40.
5. Staargardt K. Über Epithelzellveränderungen beim Trachom und andern Conjunctivalerkrankungen. Arch Ophthalmol, 1909;69:525-42.
6. Lindner K. Zur Ätiologie der gonokokkenfreien Urethritis. Klin Wochenschr, 1910;8:283-4.
7. Fritsch HO, Hofstätter A, Lindner K. Experimentelle Studien zur Trachomfrage. Graefe's Archiv für Ophthalmologie, 1910;76:547.
8. Thygeson P, Mengert WF. The virus of inclusion conjunctivitis: Further observations. Arch Ophthalmol, 1936;15:377-410.
9. Miyagawa Y, Mitamura T, Yaoi H, Ishii N, Okanishi J. Fourth report: studies on the virus of lymphogranuloma inguinale *Nicolas, Favre and Durand*. Cultivation of the virus on the chorio-allantoic membrane of the chicken embryo. Jpn J Exp Med, 1935;13:733-8.
10. Rake G, Eaton MD, Schaffer MF. Similarities and possible relationships among viruses psittacosis, meningopneumonitis and lymphogranuloma venereum. Proc Soc Exp Biol Med, 1941;48:528-31.

Bibliografía

11. T'ang FF, Chang HL, Huang YT, Wang KC. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chin Med J*, 1957;75:429-447.
12. Jones BR, Collier LH, Smith CH. Isolation of virus from inclusion blennorrhoea. *Lancet*, 1959;i:902-5.
13. Gordon FB, Quan AL. Isolation of the trachoma agent in cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1965;118:354-9.
14. Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol*, 1970;70:367-74.
15. Tam MR, Stamm WE, Handsfield HH, Stephens R, Kuo CC, Holmes KK, Ditzenberger K, Krieger M, Nowinski RC. Culture-independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med*, 1984;310:1146-50.
16. Bell TA, Kuo CC, Stamm WE, Tam MR, Stephens RS, Holmes KK, Grayston JT. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant *Chlamydia trachomatis* infections. *Pediatrics*, 1984;74:224-8.
17. Dhir SP, Boatman ES. Location of polysaccharide on *Chlamydia psittaci* by silver-methenamine staining and electron microscopy. *J Bacteriol*, 1972;111:267-71.
18. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*, 1981;31:1161-76.
19. Lovett M, Kuo CC, Holmes KK, Falkow S. Plasmids of the genus *Chlamydia*. In: *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*, Vol. 2. Nelson JD, Grassai C. eds. Washington DC: American Society for Microbiology, 1980:1250-2.

20. Gaydos C, Essig A. *Chlamydiaceae*. En: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology (11th edition), American Society for Microbiology, Washington DC (USA) 2015: pp 1106-1121.
21. 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*, 1999;49(2):415-40.
22. Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009;55:115-9.
23. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo CC, Rosselló-Móra R, Horn M. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol*, 2015;38(2):99-103.
24. Tam JE, Davis CH, Thresher RJ, Wyrick PB. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. *Plasmid*, 1992;27:231-6.
25. Stallmann S, Hegemann JH. The *Chlamydia trachomatis* Ctad1 invasin exploits the human integrin β 1 receptor for host cell entry. *Cell Microbiol*, 2016;18(5):761-75.
26. Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol*, 1991;164(2):1771-81.
27. Price MJ, Ades AE, Soldan K, Welton NJ, Macleod J, Simms I, DeAngelis D, Turner KM, Horner PJ. The natural history of *Chlamydia trachomatis* infection in women: a multi-parameter evidence synthesis. *Health Technol Assess*. 2016;20(22):1-250.

Bibliografía

28. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*, 2006;11(11):E061109.2.
29. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis*, 2011;24(1):62-9.
30. de Barbeyrac B, Raheison S, Cado S, Normandin F, Clerc M, Clairet V, Bébéar C, Goulet V. French situation concerning the Swedish *Chlamydia trachomatis* variant. *Euro Surveill*, 2007;12(10):E11-2.
31. Shipitsyna E, Hadad R, Ryzhkova O, Savicheva A, Domeika M, Unemo M. First reported case of the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) in Eastern Europe (Russia), and evaluation of Russian nucleic acid amplification tests regarding their ability to detect nvCT. *Acta Derm Venereol*, 2012;92:330-1.
32. Fieser N, Simnacher U, Tausch Y, Werner-Belak S, Ladenburger-Strauß S, von Baum H, Reischl U, Essig A. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany. *Infection*, 2013;41:159-66.
33. Won H, Ramachandran P, Steece R, Van Der Pol B, Moncada J, Schachter J, Gaydos C. Is There Evidence of the New Variant *Chlamydia trachomatis* in the United States? *Sex Transm Dis*, 2013;40:352-3.
34. Piñeiro L, Bernal S, Bordes A, Palomares JC, Gilarranz R, von Wichmann MA, Cilla G. Minimum spread of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* and distribution of *C. trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011-2012. *Infection*, 2014;42(5):905-12.
35. Cohen MS. Sexually transmitted diseases enhance HIV transmission: no longer a hypothesis. *The Lancet*, 1998;351(Suppl 3):5-7.

36. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. 2012. Disponible en <http://www.who.int/iris/handle/10665/75181>.
37. Centers for Disease Control and Prevention. STD Surveillance 2013 – *Chlamydia*. 2014. Disponible en <http://www.cdc.gov/std/stats13/chlamydia.htm>.
38. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2013. Stockholm: ECDC; 2015.
39. Chen XS, Yin YP, Chen LP, Thuy NT, Zhang GY, Shi MQ, Hu LH, Yu YH. Sexually transmitted infections among pregnant women attending an antenatal clinic in Fuzhou, China. *Sex Transm Dis*, 2006;33:296-301.
40. Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocência LA, Miranda AE. *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. *Sex Transm Dis*, 2011;38(10):957-61.
41. Romoren M, Sundby J, Velauthapillai M, Rahman M, Klouman E, Hjortdahl P. *Chlamydia* and gonorrhoea in pregnant Batswana women: time to discard the syndromic approach? *BMC Infect Dis*, 2007;7:27.
42. Kilmarx PH, Black CM, Limpakarnjanarat K, Shaffer N, Yanpaisarn S, Chaisilwattana P, Siriwasin W, Young NL, Farshy CE, Mastro TD, St Louis ME. Rapid assessment of sexually transmitted diseases in a sentinel population in Thailand: prevalence of chlamydial infection, gonorrhoea, and syphilis among pregnant women--1996. *Sex Transm Infect*, 1998;74(3):189-93.
43. Silveira MF, Erbeding EJ, Ghanem KG, Johnson HL, Burke AE, Zenilman JM. Risk of *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy: effectiveness of guidelines-based screening in identifying cases. *Int J STD AIDS*, 2010;21(5):367-70.

Bibliografía

44. Roberts SW, Sheffield JS, McIntire DD, Alexander JM. Urine screening for *Chlamydia trachomatis* during pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2011;117(4):883-5.
45. Rours GI, Verkooyen RP, Willemsse HF, van der Zwaan EA, van Belkum A, de Groot R, Verbrugh HA, Ossewaarde JM. Use of pooled urine samples and automated DNA isolation to achieve improved sensitivity and cost-effectiveness of large-scale testing for *Chlamydia trachomatis* in pregnant women. *J Clin Microbiol*, 2005;43(9):4684-90.
46. McMillan HM, O'Carroll H, Lambert JS, Grundy KB, O'Reilly M, Lennon B, Collins C, Walsh TA, Geary MP, Cafferkey MT. Screening for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic women attending outpatient clinics in a large maternity hospital in Dublin, Ireland. *Sex Transm Infect*, 2006;82(6):503-5.
47. Chen MY, Fairley CK, De Guingand D, Hocking J, Tabrizi S, Wallace EM, Grover S, Gurrin L, Carter R, Pirotta M, Garland S. Screening pregnant women for chlamydia: what are the predictors of infection? *Sex Transm Infect*, 2009;85(1):31-5.
48. Böhm I, Gröning A, Sommer B, Müller HW, Krawczak M, Glaubitz R. A German *Chlamydia trachomatis* screening program employing semi-automated real-time PCR: results and perspectives. *J Clin Virol*, 2009;46(Suppl 3):S27-32.
49. Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, Hay S, Taylor-Robinson D, Simms I, Hay P. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ*, 2010;340:c1642.
50. Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, Chêne G, Horovitz J, Dallay D, de Barbeyrac B, Bébéar C. Screening for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma genitalium* should it be

- integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015:S0732-8893(15)00030-9.
51. Goulet V, de Barbeyrac B, Raheison S, Prudhomme M, Semaille C, Warszawski J; CSF group. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*: results from the first national population-based survey in France. *Sex Transm Infect*, 2010;86(4):263-70.
52. van Bergen JE, Fennema JS, van den Broek IV, Brouwers EE, de Feijter EM, Hoebe CJ, Koekenbier RH, de Coul EL, van Ravesteijn SM, Götz HM. Rationale, design, and results of the first screening round of a comprehensive, register-based, *Chlamydia* screening implementation programme in the Netherlands. *BMC Infect Dis*, 2010;10:293.
53. Fenton KA, Korovessis C, Johnson AM, McCadden A, McManus S, Wellings K, Mercer CH, Carder C, Copas AJ, Nanchahal K, Macdowall W, Ridgway G, Field J, Erens B. Sexual behaviour in Britain: reported sexually transmitted infections and prevalent genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Lancet*, 2001;358(9296):1851-4.
54. Klavs I, Rodrigues LC, Wellings K, Kese D, Hayes R. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in the general population of Slovenia: serious gaps in control. *Sex Transm Infect*, 2004;80(2):121-3.
55. Kløvstad H, Grijbovski A, Aavitsland P. Population based study of genital *Chlamydia trachomatis* prevalence and associated factors in Norway: a cross sectional study. *BMC Infect Dis*, 2012;12:150.
56. Datta SD, Torrone E, Kruszon-Moran D, Berman S, Johnson R, Satterwhite CL, Papp J, Weinstock H. *Chlamydia trachomatis* trends in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999-2008. *Sex Transm Dis*, 2012;39(2):92-6.

Bibliografía

57. Torrone E, Papp J, Weinstock H. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Genital Infection Among Persons Aged 14-39 Years - United States, 2007-2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014;63(38):834-8.
58. Lewis D, Newton DC, Guy RJ, Ali H, Chen MY, Fairley CK, Hocking JS. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in Australia: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis, 2012;12:113.
59. Imai H, Nakao H, Shinohara H, Fujii Y, Tsukino H, Hamasuna R, Osada Y, Fukushima K, Inamori M, Ikenoue T, Katoh T. Population-based study of asymptomatic infection with *Chlamydia trachomatis* among female and male students. Int J STD AIDS, 2010;21(5):362-6.
60. Parish WL, Laumann EO, Cohen MS, Pan S, Zheng H, Hoffman I, Wang T, Ng KH. Population-based study of chlamydial infection in China: a hidden epidemic. JAMA, 2003;289(10):1265-73.
61. Joyee AG, Thyagarajan SP, Rajendran P, Hari R, Balakrishnan P, Jeyaseelan L, Kurien T; STD Study Group. *Chlamydia trachomatis* genital infection in apparently healthy adult population of Tamil Nadu, India: a population-based study. Int J STD AIDS, 2004;15(1):51-5.
62. Obasi AI, Balira R, Todd J, Ross DA, Chungalucha J, Mosha F, Grosskurth H, Peeling R, Mabey DC, Hayes RJ. Prevalence of HIV and *Chlamydia trachomatis* infection in 15--19-year olds in rural Tanzania. Trop Med Int Health, 2001;6(7):517-25.
63. Unidad de Epidemiología de Gipuzkoa, Departamento de Salud del Gobierno Vasco. Memoria de vigilancia epidemiológica en Gipuzkoa 2012. 2013.

64. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2012. Madrid, enero 2014.
65. Instituto Nacional de Estadística. Cifras de Población del Censo de 2011. Disponible en <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t20/e244/avance/p01/10/&file=01001.px&type=pcaxis&L=0>
66. Vázquez JA, García I, Villasante P, De Benito R, Bru F. Evaluación del empleo de una técnica de diagnóstico rápido de *Chlamydia trachomatis* (Test Pack) en mujeres. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1992;8:502.
67. Alonso-Sanz M, Chaves F, Sánchez S, Romero N, Dronza F. Estudio microbiológico de ciertos microorganismos implicados en las enfermedades de transmisión sexual de la población femenina penitenciaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1996;14:474-8.
68. Marinas JJ, Rego ME, Rosales M, Castro MI, Bouzas E. Evaluación de la efectividad de un programa de detección de infección asintomática por *Chlamydia trachomatis* en mujeres. *Rev Esp Salud Pública*, 1997;71:27-34.
69. Chávez M, Vargas J, Pueyo I, Valverde A, Serrano MC, Claro R, Martín-Mazuelos E. Incidencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* en un centro de ETS estimada mediante detección directa de antígeno. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2000;18:392-5.
70. Cacho J, Sanz F, Blanco MA y Grupo de ETS-Perinatal de SMMC. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: necesidad urgente de detección y tratamiento en mujeres. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2001;19:419-21.

Bibliografía

71. Otero L, García MJ, Varela JA, Palacio V, Vázquez F. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en población de riesgo de Asturias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2002;20(7):368-9.
72. Andreu Domingo A, Pumarola Suñe T, Sanz Colomo B, et al. Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* determinada mediante métodos de biología molecular. *Enferm Infeccc Microbiol Clin*, 2002;20:205-7.
73. Reina J, Gutiérrez O, González-Cárdenas M, Berlanga R. Prevalencia de infección genital por *Chlamydia trachomatis* en la población general y en un grupo de prostitutas de Palma de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2004;22(7):439-41.
74. Nogales MC, Castro C, Ramírez M, Pueyo I, Pérez L, Jarana R, Martín E. Diagnóstico de la infección por *Chlamydia trachomatis* en un centro de diagnóstico y prevención de infecciones de transmisión sexual: evaluación de los exudados cervicales, uretrales y rectales mediante técnica de PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2007;25(1):11-5.
75. Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, Avecilla A, Coll C, Saludes V, Casabona J. Prevalencia de la infección por *C. trachomatis* y *N. gonhorroae* y determinantes para su adquisición en jóvenes y adultos-jóvenes en Cataluña. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011;29(2):96-101.
76. López-Corbeto E, González V, Bascunyana E, Humet V, Casabona J. Tendencia y determinantes de la infección genital por *Chlamydia trachomatis* en menores de 25 años. Cataluña 2007-2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2015 Dec 16. pii:S0213-005X(15)00392-4. doi: 10.1016/j.eimc.2015.11.002. [Epub ahead of print]
77. Franceschi S, Smith JS, van den Brule A, Herrero R, Arslan A, Anh PT, et al. Cervical infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in

- women from ten areas in four continents. A cross-sectional study. *Sex Transm Dis*, 2007;34(8):563-9.
78. Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis*, 2013;13:388.
79. Cates W, Steiner M. Dual protection against unintended pregnancy and sexually transmitted infections: what is the best contraceptive approach? *Sex Transm Dis*, 2002;293:168–74.
80. Althaus C, Heijne J, Low N. Towards more robust estimates of the transmissibility of *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis*, 2012;39:402–4.
81. Joyner JL, Douglas JM, Foster M, Judson FN. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis*, 2002;29:196–200.
82. Geisler W, Lensing S, Press C. Spontaneous resolution of genital *Chlamydia trachomatis* Infection in women and protection from reinfection. *J Infect Dis*, 2013;207:1850–56.
83. Matthews RS, Bonigal SD, Wise R. Sterile pyuria and *Chlamydia trachomatis*. *Lancet*, 1990;336(8711):385.
84. Savage EJ, van de Laar MJ, Galloway A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, Hoffmann S, Diez M, Borrego MJ, Lowndes CM, Ison C, on behalf on the European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill*, 2009;14(48):pii=19428. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19428>.

Bibliografía

85. White JA. Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis*, 2009;22:57–66.
86. Vargas-Leguas H, Garcia de Olalla P, Arando M, Armengol P, Barberá MJ, Vall M, Vives A, Martín-Ezquerria G, Alsina M, Blanco J, Muñoz C, Caballero E, Andreu A, Ros M, Gorrindo P, Dominguez A, Caylà JA. Lymphogranuloma venereum: a hidden emerging problem, Barcelona, 2011. *Euro Surveill*, 2012;17(2):pii=20057. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20057>.
87. Rönn MM, Ward H. The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 2011;11:70.
88. Geisler WM. Duration of untreated, uncomplicated *Chlamydia trachomatis* genital infection and factors associated with chlamydia resolution: a review of human studies. *J Infect Dis*, 2010;201(Suppl 2):104-113.
89. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, Steece R, Markowitz LE, Devine OJ, Walsh CM, Wang S, Gunter DC, Irwin KL, DeLisle S, Berman SM. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections--2002. *MMWR Recomm Rep*, 2002;51(RR-15):1-38; quiz CE1-4.
90. Akande V, Turner C, Horner P, Horne A, Pacey A; British Fertility Society. Impact of *Chlamydia trachomatis* in the reproductive setting: British Fertility Society Guidelines for practice. *Hum Fertil (Camb)*, 2010;13(3):115-25.
91. Paavonen, J. *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract: State of the art. *Ann Med*, 2012;44(1):18-28.

92. Carey AJ, Beagley KW. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options of treatment. *Am J Reprod Immunol*, 2010;63(6):576-86.
93. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol*, 2003;11(3):44-51.
94. Gottlieb SL, Martin DH, Xu F, Byrne GI, Brunham RC. Summary: The natural history and immunobiology of *Chlamydia trachomatis* genital infection and implications for *Chlamydia* control. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010;201(Suppl 2):190-204.
95. Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, Sweeney YT, Kuo CC. Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed-type hypersensitivity reaction in the macaque model of *Chlamydia trachomatis* salpingitis. *Infect Immun*, 2004;72(2):1159-61.
96. Rank RG, Bowlin AK, Kelly KA. Characterization of lymphocyte response in the female genital tract during ascending Chlamydial genital infection in the guinea pig model. *Infect Immun*, 2000;68(9):5293-98.
97. Wyrick PB. *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010;201(Suppl 2):88-95.
98. Hagerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis*, 2010;201(Suppl 2):134-55.
99. Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008;1(6):46.

Bibliografía

100. Ajonuma LC, Fok KL, Ho LS, Chan PK, Chow PH, Tsang LL, Wong CH, Chen J, Li S, Rowlands DK, Chung YW, Chan HC. CFTR is required for cellular entry and internalization of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Biol Int*, 2010;34(6):593-600.
101. Srivastava P, Jha R, Bas S, Salhan S, Mittal A. In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected sites release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat-shock-protein stimulation than fertile women. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008;6(20):1-10.
102. Dean D, Bruno WJ, Wan R, Gomes JP, Devignot S, Mehari T, de Vries HJ, Morré SA, Myers G, Read TD, Spratt BG. Predicting phenotype and emerging strains among *Chlamydia trachomatis* infections. *Emerg Infect Dis*, 2009;15(9):1385-94.
103. Unemo M, Seth-Smith HM, 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*, 2010;156(Pt 5):1394-404.
104. Tan C, Spitznagel JK, Shou H-Z, Hsia RC, Bavoil PM. The polymorphic membrane protein gene family of the chlamydiaceae. En: Bavoil PM, Wyrick PB (eds). *Chlamydia: genomics and pathogenesis*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, 2006:195-218.
105. Cornelis GR, Van GF. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*, 2000;54:735-74.
106. Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD, Hogan DM, Whitmire W, McClarty G, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2001;98(24):13984-9.

107. Collet T, Macnaughton T, Walsh T, Debattista J, Timms P. Identification of novel markers for uncomplicated lower genital tract infections and upper genital tract pathology due to *Chlamydia trachomatis*. *Int J Infect Dis*, 2011;15(4):e257-66.
108. Simms I, Stephenson JM. Pelvic inflammatory disease epidemiology: what do we know and what do we need to know? *Sex Transm Infect*, 2000;76(2):80-87.
109. Price MJ, Ades AE, De Angelis D, Welton NJ, Macleod J, Soldan K, Simms I, Turner K, Horner PJ. Risk of pelvic inflammatory disease following *Chlamydia trachomatis* infection: analysis of prospective studies with a multistate model. *Am J Epidemiol*, 2013;178(3):484-92.
110. European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia* control in Europe: literature review. Stockholm: ECDC; 2014.
111. Brunham RC, Gottlieb SL, Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med*, 2015;372(21):2039-48.
112. Wang W, Stassen FR, Surcel H-M, Öhman H, Tiitinen A, Paavonen J, de Vries HJ, Heijmans R, Pleijster J, Morr  SA, Ouburg S. Analyses of polymorphism in inflammasome-associated NLRP3 and miRNA-146A genes in the susceptibility to and tubal pathology of *Chlamydia trachomatis* infection. *Drugs Today (Barc)*, 2009;45(Suppl B):95–103.
113. Scholes D, Stergachis A, Heidrich FE, Andrilla H, Holmes KK, Stamm WE. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection. *N England J Med*, 1996;334(21):1362–6.
114. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Negron KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007;22(6):1506-12.

Bibliografía

115. World Health Organization. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006–2015: breaking the chain of transmission. 2007. Disponible en: www.who.int/entity/reproductivehealth/publications/rtis/9789241563475/en/.
116. Dixon RE, Hwang SJ, Hennig GW, Ramsey KH, Schripsema JH, Sanders KM, Ward SM. *Chlamydia* infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct. *Biol Reprod*, 2009;80(4):665-73.
117. Ajonuma LC, Chan PK, Ng EH, Fok KL, Wong CH, Tsang LL, Tang XX, Ho LS, Lau MC, Chung CM, He Q, Huang HY, Yang DZ, Rowlands DK, Chung YW, Chan HC. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the pathogenesis of hydrosalpinx induced by *Chlamydia trachomatis* infection. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008;34(6):923-30.
118. He Q, Tsang LL, Ajonuma LC, Chan HC. (2010). Abnormally up-regulated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and uterine fluid accumulation contribute to *Chlamydia trachomatis*-induced female infertility. *Fertil Steril*, 2010;93(8):2608-14.
119. Hjelholt A, Christiansen G, Johannesson TG, Ingerslev HJ, Birkelund S. Tubal factor infertility is associated with antibodies against *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60. *Hum Reprod*, 2011;26(8):2069-76.
120. Varma R, Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *Clin Evid (Online)*, 2012:1406.
121. Shaw JL, Wills GS, Lee KF, Horner PJ, McClure MO, Abrahams VM, Wheelhouse N, Jabbour HN, Critchley HO, Entrican G, Horne AW. *Chlamydia trachomatis* infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NFκB

- activation resulting in a microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. *Am J Pathol*, 2011;178(1):253-60.
122. Refaat B, Al-Azemi M, Geary I, Eley A, Ledger W. Role of activins and inducible nitric oxide in the pathogenesis of ectopic pregnancy in patients with or without *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2009;16(10):1493-1503.
123. Shao R, Zhang SX, Weijdegård B, Zou S, Egecioglu E, Norström A, Brännström M, Billig H. Nitric oxide synthases and tubal ectopic pregnancies induced by *Chlamydia* infection: basic and clinical insights. *Mol Hum Reprod*, 2010;16(12):907-15.
124. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod*, 2009;24(3):679-86.
125. Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect*, 2007;83(4):314-18.
126. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 2010;88(1):31-38.
127. Cohen I, Veille JC, Calkins BM. Improved pregnancy outcome following successful treatment of chlamydial infection. *JAMA*, 1990;263(23):3160-63.
128. Rours GI, Duijts L, Moll HA, Arends LR, de Groot R, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers EA, Mackenbach JP, Ott A, Willemsse HF, van der Zwaan EA,

Bibliografía

- Verkooijen RP, Verbrugh HA. *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy associated with preterm delivery: a population-based prospective cohort study. Eur J Epidemiol, 2011;26(6):493-502.
129. Xia H, Li X, Li X, Liang H, Xu H. The clinical management and outcome of term premature rupture of membrane in East China: results from a retrospective multicenter study. Int J Clin Exp Med, 2015;8(4):6212-7.
130. Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Redzko S, Przepieść J, Zdrodowski M. The influence of *Chlamydia trachomatis* infection on spontaneous abortions. Adv Med Sci, 2009;54(1):86-90.
131. Baud D, Goy G, Jatón K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, Vial Y, Hohlfeld P, Pospischil A, Greub G. Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. Emerg Infect Dis, 2011;17(9):1630-5.
132. Ahmadi A, Khodabandehloo M, Ramazanzadeh R, Farhadifar F, Roshani D, Ghaderi E, Farhangi N. The Relationship between *Chlamydia trachomatis* Genital Infection and Spontaneous Abortion. J Reprod Infertil, 2016;17(2):110-6.
133. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Närvänen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for cervical squamous cell carcinoma. JAMA, 2001;285(1):47-51.
134. Paavonen J, Karunakaran KP, Noguchi Y, Anttila T, Bloigu A, Dillner J, Hallmans G, Hakulinen T, Jellum E, Koskela P, Lehtinen M, Thoresen S, Lam H, Shen C, Brunham RC. Serum antibody response to the heat shock protein 60 of *Chlamydia trachomatis* in women with developing cervical cancer. Am J Obstet Gynecol, 2003;189(5):1287-92.

135. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, Rodriguez AC, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Viscidi RP, Quint W, Burk RD. *Chlamydia trachomatis* and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J Natl Cancer Inst*, 2010;102(23):1794-804.
136. Chen AL, Johnson KA, Lee JK, Sütterlin C, Tan M. CPAF: a Chlamydial protease in search of an authentic substrate. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002842.
137. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*, 2012;62:324–32.
138. Weidner W, Diemer T, Huwe P, Rainer H, Ludwig M. The role of *Chlamydia trachomatis* in prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*, 2002;19:466–70.
139. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod*, 2008;79:180–9.
140. Ouzounova-Raykova V, Ouzounova I, Mitov IG, 2010. *Chlamydia trachomatis* be an aetiological agent of chronic prostatic infection? *Andrologia*, 2010;42:176–81.
141. Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Breser ML, Sánchez LR, Cuffini C, Rivero VE. *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: an update. *J Reprod Immunol*, 2013;100:37-53.
142. Furuya R, Takahashi S, Furuya S, Kunishima Y, Takeyama KOH, Tsukamoto T. Is seminal vesiculitis a discrete disease entity? Clinical and microbiological study of seminal vesiculitis in patients with acute epididymitis. *J Urol*, 2004;171:1550–53.
143. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl*, 2011;34:e330–e347.

Bibliografija

144. Pajovic B, Radojevic N, Vukovic M, Stjepcevic A. Semen analysis before and after antibiotic treatment of asymptomatic chlamydia- and ureaplasma-related pyospermia. *Andrologia*, 2012;44:18–28.
145. Sellami H, Znazen A, Sellami A, Mnif H, Louati N, Zarrouk SB, Keskes L, Rebai T, Gdoura R, Hammami A. Molecular Detection of *Chlamydia trachomatis* and Other Sexually Transmitted Bacteria in Semen of Male Partners of Infertile Couples in Tunisia: The Effect on Semen Parameters and Spermatozoa Apoptosis Markers. *PLoS One*, 2014;9(7):e98903.
146. de Barbeyrac B, Papaxanthos-Roche A, Mathieu C, Germain C, Brun JL, Gachet M, Mayer G, Bébéar C, Chene G, Hocké C. *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006;129:46–53.
147. Eggert-Kruse W, Batschulat K, Demirkaca T, Strowitzki T. Male immunity to the chlamydial 60 kDa heat shock protein (HSP 60) - associated with semen quality? *Andrologia*, 2015;47(1):66-76.
148. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*, 2010;59(RR-12):1-110.
149. Yu J, Wu S, Li F, Hu L. Vertical transmission of *Chlamydia trachomatis* in Chongqing China. *Curr Microbiol*, 2009;58(4):315-20.
150. Chojnacka K, Szczapa J, Kedzia W. Perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis* and its complication in preterm infants. *Ginekol Pol*, 2012;83(2):116-21.

151. Brocklehurst P, Rooney G. Interventions for treating genital *Chlamydia trachomatis* infection in pregnancy. Cochrane Database Syst Rev, 1998 (updated 2009);4(Art. No. CD000054).
152. Rours IG, Hammerschlag MR, Ott A, De Faber TJ, Verbrugh HA, de Groot R, Verkooyen RP. *Chlamydia trachomatis* as a cause of neonatal conjunctivitis in Dutch infants. Pediatrics, 2008;121(2):e321-6.
153. Rours GI, Hammerschlag MR, Van Doornum GJ, Hop WC, de Groot R, Willemse HF, Verbrugh HA, Verkooyen RP. *Chlamydia trachomatis* respiratory infection in Dutch infants. Arch Dis Child, 2009;94(9):705-7.
154. Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, Fine PM, Martin DH, Fuller D, Jordan JA, Janda W, Hook EW 3rd. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. Sex Transm Dis, 2005;32(2):725-8.
155. Blake DR, Maldeis N, Barnes MR, Hardick A, Quinn TC, Gaydos CA. Cost-effectiveness of screening strategies for *Chlamydia trachomatis* using cervical swabs, urine, and self-obtained vaginal swabs in a sexually transmitted disease clinic setting. Sex Transm Dis, 2008;35(7):649-55.
156. Michel CE, Sonnex C, Carne CA, White JA, Magbanua JP, Nadala EC Jr, Lee HH. *Chlamydia trachomatis* load at matched anatomic sites: implications for screening strategies. J Clin Microbiol, 2007;45(5):1395-402.
157. Piñeiro L, Vicente D, Echeverría MJ, Cilla G. Application of an automatic nucleic acid extraction method to improve the detection of *Chlamydia trachomatis*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009;27(9):549-50.

Bibliografía

158. Geisler WM. Diagnosis and Management of Uncomplicated *Chlamydia trachomatis* Infections in Adolescents and Adults: Summary of Evidence Reviewed for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*, 2015;61 Suppl 8:S774-84.
159. Hsieh YH, Gaydos CA, Hogan MT, Uy OM, Jackman J, Jett-Goheen M, Albertie A, Dangerfield DT 2nd, Neustadt CR, Wiener ZS, Rompalo AM. What qualities are most important to making a point of care test desirable for clinicians and others offering sexually transmitted infection testing? *PLoS One*, 2011;6(4):e19263.
160. Mahilum-Tapay L, Laitila V, Wawrzyniak JJ, Lee HH, Alexander S, Ison C, Swain A, Barber P, Ushiro-Lumb I, Goh BT. New point of care *Chlamydia* Rapid Test--bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study. *BMJ*, 2007;335(7631):1190-4.
161. Pearce DM, Shenton DP, Holden J, Gaydos CA. Evaluation of a novel electrochemical detection method for *Chlamydia trachomatis*: application for point-of-care diagnostics. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2011;58:755-8.
162. Dean D, Turingan RS, Thomann HU, et al. A multiplexed microfluidic PCR assay for sensitive and specific point-of-care detection of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One*, 2012; 7:e51685.
163. Huang W, Gaydos CA, Barnes MR, Jett-Goheen M, Blake DR. Comparative effectiveness of a rapid point-of-care test for detection of *Chlamydia trachomatis* among women in a clinical setting. *Sex Transm Infect*, 2013; 89:108-14.

164. Land JA, Van Bergen JE, Morré SA, Postma MJ. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening. Hum Reprod Update, 2010;16(2):189-204.
165. Pedersen LN, Herrmann B, Møller JK. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009;55(2):120-30.
166. Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverría MJ, Cilla G. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in an area of northern Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009;27(8):462-4.
167. Wang Y, Skilton RJ, Cutcliffe LT, Andrews E, Clarke IN, Marsh P. Evaluation of a high resolution genotyping method for *Chlamydia trachomatis* using routine clinical samples. PLoS One, 2011;6(2):e16971.
168. Hong KC, Schachter J, Moncada J, Zhou Z, House J, Lietman TM. Lack of macrolide resistance in *Chlamydia trachomatis* after mass azithromycin distributions for trachoma. Emerg Infect Dis, 2009;15(7):1088-9.
169. Sandoz KM, Rockey DD. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. Future Microbiol, 2010;5(9):1427-42.
170. Horner P. The case for further treatment studies of uncomplicated genital *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Transm Infect, 2006;82(4):340-3.
171. Donati M, Di Francesco A, D'Antuono A, Delucca F, Shurdhi A, Moroni A, Baldelli R, Cevenini R. In vitro activities of several antimicrobial agents against recently isolated and genotyped *Chlamydia trachomatis* urogenital serovars D through K. Antimicrob Agents Chemother, 2010;54(12):5379-80.
172. Bhengraj AR, Vardhan H, Srivastava P, Salhan S, Mittal A. Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of *Chlamydia*

Bibliografía

- trachomatis* obtained from recurrently infected female patients in India. Chemotherapy, 2010;56(5):371-7.
173. Peuchant O, Duvert JP, Clerc M, Raheison S, Bébéar C, Bébéar CM, de Barbeyrac B. Effects of antibiotics on *Chlamydia trachomatis* viability as determined by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol, 2011;60(Pt 4):508-14.
174. Lau CY, Qureshi AK. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. Sex Transm Dis, 2002;29(9):497-502.
175. Quinn TC, Gaydos CA. Treatment for *Chlamydia* Infection--Doxycycline versus Azithromycin. N Engl J Med, 2015;373(26):2573-5.
176. Geisler WM, Koltun WD, Abdelsayed N, Burigo J, Mena L, Taylor SN, Batteiger BE, Thurman AR, Hook EW 3rd, Vaughn TA, Annett MP, Muenzen RA, Caminis J. Safety and efficacy of WC2031 versus vibramycin for the treatment of uncomplicated urogenital *Chlamydia trachomatis* infection: a randomized, double-blind, double-dummy, active-controlled, multicenter trial. Clin Infect Dis, 2012;55(1):82-8.
177. Hosenfeld CB, Workowski KA, Berman S, Zaidi A, Dyson J, Mosure D, Bolan G, Bauer HM. Repeat infection with *Chlamydia* and gonorrhea among females: a systematic review of the literature. Sex Transm Dis, 2009;36(8):478-89.
178. Centers for Disease Control and Prevention. Expedited partner therapy in the management of sexually transmitted diseases. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2006. Disponible en <http://www.cdc.gov/std/treatment/eptfinalreport2006.pdf>.

179. European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia* control in Europe, 2009. Disponible en http://www.ecdc.europa.eu/en/files/pdf/Health_topics/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf.
180. Low N, Cassell JA, Spencer B, Bender N, Martin Hilber A, van Bergen J, Andersen B, Herrmann B, Dubois-Arber F, Hamers FF, van de Laar M, Stephenson JM. *Chlamydia* control activities in Europe: cross-sectional survey. *Eur J Public Health*, 2012;22(4):556-61.
181. Wiesenfeld HC, Dennard-Hall K, Cook RL, Ashton M, Zamborsky T, Krohn MA. Knowledge about sexually transmitted diseases in women among primary care physicians. *Sex Transm Dis*, 2005;32(11):649-53.
182. Maciosek M, Coffield A, Edwards N, Flottemesch TJ, Goodman MJ, Solberg LI. Priorities among effective clinical preventive services: results of a systematic review and analysis. *Am J Prev Med*, 2006;31(1):52-61.
183. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for chlamydial infection: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, 2007;147(2):128-34.
184. Gift TL, Blake DR, Gaydos CA, Marrazzo JM. The cost-effectiveness of screening men for *Chlamydia trachomatis*: a review of the literature. *Sex Transm Dis*, 2008;35(Suppl. 11):S51-60.
185. Kalwij S, Macintosh M, Baraitser P. Screening and treatment of *Chlamydia trachomatis* infections. *BMJ*, 2010;340:c1915.
186. Riera-Montes M, Velicko I. The *Chlamydia* surveillance system in Sweden delivers relevant and accurate data: results from the system evaluation, 1997-2008. *Euro Surveill*, 2011;16(27):19907.

Bibliografía

187. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Chlamydia* screening among sexually active young female enrollees of health plans—United States, 2000–2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009;58(14):362–65.
188. Boyle MH. Guidelines for evaluating prevalence studies. *Evidence-Based Mental Health*, 1998;1:37-40.
189. Batteiger BE, Tu W, Ofner S, Van Der Pol B, Stothard DR, Orr DP, Katz BP, Fortenberry JD. Repeated *Chlamydia trachomatis* genital infections in adolescent women. *J Infect Dis*, 2010;201(1):42-51.
190. Fung M, Scott KC, Kent CK, Klausner JD. Chlamydial and gonococcal reinfection among men: a systematic review of data to evaluate the need for retesting. *Sex Transm Infect*, 2007;83(4):304-9.
191. Roston A, Suleta K, Stempinski K, Keith L, Patel A. Get Yourself Tested 2011-2012: Findings and prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* at an urban public health system. *Int J STD AIDS*, 2015;26(5):322-8.
192. Turner KM, Adams EJ, Lamontagne DS, Emmett L, Baster K, Edmunds WJ. Modelling the effectiveness of *Chlamydia* screening in England. *Sex Transm Infect*, 2006;82(6):496-502.
193. Tuite AR, Jayaraman GC, Allen VG, Fisman DN. Estimation of the burden of disease and costs of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Canada. *Sex Transm Dis*, 2012;39(4):260-7.
194. Jamil MS, Bauer HM, Hocking JS, Ali H, Wand H, Walker J, Douglas L, Donovan B, Kaldor JM, Guy RJ. *Chlamydia* screening strategies and outcomes in educational settings: a systematic review. *Sex Transm Dis*, 2014;41(3):180-7.

195. Hansdotter F, Blaxhult A. 'Chlamydia Monday' in Sweden. *Euro Surveill*, 2008;13(38):18984.
196. Deogan CL, Bocangel MK, Wamala SP, Månsdotter AM. A cost-effectiveness analysis of the *Chlamydia Monday*--a community-based intervention to decrease the prevalence of *chlamydia* in Sweden. *Scand J Public Health*, 2010;38(2):141-50.
197. Van den Broek IV, Hoebe CJ, van Bergen JE, Brouwers EE, de Feijter EM, Fennema JS, Götz HM, Koekenbier RH, van Ravesteijn SM, de Coul EL. Evaluation design of a systematic, selective, internet-based, *Chlamydia* screening implementation in the Netherlands, 2008–2010: implications of first results for the analysis. *BMC Infect Dis*, 2010;10:89.
198. Greenland KE, Op de Coul EL, van Bergen JE, Brouwers EE, Fennema HJ, Götz HM, Hoebe CJ, Koekenbier RH, Pars LL, van Ravesteijn SM, van den Broek IV. Acceptability of the Internet-Based *Chlamydia* Screening Implementation in the Netherlands and Insights Into Nonresponse. *Sex Transm Dis*, 2011;38(6):467-74.
199. Clark KL, Howell MR, Li Y, Powers T, McKee KT Jr, Quinn TC, Gaydos JC, Gaydos CA. Hospitalization rates in female US Army recruits associated with a screening program for *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Dis*, 2002;29(1):1–5.
200. Andersen B, van Valkengoed I, Sokolowski I, Møller JK, Østergaard L, Olesen F. Impact of intensified testing for urogenital *Chlamydia trachomatis* infections: a randomised study with 9-year follow-up. *Sex Transm Infect*, 2011;87(2):156-61.
201. Ostergaard L, Andersen B, Moller JK, Olesen F. Home sampling versus conventional swab sampling for screening of *Chlamydia trachomatis* in women: a cluster-randomized 1-year follow-up study. *Clin Infect Dis*, 2000;31(4):951–7.

Bibliografía

202. Moss NJ, Ahrens K, Kent CK, Klausner JD. The decline in clinical sequelae of genital *Chlamydia trachomatis* infection supports current control strategies. *J Infect Dis*, 2006;193(9):1336–8.
203. Lysén M, Osterlund A, Rubin CJ, Persson T, Persson I, Herrmann B. Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol*, 2004;42(4):1641-7.
204. Owusu-Edusei K Jr, Bohm MK, Chesson HW, Kent CK. *Chlamydia* screening and pelvic inflammatory disease: Insights from exploratory time-series analyses. *Am J Prev Med*, 2010;38(6):652-7.
205. Bohm MK, Newman L, Satterwhite CL, Tao G, Weinstock HS. Pelvic inflammatory disease among privately insured women, United States, 2001-2005. *Sex Transm Dis*, 2010;37(3):131-6.
206. Ripa T, Nilsson PA. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis*, 2007;34(5):255-6.
207. Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA, Peña AS. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerg Infect Dis*, 2005;11(8):1311-2.
208. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 1990;28:495–503.
209. Bom RJ, Christerson L, Schim van der Loeff MF, Coutinho RA, Herrmann B, Bruisten SM. Evaluation of high-resolution typing methods for *Chlamydia*

- trachomatis* in samples from heterosexual couples. J Clin Microbiol, 2011;49(8):2844-53.
210. Adams EJ, Charlett A, Edmunds WJ, Hughes G. *Chlamydia trachomatis* in the United Kingdom: a systematic review and analysis of prevalence studies. Sex Transm Infect, 2004; 80: 354-62.
211. Haar K, Bremer V, Houareau C, Meyer T, Desai S, Thamm M, Hamouda O. Risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescents: results from a representative population-based survey in Germany, 2003-2006. Euro Surveill, 2013;18(34):20562.
212. Thomas AG, Brodine SK, Shaffer R, Shafer MA, Boyer CB, Putnam S, Schachter J. Chlamydial infection and unplanned pregnancy in women with ready access to health care. Obstet Gynecol, 2001;98:1117-23.
213. Satterwhite CL, Gray AM, Berman S, Weinstock H, Kleinbaum D, Howards PP. *Chlamydia trachomatis* infections among women attending prenatal clinics: United States, 2004-2009. Sex Transm Dis, 2012;39:416-20.
214. Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Thomas B, Oakeley P, Kerry S. Detection of *Chlamydia trachomatis* infection in early pregnancy using self-administered vaginal swabs and first pass urines: a cross-sectional community-based survey. Br J Gen Pract, 2002;52(483):830-2.
215. Kirk E, Bora S, Van Calster B, Condous G, Van Huffel S, Timmerman D, Bourne T. *Chlamydia trachomatis* infection in patients attending an Early Pregnancy Unit: prevalence, symptoms, pregnancy location and viability. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008; 87: 601-7.
216. Piñeiro L, Lekuona A, Cilla G, Lasa I, Martínez-Gallardo LP, Korta J, Pérez-Trallero E. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in parturient women in

Bibliografía

- Gipuzkoa, Northern Spain. SpringerPlus, 2016 May 10;5:566. DOI: 10.1186/s40064-016-2268-4.
217. Borges-Costa J, Matos C, Pereira F. Sexually transmitted infections in pregnant adolescents: prevalence and association with maternal and foetal morbidity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012;26(8):972-5.
218. Pedersen KS, Andersen JS. Social-, age- and gender differences in testing and positive rates for *Chlamydia trachomatis* urogenital infection - a register-based study. *Fam Pract*, 2014;31(6):699-705.
219. Cárcamo CP, Campos PE, García PJ, Hughes JP, Garnett GP, Holmes KK; Peru PREVEN study team. Prevalences of sexually transmitted infections in young adults and female sex workers in Peru: a national population-based survey. *Lancet Infect Dis*, 2012;12 765-73.
220. Cabeza J, García PJ, Segura E, García P, Escudero F, La Rosa S, León 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*, 2015;91(1):7-10.
221. van den Broek IV, van Bergen JE, Brouwers EE, Fennema JS, Götz HM, Hoebe CJ, Koekenbier RH, Kretzschmar M, Over EA, Schmid BV, Pars LL, van Ravesteijn SM, van der Sande MA, de Wit GA, Low N, Op de Coul EL. Effectiveness of yearly, register based screening for *chlamydia* in the Netherlands: controlled trial with randomised stepped wedge implementation. *BMJ*, 2012;345:e4316.
222. Low N, McCarthy A, Macleod J, Salisbury C, Campbell R, Roberts TE, Horner P, Skidmore S, Sterne JA, Sanford E, Ibrahim F, Holloway A, Patel R, Barton PM, Robinson SM, Mills N, Graham A, Herring A, Caul EO, Davey Smith G, Hobbs

- FD, Ross JD, Egger M; Chlamydia Screening Studies Project Group. Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. *Health Technol Assess*, 2007;11(8):iii-iv, ix-xii, 1-165.
223. Hitti J, Garcia P, Totten P, Paul K, Astete S, Holmes KK. Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among Peruvian women. *Sex Transm Dis*, 2010;37(2):81-5.
224. Labbé AC, Frost E, Deslandes S, Mendonça AP, Alves AC, Pépin J. *Mycoplasma genitalium* is not associated with adverse outcomes of pregnancy in Guinea-Bissau. *Sex Transm Infect*, 2002;78(4):289-91.
225. Weissenbacher TM, Kupka MS, Kainer F, Friese K, Mylonas I. Screening for *Chlamydia trachomatis* in pregnancy: a retrospective analysis in a German urban area. *Arch Gynecol Obstet*, 2011;283(6):1343-7.
226. Low N, Bender N, Nartey L, Redmond S, Shang A, Stephenson J. Effectiveness of *Chlamydia* screening: systemic review. *Int J Epidemiol*, 2009;38:435-48.
227. Bilardi JE, De Guingand DL, Temple-Smith MJ, Garland S, Fairley CK, Grover S, Wallace E, Hocking JS, Tabrizi S, Pirotta M, Chen MY. Young pregnant women's views on the acceptability of screening for *chlamydia* as part of routine antenatal care. *BMC Public Health*, 2010;19(10):505.
228. Honey E, Augood C, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mårdh PA, Stry A, Stray-Pedersen B. Cost effectiveness of screening for *Chlamydia trachomatis*: a review of published studies. *Sex Transm Infect*. 2002;78(6):406-12.
229. Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, Berman S, Papp JR, McQuillan G, Weinstock H. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. *Ann Intern Med*, 2007;147:89-96.

Bibliografía

230. Lavoué V, Vandenbroucke L, Lorand S, Pincemin P, Bauville E, Boyer L, Martin-Meriadec D, Minet J, Poulain P, Morcel K. Screening for *Chlamydia trachomatis* using self-collected vaginal swabs at a public pregnancy termination clinic in France: results of a screen-and-treat policy. *Sex Transm Dis*, 2012;39:622-7.
231. Mann JR, McDermott S, Gill T. Sexually transmitted infection is associated with increased risk of preterm birth in South Carolina women insured by Medicaid. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010;23:563-8.
232. Silva MJ, Florêncio GL, Gabiatti JR, Amaral RL, Eleutério Júnior J, Gonçalves AK. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: a meta-analysis study. *Braz J Infect Dis*, 2011;15:533-9.
233. Justel M, Alexandre I, Martínez P, Sanz I, Rodríguez-Fernández A, Fernández I, Pastor JC, Ortiz de Lejarazu R. Vertical transmission of bacterial eye infections, Angola, 2011-2012. *Emerg Infect Dis*, 2015;21(3):471-3.
234. Wahlberg V. Reconsideration of Crede´ prophylaxis. A study of maternity and neonatal care. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1982;295:1-73.
235. Darling EK, McDonald H. A meta-analysis of the efficacy of ocular prophylactic agents used for the prevention of gonococcal and chlamydial *ophthalmia neonatorum*. *J Midwifery Womens Health*, 2010;55(4):319-27.
236. Hammerschlag MR, Cummings C, Roblin PM, Williams TH, Delke I. Efficacy of neonatal ocular prophylaxis for the prevention of chlamydial and gonococcal conjunctivitis. *N Engl J Med*, 1989;320:769-72.
237. Rosa Fraile M, Rodríguez Granger J, De Cueto M, Sampedro A, Gaye EB, Haro JM, et al. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol*, 1999;37:2674-7.

238. Ramos JM, Milla A, López-García P, Gutiérrez F. Estudio de colonización por *Streptococcus agalactiae* en gestante extranjeras y españolas, en Elche y comarca. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2009;27:249–51.
239. Hahn HS, Lee KH, Koo YJ, Kim SG, Rhee JE, Kim MY, Hwang SJ, Lee JH, Lee IH, Lim KT, Shim JU, Kim TJ. Distribution and perinatal transmission of bacterial vaginal infections in pregnant women without vaginal symptoms. *Scand J Infect Dis*, 2014;46(5):348-53.
240. 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*, 2010;3:34.
241. Boletín epidemiológico semanal. Vigilancia de las infecciones de transmisión sexual, 1995-2010. 2012;20(7):63-72.
242. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. Stockholm: ECDC; 2012.
243. Centers for Disease Control and Prevention. Trends in Sexually Transmitted Diseases in the United States: 2009 National Data for Gonorrhea, Chlamydia and Syphilis. 2010. Disponible en <http://www.cdc.gov/std/stats09/trends2009.pdf>.
244. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 - sexually transmitted infections, including HIV and blood-borne viruses. Stockholm: ECDC; 2015.
245. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2013. Madrid, julio 2014.

Bibliografía

246. Unidad de Epidemiología de Gipuzkoa, Departamento de Salud del Gobierno Vasco. Memoria de vigilancia epidemiológica en Gipuzkoa 2013. 2014.
247. Boletín Oficial del Estado, 2015-2837;65:24012-15.
248. Boletín Oficial del País Vasco, 2015-578;27:1-6.
249. Workowski KA, Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep, 2015;5;64(RR-03):1-137.
250. Moi H, Blee K, Horner PJ. Management of non-gonococcal urethritis. BMC Infect Dis, 2015;15(1):294.
251. Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. *Mycoplasma genitalium* compared to chlamydia, gonorrhoea and trichomonas as an aetiological agent of urethritis in men attending STD clinics. Sex Transm Infect, 2009;85:438–40.
252. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. Sex Transm Infect, 2004;80:289–93.
253. Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, et al. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. Clin Infect Dis, 2013;56:934–42.
254. Varela JA, Otero L, García MJ, Palacio V, Carreño F, Cuesta M, Sánchez C, Vázquez F. Trends in the prevalence of pathogens causing urethritis in Asturias, Spain, 1989-2000. Sex Transm Dis, 2003;30(4):280-3.
255. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. Antimicrob Agents Chemother, 2012;56:1273–80.

256. Bignell C, Unemo M; European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*, 2013;24(2):85-92.
257. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT; Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30(4):218-9.
258. Leung A, Eastick K, Haddon L, Horn K, Ahuja D, Horner P. *Mycoplasma genitalium* is associated with symptomatic urethritis. *Int J STD AIDS*, 2006;17:285–8.
259. Frølund M, Lidbrink P, Wikström A, Cowan S, Ahrens P, Skov Jensen J. Urethritis-associated Pathogens in Urine from Men with Non-gonococcal Urethritis: A Case-control Study. *Acta Derm Venereol*, 2015 Dec 11. doi:10.2340/00015555-2314. [Epub ahead of print].
260. Lau A, Bradshaw CS, Lewis D, Fairley CK, Chen MY, Kong FY, Hocking JS. The efficacy of azithromycin for the treatment of genital *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 2015;61(9):1389-99.
261. Wold C, Sorthe J, Hartgill U, Olsen AO, Moghaddam A, Reinton N. Identification of macrolide-resistant *Mycoplasma genitalium* using real-time PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015;29(8):1616-20.
262. Jernberg E, Moghaddam A, Moi H. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. *International journal of STD and AIDS*, 2008;19:676–9.
263. Anagrius C, Lore B, Jensen JS. Treatment of *Mycoplasma genitalium*: observations from a Swedish STD clinic. *PLoS One* 2013, 8:e61481.

Bibliografía

264. Bradshaw CS, Chen MY, Fairley CK. Persistence of *Mycoplasma genitalium* following azithromycin therapy. PLoS One, 2008;3:e3618.
265. Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. Int J STD AIDS, 2014;25:294–8.
266. Ng A, Ross JD. Trichomonas vaginalis infection: How significant is it in men presenting with recurrent or persistent symptoms of urethritis? Int J STD AIDS, 2016;27(1):63-5.
267. Deza G, Martin-Ezquerro G, Gómez J, Villar-García J, Supervia A, Pujol RM. Isolation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in urethral exudates from men with acute urethritis: a descriptive study of 52 cases. Sex Transm Infect, 2016;92(1):29-31.
268. Nassar FA, Abu-Elamreen FH, Shubair ME, Sharif FA. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*, *genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in patients with sterile pyuria. Adv Med Sci, 2008;53(1):80-6.
269. Ito S, Horie K, Seike K, Yasuda M, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Deguchi T. Usefulness of quantifying leukocytes in first-voided urine to predict positivity for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic men at high risk for chlamydial infection. J Infect Chemother, 2014;20(12):748-51.
270. Dryden MS, Wilkinson M, Redman M, Millar MR. Detection of *Chlamydia trachomatis* in general practice urine samples. Br J Gen Pract, 1994;44(380):114-7.

271. Wilbanks MD, Galbraith JW, Geisler WM. Dysuria in the Emergency Department: Missed Diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. West J Emerg Med, 2014;15(2):227-30.
272. Wølner-Hanssen P. Silent pelvic inflammatory disease: is it overstated? Obstet Gynecol, 1995;86(3):321-5.
273. Public Health England. Rates of Pelvis Inflammatory Disease (PID) in England (2000-2013). Health Protection Report, 2015;9(22):31-4. Disponible en <https://www.gov.uk/government/publications/pelvic-inflammatory-disease-in-england>.
274. Molano M, Meijer CJ, Morr  SA, Pol R, van den Brule AJ. Combination of PCR targeting the VD2 of omp1 and reverse line blot analysis for typing of urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical scrape specimens. J Clin Microbiol, 2004;42(7):2935-9.
275. Yang CL, Maclean I, Brunham RC. DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis* omp1 gene. J Infect Dis, 1993;168(5):1225-30.
276. Zhang JJ, Zhao GL, Wang F, Hong FC, Luo ZZ, Lan LN, Zhang CL, Peng Y, Liu XL, Feng TJ, Chen XS. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Shenzhen, China. Sex Transm Infect, 2012;88:272-7.
277. Nunes A, Borrego MJ, Nunes B, Florindo C, Gomes JP. Evolutionary dynamics of ompA, the gene encoding the *Chlamydia trachomatis* key antigen. J Bacteriol, 2009;191:7182-92.
278. Bošnjak Z, Džijan S, Pavlinić D, Perić M, Ružman N, Križan IR, Lauc G, Antolović-Požgain A, Burazin J, Vuković D. Distribution of *Chlamydia trachomatis* serotypes in clinical urogenital samples from north-eastern Croatia. Curr Microbiol, 2012;64:552-60.

Bibliografija

279. Kese D, Potocnik M, Maticic M, Kogoj R. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* directly from urogenital and conjunctiva samples using an ompA gene pyrosequencing-based assay. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011;63:210-6.
280. Jalal H, Verlander NQ, Kumar N, Bentley N, Carne C, Sonnex C. Genital chlamydial infection: association between clinical features, organism genotype and load. *J Med Microbiol*, 2011;60:881-8.
281. Niemi S, Hiltunen-Back E, Puolakkainen M. *Chlamydia trachomatis* genotypes and the Swedish new variant among urogenital *Chlamydia trachomatis* strains in Finland. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2011;2011:481890.
282. Marangoni A, Foschi C, Nardini P, D'Antuono A, Banzola N, Di Francesco A, Ostanello F, Russo I, Donati M, Cevenini R. *Chlamydia trachomatis* serovar distribution and other sexually transmitted coinfections in subjects attending an STD outpatients clinic in Italy. *New Microbiol*, 2012;35:215-9.
283. Papadogeorgakis H, Pittaras TE, Papapaskevas J, Pitiriga V, Katsambas A, Tsakris A. *Chlamydia trachomatis* serovar distribution and *Neisseria gonorrhoeae* coinfection in male patients with urethritis in Greece. *J Clin Microbiol*, 2010;48:2231-4.
284. Piñeiro L, Unemo M, Cilla G. Absence of Swedish new variant *Chlamydia trachomatis* (nvCT) and *C. trachomatis* genotype distribution in Gipuzkoa, Spain, 2009-2010. *Acta Derm Venereol*, 2012;92:185-186.
285. Jurstrand M, Christerson L, Klint M, Fredlund H, Unemo M, Herrmann B. Characterisation of *Chlamydia trachomatis* by ompA sequencing and multilocus sequence typing in a Swedish county before and after identification of the new variant. *Sex Transm Infect*, 2010;86:56-60.

286. Machado AC, Bandea CI, Alves MF, Joseph K, Igietseme J, Miranda AE, Guimarães EM, Turchi MD, Black CM. Distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars among youths and adults in Brazil. *J Med Microbiol*, 2011;60:472-6.
287. Takahashi S, Yamazaki T, Satoh K, Inonue M, Takahashi S, Ishihara O, et al. Longitudinal epidemiology of *Chlamydia trachomatis* serovars in female patients in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2007;60:374-6.
288. Templeton DJ, Twin J, Jin F, Grulich AE, Garland SM, Tabrizi SN. *Chlamydia trachomatis* serovars in community-based HIV-positive and HIV-negative men who have sex with men in Sydney, Australia. *Sex Transm Infect*, 2011;87:501-2.
289. Li JH, Cai YM, Yin YP, Hong FC, Shi MQ, Feng TJ, Peng RR, Wang BX, Chen XS. Prevalence of anorectal *Chlamydia trachomatis* infection and its genotype distribution among men who have sex with men in Shenzhen, China. *Jpn J Infect Dis*, 2011;64:143-6.
290. Twin J, Moore EE, Garland SM, Stevens MP, Fairley CK, Donovan B, Rawlinson W, Tabrizi SN. *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Australia. *Sex Transm Dis*, 2011;38:279-85.
291. Klint M, Löfdahl M, Ek C, Airell A, Berglund T, Herrmann B. Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis* ompA genotypes. *J Clin Microbiol*, 2006;44:4066-71.
292. Bom RJ, van der Helm JJ, Schim van der Loeff MF, van Rooijen MS, Heijman T, Matser A, de Vries HJ, Bruisten SM. Distinct transmission networks of *Chlamydia trachomatis* in men who have sex with men and heterosexual adults in Amsterdam, The Netherlands. *PLoS One*, 2013;8(1):e53869.

Bibliografía

293. Christerson L, Bom RJ, Bruisten SM, Yass R, Hardick J, Bratt G, Gaydos CA, Morré SA, Herrmann B. *Chlamydia trachomatis* strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States. *J Clin Microbiol*, 2012;50:3548-55.
294. Quint KD, Bom RJ, Quint WG, Bruisten SM, van der Loeff MF, Morré SA, de Vries HJ. Anal infections with concomitant *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *BMC Infect Dis*, 2011;11:63.
295. 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*, 2010;78:2544-53.
296. Bax CJ, Quint KD, Peters RP, Ouburg S, Oostvogel PM, Mutsaers JA, Dörr PJ, Schmidt S, Jansen C, van Leeuwen AP, Quint WG, Trimbos JB, Meijer CJ, Morré SA. Analyses of multiple-site and concurrent *Chlamydia trachomatis* serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital versus rectal specimens in male and female patients. *Sex Transm Infect*, 2011;87(6):503-7.
297. Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, González-Alba JM, Rodríguez C, Hellín T, Vera M, González-Sainz FJ, Clavo P, Villa M, Cantón R, Del Romero J, Galán JC. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clin Microbiol Infect*, 2014;20:219–25.
298. De Munain JL, Ezpeleta G, Imaz M, Del Mar Camara M, Esteban V, Santamaría JM, Cisterna R. Two lymphogranuloma venereum cases in a heterosexual couple in Bilbao (Spain). *Sex Transm Dis*, 2008;35(11):918-9.

299. De Vrieze NH, van Rooijen M, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ. Anorectal and inguinal lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands: trends over time, symptomatology and concurrent infections. *Sex Transm Infect*, 2013;89:548–52.
300. Versteeg B, van Rooijen MS, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ, Bruisten SM. No indication for tissue tropism in urogenital and anorectal *Chlamydia trachomatis* infections using high-resolution multilocus sequence typing. *BMC Infect Dis*, 2014;14:464.
301. Herrmann B, Eden D, Hadad R, Christerson L, Loré B, Osterlund A, Larsson I, Sylvan S, Fredlund H, Unemo M. Prevalence trends of the new variant of *Chlamydia trachomatis* in four counties of Sweden in 2007-2011. *Sex Transm Dis*, 2012;39:648-50.
302. Jurstrand M, Fredlund H, Unemo M. The new variant of *Chlamydia trachomatis* was present as early as 2003 in Orebro County, Sweden, but remained undetected until 2006. *Sex Transm Infect*, 2013;89(7):607-8.
303. Gravningen K, Christerson L, Furberg AS, Simonsen GS, Ödman K, Ståhlsten A, Herrmann B. Multilocus sequence typing of genital *Chlamydia trachomatis* in Norway reveals multiple new sequence types and a large genetic diversity. *PLoS One*, 2012;7(3):e34452.
304. de Vries HJ, Schim van der Loeff MF, Bruisten SM. High-resolution typing of *Chlamydia trachomatis*: epidemiological and clinical uses. *Curr Opin Infect Dis*, 2015;28(1):61-71.
305. Klint M, Fuxelius HH, Goldkuhl RR, Skarin H, Rutemark C, Andersson SG, Persson K, Herrmann B. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol*, 2007;45(5):1410-4.

Bibliografía

306. Herrmann B, Isaksson J, Ryberg M, Tångrot J, Saleh I, Versteeg B, Gravningen K, Bruisten S. Global Multilocus Sequence Type Analysis of *Chlamydia trachomatis* Strains from 16 Countries. *J Clin Microbiol*, 2015;53(7):2172-9.
307. Christerson L, Ruettinger A, Gravningen K, Ehrlich R, Sachse K, Herrmann B. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* by use of a novel multilocus typing DNA microarray. *J Clin Microbiol*, 2011;49(8):2838-43.
308. Taylor SN, Liesenfeld O, Lillis RA, Body BA, Nye M, Williams J, Eisenhut C, Hook EW 3rd, Van Der Pol B. Evaluation of the Roche cobas® CT/NG test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male urine. *Sex Transm Dis*, 2012;39(7):543-9.
309. Parra M, Palomares JC, Bernal S, Sivianes N, Pérez L, Pueyo I, Almeida C, Martín-Mazuelos E. Evaluation of the cobas 4800 CT/NG test for detecting *Chlamydia trachomatis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011;29(6):421-4.

9. ANEXOS**Anexo I.- Población de Gipuzkoa objeto del estudio**

Población de Gipuzkoa (excluido Alto Deba) por tramos de edad, según sexo y comarcas: datos obtenidos de los censos de población 2006 y 2011 de EUSTAT.

Censo 2006 (para el cálculo de tasas de incidencia en el periodo 2006-2010):

Edades (años)	<15	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-64	>64	Total
<u>Sexo:</u>										
Hombres	41.702	13.429	17.701	25.154	28.012	26.026	24.797	81.685	45.059	303.565
Mujeres	39.775	12.919	16.754	23.559	25.622	24.487	24.731	83.676	64.947	316.470
<u>Comarcas:</u>										
Donostialdea	39.913	12.878	17.014	24.045	27.024	25.896	25.375	84.836	56.663	313.644
Bidasoa	10.360	3.223	4.409	6.202	7.080	6.439	5.896	19.788	12.145	75.542
Bajo Deba	6.054	2.218	2.947	4.129	4.359	3.943	3.962	14.751	11.014	53.377
Tolosaldea	6.410	2.005	2.423	3.505	3.901	3.612	3.599	11.930	7.591	44.976
Goierrri Urola	18.740	6.024	7.662	10.832	11.270	10.623	10.696	34.056	22.593	132.496
Total	81.477	26.348	34.455	48.713	53.634	50.513	49.528	165.361	110.006	620.035

Censo 2011 (para el cálculo de tasas de incidencia en el periodo 2011-2015):

Edades (años)	<15	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-64	>64	Total
<u>Sexo:</u>										
Hombres	47.431	13.650	14.801	19.000	25.617	28.149	26.138	87.386	49.781	311.953
Mujeres	45.071	12.632	14.484	18.439	24.466	26.066	24.950	89.656	69.975	325.739
<u>Comarcas:</u>										
Donostialdea	44.115	12.915	14.431	18.602	24.717	27.359	26.120	90.519	62.139	320.917
Bidasoa	11.229	3.231	3.405	4.633	5.982	6.737	6.265	20.776	13.317	75.575
Bajo Deba	7.316	1.958	2.422	3.120	4.334	4.452	4.029	15.377	11.444	54.452
Tolosaldea	7.600	2.002	2.164	2.645	3.736	4.017	3.733	12.963	8.176	47.036
Goierrri Urola	22.242	6.176	6.863	8.439	11.314	11.650	10.941	37.407	24.680	139.712
Total	92.502	26.282	29.285	37.439	50.083	54.215	51.088	177.042	119.756	637.692

Anexo II.- Índice de números GenBank

Cepas referidas en el texto incluidas en Genbank:

KF154357: genotipo A

KF154358: genotipo A

KF154359: genotipo B

JF739862: genotipo E (cepa salvaje)

Anexo III.- Publicaciones científicas

- 1.- Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverría MJ, Cilla G. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in an area of northern Spain. *Enferm Infeccc Microbiol Clin*, 2009;27(8):462-4. (Referencia 166).
- 2.- Piñeiro L, Vicente D, Echeverría MJ, Cilla G. Application of an automatic nucleic acid extraction method to improve the detection of *Chlamydia trachomatis*. *Enferm Infeccc Microbiol Clin*, 2009;27(9):549-50. (Referencia 157).
- 3.- Piñeiro L, Unemo M, Cilla G. Absence of Swedish new variant *Chlamydia trachomatis* (nvCT) and *C. trachomatis* genotype distribution in Gipuzkoa, Spain, 2009-2010. *Acta Derm Venereol*, 2012;92:185-186. (Referencia 284).
- 4.- *Chlamydia trachomatis* infection and reproductive health outcomes in women. Piñeiro L, Cilla G. *Chlamydia*, chapter 11, 205-230. Intech, ISBN 978-953-51-0470-4. Marzo 2012, accesible en: <http://www.intechopen.com/books/chlamydia>.
- 5.- Piñeiro L, Bernal S, Bordes A, Palomares JC, Gilarranz R, von Wichmann MA, Cilla G. Minimum spread of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* and distribution of *C. trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011-2012. *Infection*, 2014;42(5):905-12. (Referencia 34).
- 6.- Piñeiro L, Lekuona A, Cilla G, Lasa I, Martínez-Gallardo LP, Korta J, Pérez-Trallero E. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in parturient women in Gipuzkoa, Northern Spain. *SpringerPlus*, 2016; DOI: 10.1186/s40064-016-2268-4. (Referencia 216).



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Genotipado de *Chlamydia trachomatis* en un área del norte de España

Luis Piñeiro^{a,*}, Milagrosa Montes^a, Alberto Gil-Setas^c, Xabier Camino^b, María Julia Echeverría^a y Gustavo Cilla^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, España

^b Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, España

^c Microbiología, Servicio Navarro de Salud-Osasunbidea, Pamplona, Navarra, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de octubre de 2008
Aceptado el 18 de diciembre de 2008
On-line el 1 de mayo de 2009

Palabras clave:

Infección de transmisión sexual
Chlamydia trachomatis
Genotipado
ompA

Keywords:

Sexually transmitted infection
Chlamydia trachomatis
Genotyping
ompA

RESUMEN

Introducción: Se estudiaron los genotipos circulantes de *Chlamydia trachomatis* que causan infección en nuestra área geográfica con el fin de detectar posibles peculiaridades epidemiológicas.

Métodos: Se genotiparon 177 cepas obtenidas entre 2006 y 2008 empleando una reacción en cadena de la polimerasa con cebadores del gen *ompA* y posterior secuenciación.

Resultados: Los genotipos más frecuentes fueron el E (45,3%), el D (15,3%), el G (10,2%) y el F (9,6%). Otros genotipos encontrados fueron B, H, I, J, K y LGV II.

Conclusión: La técnica empleada tuvo una alta rentabilidad (89%).

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in an area of Northern Spain

ABSTRACT

Introduction: Circulating *Chlamydia trachomatis* genotypes that cause infection in our geographic area were studied with the aim of detecting possible epidemiological peculiarities.

Methods: A total of 177 strains obtained between 2006 and 2008 were genotyped using a PCR with primers targeting the *ompA* gene, and later sequenced.

Results: The most frequent genotypes were: E (45.3%), D (15.3%), G (10.2%) and F (9.6%). Other genotypes found were: B, H, I, J, K and LGV II.

Conclusion: The molecular assay used had a high yield (89%).

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El interés epidemiológico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* ha aumentado notablemente en los últimos años. La *C. trachomatis* es ya la principal causa de infecciones de transmisión sexual (ITS), que puede pasar inadvertida y ocasionar graves complicaciones¹. Según la técnica empleada se clasifica en serotipos y genotipos. El serotipado se realiza con anticuerpos monoclonales epitopo específicos frente a la MOMP (*major outer membrane protein* 'proteína principal de la membrana externa'), pero está en desuso debido a la complejidad y baja rentabilidad del cultivo de *C. trachomatis*. Actualmente hay varios métodos de genotipado, entre los que destacan la PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa') convencional o anidada seguida de secuenciación, PCR en tiempo real empleando sondas específicas y

el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*)^{2,3}.

Debido a la gran diversidad existente de genotipos, el genotipado de *C. trachomatis* puede resultar de interés por varios motivos, entre los que cabe destacar: conocer su distribución geográfica, facilitar el seguimiento terapéutico y de contactos (trazabilidad), dilucidar si algunos genotipos se asocian más a ciertas manifestaciones clínicas y aportar información útil para el desarrollo de vacunas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los genotipos circulantes de *C. trachomatis* en nuestra área geográfica, en una época en que la población inmigrante todavía era inferior al 10%, con el fin de detectar posibles peculiaridades epidemiológicas que originen futuras líneas de investigación.

Material y métodos

Entre enero de 2006 y agosto de 2008 se analizaron 1.500 muestras (878 de cérvix, 495 uretrales, 99 rectales, 11

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luisdario.pineirovazquez@osakidetza.net (L. Piñeiro).

conjuntivas y 17 de otras localizaciones) de 1.299 episodios de 1.176 pacientes (451 varones y 725 mujeres) con una edad media de 33 años (mediana de 31 años, rango de 0,4 a 83 años). Se consideró que las muestras de un mismo paciente recibidas en 6 meses correspondieron a un mismo episodio, salvo que en ese período tuviera una primera muestra negativa y otra segunda positiva. Las muestras procedieron principalmente de pacientes sintomáticos en los que se sospechaba ITS, tanto de urgencias hospitalarias como de consultas hospitalarias o ambulatorias (mayoritariamente de una consulta de ITS), y de pacientes asintomáticos (aproximadamente uno de cada 3) con exposiciones de riesgo que acudieron para realizarse controles. También se incluyeron en el estudio 67 muestras de diferentes episodios de pacientes ya diagnosticados en Navarra. Se recogieron datos clínicoepidemiológicos como sexo, edad, nacionalidad, residencia, conductas de riesgo, localización de la infección y tipo de muestra, aunque por razones de confidencialidad, en algunos pacientes los datos epidemiológicos fueron incompletos.

La obtención y transporte de las muestras se realizó con el medio ViralPack (Biomedics). Se emplearon 2 métodos de obtención de ácidos nucleicos a partir de las muestras. Desde enero de 2006 hasta diciembre de 2007 y en todas las muestras procedentes de Navarra se realizó una extracción manual de las muestras con el equipo AmpliCor CT/NG Specimen Preparation (Roche). Desde diciembre de 2007 se utilizó un método de extracción automatizada con el equipo NucliSens en el robot EasyMAG (BioMérieux). Para la detección se empleó el COBAS TaqMan CT Test (Roche), cuya diana es el plásmido críptico de *C. trachomatis*. En el momento de la realización de este trabajo este método no detectaba la variante con una delección de 377 pb en el plásmido críptico, recientemente descrita en Suecia, si bien se hallaron en otros países europeos ha sido anecdótico⁴. Para el genotipado de las muestras positivas se realizó una PCR anidada de un fragmento del gen *ompA* empleando los cebadores descritos por Lysén et al⁵ a partir del ácido desoxirribonucleico extraído en el robot easyMAG (BioMérieux). Los amplicones se secuenciaron mediante la utilización del cebador MOMP87 en un ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Se obtuvieron secuencias de unos 800 nucleótidos que se analizaron en el Basic Local Alignment and Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Resultados

Se estudiaron los genotipos de *C. trachomatis* detectados en 177 episodios (tabla 1). Las muestras procedieron de 173 pacientes

(91 varones y 82 mujeres) con una edad media de 30 años. El 55% eran sujetos autóctonos y el 45% eran inmigrantes. Se identificó el genotipo de 157 de los 177 episodios (89%). En 115 episodios se pudo secuenciar el amplicón obtenido en la primera PCR y en 42 episodios fue necesario realizar la PCR anidada. Globalmente, el genotipo más frecuente fue el E (en 71 de 157 [45,3%] seguido de los genotipos D (15,3%), G (10,2%), F (9,6%), I (7,6%), J (7,6%), H (1,9%), K (1,3%), B (0,6%) y LGV-II (0,6%). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes obtenidos en Gipuzkoa y Navarra. En Gipuzkoa el genotipo G fue el segundo más frecuente después del E y 9 de 12 episodios (75%) correspondieron a varones. También en el grupo de varones y en inmigrantes el genotipo más frecuente después del E fue el G (el 12,2 y el 12,7% respectivamente).

Discusión

Las infecciones por *C. trachomatis* son un importante problema de salud pública mundial y en Europa su tasa de incidencia presenta una tendencia ascendente, con cifras de 100 casos por cada 100.000 habitantes (510 por cada 100.000 en el grupo de edad entre 15 y 24 años)¹.

La distribución de los grupos genotipados en este trabajo fue similar a la descrita en otras partes del mundo, quizás con una mayor frecuencia relativa del genotipo G (especialmente en las cepas de Gipuzkoa)^{2,3}. Los genotipos D-K son los más frecuentes en Occidente y, de ellos, el genotipo E es el más prevalente, lo que también se observó en la serie del presente estudio (45%). Estos genotipos causan generalmente enfermedades genitales (uretritis, epididimitis, cervicitis, salpingitis, etc.) y sus complicaciones (enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico, infertilidad, etc.), pero también pueden estar relacionados con otras enfermedades, como el síndrome de Reiter, neumonía y conjuntivitis (2 casos por el genotipo E)^{1,5}. En el presente trabajo los síntomas más referidos fueron uretritis en los varones y dolor abdominal o sospecha de enfermedad inflamatoria pélvica en las mujeres. Tres episodios sucedieron en gestantes con ITS previas. Se detectaron 12 episodios en mujeres asintomáticas al realizarse controles por tener factores de riesgo de contraer ITS. Los genotipos LGV-I, LGV-II y LGV-III se asocian al linfogranuloma venéreo. En este estudio se detectó el genotipo LGV-IIb en una muestra de un varón homosexual de 46 años con proctitis, proveniente de Vitoria, que refirió como factor de riesgo una pareja de origen sudamericano. El linfogranuloma venéreo es una infección más frecuente en

Tabla 1
Número y porcentaje de episodios genotipados

Genotipos	Episodios, n (%)	Residencia, n (%)		Sexo, n (%)		Nacionalidad*		Muestra			
		GI	NA	V	M	E	NE	UR	CE	RE	CO
E	71 (45,3)	46 (48)	25 (41)	36 (44)	35 (46,7)	26 (44,9)	29 (52,7)	33	34	2	2
D	24 (15,3)	12 (12,5)	12 (19,7)	9 (11)	15 (20)	11 (19)	4 (7,3)	8	15	1	0
G	16 (10,2)	12 (12,5)	4 (6,5)	10 (12,2)	6 (8)	6 (10,3)	7 (12,7)	10	6	0	0
F	15 (9,6)	9 (9,4)	6 (9,8)	9 (11)	6 (8)	6 (10,3)	5 (9,1)	9	6	0	0
I	12 (7,6)	7 (7,3)	5 (8,2)	8 (9,7)	4 (5,3)	5 (8,7)	3 (5,5)	8	4	0	0
J	12 (7,6)	5 (5,2)	7 (11,5)	6 (7,3)	6 (8)	1 (1,7)	6 (10,9)	6	6	0	0
H	3 (1,9)	1 (1)	2 (3,3)	1 (1,2)	2 (2,7)	1 (1,7)	0	1	2	0	0
K	2 (1,3)	2 (2,1)	0	1 (1,2)	1 (1,3)	1 (1,7)	0	1	1	0	0
B	1 (0,6)	1 (1)	0	1 (1,2)	0	0	1 (1,8)	1	0	0	0
LGV-II	1 (0,6)	1 (1)	0	1 (1,2)	0	1 (1,7)	0	0	0	1	0
Tipados	157 (100)	96 (100)	61 (100)	82 (100)	75 (100)	58 (100)	55 (100)	77	74	4	2
No tipables	20	14	6	12	8	13	4	6	8	5	1
Total	177	110	67	94	83	71	59	83	82	9	3

CE: cérvix; CO: conjuntival; E: española; GI: Gipuzkoa; M: mujeres; NA: Navarra; NE: no española; RE: rectal; UR: uretral; V: varones.
* Nacionalidad desconocida en 47 episodios.

países tropicales y subtropicales (África, Asia, América del Sur y Caribe), aunque en los últimos años se han descrito numerosos casos en Europa, en varones homosexuales que presentaban típicamente proctitis, asociados al genotipo LGV-IIb^{6,7}. Los genotipos A, B, Ba y C se relacionan con el tracoma, una de las principales causas de ceguera en el mundo y que se distribuye fundamentalmente en África, Asia, América Central y del Sur y Australia. En un episodio se detectó el genotipo B en una muestra uretral de un varón de 26 años de Europa del Este con uretritis y coinfección por *Haemophilus parainfluenzae*. Su detección, aunque en una localización inusual, así como la del LGV-IIb, pone de manifiesto la capacidad de exportación geográfica de cepas de *C. trachomatis* y la validez del método de genotipado empleado para detectar la amplia variedad de genotipos, incluso los poco frecuentes en esta zona. En este estudio, la representación de la población inmigrante (45%) fue mayor que la que le correspondería por su presencia en la población general (inferior al 10%), ya que a una parte importante de los pacientes se los atendió en una consulta de ITS en la que uno de los motivos habituales de consulta fue el ejercicio de la prostitución.

Se han descrito varios métodos para el genotipado de *C. trachomatis*. El más utilizado se basa en la secuenciación del gen *ompA* y en el análisis de las diferencias en sus 4 dominios variables^{2,3}. La técnica utilizada en este trabajo emplea una PCR anidada convencional². Jalal et al emplearon una PCR anidada en tiempo real que permitiría la detección de hasta un 10% de infecciones mixtas, pero con un costo superior debido a la utilización de sondas. El RFLP es otro método capaz de detectar infecciones mixtas, pero su poder discriminatorio y su reproducibilidad entre distintos laboratorios es menor. La estrategia empleada en este trabajo con la técnica de genotipado tuvo una rentabilidad alta (89%), aunque entre sus limitaciones se debe considerar que no discrimina infecciones mixtas. De las 20 cepas que no se pudieron genotipar, 15 correspondieron a muestras con detecciones en ciclos de amplificación altos y, por tanto, con baja carga bacteriana. Nueve de ellas no se detectaron empleando la extracción manual de ácidos nucleicos y sí con la extracción automatizada que permitió, desde diciembre de 2007, aumentar la sensibilidad de detección de *C. trachomatis*⁸.

Este es el primer estudio sobre genotipado de *C. trachomatis* realizado en España. El genotipado basado en el gen *ompA*

permitió conocer la distribución de los genotipos circulantes en un área del norte de España, confirmando el predominio del genotipo E. Sin embargo, para poder aportar una información epidemiológica más detallada (diferentes variantes genotípicas, trazabilidad de contactos) es necesario aplicar nuevas técnicas moleculares descritas recientemente que permitan una mayor resolución y discriminación genotípica^{9,10}.

Bibliografía

1. Amato-Gauci A, Ammon A. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Report on the status of communicable diseases in the EU and EEA/EFTA countries. European Centre for Disease Prevention and Control. June 2007 [consultado 27/3/2009]. Disponible en: http://www.ecdc.europa.eu/pdf/Epi_report_2007.pdf.
2. Lysén M, Osterlund A, Rubin CJ, Persson T, Persson I, Herrmann B. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infection during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1641-7.
3. Jalal H, Stephen H, Alexander S, Carne C, Sonnex C. Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2649-53.
4. Savage EJ, Ison C, Van de Laar MJ. European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI). Results of a Europe-wide investigation to assess the presence of a new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Euro Surveill.* 2007;12:736 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=736>.
5. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections—2002. *MMWR Recomm Rep.* 2002;51(RR15):1-38 quiz CE1-4.
6. Thomson NR, Holden MT, Carder C, Lennard N, Lockey SJ, Marsh P, et al. *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. *Genome Res.* 2008;18:161-71.
7. Vall Mayans M, Caballero E, García de Olalla P, Armengol P, Codina MG, Barberá MJ, et al. Outbreak of lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Barcelona 2007/08—an opportunity to debate sexual health at the EuroGames 2008. *Euro Surveill.* 2008;13:1-2.
8. Piñero L, Marimón JM, Vicente D, Serrano E, Cilla G. Aplicación de un extractor automático de ácidos nucleicos para mejorar la detección de *Chlamydia trachomatis*. XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(Espec Congr):163.
9. Klint M, Fuxelius HH, Goldkuhl RR, Skarin H, Rutemark C, Andersson SG, et al. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1410-4.
10. Pedersen LN, Pedenphant L, Møller JK. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using *omp1* and a set of variable number tandem repeats. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:644-52.

2.-

Cartas científicas / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(9):546-552

549

C. perfringens, incluso en ausencia de enfermedad maligna u otros factores predisponentes y administrar tratamiento de forma intensiva y precoz.

Bibliografía

- Lorber B. Gangrena Gaseosa y otras enfermedades asociadas con *Clostridium*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. 6.ª ed. Madrid: Elsevier España; 2006. p. 2828-37.
- Poulou A, Manolis E, Markou F, Ropotou A, Georgiadis M, Tsakris A. Fatal massive hemolysis as the first manifestation of *C. perfringens* septicemia in a patient with non-systematic or local predisposing disorder. *Anaerobe*. 2007;13:40-2.
- Pun KC, Wehner JH. Abdominal pain and massive intravascular hemolysis in a 47 year old man. *Chest*. 1996;110:1353-5.
- Kirchhoff P, Müller V, Petrowsky H, Clavien P. Fatal emphysematous cholecystitis caused by *C. perfringens*. *Surgery*. 2007;141:411-2.
- Barret J, Whiteside J, Boardman L. Fatal clostridial sepsis after spontaneous abortion. *Obstet Gynecol*. 2002;99:899-901.
- Monteiro B, Kapoor J, Tanque L, Siegel M. Severe intravascular hemolysis in a patient with aml and *C. perfringens* sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34:165-7.
- McArthur HL, Dalal BI, Kollmansberger C. Intravascular hemolysis as a complication of *C. perfringens* sepsis. *J Clin Oncol*. 2006;24:2387-8.
- Loran MJ, McElean M, Wilner G. Massive hemolysis associated with *C. perfringens* sepsis. *Am J Emerg Med*. 2006;24:881-3.
- Kapoor J, Monteiro B, Tanoue L, Siegel M. Massive intravascular hemolysis and rapidly fatal outcome. *Chest*. 2007;132:2016-9.
- Bätge B, Filejski W, Kurowski V, Klüter H, Djonlagic H. Clostridial sepsis with massive intravascular hemolysis: Rapid diagnosis and successful treatment. *Intensive Care Med*. 1992;18:488-90.

Inés Macías, Ricardo Salas de Zayas, Lorena Zoila y Cristina Dólera *

Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, España

*Autor para correspondencia.
Correo electrónico: cristinadolera@hotmail.com (C. Dólera).

doi:10.1016/j.eimc.2008.11.008

Aplicación de un extractor automático de ácidos nucleicos para mejorar la detección de *Chlamydia trachomatis*

Application of an automatic nucleic acid extraction method to improve the detection of *Chlamydia trachomatis*

Sr. Editor:

La infección por *Chlamydia trachomatis* es un importante problema de salud pública y la principal causa de infecciones de transmisión sexual (ITS) en nuestro medio^{1,2}. Las ITS por *C. trachomatis* son prevenibles y de fácil tratamiento, aunque debido al alto porcentaje de pacientes asintomáticos (del 50 al 70%) requieren un diagnóstico clinicomicrobiológico preciso y rápido para evitar la propagación de la infección y la aparición de posibles secuelas^{3,4}. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han aumentado la sensibilidad del diagnóstico de esta infección⁵. Uno de los métodos comerciales más utilizados en Europa es el COBAS[®] TaqMan (Roche), que incluye un equipo de preparación manual de la muestra mediante lisis para exponer los ácidos nucleicos. El objetivo de este trabajo fue comparar este procedimiento manual con una extracción automatizada de ácidos nucleicos.

Entre diciembre de 2007 y marzo de 2008 se analizaron prospectivamente 200 muestras de 177 pacientes (63 varones y 114 mujeres) con una edad media de 31 años (rango de 15 a 68; mediana de 30). Se emplearon en paralelo 2 métodos de obtención de ácidos nucleicos según las instrucciones de cada fabricante: a) preparación manual mediante lisis con el equipo Amplicor CT/NG Specimen Preparation (Roche) y b) método automatizado con el equipo NudiSens en el robot EasyMAG (BioMérieux). La detección

de *C. trachomatis* se efectuó mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real basada en la amplificación del plásmido críptico con cebadores y sondas específicas (COBAS[®] TaqMan CT Test, Roche). La valoración se realizó con el analizador COBAS[®] TaqMan 48, que aporta los resultados cualitativos por cada muestra junto con un análisis semicuantitativo mediante una gráfica que indica la intensidad de fluorescencia en cada ciclo de amplificación. Para el análisis de los resultados se empleó el test de McNemar para datos pareados.

De las 200 muestras analizadas, se detectó *C. trachomatis* en 24 (12%): 8 exudados cervicales de mujeres, y 10 uretrales y 6 rectales de 15 varones (tabla 1). Con el método de preparación manual fueron positivas 17 (8,5%) muestras y con el método de extracción automatizada fueron positivas las 24 (12%) muestras, un 30% más. Siete muestras (3 de cérvix, 3 rectales y una uretral) tuvieron un resultado discordante: fueron positivas cuando la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) se hizo con el método automático y fueron negativas cuando se efectuó la preparación manual ($p = 0,004$). Todas las muestras que fueron positivas con el método manual lo fueron también con el automático.

El análisis semicuantitativo mostró que en todas las muestras positivas por ambos métodos de obtención de ácidos nucleicos (manual y automático), la amplificación se inició siempre en uno o 2 ciclos anteriores en las muestras extraídas por el método automático, lo que indicó la obtención de un mayor número de copias de *C. trachomatis*. Asimismo, este análisis reveló que en las muestras con resultado discordante la carga bacteriana era baja, ya que en todas ellas la detección de la diana se produjo en los ciclos finales de amplificación. La confirmación mediante hibridación con sondas de los amplificadores obtenidos que proporciona el sistema COBAS[®] TaqMan CT Test asegura la especificidad de los

Tabla 1
Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras pareadas con 2 métodos de obtención de ácidos nucleicos

Muestras	n positivos (%)				Test de McNemar
	Total	Extracción automática	Preparación manual	Discordantes	
Cérvix (n = 113)	8 (7,1)	8 (7,1)	5 (4,4)	3 (2,7)	Z = 1,732; p = 0,042
Uretral (n = 65)	10 (15,4)	10 (15,4)	9 (13,8)	1 (1,5)	Z = 0,5; p = 0,31
Rectal (n = 17)	6 (35,3)	6 (35,3)	3 (17,6)	3 (17,6)	Z = 1,732; p = 0,042
Otros (n = 5)	0	0	0	0	-
Total (n = 200)	24 (12)	24 (12)	17 (8,5)	7 (3,5)	Z = 2,65; p = 0,004

resultados. Los mejores resultados encontrados en este trabajo para el método automático de extracción se pueden explicar por la mayor sensibilidad en detectar las cargas bacterianas bajas. Este método realiza una lisis celular, tras la que los ácidos nucleicos liberados se atrapan en una matriz inmunomagnética de sílice, posteriormente se purifican y se obtiene un producto final concentrado⁶. Sin embargo, el sistema de preparación manual se basa en una lisis celular química y posterior exposición del ADN. La preparación manual es sencilla y dura media hora, pero la extracción automática optimiza el rendimiento del trabajo y requiere menor manipulación, lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada y permite mayor reproducibilidad.

El presente estudio está basado en un número pequeño de muestras y los resultados deben interpretarse como preliminares. Sin embargo, indican que un sistema de extracción automatizada de ácidos nucleicos podría mejorar el rendimiento de la técnica manual empleada actualmente en el equipo COBAS[®] TaqMan. Los resultados de otro estudio reciente apoyan esta misma hipótesis⁷. Si nuevos estudios reproducen los resultados de este trabajo, sería conveniente que el citado método de detección de *C. trachomatis* incorporara un sistema de extracción de ácidos nucleicos automatizado, avalado por el Marcado CE, lo que aportaría mejoras a la técnica actual.

Bibliografía

1. WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates (WHO/HIV_AIDS/2001.02/WHO/CDS/CSR/

doi:10.1016/j.jeimc.2009.01.005

- EDC(2001.10). Geneva: World Health Organization, 2001. http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf.
2. Amato-Gauci A, Ammon A. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. Report on the status of communicable diseases in the EU and EEA/EFTA countries. European Centre for Disease Prevention and Control. June 2007. http://www.ecdc.europa.eu/pdf/Epi_report_2007.pdf.
3. Gats W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(6 Pt 2):1771-81.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections - 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2002;51(No. RR15):1-39.
5. Ostergaard L. Diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection by use of DNA amplification. *APMIS Suppl.* 1999;89:5-36.
6. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495-503.
7. Geertsen R, Friderich P, Dobeck M, Emler S. Evaluation of an automated extraction method for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Cobas Amplicor PCR from different sample materials. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2007;39:405-8.

Luis Piñeiro *, Diego Vicente, María Julia Echeverría y Gustavo Cilla

Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, España

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luisdario.pineirovazquez@osakidetza.net (L. Piñeiro).

Acidosis láctica inducida por linezolid

Linezolid-induced lactic acidosis

Sr. Editor:

El linezolid es un antibiótico de la familia de las oxazolidinonas con actividad para microorganismos grampositivos, incluso los resistentes a vancomicina. Entre los efectos adversos más frecuentemente descritos destacan molestias gastrointestinales, cefalea, mielosupresión¹, síndrome serotoninérgico y neuropatía óptica, potencialmente reversibles tras retirar el fármaco. Se han descrito otros efectos colaterales menos frecuentes. A continuación presentamos un caso de acidosis láctica grave en un paciente en tratamiento con linezolid. Se han descrito algunos casos similares en Estados Unidos, pero que sepamos, este es el primer caso que se ha comunicado a publicaciones nacionales.

Se trata de un varón de 72 años, con antecedentes de cistectomía radical por carcinoma de vejiga, osteoporosis con aplastamientos vertebrales, fibrosis pulmonar idiopática, e intervenido de cáncer de recto. Acude a nuestro centro por presentar un cuadro de malestar general, disnea y fiebre de un mes y medio de evolución, siendo diagnosticado de endocarditis de la válvula pulmonar en base al hallazgo mediante ecocardiografía transtorácica de 2 vegetaciones de gran tamaño en la válvula pulmonar y al crecimiento de *Enterococcus faecalis* en 8 frascos de hemocultivo, resistente a gentamicina y sensible a estreptomycin, ampicilina y vancomicina. Tras episodio de vasculitis por hipersensibilidad con ampicilina (2 g cada 4 h por vía intravenosa [i.v.] durante 3 días) y ceftriaxona (2 g cada 12 h por vía i.v. en esos mismos 3 días), tuvo deterioro de la función renal con vancomicina (1 g cada 24 h por vía i.v. durante 4 días) y estreptomycin

(0,5 g cada 24 h por vía i.v. durante 8 días), por lo que se decidió continuar tratamiento antibiótico con linezolid, inicialmente en dosis de 600 mg/12 h por vía i.v., cambiando 9 días después a vía oral con la intención de completar 8 semanas de tratamiento; se le dio de alta hospitalaria para seguimiento ambulatorio.

En el día 34 de tratamiento con linezolid acudió a revisión con disnea de medianos esfuerzos, sin que la exploración física revelara nada llamativo. Las determinaciones realizadas mostraban 7,7 g/dl de hemoglobina (Hb), un recuento plaquetario de $64 \times 10^9/l$, los leucocitos totales eran normales y la función renal era estable; se le transfundieron 2 concentrados de hematies. Cinco días después acude a urgencias por malestar general, náuseas, oliguria e hipotensión arterial, destacando empeoramiento de la función renal (creatinina de 3,0 mg/dl), pancitopenia (8,6 g/dl de Hb, recuento leucocitario total con fórmula normal de $4400 \times 10^9/l$ y recuento plaquetario de $13 \times 10^9/l$); la gasometría venosa mostraba un patrón de acidosis metabólica (pH 6,93; 44 mmHg de presión parcial de dióxido de carbono, 9,2 mmol/l de bicarbonato y 23,2 mmol/l de exceso de bases); las concentraciones de lactato en sangre eran de 6,1 mmol/dl y alcanzaron su valor máximo (13,8 mmol/dl) 2 días después. El paciente ingresó en la unidad de cuidados intensivos (UCI), se suspendió la administración de linezolid y se inició tratamiento con imipenem (0,5 g cada 12 h por vía i.v.), noradrenalina (en perfusión continua por vía i.v. en dosis variables en función de los parámetros hemodinámicos), hidrocortisona (50 mg cada 6 h por vía i.v.) e hidratación parenteral. Se realizaron cultivos de varias muestras biológicas y todos estos resultaron negativos, así como una tomografía computarizada de abdomen y radiografía de tórax que no mostraban alteraciones significativas. Con estas medidas la evolución clínica fue favorable con mejoría progresiva de los parámetros bioquímicos (corrección de las concentraciones de lactato y bicarbonato) y de los parámetros hematológicos. La clínica inicial de fiebre, disnea y

Absence of Swedish New Variant *Chlamydia trachomatis* (nvCT) and *C. trachomatis* Genotype Distribution in Gipuzkoa, Spain, 2009–2010

Luis Piñeiro¹, Magnus Unemo² and Gustavo Cilla¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, Paseo Dr. Beguiristain s/n, ES-20014 San Sebastián, Gipuzkoa, Spain and ²Swedish Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden. E-mail: luisdario.pineirovazquez@osakidetza.net

Accepted June 29, 2011.

The reported incidence of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* (CT) infections has recently increased substantially in many European countries, probably due to the introduction of more sensitive diagnostic methods, e.g. nucleic acid amplification tests (NAATs), and enhanced CT transmission, as well as improved screening and reporting systems (1). In 2006 a new variant of *C. trachomatis* (nvCT) was reported in Sweden. The nvCT contains a 377-base pair (bp) deletion in the cryptic plasmid that covers the single targets originally utilized in the NAATs from Roche Diagnostics (Amplicor, Cobas Amplicor, Cobas TaqMan48) and Abbott Laboratories (Abbott m2000) (2, 3). The nvCT caused many thousands of falsely negative diagnoses in Sweden (4–6). Although the nvCT has been detected in Norway, Finland and Denmark (5–7), only a few cases of nvCT have been reported outside the Nordic countries (5, 6, 8, 9). Knowledge of nvCT presence and spread in many countries, especially those in southern Europe, remains limited, since only a few studies have been reported (5, 10, 11). No screening for nvCT has been performed previously in Spain, despite the fact that more than one million people from Sweden (and numerous others from the other Nordic countries) travel to Spain each year.

The aims of this study were to analyse the possible presence of nvCT and to describe the genotype distribution of CT in Gipuzkoa (Basque Country, northern Spain).

MATERIALS AND METHODS

All samples included (Table I) were analysed at the University Hospital of Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, which has a catchment population of 405,745 inhabitants. The samples (mainly urethral, cervical and rectal swabs) were from symptomatic patients with suspected sexually transmitted infections (STI) attending our hospital or one main STI clinic, or from asymptomatic patients (approximately one-third) with risk exposures consulting for a routine check-up. Between January 2006 and November 2008, CT detection was performed using the COBAS TaqMan CT Test (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), which detects wild type CT (wtCT) but not nvCT. From December 2008 to December 2010, the new COBAS TaqMan CT Test v2.0 (Roche Diagnostics) was used. This dual target test, which targets both the cryptic plasmid and the chromosomal *ompA* gene, detects both wCT and nvCT (as well as plasmid-free CT mutants). Detection and *ompA* genotyping of positive samples were performed as described previously (12). For detection of nvCT, DNA isolation with the robotized system NucliSens easyMAG (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) and a previously described real-time PCR (3), slightly modified by using melting curve analysis instead of hybridization probes, were used. This PCR easily distinguished between wCT (mel-

Table I. Total number, percentage of positive samples and proportion of genotype E *Chlamydia trachomatis*, by year and in the 2 study periods

Year/month	Samples n	Positive n (%)	Typed n (%)	Genotype E n (%)
2006	405	31 (7.7)	24 (77)	10 (42)
2007	573	40 (6.9)	33 (83)	17 (52)
2008	820	70 (8.5)	59 (84)	31 (53)
2009	946	79 (8.4)	66 (84)	22 (33)
2010	1,039	82 (7.9)	73 (89)	30 (41)
Jan 2006–Nov 2008	1,721	135 (7.8)	112 (83)	56 (50)
Dec 2008–Dec 2010	2,062	167 (8.1)	143 (86)	54 (38)
Total	3,783	302/3783 (8.0)	255/302 (84)	110/255 (43)

ting temperature approximately 81°C) and nvCT (approximately 78°C). For confirmation, all amplicons were sequenced. Purified DNA from the previously genome-sequenced nvCT (Sweden2 (6)) was included as a positive control in all PCRs.

RESULTS

During the study period, the number of samples submitted for CT diagnostics increased substantially, although the percentage of positive samples remained largely constant (Table I). From December 2008 to December 2010, the period in which molecular assays allowed the presence of both wtCT and nvCT to be analysed, 167 (8.1%) of the 2,062 samples analysed were positive. Of these positive samples ($n=167$), 143 (86%) could be genotyped and 54 (38%) of these belonged to genotype E (51 episodes from 50 patients (24 men and 26 women), median age 30 years (range 20–60 years)). No nvCT or strains lacking the cryptic plasmid were found. In the amplified sequence, the 54 wCT strains showed a nucleotide sequence identity of $\geq 99\%$ among each other and the prototype strain Sweden3 (GenBank accession number FM865440). Throughout the study period, the most frequent genotype was genotype E, followed by F, D and G, with no significant differences between the two periods in genotypes E, D and G (Table II). In contrast, the proportion of genotype F samples increased from 9.4% ($n=10$) in the first period to 18.5% ($n=25$) in the second (χ^2 , $p=0.046$). Interestingly, the L2b genotype was detected in rectal swabs from two homosexual men with proctitis, and genotypes B and A, which have rarely been described in genital infections (13), in urethral samples from three men with urethritis (GenBank accession number of one strain of each genotype: L2b-JF812080, B-JF812071, A-JF812081).

Table II. Number and percentage of episodes of Chlamydia trachomatis infection genotyped in the two study periods (samples of a patient obtained in ≤ 6 months were considered as the same episode)*

Study period	Genotype, n (%)										Total	
	E	G	D	F	I	J	K	H	L	B		A
Jan 2006 – Nov 2008	52 (49.1)	14 (13.2)	12 (11.2)	10 (9.4)	7 (6.6)	6 (5.7)	2 (1.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	0	106
Dec 2008 – Dec 2010	51 (37.8)	17 (12.6)	23 (17.0)	25 (18.5)	4 (3.0)	6 (4.4)	2 (1.5)	4 (3.0)	1 (0.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	135

*Additionally 14 samples were analysed, whose genotypes were the same as the genotype found in the other samples of their respective episodes.

DISCUSSION

In a globalized world with intense population movement (migrations, commerce, tourism, etc.), monitoring the molecular evolution and epidemiology of pathogenic microorganisms is essential to detect the emergence and spread of variant strains that change their behaviour (fitness, virulence, resistance phenotypes, detectability with distinct diagnostic methods, etc.) and to adopt effective preventive, diagnostic and therapeutic measures. The present study was based on the hypothesis that the substantial increase in the number of samples submitted for CT diagnostics and the number of CT-positive samples detected, when introducing dual target CT test, in our region (Table I) could be due partly to the recent emergence of nvCT. Moreover, more than one million people from Sweden (and many people from other Nordic countries) travel to Spain each year, which, like several other southern European countries, is a major destination for tourism and business. Furthermore, nearly 200,000 Spanish people (an estimated 4,000 from Gipuzkoa) travel to Sweden and the other Nordic countries each year. Nevertheless, no information has been reported previously on the presence or absence of nvCT in Spain, nor, with the exception of France, in any of the southern European countries (14). No nvCT was detected in Gipuzkoa (Basque Country, northern Spain), which receives approximately 8,000 tourists each year from the Nordic countries. However, it would also be valuable to perform the same type of nvCT screening at the main travel destinations in Spain (the Canary Islands and Mediterranean regions) and other countries, i.e. where most Swedish people go for holidays, a context in which sexual contacts may increase.

In conclusion, no nvCT was found in Gipuzkoa, Spain. However, nvCT causes disease and has the same biological fitness as wCT, and thus it may be expected to spread to other countries (5, 6). Epidemiological and microbiological surveillance, including nvCT screening, must be maintained through the use of appropriate diagnostic methods and external and internal quality assessments.

ACKNOWLEDGEMENTS

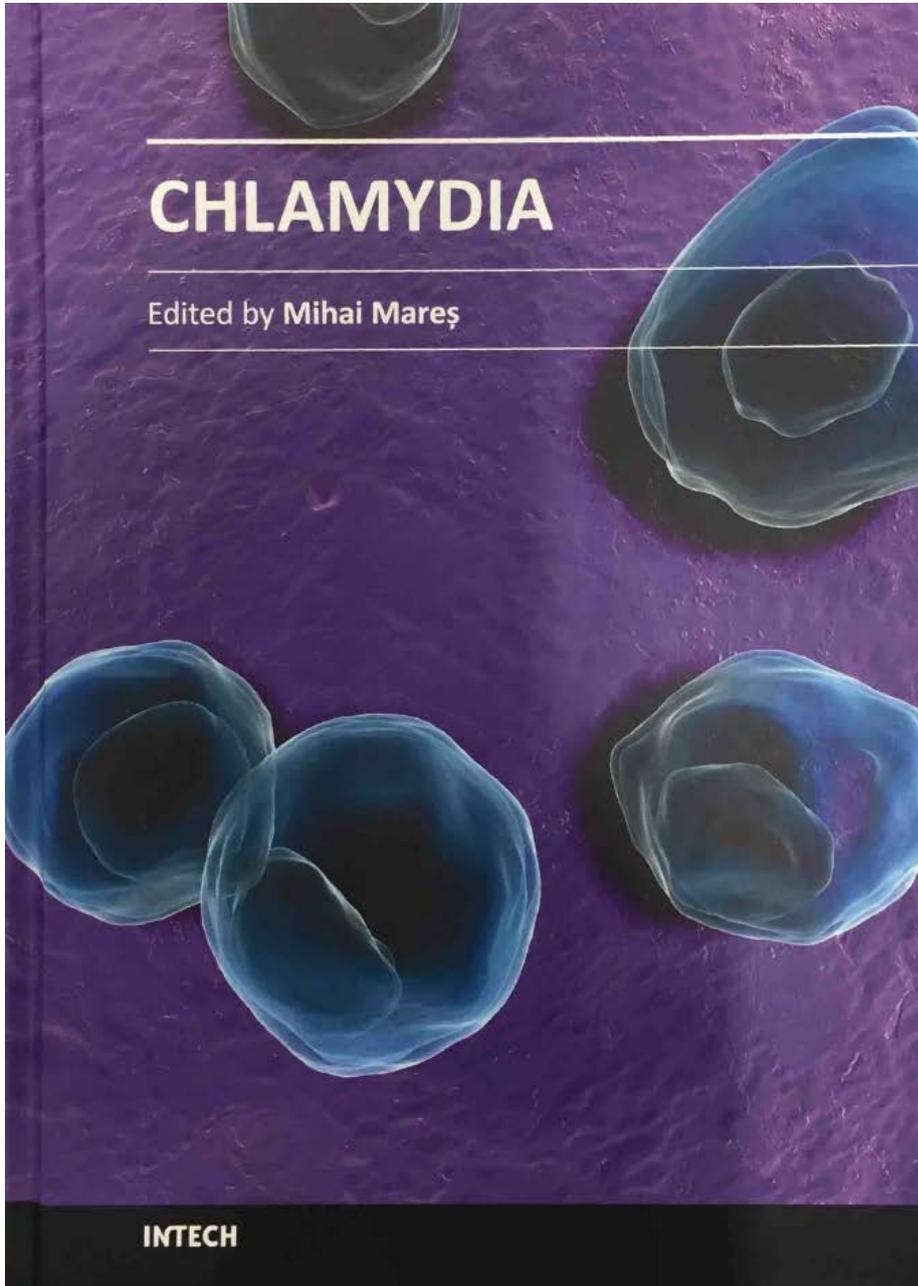
This study was partially funded by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI10/02191).

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf.
2. Ripa T, Nilsson P. A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill 2006; 11: E061109.2.
3. Ripa T, Nilsson PA. A Chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic amplification tests. Sex Transm Dis 2007; 34: 255–256.
4. Herrmann B, Tömer A, Low N, Klint M, Nilsson A, Velicko I, et al. Emergence and spread of Chlamydia trachomatis variant, Sweden. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1462–1465.
5. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis. Curr Opin Infect Dis 2011; 24: 62–69.
6. Unemo M, Seth-Smith HM, Cutcliffe LT, Skilton RJ, Barlow D, Goulding D, et al. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. Microbiology 2010; 156: 1394–1404.
7. Reinton N, Moi H, Bjerner J, Moghaddam A. [The Swedish Chlamydia mutant nvC trachomatis in Norway.] Tidsskr Nor Laegeforen 2010; 130: 380–381 (in Norwegian).
8. Clarke IN, Hammas B, Beerens AMJ, Luijt DS, Westh H, Nilsson P, et al. Detection and spread of new variant Chlamydia trachomatis in northern European countries. Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Hof bei Salzburg, Austria, June 20–25, 2010.
9. Klint M, Hadad R, Christerson L, Loré B, Anagrius C, Österlund A, et al. Prevalence trends in Sweden for the new variant of Chlamydia trachomatis. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 683–689.
10. Reischl U, Straube E, Unemo M. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organised by INSTAND e.V., Germany. Euro Surveill 2009; 14: pii: 19302.
11. Unemo M, Rossouw A, James V, Jenkins C. Can the Swedish new variant of Chlamydia trachomatis (nvCT) be detected by UK NEQAS participants from seventeen European countries and five additional countries/regions in 2009? Euro Surveill 2009; 14: pii: 19206.
12. Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverria MJ, Cilla G. [Genotyping of Chlamydia trachomatis in an area of northern Spain.] Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27: 462–464 (in Spanish).
13. Takahashi S, Yamazaki T, Satoh K, Inoue M, Takahashi S, Ishihara O, et al. Longitudinal epidemiology of Chlamydia trachomatis serovars in female patients in Japan. Jpn J Infect Dis 2007; 60: 374–376.
14. de Barbeyrac B, Raherison S, Cado S, Normandin F, Clerc M, Claret V, et al. French situation concerning the Swedish Chlamydia trachomatis variant. Euro Surveill 2007; 12: E11–E12.

4.-



Chlamydia

Edited by Mihai Mares

Published by InTech

Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia

Copyright © 2012 InTech

All chapters are Open Access distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license, which allows users to download, copy and build upon published articles even for commercial purposes, as long as the author and publisher are properly credited, which ensures maximum dissemination and a wider impact of our publications. After this work has been published by InTech, authors have the right to republish it, in whole or part, in any publication of which they are the author, and to make other personal use of the work. Any republication, referencing or personal use of the work must explicitly identify the original source.

As for readers, this license allows users to download, copy and build upon published chapters even for commercial purposes, as long as the author and publisher are properly credited, which ensures maximum dissemination and a wider impact of our publications.

Notice

Statements and opinions expressed in the chapters are these of the individual contributors and not necessarily those of the editors or publisher. No responsibility is accepted for the accuracy of information contained in the published chapters. The publisher assumes no responsibility for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained in the book.

Publishing Process Manager Romina Skomersic

Technical Editor Teodora Smiljanic

Cover Designer InTech Design Team

First published March, 2012

Printed in Croatia

A free online edition of this book is available at www.intechopen.com
Additional hard copies can be obtained from orders@intechopen.com

Chlamydia, Edited by Mihai Mares

p. cm.
ISBN 978-953-51-0470-4

***Chlamydia trachomatis* Infection and Reproductive Health Outcomes in Women**

Luis Piñeiro and Gustavo Cilla

*Microbiology Service, Hospital Donostia and Biodonostia Research Institute
Spain*

1. Introduction

Chlamydia trachomatis infection is a major and increasing public health problem worldwide and is currently the main cause of sexually-transmitted infections (STI). The incidence of this infection is highest in young women and is especially important in this population group due to the potential consequences in the female reproductive tract, such as pelvic inflammatory disease, tubal damage, and infertility. During pregnancy, *C. trachomatis* infection has been associated with adverse outcomes, including spontaneous abortion, ectopic pregnancy, premature rupture of membranes, preterm birth. Moreover, the infection can be transmitted perinatally to women's offspring causing neonatal conjunctivitis, nasopharyngitis and pneumonia.

Because of the particular characteristics of this intracellular microorganism (unique biphasic division cycle, slow metabolism) and its interaction with the host's immune response, *C. trachomatis* infection may often pass unnoticed and be under-diagnosed, facilitating its spread, which is mainly associated with sexual risk behaviour. *C. trachomatis* is currently classified in 18 genotypes, or serovars, based on the genetic variation of the major outer membrane protein (MOMP). The genotypes most frequently producing genitourinary tract infection are genotypes D, E, F, G, H, I, J and K. In the last decade, the microbiological diagnosis of *C. trachomatis* infection has improved due to the development of nucleic acid amplification techniques (NAATs) and their progressive introduction in laboratories. Contact tracing is essential in the management of this infection to avoid reinfections. Due to the high and growing impact of *C. trachomatis* infection in public health, the main international agencies involved in STI surveillance (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC]...) have proposed various prevention measures and levels of intervention to improve its control.

This chapter discusses the transmission and epidemiological data of *C. trachomatis* infection in women of reproductive age, especially pregnant women, and the etiopathogenic mechanisms causing its symptoms and sequelae on fertility and pregnancy. The management of this infection in pregnancy will be analysed in detail, focusing on diagnosis and appropriate treatment, information on the possible effects of this infection, and partner management, which may raise particularly delicate issues. Finally, the screening strategies established in several countries for the population groups with the highest prevalence of this infection will be described and their effectiveness in controlling its spread and in

Minimum spread of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* and distribution of *C. trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011–2012L. Piñero · S. Bernal · A. Bordes · J. C. Palomares ·
R. Gilarranz · M. A. von Wichmann ·
G. CillaReceived: 3 February 2014 / Accepted: 8 July 2014 / Published online: 24 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014**Abstract**

Purpose The aim of this study was to determine the presence of the new Swedish *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) variant (nvCT) and the distribution of *C. trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant regions of Spain.

Methods The genotypes of strains causing 624 episodes of infection (January 2011–September 2012) were studied using a nested PCR that amplifies a fragment of the *ompA* gene, followed by sequencing. To detect nvCT, a real-time PCR was used that amplifies a fragment of the cryptic plasmid with a 377 base pair deletion, which identifies the nvCT.

Results and conclusion The *ompA* genotype was identified in 565 (90.5 %) episodes. Eleven genotypes were detected, of which nine were found in all three regions. Only one nvCT strain was detected (0.4 %), despite the predominance of genotype E (41 %). Other frequent genotypes were genotypes D (19 %), F (13 %), G (11 %), and J (7 %). Genotype L2b, causing lymphogranuloma venereum, was detected in men who have sex with men (MSM) in all three regions. Genotypes E and F were more frequent in women and heterosexual men, and genotypes D, G, J and L2b in MSM. In men, the main factor causing differences in the distribution of *C. trachomatis* was sexual behavior (MSM versus heterosexual men), while the distribution of *C. trachomatis* genotypes was similar in women and heterosexual men.

Keywords *Chlamydia trachomatis* · New variant of *Chlamydia trachomatis* · Genotyping · *ompA* gene · Genotype distribution · Lymphogranuloma venereum

L. Piñero · G. Cilla (✉)
Microbiology Department, Hospital Universitario Donostia-
Instituto de Investigación Biodonostia, Paseo Dr Beguiristain
s/n, 20014 San Sebastián, Spain
e-mail: gustavo.cillaeguiluz@osakidetza.net

S. Bernal · J. C. Palomares
Clinical Unit of Infectious Diseases and Microbiology (UCEIM),
Hospital Universitario Valme, Avda de Bellavista s/n,
41014 Sevilla, Spain

A. Bordes · R. Gilarranz
Microbiology Department, Hospital Universitario Dr. Negrín, C/
Barranco de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria,
Spain

M. A. von Wichmann
Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario Donostia-
Instituto BioDonostia, Paseo Dr Beguiristain s/n,
20014 San Sebastián, Spain

G. Cilla
Biomedical Research Centre Network for Respiratory Diseases
(CIBERES), San Sebastián, Spain

Introduction

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) is the main bacterial cause of sexually transmitted infections (STI), mainly urethritis and vaginitis/cervicitis. This bacterium is an increasingly important public health problem, with an estimated 105.7 million new infections each year [1]. The infection may be in more than 50 % of cases asymptomatic and consequently its real incidence is probably higher than reported [2]. Untreated infections can lead to complications such as pelvic inflammatory disease or ectopic pregnancy in women, epididymitis in men, and infertility in both sexes. Moreover, in *C. trachomatis*-infected individuals, there is a greater risk of acquiring and, in the case of coinfection, of transmitting other STI.

The main international agencies involved in STI surveillance recommend strengthening control of *C. trachomatis* infection through strategies that allow correct diagnosis and improved epidemiological surveillance [3, 4]. One strategy that can enhance knowledge of the epidemiology of *C. trachomatis* infection is identification of the serotype or genotype of circulating *C. trachomatis* strains through analysis of the major outer membrane protein (MOMP) or of the gene codifying MOMP (*ompA*), respectively. Such analyses have allowed *C. trachomatis* to be classified into 14 major serotypes/genotypes (A–C, D–K, L1–L3). This number increases if the distinct genovariants identified in some of these serotypes/genotypes are included (B/Ba, D/Da, G/Ga, I/Ia, J/Ja, L2/L2a/L2b, etc.). Moreover, in 2006 a new variant of *C. trachomatis* (nvCT) containing a 377-base pair (bp) deletion in the cryptic plasmid was reported in Sweden and spread rapidly in that country [5].

The aims of this study were to determine the presence of the nvCT and to analyze circulating *C. trachomatis ompA* genotypes in three geographically distant areas of Spain, given the scarcity of information on the molecular epidemiology of *C. trachomatis* and the high number of tourists visiting Spain from Scandinavian countries.

Materials and methods

Patient samples

Chlamydia trachomatis-positive samples consecutively detected in 2011 and 2012 in three geographically distant areas of Spain—Gipuzkoa (Basque Country, northern Spain), Seville (Andalusia, southern Spain), and Gran Canaria (Canary islands)—were frozen at -40°C and sent to the Donostia University Hospital (Gipuzkoa) for genotyping. A total of 744 samples were processed from 616 patients (342 men and 274 women) with a mean age of 29.6 ± 8.4 years (median 28 years, range 0–77 years), in whom there were 624 episodes of *C. trachomatis* infection. The samples were obtained consecutively during a routine healthcare checkup from symptomatic patients, persons with risk exposures or pregnant women, attending STI clinics (46.7 %), general practitioner practices (29.3 %) or medical specialty offices (24 %). Samples obtained from a single patient within 6 months were considered to correspond to a single episode of *C. trachomatis* infection, except when the patient experienced two symptomatic episodes separated by at least one negative sample or when there were two positive samples with distinct genotypes (reinfection). Type of sample and the following clinical–epidemiological data were gathered: sex, age, origin (Spanish or immigrant), geographical area of residence,

sexual behavior in men [classified as men who have sex with men (MSM) or heterosexual (HTS)], and symptoms (Table 1). For reasons of confidentiality, data collection was incomplete in some patients. The study was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the Donostia University Hospital.

DNA extraction, amplification and sequencing techniques

All the samples included in this study were *C. trachomatis*-positive with the Cobas[®] 4800 CT/NG test (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), which targets both the cryptic plasmid and the chromosomal *ompA* gene, detecting both wild-type *C. trachomatis* (wtCT) and nvCT as well as plasmid-free *C. trachomatis* mutants. For genotyping, amplification of a 990 bp fragment of the *ompA* gene was performed with the remnant DNA from the commercial procedure, by using previously described methods [6]. When amplicons were not obtained, nucleic acids were re-extracted directly from the original samples using another method (NucliSENS Easy-Mag, Bio-Mérieux, Marcy l'Étoile, France). Amplicons were sequenced through the use of the MOMP87 primer in the 3130XL Genetic Analyzer (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences obtained were analyzed in the Basic Local Alignment and Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

In samples with genotype E, a real-time PCR was performed that amplifies a fragment of the cryptic plasmid with the 377 bp deletion, which identifies the nvCT; primers and conditions were those described by Ripa et al. [7], but instead of FRET hybridization probes we used SYBR Green I (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) and melting curve analysis in a Lightcycler 2.0 instrument (Roche), which allowed wtCT (melting temperature 80.5°C) to be easily distinguished from nvCT (78.3°C). For confirmation, the amplicons of strains suspicious for nvCT were sequenced. Purified DNA from the previously genome-sequenced nvCT (Sweden2) was included as a positive control in all PCRs [8].

Statistical analyses

The Chi-square test was applied to compare categorical variables with application of Fisher's corrections (two tailed) when required. The Mann–Whitney *U* test or analysis of variance was used to compare the means of continuous variables. To analyze associations between genotype distribution and the clinico-epidemiological variables of the study, those variables that obtained a significance of $p < 0.20$ in univariate analyses were assessed

Table 1 Main characteristics of the 624 episodes (616 patients) of *Chlamydia trachomatis* infection included in this study and distribution by region

	Total	Gipuzkoa	Seville	Gran Canaria	Statistical differences (<i>p</i>)*
No. of episodes	624	286	220	118	
Age mean \pm SD ^a	29.6 \pm 8.4	30.7 \pm 8.3	28.9 \pm 8.3	28.3 \pm 8.8	0.01**
Sex (%)					
Men	345 (55.3)	117 (40.9)	150 (68.2)	78 (66.1)	<0.01
Women	279 (44.7)	169 (59.1)	70 (31.8)	40 (33.9)	
Origin (%)	594 known	272 known	220 known	102 known	<0.01
Spanish	478 (80.5)	181 (66.5)	205 (93.2)	92 (90.2)	
Immigrant	116 (19.5)	91 (33.5)	15 (6.8)	10 (9.8)	
Sexual behavior in men (%)	232 known	86 known	144 known	2 known	<0.01
MSM ^b	92 (39.7)	23 (26.7)	67 (46.5)	2	
HTS ^b	140 (60.3)	63 (73.3)	77 (53.5)	–	
Symptoms (%)	563 known	280 known	211 known	72 known	<0.01
Symptomatic	321 (57.0)	180 (64.3)	72 (34.1)	69 (95.8)	
Asymptomatic	242 (43.0)	100 (35.7)	139 (65.9)	3 (4.2)	
Type of sample (%) ^c					
Cervix/vagina	207 (33.2)	107 (37.4)	66 (30.0)	34 (28.8)	<0.01
Urine	164 (26.3)	63 (22.0)	94 (42.7)	7 (5.9)	<0.01
Urethra	164 (26.3)	86 (30.1)	11 (5.0)	67 (56.8)	<0.01
Rectal	64 (10.3)	14 (4.9)	48 (21.8)	2 (1.7)	<0.01
Conjunctival	14 (2.2)	6 (2.1)	0	8 (6.8)	ND ^d
Pharyngeal swab	10 (1.6)	9 (3.1)	1 (0.5)	0	ND ^d
Inguinal lymphadenopathy	1 (0.2)	1 (0.3)	0	0	ND ^d

* Chi-square test unless otherwise specified

** Analysis of variance

^a Excluding infants <1 year (*n* = 9) and patients of unknown age (*n* = 3)^b MSM men who have sex with men, HTS heterosexual men^c Sample in which the genotype was obtained^d ND: not done (due to the small number of episodes)

using a multivariate analysis through multinomial logistic regression. Because of the small number of episodes caused by some genotypes, genotypes A, B, I, K, H and L were excluded from this analysis. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed with SPSS software (SPSS Statistics 20 Command, IBM, Chicago, IL, USA).

Results

Genotypes detected and nvCT detection

The *C. trachomatis ompA* genotype was obtained in 90.5 % (565/624) of the episodes [88.6 % of the samples (659/744)]. The percentage of genotyped episodes was 84.1 % (138/164) in urine samples, 90.9 % (149/164) in urethral samples, 93.8 % (60/64) in rectal samples, and 94.2 % (195/207) in cervical/vaginal samples (*p* = 0.008). Genotype determination was achieved in 100 % (175/175) of the episodes with positive samples with a cycle threshold <30 in the detection technique (Cobas[®] 4800 CT/NG test), in 96.7 % (267/276) of those with a cycle threshold of 30–34 and in 71.1 % (123/173) of those with a cycle threshold \geq 35 (*p* < 0.001). Of the

565 genotyped episodes, 11 different genotypes were identified, the most frequent being genotype E (40.5 %) (Table 2). One nvCT strain in a urine sample from a MSM from Seville with multiple partners was identified (Fig. 1) and was confirmed through sequencing that yielded 100 % homology to published sequences of the nvCT (*C. trachomatis* plasmid pSW2, strain Sweden2, serovar E). Genotype E was followed in frequency by genotypes D (19.5 %), F (12.6 %), G (10.8 %), and J (7.3 %). The remaining genotypes (I, K, L2, H, A and B) were detected less frequently (0.2–3.0 %). Nine genotypes, among them L2, were detected in the three regions studied. In urogenital samples, two unusual strains of genotype A (a man and a woman without symptoms), and one of genotype B (a woman with a tubo-ovarian abscess and pelvic inflammatory disease) were detected [GenBank accession numbers: KF154357 (A), KF154358 (A) and KF154359 (B)]. During the study period, there were seven repeat episodes, of which five showed reinfection with a distinct genotype. Coinfection with *Neisseria gonorrhoeae* was documented in 9.5 % of the episodes (59/624), and was more frequent in patients attending STI clinics or primary care centers [11.4 % (54/474)] than in those attending specialized care [3.3 % (5/150)].

Table 2 *Chlamydia trachomatis* genotype distribution in three regions of Spain according to the clinical and epidemiological characteristics of the population studied (row percentages). Univariate analysis (statistically significant differences in bold*)

Genotype Feature	E		D		F		G		J		L2		Other ^a	
	Total	No. (%)	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p
Region														
Gran Canaria	104	53 (51.0)	21 (20.2)	0.46	7 (6.7)	0.001	5 (4.8)	<0.001	5 (4.8)	0.41	2 (1.9)	NS	11 (10.6)	0.81
Seville	208	76 (36.5)	43 (20.7)		18 (8.7)		36 (17.3)		14 (6.7)		5 (2.4)		16 (7.7)	
Gipuzkoa	253	100 (39.5)	46 (18.2)		46 (18.2)		20 (7.9)		22 (8.7)		4 (1.6)		15 (5.9)	
Total	565	229 (40.5)	110 (19.5)		71 (12.6)		61 (10.8)		41 (7.3)		11 (1.9)		42 (7.5)	
Age (years)^b														
16–29	315	133 (42.2)	55 (17.5)	0.31	41 (13.0)	0.63	36 (11.4)	0.74	22 (7.0)	0.55	1 (0.3)	0.001**	27 (8.6)	0.30
≥30	240	91 (37.9)	54 (22.5)		28 (11.7)		22 (9.2)		20 (8.3)		10 (4.2)		15 (6.2)	
Total	555	224 (40.4)	109 (19.6)		69 (12.4)		58 (10.5)		42 (7.6)		11 (2.0)		42 (7.5)	
Sex														
Men	316	116 (36.7)	64 (20.2)	0.037	30 (9.5)	0.013	42 (13.3)	0.031	30 (9.5)	0.021	11 (3.5)	0.002**	23 (7.3)	0.87
Women	249	113 (45.4)	46 (18.5)		41 (16.5)		19 (7.6)		11 (4.4)		0		19 (7.6)	
Total	565	229 (40.5)	110 (19.5)		71 (12.6)		61 (10.8)		41 (7.3)		11 (1.9)		42 (7.5)	
Sexual behavior														
MSM ^c	85	11 (12.9)	23 (27.1)	<0.001	4 (4.7)	0.07	14 (16.5)	0.76	21 (24.7)	<0.001	11 (12.9)	<0.001**	1 (1.2)	0.008
HTS ^c	134	53 (39.6)	25 (18.7)		16 (11.9)		20 (14.9)		6 (4.5)		0		14 (10.4)	
Total	219	64 (29.2)	48 (21.9)		20 (9.1)		34 (15.5)		27 (12.3)		11 (5.0)		15 (6.9)	
Origin														
Spanish	435	175 (40.2)	88 (20.2)	0.83	49 (11.3)	0.13	50 (11.5)	0.40	31 (7.1)	0.84	10 (2.3)	0.70**	32 (7.4)	0.90
Immigrant	104	43 (41.3)	17 (16.3)		18 (17.3)		9 (8.7)		8 (7.7)		1 (1.0)		8 (7.7)	
Total	539	218 (40.4)	105 (19.5)		67 (12.4)		59 (10.9)		39 (7.2)		11 (2.0)		40 (7.4)	
Symptoms														
Symptomatic	301	120 (39.9)	70 (23.3)	0.69	38 (12.6)	0.038	26 (8.6)	0.039	19 (6.3)	0.21	7 (2.3)	0.77**	21 (6.9)	0.69
Asymptomatic	215	82 (38.1)	34 (15.8)		27 (12.6)		31 (14.4)		20 (9.3)		4 (1.9)		17 (7.9)	
Total	516	202 (39.1)	104 (20.2)		65 (12.6)		57 (11.0)		39 (7.6)		11 (2.1)		38 (7.4)	
Sample														
Cervix/vagina	195	86 (44.1)	41 (21.0)	<0.001	29 (14.9)	0.14	16 (8.2)	0.42	6 (3.1)	0.002	0	<0.001	17 (8.7)	0.18
Urine	138	50 (36.2)	24 (17.4)		21 (15.2)		19 (13.8)		13 (9.4)		0		11 (8.0)	
Urethra	149	73 (49.0)	28 (18.8)		16 (10.7)		15 (10.1)		9 (6.0)		0		8 (5.4)	
Rectum	60	11 (18.3)	15 (25.0)		2 (3.3)		9 (15.0)		11 (18.3)		10 (16.7)		2 (3.3)	
Other	23	9 (39.1)	2 (8.7)		3 (13.0)		2 (8.7)		2 (8.7)		1 (4.3) ^d		4 (17.4)	

Table 2 continued

Genotype	E		D		F		G		J		L2		Other ^a	
	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p	No. (%)	p
Total	565		110 (19.5)		71 (12.6)		61 (10.8)		41 (7.3)		11 (1.9)		42 (7.5)	

* Chi-square test, or ** Fisher exact test when required were used
^a Other genotypes: Gran Canaria I (*n* = 3), K (*n* = 7), H (*n* = 1); Seville I (*n* = 9), K (*n* = 5), H (*n* = 1), A (*n* = 1); Gipuzkoa I (*n* = 5), K (*n* = 5), H (*n* = 3), A (*n* = 1), B (*n* = 1)
^b Excluding infants <1 year (*n* = 8) and patients of unknown age (*n* = 2); mean age (±95 % CI) genotype E 28.6 (27.7–29.6), D 30.8 (29.0–32.7), F 30.1 (28.1–32.1), G 27.6 (26.1–29.1), J 31.8 (28.1–35.5), L2 41.7 (35.3–48.1), other 29.1 (26.6–31.7)
^c MSM men who have sex with men, HTS heterosexual men
^d An L2 genotype in an inguinal lymphadenopathy sample (biopsy)

Genotype distribution by sex and sexual behavior in men (men who have sex with men vs. heterosexuals)

Analysis of genotype distribution by sex showed that genotypes G (*p* = 0.031), J (*p* = 0.021) and L2 (*p* = 0.002) were more frequent in men and that genotypes E (*p* = 0.037) and F (*p* = 0.013) were more frequent in women (Table 2). Analysis of genotype distribution among men according to sexual behavior (known in 219/316) revealed differences in the distribution of genotypes J and L2, which were more frequent in MSM (*p* < 0.001 for both genotypes) and of genotype E, which was more frequent in HTS (*p* < 0.001). The 11 genotype L2 samples detected corresponded to MSM, of which six had proctitis, one had inguinal lymphadenopathy and four were asymptomatic, and the variant L2b was identified in all of them. Human immunodeficiency virus (HIV) infection was detected in eight patients. In contrast, genotype distribution was similar in heterosexual men and in women, except for genotype G, which was more frequent in men (*p* = 0.024).

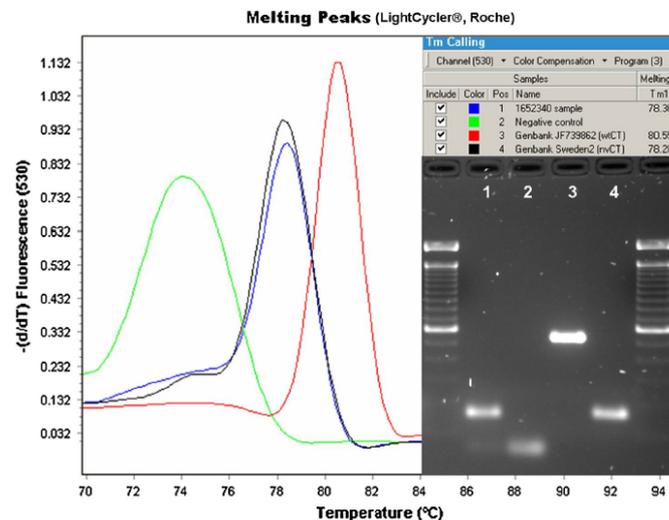
Distribution of genotypes by age, ethnicity, and symptoms

No differences were found by age, except for genotype L2, which were detected only in persons older than 30 years (*p* = 0.001), nor were any differences found in genotype distribution by Spanish or immigrant origin. An association was found between genotype D infection and symptomatic participants (*p* = 0.038) and between genotype G and asymptomatic participants (*p* = 0.039) (Table 2).

Multivariate analysis

In a multinomial logistic regression analysis of genotype distribution by age, sex, origin (Spanish or immigrant) and symptoms (yes/no), using as reference genotype E, differences were maintained in the distribution of genotypes G (*p* = 0.003) and J (*p* = 0.007) in men. Subsequently, genotype distribution was analyzed only in men, with the addition of the variable of sexual behavior (MSM vs. HTS); this analysis supported the association between MSM and genotype J (*p* < 0.001, OR 18.1, 95 % CI 5.84–58.82) and also revealed an association between MSM and genotypes D (*p* < 0.001, OR 4.54, 95 % CI 1.84–11.23) and G (*p* = 0.007, OR 3.89, 95 % CI 1.45–10.41), which was not detected in the univariate analysis. Multivariate analysis did not reveal any difference between genotypes E and F. Associations between genotypes and age, origin and the presence or absence of symptoms were not found.

Fig. 1 Melting curve analysis of real-time PCR assay for detecting *Chlamydia trachomatis* cryptic plasmid and agarose gel electrophoresis of the amplification products. **1**, blue line new variant strain 1652340, obtained from a urine sample collected from a patient from Seville (Spain 2012); **2**, green line molecular grade water, as negative control; **3**, red line wild-type strain GenBank JF739862; **4**, black line reference new variant strain Sweden2. The new variant amplicon had a melting peak at 78.3 °C, representing the 161 bp band, and the wild-type strain at 80.5 °C with a 537 bp band



Discussion

In the present study, a wide variety of *C. trachomatis ompA* genotypes were detected ($n = 11$), of which nine were detected in all three regions studied. The most prevalent was genotype E, which is the most prevalent genotype in most countries except some in southeast Asia, where genotype F has been found in a similar or higher frequency [9]. Only one nvCT strain was detected among the 229 genotype E strains studied (0.4 %). In the only study that had previously investigated the presence of nvCT in Spain (Gipuzkoa 2009–2010), and which included 54 genotype E strains, no nvCT strain had been detected [10]. Therefore, nvCT, which is highly prevalent in Sweden [11, 12], does not seem to have spread to the Spanish regions studied, even though they receive a large number of Swedish tourists each year, especially the Canary Islands and Andalusia (>600,000/year). This strain, which has been present in Sweden since at least 2003 [12], spread rapidly in that country because it was not detected by some commercial nucleic acid amplification tests due to a 377 bp deletion in the cryptic plasmid; at that time, the deleted region in the plasmid contained the only target for some tests [7]. Although there are still few studies that have analyzed the nvCT strain outside Scandinavia, surprisingly, it has only rarely been detected in Europe, with reports of only isolated strains in Germany [13], France [14], Scotland [15], Ireland [15], and Russia [16]. Possibly, until now

the nvCT strain may have been transmitted through geographically localized sexual networks of risk groups within Sweden, mainly young heterosexuals, and for this reason has shown only limited dissemination to other countries [15].

Eleven infections with *C. trachomatis* genotype L2b were detected, causing lymphogranuloma venereum (LGV), distributed in the three regions studied. Clusters of LGV have been detected in large cities in certain developed countries since 2003, affecting mainly MSM, mostly HIV-infected, and the most frequent presentation was proctitis [17, 18]. In Spain, major outbreaks have been developing in Barcelona and Madrid since at least 2007 [19, 20] and a few cases have been referred in the North of Spain [10, 21, 22]. Clinicians should be aware that this disease is present in Spain, especially in MSM, and that cases may occur far from the large cities in which outbreaks are developing; furthermore, diagnostic confirmation through genotyping is important because a different antibiotic regimen is required in L1–L3 infections than in infections with other genotypes.

Interestingly in men, genotypic distribution clearly differed among MSM and HTS men, with distribution in the latter being similar to that among women. The most frequent genotypes were genotype E in HTS men and genotypes D, J, G and L2 among MSM, with genotype E representing only 13 % of *C. trachomatis* strains in MSM. Recently, studies performed in highly distant countries (Australia, China, the

USA, Holland, Sweden and now Spain) have shown that genotypes D, J, G and, in some studies, L2 are predominant in MSM [23–27]. It is unknown whether these differences are due to a different cellular tropism in distinct *C. trachomatis* strains [28] or to the existence of epidemiological network structures that could have aided the spread of specific genotypes, depending on sexual behavior [23, 25–27]. However, the finding that genetic diversity is lower in clusters of MSM than in clusters of HTS men supports the view that transmission patterns differ between the two groups [23]. In the present study, the most important factor contributing to differences in genotype distribution among men was sexual behavior. Adequate definition of the study population, including sexual behavior, is essential to evaluate the prevalence of *C. trachomatis* genotypes in a given population.

Identification of the *ompA* genotypes can aid investigation of outbreaks or sexual networks. The technique used for genotyping in this study, which amplifies a fragment of the *ompA* gene (990 bp) whose sequencing allows analysis of its four variable domains, is a reliable and sensitive technique that has been used before in various studies [8, 10, 26]. In this study, it allowed genotyping of 89 % of the unselected samples in which *C. trachomatis* had been detected in the diagnostic laboratory. In our experience, the assay performed well with the different types of samples used, except for samples with a low *C. trachomatis* load. In fact, in most episodes that were not genotyped (50/59, 84.7 %) the positive results with the commercial technique had been obtained at high cycle thresholds (Ct \geq 35).

This study presents some limitations. Firstly, analysis of the complete gene (\approx 1,280 bp) would have allowed higher resolution typing. Moreover, the technique does not identify mixed infections when the concentration of strains of other genotypes present in the sample is low [6]. Secondly, due to confidentiality reasons, there was a lack of available clinical–epidemiological information in some participants. Finally, although genotype distribution was analyzed in three geographically distant regions of Spain, the results do not necessarily represent the situation of the entire country, especially that of the large cities.

In conclusion, despite the large influx of tourists to Spain from Scandinavian countries each year, only one case of nvCT was detected in this study, suggesting that this strain has not currently spread within Spain. However, its detection, as well as that of *C. trachomatis* strains causing LGV in the three regions studied, highlight the need to establish surveillance systems for *C. trachomatis*, including surveillance of its genetic diversity, in Spain.

Acknowledgments This study was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI10/02191). The authors are grateful to Magnus Unemo (National Reference Laboratory for Pathogenic

Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden) for the generous gift of DNA from the new variant of *Chlamydia trachomatis* strain Sweden 2; Pedro Idigoras (Microbiology Department, Hospital Universitario Donostia-Instituto de Investigación Biodonostia, San Sebastián, Spain) and Isabel Pueyo (Center for Sexually Transmitted Infections, Seville, Spain) for gathering clinical and epidemiological data.

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. 2012. <http://www.who.int/iris/handle/10665/75181>.
2. Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164:1771–81.
3. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia control in Europe. Stockholm, June 2009. (ECDC Guidance). 2009. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0906_gui_chlamydia_control_in_europe.pdf.
4. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-12):1–110.
5. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006;11(11):E061109.2.5.
6. Lysén M, Österlund A, Rubin CJ, Persson T, Persson I, Herrmann B. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infection during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1641–7.
7. Ripa T, Nilsson PA. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis*. 2007;34:255–6.
8. Unemo M, Seth-Smith HM, 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*. 2010;156:1394–404.
9. Zhang JJ, Zhao GL, Wang F, Hong FC, Luo ZZ, Lan LN, Zhang CL, Peng Y, Liu XL, Feng TJ, Chen XS. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Shenzhen, China. *Sex Transm Infect*. 2012;88:272–7.
10. Piñero L, Unemo M, Cilla G. Absence of Swedish new variant *Chlamydia trachomatis* (nvCT) and *C. trachomatis* genotype distribution in Gipuzkoa, Spain, 2009–2010. *Acta Derm Venereol*. 2012;92:185–6.
11. Herrmann B, Éden D, Hadad R, Christerson L, Loré B, Österlund A, Larsson I, Sylvan S, Fredlund H, Unemo M. Prevalence trends of the new variant of *Chlamydia trachomatis* in four counties of Sweden in 2007–2011. *Sex Transm Dis*. 2012;39:648–50.
12. Jurstrand M, Fredlund H, Unemo M. The new variant of *Chlamydia trachomatis* was present as early as 2003 in Örebro County, Sweden, but remained undetected until 2006. *Sex Transm Infect*. 2013;89:607–8.
13. Fieser N, Simmacher U, Tausch Y, Werner-Belak S, Ladenburger-Strauß S, von Baum H, Reischl U, Essig A. *Chlamydia trachomatis* prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany. *Infection*. 2013;41:159–66.

14. De Barbeyrac B, Raheison S, Cado S, Normandin F, Clerc M, Clairet V, Bébéar C, Goulet V. French situation concerning the Swedish *Chlamydia trachomatis* variant. *Euro Surveill.* 2007;12:E11-2.
15. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24:62-9.
16. Shipitsyna E, Hadad R, Ryzhkova O, Savicheva A, Domeika M, Unemo M. First reported case of the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) in Eastern Europe (Russia), and evaluation of Russian nucleic acid amplification tests regarding their ability to detect nvCT. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:330-1.
17. Rönn MM, Ward H. The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:70. doi:10.1186/1471-2334-11-70.
18. White JA. Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:57-66.
19. Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, González-Alba JM, Rodríguez C, Hellín T, Vera M, González-Sainz FJ, Clavo P, Villa M, Cantón R, Del Romero J, Galán JC. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:219-25. doi:10.1111/1469-0691.12256.
20. Vargas-Leguas H, Garcia de Olalla P, Arando M, Armengol P, Barbera M, Vall M, Vives A, Martín-Ezquerro G, Alsina M, Blanco J, Muñoz C, Caballero E, Andreu A, Ros M, Gorrindo P, Domínguez A, Cayla J. Lymphogranuloma venereum: a hidden emerging problem, Barcelona, 2011. *Euro Surveill.* 2012;17:20057.
21. 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.* 2013;3:e002330. doi:10.1136/bmjopen-2012-002330.
22. Savage EJ, van de Laar MJ, Galloway A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, Hoffmann S, Diez M, Borrego MJ, Lowndes CM, Ison C, European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) Network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill.* 2009;14:19428.
23. Twin J, Moore EE, Garland SM, Stevens MP, Fairley CK, Donovan B, Rawlinson W, Tabrizi SN. *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Australia. *Sex Transm Dis.* 2011;38:279-85.
24. Bom RJ, van der Helm JJ, Schim van der Loeff MF, van Rooijen MS, Heijman T, Matser A, de Vries HJ, Bruisten SM. Distinct transmission networks of *Chlamydia trachomatis* in men who have sex with men and heterosexual adults in Amsterdam, The Netherlands. *PLoS One.* 2013;8:53869. doi:10.1371/journal.pone.0053869.
25. Christerson L, Bom RJ, Bruisten SM, Yass R, Hardick J, Bratt G, Gaydos CA, Morré SA, Herrmann B. *Chlamydia trachomatis* strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3548-55.
26. Klint M, Löfdahl M, Ek C, Airell A, Berglund T, Herrmann B. Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4066-71.
27. Quint KD, Bom RJ, Quint WG, Bruisten SM, van der Loeff MF, Morré SA, de Vries HJ. Anal infections with concomitant *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2011;11:63. doi:10.1186/1471-2334-11-63.
28. 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.* 2010;78:2544-53.

RESEARCH

Open Access



Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in parturient women in Gipuzkoa, Northern Spain

Luis Piñeiro¹, Arantza Lekuona², Gustavo Cilla^{1,3*}, Izaskun Lasa², Laura-Pilar Martínez-Gallardo², Javier Korta⁴ and Emilio Pérez-Trallero^{1,3,5}

Abstract

The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in Southern Europe is poorly understood and its identification is essential for the design of appropriate prevention policies. The prevalence of *C. trachomatis* in 2011–2014 was determined through polymerase chain reaction in urine samples from 11,687 unselected parturient women from the Basque Country, Spain (San Sebastián area). The overall age-adjusted prevalence was 1.0 % (95 % CI 0.8–1.2). The prevalence of infection in women younger than 25 years was 6.4 % and decreased substantially with increasing age: 2.0 % in 25–29 year-olds and 0.5 % in older women ($P < 0.001$). The prevalence was higher in parturient of foreign origin (1.9 %, 95 % CI 1.3–2.5) than in Spanish parturients (0.8 %, 95 % CI 0.6–1.0), ($P < 0.001$). The results of this study support the need to screen young women as part of antenatal care in Spain.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, Prevalence, Pregnant women, Parturient women, Asymptomatic women, Spain

Background

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) is the most diagnosed sexually transmitted bacterial infection worldwide, with an estimated 100 million new infections each year (WHO 2012). Chlamydial infections in women frequently cause cervicitis and urethritis, but it has been estimated that up to 70–75 % of the cases are asymptomatic. Asymptomatic infection facilitates its spread to sexual contacts and can cause serious sequelae, including pelvic inflammatory disease, tubal damage, ectopic pregnancy, and infertility (Cates and Wasserheit 1991; Haggerty et al. 2010). In pregnant women, the infection has been associated with adverse pregnancy outcomes such as prematurity, and may be transmitted vertically to the newborn, which may result in neonatal ocular or respiratory tract infection (Blas et al. 2007; Rours et al. 2011; Hammerschlag 2011).

The knowledge of the prevalence of the *C. trachomatis* infection is essential for the design of appropriate infection control programs. In most countries of Southern Europe, the prevalence of *C. trachomatis* infection in pregnant women is not well characterized. Moreover, even though these women are a potential target group for prevention policies (ECDC 2014; CDC et al. 2014; Böhm et al. 2009), to date no recommendation has been made in Spain in this regard. The aim of this study was to estimate the prevalence of *C. trachomatis* infection in an unselected population of pregnant women at term, by age-group and geographical area of origin, in the Basque Country, Spain.

Methods

The study was conducted in the city of San Sebastián and surrounding counties (413,000 inhabitants, with 4000–4500 deliveries per year). Eighty-seven percent of parturient women in the area attended Donostia University Hospital, the remainder attended private health care facilities.

The presence of *C. trachomatis* was determined in urine samples (first catch) collected from unselected parturient

*Correspondence: carlosgustavosantiago.cillaeguiluz@osakidetza.eus

¹ Microbiology Department, Hospital Universitario Donostia, Paseo Dr Beguiristain s/n, 20014 San Sebastián, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

women who delivered a live neonate in the Donostia University Hospital between January 2011 and December 2014. *C. trachomatis* determination was included in a previously established free-of-charge prevention program for sexually-transmitted diseases in our hospital, which included serological detection of *Treponema pallidum* and human immunodeficiency virus (HIV). Women were informed about *C. trachomatis* infections and were screened in the immediate postpartum period, unless they refused to participate. Samples were preserved at 4 °C until processing, which was carried out within 48 h. *C. trachomatis* DNA was detected using a real-time PCR (Cobas[®] 4800 CT/NG, Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA), which also detects *Neisseria gonorrhoeae* DNA. Samples with an invalid result (no amplification of the internal control) were diluted appropriately and were re-analyzed. Detection of antibodies against *Treponema pallidum* and HIV was performed with a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (Architect Syphilis TP reagent, and Architect HIV Ag/Ab Combo, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). *Treponema* CMIA-positive samples were reanalyzed using fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) (Bio-Mérieux, Marcy l'Étoile, France) and Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) (Siemens, Marburg, Germany) tests. Upon detection of *C. trachomatis* infection, women were referred to a gynecologist for treatment (azithromycin 1 g orally), as well as treatment of their sexual partners, if applicable. Similarly, their newborns were placed under medical and microbiological surveillance (medical examination and pharyngeal exudate 7–10 days after birth).

The prevalence of infection and its 95 % exact binomial confidence interval (CI) were calculated based on the number of *Chlamydia*-positive women (numerator) and on the number of women with a valid result of the diagnostic test (denominator). To estimate the prevalence according to the women's geographical origin (native or foreign immigrant), the country of origin in all *Chlamydia*-positive women and in a sample of 1124 parturient women of the study was identified. As the proportion of immigrants vary widely with age, this sample was chosen by stratified random sampling in the four age-groups in which was divided the population of the study (sample size estimated with 5 % precision and 95 % confidence interval for each age-group) using as reference population that of parturient women from the Basque Country classified by age and country of origin, provided by the Basque Institute of Statistics. The distribution by countries found in the 1124 women was extrapolated to the population of women investigated. The overall prevalences were age-adjusted in relation to the distribution by the age of the total number of parturients in the area

(Basque Institute of Statistics). The Chi square test was used to compare percentages with application of Fisher's corrections (two-tailed), when required. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. The study was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the Health Area of Gipuzkoa.

Results

Samples were analysed from 12,228 parturient women (median age 33 years, range 14–54), representing 76.4 % of the eligible population screened (84.6 % in the last three years). The result was invalid (inhibition of internal control amplification) in 541/12,228 samples (4.4 %), corresponding mostly to haematuric urine samples. *C. trachomatis* was detected in 121/11,687 women, with an overall age-standardized prevalence of 1 % (95 % CI 0.8–1.2) and an annual prevalence ranging from 1.2 % in 2011 to 0.8 % in 2013 (*P* = 0.14, non-significant). The median age of *C. trachomatis*-positive women was 27 years, range 17–43.

The prevalence of infection was higher in younger women, being 6.4 % in those aged <25 years, and decreased with increasing age: 2.0 % in 25–29 year-olds and 0.5 % in women aged ≥30 years old (*P* < 0.001) (Table 1). Women aged <25 and <30 years old represented 5.1 and 20.5 % of parturient women but accounted for 31.4 and 60.3 % of detected cases, respectively. Overall and in all age groups, prevalence was higher in immigrant than in Spanish parturient women [overall age-standardized prevalence 1.9 % (95 % CI 1.3–2.5) vs. 0.8 % (95 % CI 0.6–1.0) respectively, *P* < 0.001] (Table 1). Parturient women of Latin American origin had the highest prevalence (4.9 %) and they also were the main group of population among immigrants (43 %), accounting for 37.2 % of all infected women and 78.9 % (n = 45) of infected immigrants. The estimated prevalence in women of North African origin, the second largest immigrant group in Spain, was 1 % in this study (4/418).

Neither *Neisseria gonorrhoeae* nor current *Treponema pallidum* infection (VDRL positive) was detected in any of the 11,687 parturient women, although 27 women (0.2 %) (one of whom was *Chlamydia*-infected) had a history of syphilis (CMIA/FTA-Abs positive). Seven women (0.1 %) had HIV infection but none of these was coinfecting with *C. trachomatis*. Only two *Chlamydia*-positive patients had symptoms attributable to the infection during pregnancy (one woman with cervicitis at week 25 and another with dysuria, leukocyturia and negative urine culture in week 36). A further four women had nonspecific symptoms of doubtful interpretation (vulvovaginal pruritus and/or vaginal discharge). The prevalence of preterm birth (neonates less than 37 weeks of gestational age) in *Chlamydia*-positive mothers was 7.6 % (n = 9).

Table 1 Prevalence of *C. trachomatis* infection by age and country of origin in puerperal women from the San Sebastián area, Basque Country, Spain (2011–2014)

Age ^a (years)	Total				Native				Foreign immigrants				P
	No.	CT+	(%)	(95 % CI)	No. ^b	CT+	(%)	(95 % CI)	No. ^b	CT+	(%)	(95 % CI)	
<25	596	38	(6.4) ^c	(4.7–8.6)	247	14	(5.7)	(3.4–9.3)	349	24	(6.9)	(4.7–10.0)	0.552
25–29	1799	35	(2.0)	(1.4–2.7)	1164	16	(1.4)	(0.9–2.2)	635	19	(3.0)	(1.9–4.6)	0.018
30–34	4710	26	(0.6)	(0.4–0.8)	4065	18	(0.4)	(0.3–0.7)	645	8	(1.2)	(0.6–2.4)	0.019 ^d
≥35	4582	22	(0.5)	(0.3–0.7)	4073	16	(0.4)	(0.2–0.6)	509	6	(1.2)	(0.6–2.5)	0.029 ^d
Total	11,687	121	(1.0) ^e	(0.9–1.2)	9549	64	(0.7) ^e	(0.5–0.8)	2138	57	(2.7) ^e	(2.1–3.4)	<0.001

^a Median age 33 years, range 14–54

^b Number estimated on the basis of randomized stratified sampling in women giving birth in the Donostia University Hospital during the study period (see "Methods"). The origin of *Chlamydia*-positive women was individually collected after their detection in screening

^c Prevalence was 9.6 % (95 % CI 5.6–16.0) (12/125) and 5.5 % (95 % CI 3.8–8.0) (26/471) in women younger than 20 years and those aged 20–24 years old, respectively

^d Fisher exact test (two tailed)

^e Age-adjusted prevalence was 1.0 % (95 % CI 0.8–1.2) for the entire group and was 0.8 % (95 % CI 0.6–1.0) and 1.9 % (95 % CI 1.3–2.5) for native women and foreign immigrants, respectively, Chi square = 20.54, *P* < 0.001

Perinatal transmission was detected in 10/91 (11 %) neonates studied. Four of them were symptomatic and presented conjunctivitis.

Discussion

The present study was conducted in the immediate postpartum of women representative of the full-term pregnant women in our region that attended public healthcare. The median age at delivery in the San Sebastián area was high, which may explain why the overall prevalence of infection was considerably lower than in pregnant women from central and northern European countries (1 vs. 2–3.9 %) (Rours et al. 2011; Böhm et al. 2009; McMillan et al. 2006; Oakeshott et al. 2002; Kirk et al. 2008; Peuchant et al. 2015). As in most studies, the prevalence of infection in this study was higher in younger women. The prevalence of infection among women younger than 25 years (6.4 %) was closer to that found in the previously-mentioned European studies, showing figures somewhat higher than in Germany (4.5–5.7 %) (Böhm et al. 2009) but somewhat lower than in France (7.9 %) (Peuchant et al. 2015), the United Kingdom (8.6–8.7 %) (Oakeshott et al. 2002; Kirk et al. 2008), Eire (8.7 %) (McMillan et al. 2006) and the Netherlands (9.1 %) (Rours et al. 2011). The prevalence decreased sharply in older parturient women participating in this survey, which could partly be because women tend to have fewer partners as they get older. No *N. gonorrhoeae* infection was found in this large group, similar to the results recently obtained in the South of France in a group of 1004 pregnant women (Peuchant et al. 2015) and in Northern Italy among 2099 sexually active adolescents (Matteelli et al. 2016).

Information on the prevalence of *C. trachomatis* infection in the sexually-active general population in Spain is very scarce, since only one population-based study, limited to a town in the region of Asturias, has been conducted in the last decade (Fernández-Benitez et al. 2013). In that study, the prevalence of infection among sexually-active women younger than 25 years (4 %, range 2.8–6.4 %) was fairly similar to that observed in the present study. The prevalence of infection was higher in immigrant women as a whole, and especially in women of Latin American origin, who represent the main source of migration to Spain. These findings were probably related to the higher infection rates in their countries of origin (Cabeza et al. 2015; Pinto et al. 2011). Migration to Spain is a relatively recent event and, in studies conducted in other populations in Spain, has been considered an independent risk factor for *C. trachomatis* infection (Corbeto et al. 2010).

The study has some limitations. Because of the large number of pregnant women included in this study, no data on sexual activity were collected prospectively. Moreover, using nucleic acid amplification tests, the sensitivity of first catch urine specimens to detect *C. trachomatis* might be somewhat lower (up to 10 %) than that obtained from the vagina or cervix (CDC et al. 2014). Therefore the prevalence of *C. trachomatis* in women in Gipuzkoa could be slightly higher than that found in this study. However, first catch urine is an acceptable sample for the diagnosis of *C. trachomatis* urogenital infections in women (CDC et al. 2014), it is commonly used for *C. trachomatis* screening during pregnancy (Satterwhite et al. 2012; Böhm et al. 2009) and has been used in prevalence studies (Rours et al. 2011; McMillan et al.

2006). In addition, although lower percentages of invalid results have been referred by other authors (Rockett et al. 2010) they did not test urine specimens from postpartum women, among which haematuric urines are common. The percentage of invalid tests in our study (4.4 %) was similar to that found in another study in parturient women from Brazil (Pinto et al. 2011) in which 3.7 % of women were excluded because of bleeding during sample collection. Finally, although women were warned that urine collection should be first catch, we cannot ensure that it was the collected sample in all cases.

The most effective measure to control *C. trachomatis* infection is population-based screening in adolescents and young adults, but it is difficult to implement (ECDC 2014). An additional policy is screening in pregnancy. This form of screening is easy to implement and can achieve high coverage, since pregnant women usually make use of prenatal care and are usually willing to undergo diagnostic tests that could prevent adverse pregnancy outcomes. Pregnancy-based screening would detect infected women who are therefore at risk of pregnancy complications, and of transmitting the infection to their infants during delivery (Rours et al. 2011; Hammerschlag 2011; ECDC 2014; CDC et al. 2010). Most of these women are asymptomatic and their infection would remain undetected without screening. In this context, the high prevalence observed in young women in this study supports the need to recommend *C. trachomatis* screening in pregnant women ≤ 25 years during their first gestational control visit in this region of Spain and the possible broadening of this strategy to women aged 25–29 years.

Conclusion

The results of this large study show that prevalence of *C. trachomatis* infection was high among pregnant women younger than 25 years (6 %). *C. trachomatis* infection represents a significant public health problem in this Southern European region. A gestational screening should be implemented in young women as part of antenatal care in Spain.

Abbreviations

C. trachomatis: *Chlamydia trachomatis*; CI: confidence interval; HIV: human immunodeficiency virus; PCR: polymerase chain reaction; CMA: chemiluminescent microparticle immunoassay; FTA-Abs: fluorescent treponemal antibody absorption; VDRL: Venereal Disease Research Laboratory; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; CDC: Centers for Disease Control and Prevention (USA).

Authors' contributions

LP, GC, AL, and EPT conceived of the study, carried out its design and drafted the manuscript. LP and GC conducted the laboratory analysis. AL, IL, and LPMG contacted the women, organized sample collection, and performed the clinical histories. JK attended children of *Chlamydia*-positive mothers. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Microbiology Department, Hospital Universitario Donostia, Paseo Dr Beguiristain s/n, 20014 San Sebastián, Spain. ² Obstetrics and Gynecology Department, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain. ³ Biomedical Research Centre Network for Respiratory Diseases (CIBERES), San Sebastián, Spain. ⁴ Pediatrics Department, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain. ⁵ Department of Medicine Preventive and Public Health, UPV/EHU, San Sebastián, Spain.

Acknowledgements

This work was partially supported by a grant from the *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS P110/02191). The authors thank Cristina Sarasqueta (Instituto de Investigación Bionostia, San Sebastián, Spain) the help to perform the statistical analysis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 18 August 2015 Accepted: 3 May 2016

Published online: 10 May 2016

References

- Bias MM, Cancihuaman FA, Alva IE, Hawes SE (2007) Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington state. *Sex Transm Infect* 83:314–318
- Böhm I, Gröning A, Sommer B, Müller HW, Krawczak M, Glaubitz R (2009) A German *Chlamydia trachomatis* screening program employing semi-automated real-time PCR: results and perspectives. *J Clin Virol* 46(Suppl 3):S27–S32
- Cabeza J, García PJ, Segura E, García P, Escudero F, La Rosa S, León S, Klausner JD (2015) Feasibility of *Chlamydia trachomatis* screening and treatment in pregnant women in Lima, Peru: a prospective study in two large urban hospitals. *Sex Transm Infect* 91:7–10
- Cates W Jr, Wasserheit JN (1991) Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 164:1771–1781
- Centers for Disease Control and Prevention, Workowski KA, Berman SM (2010) Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59(RR-12):1–110
- Centers for Disease Control and Prevention, Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B (2014) Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *MMWR Recomm Rep* 63(RR-2):1–19
- Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, Avelilla A, Coll C, Saludes V, Casabona J (2010) Epidemiological features and determinants for *Chlamydia trachomatis* infection among women in Catalonia, Spain. *Int J STD AIDS* 21:718–722
- European Centre for Disease Prevention and Control (2014) *Chlamydia* control in Europe: literature review. ECDC, Stockholm. doi:10.2900/16352. ISBN 978-92-9193-548-2
- Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F, Chlamydial Primary Care Group (2013) Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis* 13:388
- Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB (2010) Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis* 201(Suppl 2):S134–S155
- Hammerschlag MR (2011) Chlamydial and gonococcal infections in infants and children. *Clin Infect Dis* 53(Suppl 3):S99–S102
- Kirk E, Bora S, Van Calster B, Condous G, Van Huffel S, Timmerman D, Bourne T (2008) *Chlamydia trachomatis* infection in patients attending an Early Pregnancy Unit: prevalence, symptoms, pregnancy location and viability. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87:601–607
- Matteelli A, Capelli M, Sulis G, Toninelli G, Carvalho AC, Pecorelli S, Caruso A, Bonfanti C, Gargiulo F, Donato F, on behalf of the Clamigon Study Group (2016) Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in adolescents in Northern Italy: an observational school-based study. *BMC Public Health*. 16(1):200. doi:10.1186/s12889-016-2839-x

- McMillan HM, O'Carroll H, Lambert JS, Grundy KB, O'Reilly M, Lennon B, Collins C, Walsh TA, Geary MP, Cafferkey MT (2006) Screening for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic women attending outpatient clinics in a large maternity hospital in Dublin, Ireland. *Sex Transm Infect* 82:503–505
- Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Thomas B, Oakeley P, Kerry S (2002) Detection of *Chlamydia trachomatis* infection in early pregnancy using self-administered vaginal swabs and first pass urines: a cross-sectional community-based survey. *Br J Gen Pract* 52:830–832
- Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, Chêne G, Horovitz J, Dallay D, de Barbeyrac B, Bébéar C (2015) Screening for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma genitalium* should it be integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? *Diag Microbiol Infect Dis* 82:14–19
- Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocêncio LA, Miranda AE (2011) *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. *Sex Transm Dis* 38:957–961
- Rockett R, Goire N, Limnios A, Turra M, Higgins G, Lambert SB, Bletchly C, Nissen MD, Sloots TP, Whiley DM (2010) Evaluation of the cobas 4800 CT/NG test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect* 86:470–473
- Rours GI, Duijts L, Moll HA, Arends LR, de Groot R, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers EA, Mackenbach JP, Ott A, Willemse HF, van der Zwaan EA, Verkoijen RP, Verbrugh HA (2011) *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy associated with preterm delivery: a population-based prospective cohort study. *Eur J Epidemiol* 26:493–502
- Satterwhite CL, Gray AM, Berman S, Weinstock H, Kleinbaum D, Howards PP (2012) *Chlamydia trachomatis* infections among women attending prenatal clinics: United States, 2004–2009. *Sex Transm Dis* 39:416–420
- World Health Organization (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. <http://www.who.int/iris/handle/10665/75181>

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

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

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

Anexo IV.- Financiación

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con una beca concedida por el *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS PI10/02191), especialmente los apartados sobre el estudio de prevalencia y genotipado.