

REPOSITORIO ACADÉMICO DIGITAL INSTITUCIONAL

“DIVERSIDAD DE GENOTIPOS DE *Chlamydia trachomatis* EN MUESTRAS UROGENITALES DERIVADAS DEL LABORATORIO CENTRAL ADN SA DE CV”

Autor: Socorro Mariana García Gonzalez

**Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciado en Medicina General**

**Nombre del asesor:
Dra. Mercedes Pineda De León Bautista**

Este documento está disponible para su consulta en el Repositorio Académico Digital Institucional de la Universidad Vasco de Quiroga, cuyo objetivo es integrar, organizar, almacenar, preservar y difundir en formato digital la producción intelectual resultante de la actividad académica, científica e investigadora de los diferentes campus de la universidad, para beneficio de la comunidad universitaria.

Esta iniciativa está a cargo del Centro de Información y Documentación “Dr. Silvio Zavala” que lleva adelante las tareas de gestión y coordinación para la concreción de los objetivos planteados.

Esta Tesis se publica bajo licencia Creative Commons de tipo “Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada”, se permite su consulta siempre y cuando se mantenga el reconocimiento de sus autores, no se haga uso comercial de las obras derivadas.





Educar en la verdad

UNIVERSIDAD VASCO DE QUIROGA

ESCUELA DE MEDICINA

TESIS PROFESIONAL DE LICENCIATURA

**DIVERSIDAD DE GENOTIPOS DE *Chlamydia trachomatis* EN
MUESTRAS UROGENITALES DERIVADAS DEL LABORATORIO
CENTRAL ADN SA DE C.V.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN MEDICINA GENERAL**

**PRESENTA:
SOCORRO MARIANA GARCIA GONZALEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MERCEDES PIEDAD DE LEÓN BAUTISTA**

**CLAVE:16PSU0181N
ACUERDO: LIC170213**

MORELIA, MICHOACÁN

14 DE SEPTIEMBRE 2021

DEDICATORIAS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por dejarme vivir hasta este momento, por siempre iluminar mi camino en las buenas y en las malas y por haberme dado una familia hermosa.

A mis padres Mario Garcia Zamudio y Julieta Gonzalez Orozco por siempre apoyarme en estar allí para mí en todo momento de mi vida, por guiarme y brindarme siempre la instrucción que necesitaba. Los amo demasiado y les agradezco de todo corazón todo el amor que me han brindado.

Mis hermanos y cuñado muchas gracias también por su apoyo incondicional son mis mejores amigos gracias por nunca dudar de mí y siempre apoyarme los amo mucho.

A mi tía Oli que es mi mejor amiga, un gran apoyo y alguien muy especial en mi vida. A mi amigo Juan de Dios Pérez Robledo que nunca me juzgó, siempre me apoyó en todo momento y tiene un lugar muy importante en mi corazón; gracias por todo. Claudia Guillen una gran amiga que a pesar de todas las adversidades siempre ha estado allí para mí, gracias amiga. Dra. Nancy a usted que me ha orientado, apoyado y alentado a seguir adelante, gracias por brindarme todo su apoyo, cariño y amistad.

Quiero también mandarle un fuerte abrazo y una dedicación a mi tío Noel y su familia ya que ellos han sido una gran pieza importante en mi vida, los quiero mucho gracias por tanto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Vasco de Quiroga por haberme alojado durante 9 años, 3 años de preparatoria y 6 años de carrera gracias por brindarme una casa en sus instalaciones siempre Halcón.

Al laboratorio Central ADN muchas gracias por brindarme sus instalaciones y apoyo durante esta etapa de mi vida gracias.

A la Dra. Mercedes Piedad de León Bautista muchas gracias por todo el apoyo brindado y por dejarme participar con usted en este proyecto. Gracias por las nuevas enseñanzas y nuevos conocimientos gracias por todo mi estimada Dra.

Gracias a los compañeros de trabajo del laboratorio Central ADN por su apoyo y enseñanza durante la estancia.

Al comité de investigación gracias por su apoyo y orientación

“GRACIAS. “

A cada una de las instituciones y personas que hicieron posible la realización de este proyecto y sobre todo por confiar en mí.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
GLOSARIO.....	X
MARCO TEÓRICO	XII
MARCO REFERENCIAL.....	1
ESPECIES DE <i>Chlamydia</i>.....	2
<i>Chlamydia psittaci</i>.....	2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>.....	2
<i>Chlamydia trachomatis</i>.....	3
<i>Chlamydia trachomatis</i>.....	3
EPIDEMIOLOGÍA	3
ESTRUCTURA BIOLÓGICA DE CT.....	4
CICLO BIOLÓGICO DE CT	6
TIPOS DE SEROVARES.....	7
<i>Chlamydia trachomatis</i> Y SUS TROPISMOS TISULARES	9
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	10
PRINCIPALES COMPLICACIONES DE LA CLAMIDIASIS	11
ENFERMEDAD PÉLVICA INFLAMATORIA (EPI)	11
INFERTILIDAD.....	12
EMBARAZO ECTÓPICO	13
MÉTODOS PARA DETECTAR CT.....	13
CAMPO CLARO	13
ELISA: INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO	14
DETECCIÓN DE CT POR NAAT's.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	17

OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
SELECCIÓN DE LAS FUENTES, MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	21
METODOLOGÍA	23
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIÓN	47
PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	47
LIMITACIONES	48
REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	PÁGINA
FIGURA 1: MEMBRANA DE <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	4
FIGURA 2: CICLO BIOLÓGICO DE <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	7
FIGURA 3: APARATO REPRODUCTOR FEMENINO Y MASCULINO-----	10
FIGURA 4: MÉTODO DE DETECCIÓN DE <i>Chlamydia trachomatis</i> POR CAMPO CLARO-----	14
FIGURA 5: CASSET DE DETECCIÓN DE <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	15
FIGURA 6: PROCESOS PCR-----	16
FIGURA 7: FLUJO DE IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS A <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	25
FIGURA 8: PROCESO DE SELECCIÓN MUESTRAS <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	30
FIGURA 9: PCR EN PUNTO FINAL GEN OMPA-----	31
FIGURA 10: MUESTRAS POSITIVAS A <i>Chlamydia trachomatis</i> ESTANDARIZACIÓN MOMP 87 -----	32
FIGURA 11: BLASTIN PROGRAM -----	33
TABLA 1: DESCRIPCIÓN DE SEROVAR Y SU IMPLICACIÓN CLÍNICA-----	8
TABLA 2: CUADRO CLÍNICO CARACTERÍSTICAS EN PACIENTES POSITIVOS A <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	10
TABLA 3: CRITERIOS INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN-----	21
TABLA 4: DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA-----	21
TABLA 5: OLIGONUCLEÓTIDOS Y SECUENCIAS-----	24
TABLA 6: ANALISIS ESTADISTICO-----	27
TABLA 7: BASE DE DATOS <i>Chlamydia trachomatis</i> -----	30
TABLA 8: SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> SEGÚN EL SEXO -----	36
TABLA 9: VARIANTES DE <i>Chlamydia trachomatis</i> SEGÚN EL SITIO-----	37

TABLA 10: VARIANTE EN PACIENTES CON <i>Chlamydia trachomatis</i> EN EL PATOGENO MAS FRECUENTE-----	38
TABLA 11: FRECUENCIA DE PATOGENOS DETECTADOS DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN UREAPLASMA EN PACIENTES CON <i>Chlamydia trachomatis</i> ---	41

GRÁFICA 1: FRECUENCIA DEL SEXO EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO-----	34
GRÁFICA 2: FRECUENCIA DEL SITIO ANATÓMICO-----	34
GRÁFICA 3: TIPO DE SEROVARES-----	35
GRÁFICA 4: FRECUENCIA DEL TIPO DE SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> SEGÚN EL SEXO DEL PACIENTE-----	36
GRÁFICA 5: FRECUENCIA DEL TIPO DE SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> SEGÚN EL SITIO ANATÓMICO-----	37
GRÁFICA 6: TIPO DE SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN PACIENTES CON <i>Ureaplasma</i> -----	39
GRÁFICA 7: TIPO DE SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN PACIENTES CON <i>Mycoplasma</i> -----	39
GRÁFICA 8: TIPO DE SEROVAR DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN PACIENTES CON <i>Haemophilus</i> -----	40
GRÁFICA 9: FRECUENCIA DE <i>Candida</i> -----	41
GRÁFICA 10: FRECUENCIA DE <i>Ureaplasma</i> -----	42
GRÁFICA 11: FRECUENCIA DE <i>Trichomonas</i> -----	42
GRÁFICA 12: FRECUENCIA DE <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -----	43
GRÁFICA 13: FRECUENCIA DE <i>Mycoplasma</i> -----	43
GRÁFICA 14: FRECUENCIA DE <i>Haemophilus</i> -----	44

RESUMEN

Antecedentes: *Chlamydia trachomatis* es la STI no viral más común en el mundo, por lo que, su detección e identificación de serovares es primordial para la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de métodos de prevención en nuestra población. Nuestro objetivo investigativo fue demostrar la diversidad y frecuencia de los serovares de *Chlamydia trachomatis* en el tracto urogenital en pacientes mexicanos.

Metodología: Se analizaron 40 muestras positivas a *Chlamydia trachomatis* mediante diseño observacional, prospectivo y transversal. Para la detección de serovares se utilizó secuenciación automatizada y alineamiento *in silico*. Estadísticamente, se analizaron las variables como el sexo, edad, sitio anatómico y patógenos concomitantes.

Resultados: Con los resultados obtenidos se reportó que la prevalencia del serovar más común en nuestra población mexicana fue el F (38.1%), seguido del E (27.3%) y D (18.2%) en los cuales, el serovar F se presentó con predominio en hombres, mientras que el serovar E fue prevalente en ambos sexos y el D en mujeres. Los patógenos concomitantes más comunes encontrados fueron *Ureaplasma* spp (22.7%), *Mycoplasma* spp (13.6%) y *Haemophilus* spp. (9.1%).

Conclusión: Los serovares o genotipos de *Chlamydia trachomatis* fue diversa en la población estudiada; además, se observó que el sexo juega un papel importante en el aislamiento de estos. En síntesis, la vigilancia epidemiológica va más allá de la simple detección de CT para el desarrollo de medidas preventivas y disminuir las complicaciones sexuales y reproductivas.

ABSTRACT

Background: *Chlamydia trachomatis* (CT) is the most common non-viral STI in the world. Therefore, its detection and identification of serovars are essential for epidemiological surveillance and the development of prevention methods in our population. We aimed to demonstrate the diversity and frequency of serovars of *Chlamydia trachomatis* in the urogenital tract from Mexican patients.

Methodology: We carried out an observational, prospective and cross-sectional study through 40 samples positive for CT. For the serovars identification, automated sequencing and in silico alignment were used. Moreover, the variables like serovars, sex, aged groups, anatomical sites and, concomitant pathogens, were statistically analyzed.

Results: We reported that the prevalence of the most common serovars in our Mexican population were F (38.1%), E (27.3%) and, D (18.2%). Serovar F was the most prevalent in men, meanwhile, serovar D was in women and, E was equally prevalent in both genders. The most common concomitant pathogens were *Ureaplasma spp.* (22.7%), *Mycoplasma spp.* (13.6%) and, *Haemophilus spp.* (9.1%).

Conclusion: Detecting serovars of *Chlamydia trachomatis* were diverse in our study on the Mexican population. Furthermore, we observed that gender plays a central role in their isolation. In summary, epidemiological surveillance goes beyond the simple detection of CT to develop preventive actions and reduce sexual and reproductive complications.

ABREVIATURAS

ATP: Adenosine triphosphate

CT: *Chlamydia trachomatis*

CDC: Center of disease control and prevention

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DIU: Dispositivo intrauterino

EB: Elementary body / cuerpo elemental

EPI: Enfermedad pélvica inflamatoria

ETS: Enfermedad de transmisión sexual

LGV: Linfogranuloma venéreo

MOMP: Major outer membrane protein

NG: *Neisseria gonorrhoeae*

NAATS: Nucleic Acid Amplification Test

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey/ Encuesta de Salud Nacional y Examen de Nutrición

NGU: Non-Gonococcal Urethritis

PCR: Polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa

RB: Reticulate body / cuerpo reticulado

RNA: Ribonucleic acid

STD/STI: Sexually transmitted disease/ sexually transmitted infection / enfermedades de transmisión sexual

TWAR: Taiwan acute respiratory agent/ Agente respiratorio agudo de Taiwán

T3S: Tercer mecanismo de secreción

GLOSARIO

ANTÍGENO: Un antígeno es una sustancia que puede ser reconocida por los receptores del sistema inmunitario adaptativo

ANTICUERPO: Es una proteína producida por el sistema inmunitario del cuerpo cuando detecta sustancias dañinas, llamadas antígenos.

ACTINA: Proteína filamentosa del protoplasma celular, que se encarga de conferir su forma a la célula, fijar las proteínas de membrana, participar en los movimientos celulares.

BALANITIS: Inflamación del prepucio y glande

CHOQUE TÉRMICO: Cambio brusco de temperatura

DISURIA: Micción difícil o dolorosa

DISPAREUNIA: Dolor al momento del coito

ERITEMA: Lesión cutánea que ocasiona enrojecimiento ya sea limitado o extenso

ECTÓPICO: Embarazo en el que el óvulo fertilizado se implanta fuera del útero.

EPI: Infección de los órganos reproductores del aparato femenino

INMUNOGÉNICA: Capacidad que tiene un antígeno de activar el sistema inmunitario e inducir una respuesta inmune

INFERTILIDAD: Enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino definida por la imposibilidad de lograr un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección

LEUCORREA: Flujo de una secreción blanquecina, amarillenta o verdosa de la vagina de la mujer que puede ser normal o que puede ser un signo de infección

ORNITOSIS/ PSITACOSIS: Es una enfermedad infecciosa que suele ser transmitida a los humanos por las aves pertenecientes a la familia de los loros, los pavos y las palomas.

PCR: Es una técnica rápida y económica que se utiliza para "amplificar" (copiar) pequeños segmentos de ADN.

PEPTIDOGLUCANO: El peptidoglucano, también conocido como mureína, es uno de los componentes principales presentes en la pared celular de la mayoría de las bacterias. Su principal función es preservar la integridad de la célula y resistir a la turgencia.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA: Determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN

TRACOMA: Una enfermedad ocular que resulta de la infección por *Chlamydia trachomatis*

MARCO TEÓRICO

Se ha reportado en la literatura que la identificación de los serovares son de gran importancia ya que tiene una implicación en la clínica, debido a que cada población en cualquier parte del mundo tienen sus distintos serovares; uno de los autores del grupo de trabajo de Brasil demostró a través de secuenciación que se identificaron distintos serovares en su población analizada en el cual ellos utilizaron 154 muestras endocervicales de mujeres que acudieron al hospital de Belem del 2012 al 2013. Las muestras utilizadas se sometieron a extracción de ADN a través del proceso PCR en el cual pudieron obtener de esas 154 muestras solo 17 muestras positivas a CT esas muestras fueron secuenciadas, lo cual permitió conocer que los serovares más comunes en esa población fueron E, F, G.

Otros estudios han descrito una diversidad en serovares, tal como ocurrió en una comunidad australiana donde se analizaron 401 muestras de pacientes positivos a CT, reportando que los serovares más frecuentes fueron E, F y D Este estudio tuvo resultados comparables con el de Brasil; sin embargo, el tercer serovar más frecuente fue divergente. En México se identificó una nueva variante de CT en 69 muestras positivas a CT tomadas de pacientes mexicanos diseñaron oligonucleótidos específicos que identificaron en la delección de 377 pb en ORF1, y detección de un tándem de 44 pb repetidos en ORF3; tal como ocurre con la nvCT-sueca, la cual fue utilizada para el proceso metodológico. Las muestras con la delección fueron genotipificadas mediante los genes de la proteína principal de la membrana externa A (ompA) y de la proteína polimórfica de membrana H (pmpH). Se obtuvo que la nueva variante de CT en pacientes mexicanos es perteneciente al serovar D, esto reporta que en la población mexicana existe una nueva variante nvCT; la población mexicana tiene una proporción mayor de casos de la nueva variante, a la reportada por Yeow en mujeres de Malasia y por Ann en Massachusetts, EE. UU.

Contrastando y comparando esta información, claramente se avista la importancia de conocer los tipos de serovares. Lo cual aportará un conocimiento sobre los distintos serovares que existen y aquellos que llegan a predominar en nuestra población. Teniendo conocimiento sobre que serovares predominan en nuestra población se podrá llegar a dar un diagnostico oportuno ya que se tiene un conocimiento mas amplio y certero con respecto al patogneno, asi como su diversidad de serovariedad y las afectaciones clinicas que este puede llegar a manifestar. Aunado a esto se podra dar un tratamiento y una prevención oportuna hacia nuestra población. Tambien el fomentar la inducción de creación de vacunas especificas para cada tipo de serovar o para el serovar de mayor prevalencia que este presente en nuestra población.

MARCO REFERENCIAL

Este proyecto se enfocó en describir la variación de los serovares de CT en muestras urogenitales donadas al área de enfermedades de transmisión sexual en el laboratorio sede, CENTRAL ADN S.A. de C.V. Se analizaron 40 muestras positivas a CT para encontrar cuales de esas muestras eran viables para secuenciación y conocer cuales son los genotipos o serovares de mayor prevalencia en las muestras donadas al laboratorio, esto se llevó a cabo mediante un diseño observacional, prospectivo y transversal. Este proyecto de investigación pretende demostrar que una prueba diagnóstica para CT debe identificar el tipo de serovar que está presente en la muestra analizada, y conocer la ecología de la infección debido a que existen diversos tipos de serovares o genotipos en nuestra población y respaldar el desarrollo de vacunas.

Debido a que este proyecto se enfocó en conocer cual fue el genotipo o serovar mas frecuente en las muestras urogenitales donadas al banco del laboratorio Central ADN es importante el conocer que es *chlamydia*, como se detecta y que complicaciones puede esta llegar a presentar en el ser humano, por eso cabe mencionar que *chlamydia* es un patógeno notificado con mayor frecuencia a nivel mundial y consta de varias especies, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* que pertenecen a la familia de *Chlamydiaceae*. ***Chlamydia trachomatis* (CT)** es la de mayor importancia, ya que se transmite a través de cualquier contacto sexual ya sea annilingus, cullingus, coito anal, coito vaginal, entre otras; así como, durante el paso por el canal del parto, o cesárea. El campo de estudio de CT es muy amplio; puesto que, se han descrito serovares o genotipos con implicaciones clínicas diferentes.

ESPECIES DE *Chlamydia*

Chlamydia es un patógeno intracelular obligado de mayor prevalencia a nivel mundial; se clasifica en distintas especies, las cuales tienen una implicación y manifestación distinta dependiendo de la mucosa o el área a la que se adhieran.

Chlamydia psittaci: causa ornitosis/psitacosis, una clamidiosis zoonótica que puede ser inaparente, grave, aguda o crónica, y afecta predominantemente aves

de corral y psitácidas; *psittaci* pertenece a la familia Chlamydiaceae, que se compone de 11 especies distintas. Las infecciones por *psittaci* comprometen significativamente la salud animal. La psitacosis también tiene un aspecto zoonótico y los casos de transmisión de aves a humanos se notifican de forma recurrente. (Radomski N, 2016). La psitacosis en los humanos a menudo causa síntomas similares a los de la influenza (cefalea, mialgias, artralgias, escalofríos); puede provocar neumonía grave y problemas de salud no respiratorios. (Butler, N.D.2018).

Chlamydia pneumoniae: Anteriormente conocida como TWAR (agente respiratorio agudo de Taiwán) es uno de los patógenos comúnmente involucrados en la neumonía adquirida en la comunidad y se transmite de persona a persona a través de gotitas respiratorias sin ningún reservorio animal conocido. También se ha informado de transmisión a través de portadores asintomáticos. El período de incubación puede ser de aproximadamente 3-4 semanas, que es más que la mayoría de las infecciones respiratorias. (Gautam J, 2020) No existe un sistema nacional de notificación o vigilancia de las infecciones por *Chlamydia pneumoniae*; sin embargo, se desconoce el número real de personas afectadas por la infección y probablemente se subestima. (Ewig, 2011)

Chlamydia trachomatis: Es una bacteria intracelular obligada gramnegativa, en humanos como su anfitrión natural exclusivo. Existen diferentes serovares de CT que afectan al ser humano, agentes etiológicos de patologías como la ceguera prevenible, serovares A a C; las infecciones bacterianas de transmisión sexual más comunes en todo el mundo, serovares D a K, y las infecciones del sistema linfáticos serovares L1 a L3. La mayoría de las mujeres infectadas permanecen asintomáticas y, por lo tanto, no buscan tratamiento. (Witkin SS, 2017).

Chlamydia trachomatis

EPIDEMIOLOGÍA

La infección por CT, a menudo denominada "clamidia" es la infección de transmisión sexual notificada con mayor frecuencia en todo el mundo. Actualmente, el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de EE. UU, recomienda la detección y notificación obligatoria de CT para mujeres sexualmente activas menores de 25 años; sin embargo, si las mujeres no acceden a la atención o los médicos no realizan pruebas de detección, muchas infecciones no se diagnostican, no se notifican ni se tratan. Center of disease control and prevention (CDC) monitorean la prevalencia poblacional de la infección por CT genital a través de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES). Se ha observado que CT presenta variaciones según la edad y la raza / etnia, con mayor prevalencia entre los negros no hispanos (5,2%). En mujeres sexualmente activas el rango de edad con mayor prevalencia es de 14 a 24 años; este grupo etáreo es el principal blanco para ejecutar las pruebas de screening para CT la población destinataria de las pruebas de detección de rutina, fue del 4,7% en general y del 13,5% entre las mujeres negras no hispanas, es por ello que, la infección por CT comparte diversas presentaciones clínicas y subclínicas y debido a que, muchas suelen ser asintomáticas, los proveedores de atención médica deben examinar de forma rutinaria a las mujeres jóvenes de 25 años sexualmente activas para detectar la infección y brindar tratamiento inmediato a las personas infectadas. (Elizabeth Torrone, 2014).

ESTRUCTURA BIOLÓGICA DE CT

Los miembros del género *Chlamydia* son bacterias intracelulares que carecen de peptidoglicano en su pared celular. CT se caracteriza por tener una morfología ovoide de 0.3 a 1 μm de diámetro, dependiendo de la etapa en el ciclo de replicación. Su envoltura es del tipo gram negativo, que contiene una membrana externa lipopolisacárido y proteínas. Una diferencia importante es que las clamidias carecen de la capa de peptidoglicano delgada entre la membrana externa y la membrana plasmática. Uno de los datos más relevantes es que, aunque carece de esta molécula, estudios genómicos han demostrado un grupo casi completo de genes que codifican para la síntesis de peptidoglicano. Ver figura 1.

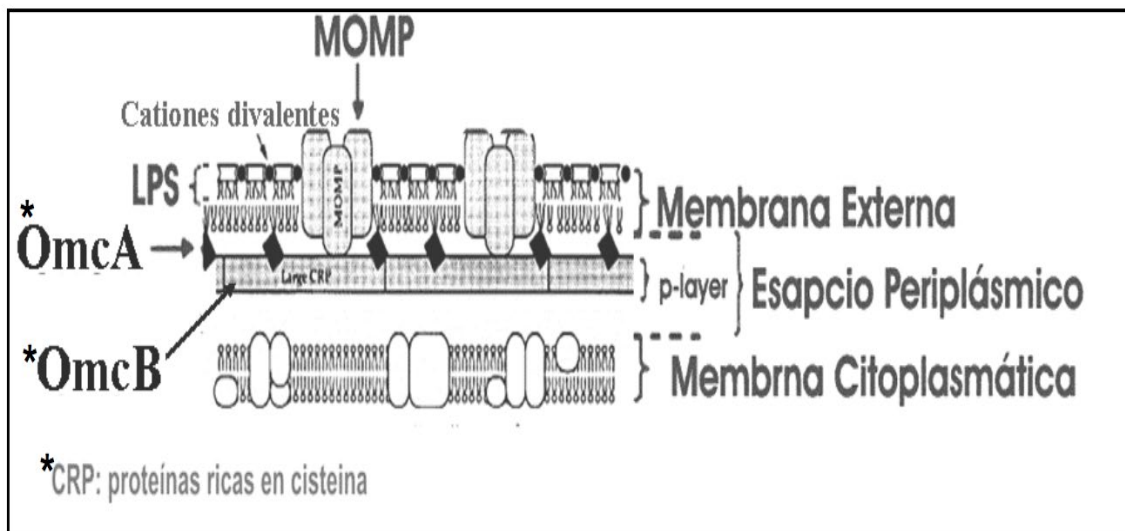


Figura 1. Membrana CT. **MOMP:** proteína principal de la membrana externa; **OmcA:** Proteína de membrana externa pequeña rica en cisteína; **OmcB:** polipéptido de membrana externa rico en cisteína

La membrana externa de CT está constituida por proteínas de membrana externa principal (MOMP); que es altamente inmunogénica. CT depende de la célula hospedera para obtener aminoácidos clave y metabolitos generadores de energía

como el ATP. El crecimiento intracelular obligado requiere metabolitos provenientes de la célula hospedera, ya que CT requiere de una fuente de energía segura para llevar a cabo su ciclo biológico.

La homología del DNA entre CT, *C. psittaci* y *C. pneumoniae* es menor de 30%, aunque análisis de secuencia de rRNA sugieren que comparten un origen común, donde las tres especies comparten un antígeno de grupo común. (Kenneth J, 2017). En el caso de CT tiene tres, cada uno con un tropismo tisular diferente; es decir, las biovariedades A-C infectan células epiteliales oculares y causan tracoma; las biovariedades D-K por células epiteliales urogenitales, ocasionando no gonocócica (NGU; *nongonococcal urethritis*), cervicitis mucopurulenta y conjuntivitis de inclusión, y las biovariedades L₁-L₃ con una afección por los tejidos colorrectales y genitales, causales de linfogranuloma venéreo (LGV; *lymphogranuloma venereum*). (Kenneth J, 2017).

CICLO BIOLÓGICO DE CT

El ciclo biológico de CT es caracterizado por la presencia de dos distintas morfologías denominadas cuerpos elementales (EB) y cuerpos reticulados (RB), o. A continuación se describe el proceso dentro de la célula huésped.

1. Una vez que los EB liberan CT de células previamente infectadas, estas se adhieren a las células hospedadoras T, desencadenando la liberación de efectores de T3S que participan en el reordenamiento de moléculas de actina; la interacción con la vía endocítica y modulación de la célula hospedadora. su supervivencia CT y respuesta inmunológica (~ 0-2 h después de la infección).
2. La inclusión naciente se segrega de la vía fagolisosomal, los EB se diferencian en RB la inclusión migra a lo largo de los microtúbulos a una región centrosomal perinuclear (~ 2-6 h después de la infección).
3. Los RB comienzan a replicarse exponencialmente, lo que lleva a una gran inclusión que ocupa la mayor parte del citoplasma de la célula huésped (~ 6-24 h después de la infección).
4. Los RB se vuelven a diferenciar de forma asincrónica en EB (~ 24-48 h después de la infección). Esta última fase del ciclo biológico, permite que la infección de CT a otras células huésped se lleve a cabo.
5. Las siguientes dos fases (fase 5 y fase 6) se repiten ya que llevan a cabo el mismo proceso. Los EB y algunos RB duraderos se liberan por lisis de la célula huésped o extrusión (~48-72 h después de la infección). En determinadas condiciones de estrés (antibióticos o citocinas) se produce la formación reversible de RB aberrantes, una forma de clamidia similar a la persistencia.(Joana N. Bugalhão, 2019) Ver figura 2

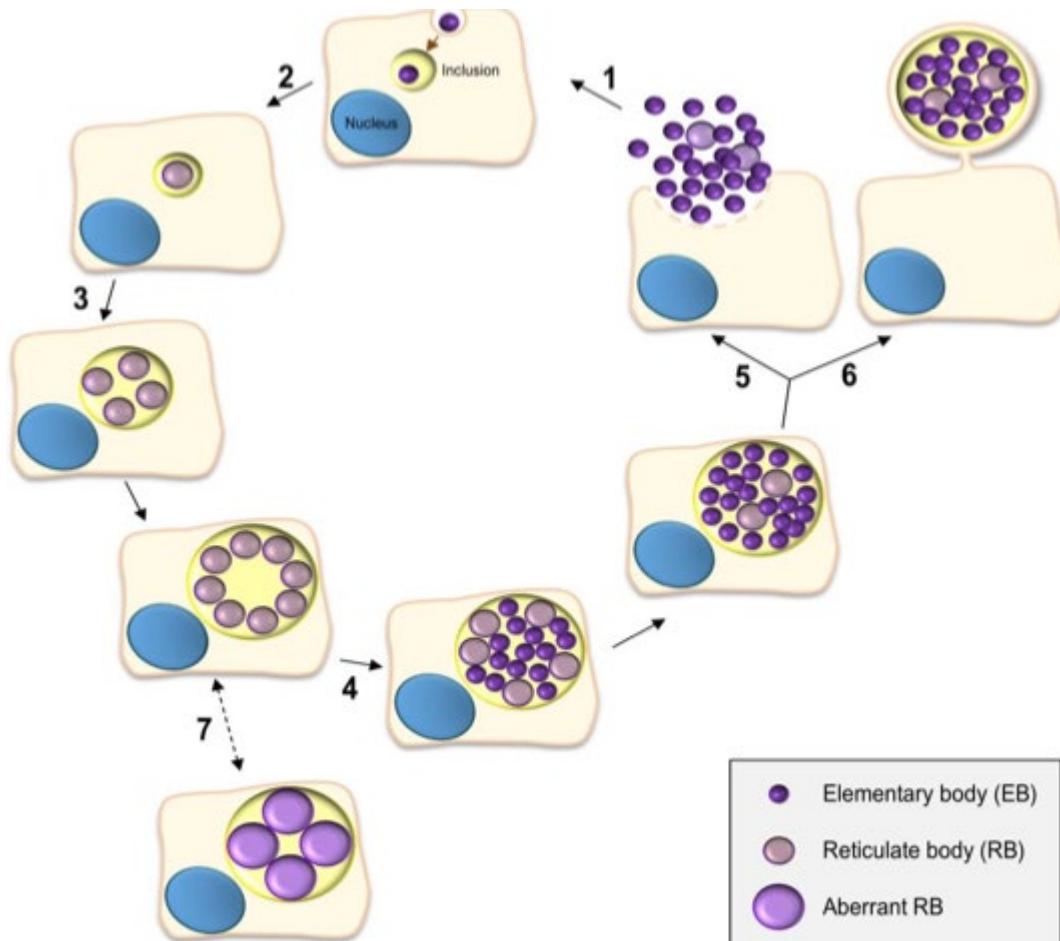


FIGURA 2. Ciclo biológico de CT. Descripción del ciclo biológico de CT, 1; adhesión a la célula hospedadora; 2; inclusión y diferenciación de EB a RB; 3; replicación de RB dentro de la célula huésped; 4; diferenciación de RB a EB; 5 y 6; exocitosis liberación de EB y RB. Tomado de (Joana N. Bugalhão, 2019)

TIPOS DE SEROVARES

Un serotipo o serovariedad es una variación distinta dentro de una especie de bacteria o virus. CT se clasifica en distintos serovares dependiendo de su variación antigénica y la adherencia de su proteína MOMP, los cuales afectan distintos tejidos humanos, con manifestaciones clínicas distintas.

Tabla 1. Descripción de serovares y su implicación clínica		
TIPO DE SEROVAR CT	COMPLICACIÓN	CITA
A,B,Ba y C	TRACOMA	(O'Connell, 2016)
D a K	INFECCIÓN UROGENITALES	(O'Connell, 2016)
L1,L3	LINFOGRANULOMA	(O'Connell, 2016)

- **Serovares A, B, Ba y C:** Este tipo de serovares manifiestan que el tracoma es una enfermedad ocular grave, descrita como endémica en África y Asia. El tracoma se define por un cuadro clínico que se manifiesta con prurito, protuberancias en párpados, ardor ocular hasta ocasionar la ceguera total. (O'Connell, 2016)
- **Serovares D-K:** Estos serovares han sido ampliamente relacionados con infecciones del tracto genital e infecciones neonatales. En un 75% son asintomáticos pero pueden llegar a presentar flujo vaginal distinto, dolor abdominal en mujeres, mientras que en hombres ocasiona uretritis. (O'Connell,2016)

- **Serovares L1-L3:** Son predominio del LGV, que se correlaciona con la enfermedad de úlcera genital en países tropicales. Se llega a manifestar con ganglios inflamados en área inguinal, edema y enrojecimiento. (O'Connell,2016)

Las complicaciones mas importantes asociadas a CT así como, ceguera irreversible, infertilidad, LG, entre otras son tratables y prevenibles.

***Chlamydia trachomatis* Y SUS TROPISMOS TISULARES**

CT puede infectar a mujeres. Se ha descrito principalmente en la vagina y cérvix, mientras que en hombres en el tercio medio de la uretra; sin embargo, diversos reportes han demostrado que puede localizarse en otros, tales como ano, orofaringe, intestino, senos paranasales, colon. (Philips, 2019) En el área rectal se puede encontrar CT debido a diferentes patrones de actividad sexual, sexo masculino, hombres teniendo sexo con hombres o prácticas sexuales como sexo oral, sexo anal, anilingus.(Batteiger TA, 2019) Se ha reportado en las clínicas de ETS de Estados Unidos 506 mujeres transgénero y 120 hombres transgénero en donde informaron que mujeres y hombres dieron positivo a CT en uno o más sitios anatómicos. (MA, 2019,). Así como CT se puede encontrar en área gingival en personas que han padecido conjuntivitis, preeclampsia, otitis, debido a la proximidad se ha reportado la presencia de CT en orofaringe en aquellas personas que practican el sexo oral.(Coronado- Cerda EE, 2020)

A continuación se presenta una figura del aparato femenino y masculino para poder localizar el sitio anatómico de los ya mencionados. Ver figura 3

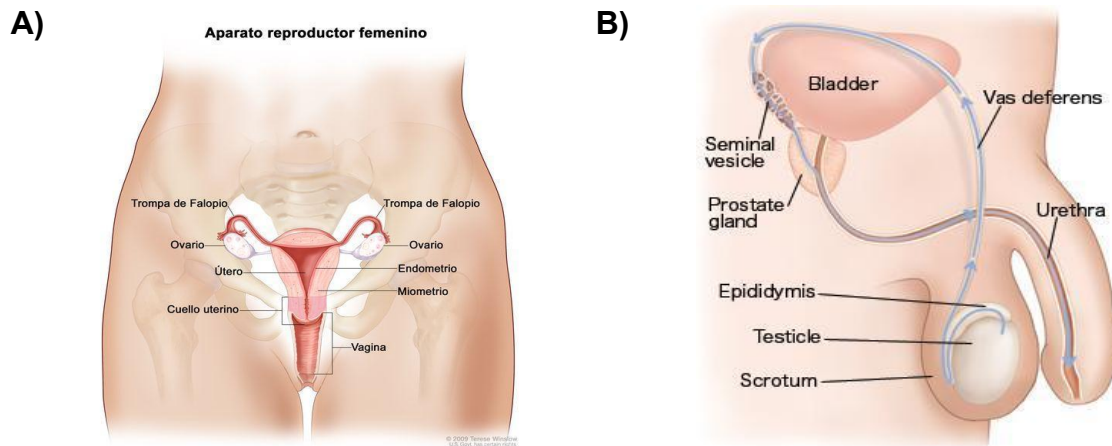


Figura 3. Aparato femenino (A) y masculino (B)

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El 75% de los pacientes con detección positiva a CT son asintomáticos, con predilección en el sexo femenino (Witkin,2017), pero se han descrito signos y síntomas que apoyan la clínica para el diagnóstico de clamidiasis. :

Tabla 2. Cuadro clínico característico en pacientes positivos a CT	
MUJERES	HOMBRES
• DISPAREUNIA • DISURIA • DOLOR ABDOMINAL BAJO • FLUJO ANORMAL • ERITEMA	• URETRITIS GONOCÓCICA • BALANITIS • SALIDA DE LÍQUIDO ANORMAL • ERITEMA

La falta de una detección oportuna de CT, está ligada a distintas complicaciones clínicas con consecuencias importantes como la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), infertilidad, embarazo ectópico, entre otros.

PRINCIPALES COMPLICACIONES DE LA CLAMIDIASIS

ENFERMEDAD PÉLVICA INFLAMATORIA (EPI)

La (EPI) es una patología inducida por una infección polimicrobiana que involucra el tracto genital femenino superior, incluido el endometrio, las trompas de Falopio, los ovarios y el peritoneo; que afecta principalmente a mujeres jóvenes sexualmente activas.

Fisiopatológicamente, la EPI se origina por el ascenso espontáneo de microorganismos desde el cuello uterino o la vagina al endometrio derivando en endometritis, que posteriormente se propaga a las trompas de Falopio y estructuras adyacentes. Las relaciones sexuales y la menstruación retrógrada son dos eventos descritos como condicionantes en la migración hacia el tracto genital superior, lo que provoca daño inflamatorio supurativo a lo largo de la superficie epitelial de las trompas de Falopio y los ovarios, esto conlleva a cicatrices, adherencias y obstrucción. (Philips, 2019)

Se considera una infección polimicrobiana debido a que los principales patógenos de transmisión sexual son, *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y CT. Los organismos infecciosos adicionales incluyen *Mycoplasma genitalium* y microbiota vaginal fisiológica asociada con la vaginosis bacteriana.

Los factores de riesgo para desarrollar EPI son las prácticas sexuales de riesgo en las que exista penetración y/o contacto pene-ano, pene-vagina, pene-boca, pene-mano-boca, mano-ano-boca o con objetos contaminados (fómites), tener una edad

menor de 25 años, múltiples parejas sexuales; así como, la pareja y cuadros previos de EPI. (Ford, 2016,)

Las manifestaciones clínicas de EPI pueden ser inespecíficas desde un cuadro asintomático hasta cuadros graves de pelvi-peritonitis. Los síntomas con mayor predominio son el dolor abdominal, leucorrea, sangrado irregular y antecedentes de DIU. A la exploración física, los datos sugerentes de EPI son el dolor abdominal bajo, dispareunia, leucorrea, sangrado transvaginal al examen bimanual, dolor al a la movilización cervical vaginal. (MD, 2016)

El diagnóstico de EPI se lleva a cabo mediante exámenes de laboratorio y de gabinete, así como biopsia de endometrio, estudio ecográfico pélvico transvaginal, estudio de laparoscopia y la PCR se solicita para descartar la presencia de NG y CT (Guia de práctica clínica, 2009).

INFERTILIDAD

La infertilidad se define como una enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección, o debido a un deterioro de la capacidad de reproducción de una persona, ya sea como un individuo o con su pareja. (Tsevat DG, 2017)

CT ascendente no tratada puede provocar un daño irreversible en las trompas de Falopio, incluidas las oclusiones tubáricas proximales y distales que conducen a la infertilidad. La mayor cantidad de proteína de choque térmico (hsp60) sintetizada por CT induce una respuesta inmune proinflamatoria en el epitelio de las trompas de Falopio humano, lo que resulta en cicatrices y oclusión tubárica. CT está asociado con un riesgo significativamente mayor de infertilidad tubárica en mujeres, independientemente de la infección que invoca los síntomas clínicos. (Tsevat DG, 2017)

EMBARAZO ECTÓPICO

Esta patología se define como la implantación de un embrión fuera de la cavidad uterina; tales como, el ovario; aunque el sitio ectópico más común son las trompas de Falopio, en las porciones ampolla, infundibular e ístmica.

Las causas de embarazo ectópico pueden ser la destrucción anatómica e histológica de las trompas de Falopio, defecto congénito en las trompas, cicatrización después de una ruptura del apéndice, endometriosis, entre otros. El daño a las trompas de Falopio, generalmente es secundario a la inflamación, induce una disfunción tubárica que puede resultar en la retención de un ovocito o embrión. El embarazo ectópico se manifiesta con su triada clásica dolor, sangrado vaginal y amenorrea; también pueden presentar náuseas, vómito y diarrea, aunque estos últimos son poco comunes. (Mummert T, 2020).

MÉTODOS PARA DETECTAR CT

CAMPO CLARO

El campo claro es aquel en el cual la luz que emite la fuente de iluminación del microscopio es ópticamente conjugada con el plano de la muestra a través de las lentes del colector y el condensador. Una vez que la luz interacciona con la muestra, la luz reemitida por ella se conjuga ópticamente con el plano del observador para formar la imagen empleando para ello la lente objetivo y la lente ocular. La imagen de la muestra en el plano del observador es magnificada y el grado de aumento es caracterizado por el factor de aumento total. Para la detección de CT con esta técnica se utiliza tinción de Wright o Giemsa para poder teñir los núcleos del patógeno y que estos puedan ser observados a través del microscopio y detectar la presencia del patógeno. (Altamirano, noviembre 2015)

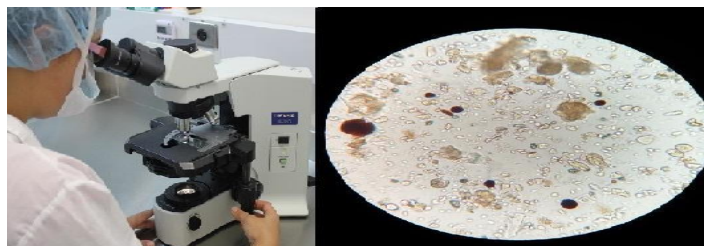


Figura 4. Método de detección de CT por campo claro: Técnica llevada a cabo con microscopía de luz, con tinciones de Wright o Giemsa que ayudan a detectar a la bacteria de CT tiñendo su núcleo

ELISA: INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

ELISA es un ensayo bioquímico analítico sensible y específico utilizado para la detección y análisis cuantitativo o cualitativo de un analito, descrito como ser cualquier sustancia específica, ya sea una proteína específica o un complejo multiproteico o biomolecular).

ELISA se basa en la producción de anticuerpos antígenos específicos, ya sean monoclonales o policlonales. (GN., 2017)

Con esta técnica (en sangre, plasma) se pueden marcar los anticuerpos de detección con radioisótopos que proporcionan una forma indirecta de cuantificar una proteína midiendo la radiactividad. Alternativamente, la cuantificación indirecta se puede realizar midiendo la señal que se produce cuando se utiliza el sustrato apropiado, con anticuerpos que son ligados químicamente a enzimas biológicas. Del mismo modo, la etiqueta de fluorescencia permite la cuantificación indirecta de proteínas unidas químicamente con un tinte fluorescente midiendo los rendimientos cuánticos de fluorescencia y comparándolo con un estándar. Generalmente, ELISA tiene una buena sensibilidad con un límite de detección / límite de cuantificación (LOD /LOQ) hasta una escala de nanogramos más baja.

La detección de CT mediante ELISA con casset se basa en el reconocimiento y la unión específica de ese antígeno (alérgeno potencial), que se conoce como ligando, a un anticuerpo específico. La unión alérgeno-anticuerpo depende de la solubilidad e integridad de la proteína. Estos anticuerpos específicos de antígeno pueden

reconocer un epítipo particular en un alérgeno en el caso de CT la prueba reconocería como antígeno COMP (Complexes of Outer Membrane Proteins) de CT para hacer la detección del patógeno (Vircell Microbiologist, 2018,)

Existen diversas marcas de kits para la detección de CT con cassette, así como, Certum diagnostics, Eligene, Xerion, Right sign, entre otras. Ver figura 5

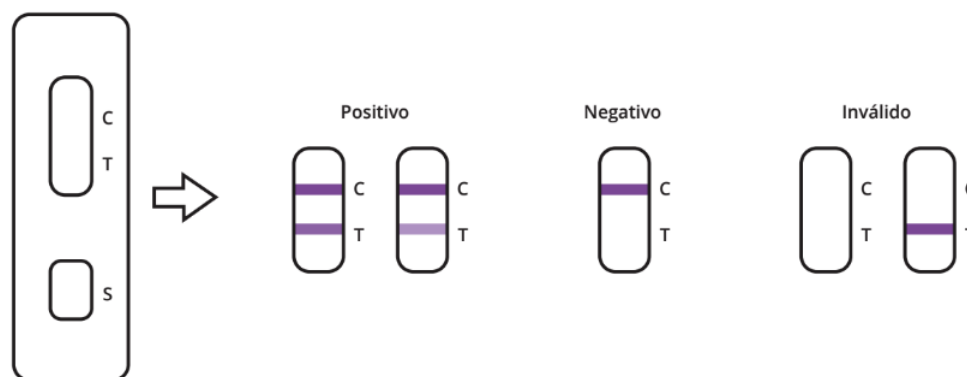


Figura 5. Cassette de detección para CT. Pruebas rápidas.

DETECCIÓN DE CT POR NAAT's

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un estudio de amplificación de ácidos nucleicos conocido como NAAT's fue desarrollada en 1983 por Kary B. Mullis, un bioquímico estadounidense que ganó el premio nobel de Química en 1993 por su aportación. Es una técnica que se utiliza para hacer numerosas copias de un segmento específico del ADN en forma rápida y precisa. La PCR permite que se puedan obtener grandes cantidades de ADN que se requieren para distintos experimentos y procedimientos médicos, forenses, de biología molecular, entre otros.

La detección de CT por PCR consta de tres pasos para llevar a cabo su proceso de amplificación, la muestra sospechosa a CT es sujeta extrayendo del material genético o DNA. Este material genético purificado será el blanco para que los

oligonucleótidos se acoplen y el amplicón de interés se pueda detectar, ver figura 6. El número de copias se multiplica de manera exponencial conforme ocurre cada ciclo de tres pasos.

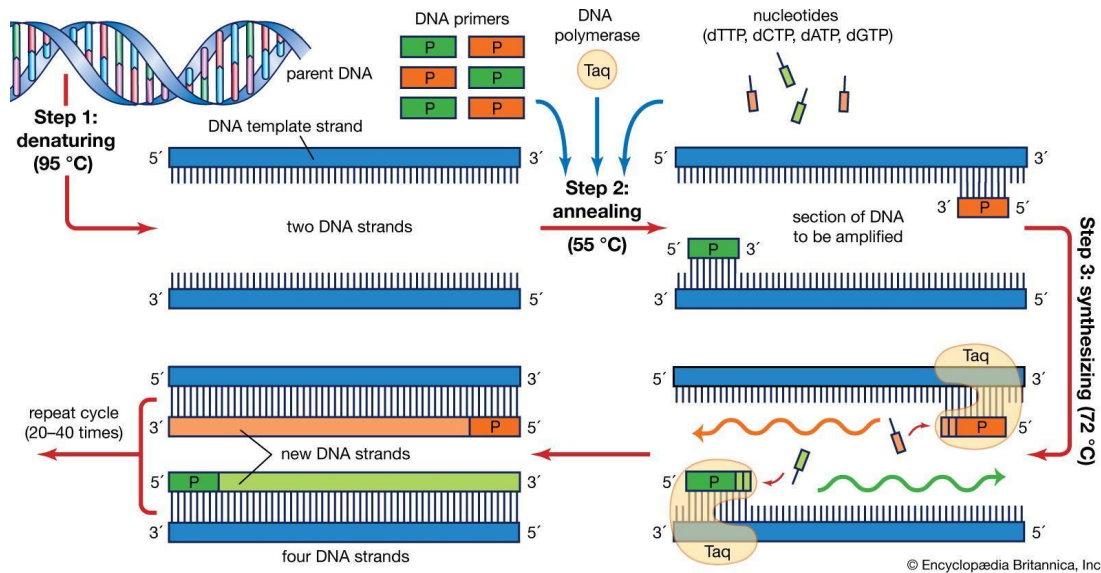


Figura 6. Proceso PCR. Paso 1; material genético purificado; 2; desnaturalización del ADN; 3; alineación de temperatura; 4; elongamiento del ADN (Britannica, 2019)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál fue el genotipo más frecuente de CT en muestras urogenitales donadas al banco de muestras del laboratorio CENTRAL ADN SA DE C.V.?

HIPÓTESIS

La frecuencia de los genotipos de *Chlamydia trachomatis* es diversa en las muestras urogenitales analizadas en el laboratorio.

JUSTIFICACIÓN

La genotipificación de CT tiene una alta relevancia a nivel epidemiológico y clínico debido a la distribución temporal y geográfica de las cepas en todo el mundo; lo cual tiene implicaciones en el desarrollo de vacunas, en la vigilancia epidemiológica y en la resistencia a los microbianos. Aunado a esto, la genotipificación de CT por NAAT^s ofrece la posibilidad de validar un panel que identifique estas cepas que posteriormente pueden revelar vías de transmisión y asociaciones con diferentes tropismos tisulares y patogenicidad en el tracto urogenital.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la diversidad de los genotipos de CT en tracto urogenital de las muestras donadas al banco de muestras de CENTRAL ADN SA. DE C.V.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar una base de datos de las muestras positivas de CT derivadas del banco de muestras donadas al laboratorio de CENTRAL ADN SA DE C.V.
- Estandarizar y validar las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos sintéticos específicos para la genotipificación de CT
- Identificar los genotipos (A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K, L1, L2, L2a y L3) de CT
- Calcular la prevalencia de los genotipos de CT en las muestras analizadas donadas al banco de CENTRAL ADN SA DE C.V.
- Correlacionar los genotipos de CT con los patógenos concomitantes en las muestras donadas al banco de CENTRAL ADN SA DE C.V.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO Y CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo con el método observacional, en el cual se obtuvo un registro sistemático y objetivo de contrastación de hipótesis, la replicabilidad de sus resultados y contribuye al desarrollo teórico al proporcionar resultados válidos. Con un tipo de diseño prospectivo y transversal que con su estudio se podrá dar seguimiento a corto y largo plazo para el análisis de la evolución de casos de CT.

UNIVERSO O POBLACIÓN

La población o universo de estudio fueron todos aquellos pacientes que donaron sus muestras ya sea de cervix, uretra, glándula entre otras al departamento de enfermedades de transmisión sexual del laboratorio central ADN. No se hizo distinción de sexo. La edad mínima fue de 18 años, con una máxima de 60 años de edad.

MUESTRA

El muestreo fue casual, se realizó con una población incidental el cual arrojó un resultado variado con el que se pudo analizar diferentes edades , patógenos concomitantes. Se analizaron 2100 muestras de ETS en el cual 40 fueron positivas a CT y solo 26 muestras de las 40 fueron viables para secuenciación. Ver figura 8.

DEFINICIÓN DE LAS UNIDADES DE OBSERVACIÓN

- Muestras positivas a CT por técnica de PCR
- Unidad de análisis: Muestras urogenitales de pacientes donadores positivos a CT por biología molecular.

CRITERIOS

Tabla 3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Muestras de pacientes donadores positivos a CT	Muestras de pacientes donadores negativos a CT	Que el material genético obtenido de la muestra consentida presente degradación.
Muestras de hombres y mujeres mayores a 18 años		Que al obtenerse el resultado final, se demuestre ausencia del material genético.
		Que no se tenga muestra

DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA

A continuación se enumeran las principales variables estudiadas

Tabla 4. Variables y unidades de medida

Variable	Definición de la variable	Escala de medición	Unidad de medición
Variable Independiente			
Genotipos de CT	Identificación por biología molecular de los genotipos (A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H I/Ia, J, K, L1, L2, L2a y L3)	Cualitativa politómica	A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia J, K, L1, L2 L2a Y L3
Variables Dependientes			
EDAD DEL PACIENTE	Tiempo que ha vivido una persona contando desde su nacimiento en años	Cuantitativa continua	• 14-18 • 18-24 • 24-35 • 35-45 • 45-60
SEXO	Sin distinción de sexo	Cualitativa nominal dicotómica	• Mujeres • Hombres
PATÓGENOS CONCOMITANTES	Patógenos presentes en el mismo período de tiempo	Nominal dicotómica	• <i>Neisseria gonorrhea</i> • <i>Mycoplasma spp</i> • <i>Candida spp.</i> • <i>Ureaplasma spp.</i> • <i>Trichomonas vaginalis</i> • HSV 1 y 2

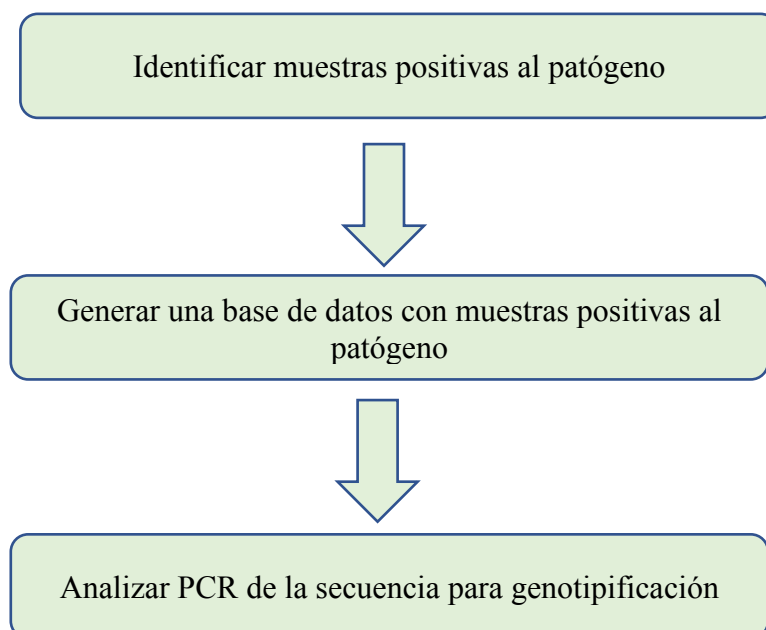
Tabla 4: HSV (Virus del herpes simple)

SELECCIÓN DE LAS FUENTES, MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Estas técnicas están basadas en fundamentos internacionales y validados. Brevemente, las muestras colectadas en medios de transporte universal (UTM), son sujetas a la extracción de material genético mediante la técnica con proteinasa K y temperaturas de ebullición. Para la detección de CT por secuenciación automatizada.

FLUJO DE TRABAJO PARA LA CAPTACIÓN, TOMA DE LAS MUESTRAS Y SU POSTERIOR PROCESAMIENTO MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.



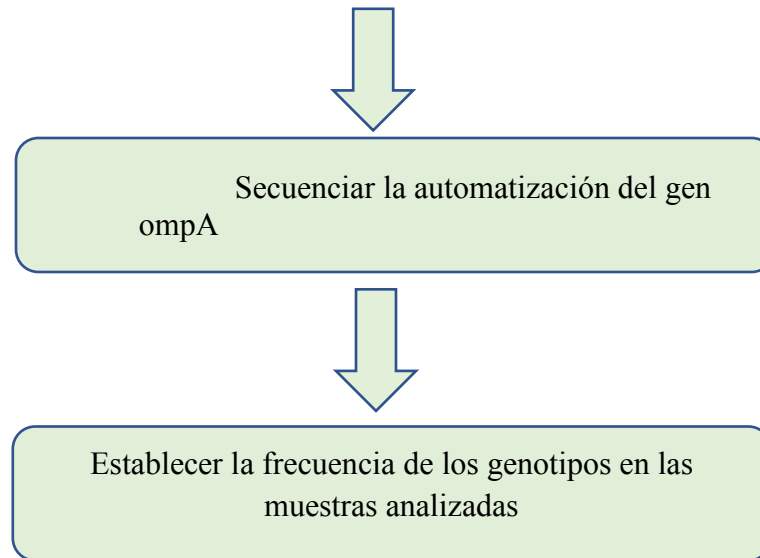


Tabla 5. Oligonucleótidos y secuencias para la amplificación del gen *OmpA* codificante para la proteína MOMP

GENE- REGIÓN	PRIMER NAME	SEQUENCE 5'-3'	CITA
PLGV440	KL5	TTTGCCTTAA CCCCACCAT T	(Mahony, 1993)
PLGV440	KL6	CGTCCTTCC TA AGATA	(Mahony, 1993)
OMPA	P1	ATG AAA CTC TTG AAA TCG	(Ngandijo, 2004)

OMPA	OMP2	CTC AAC TGT GAC TGC GTA TTT	(Ngandijo, 2004)
OMP	MOMP 87	TGAACCAAG CCTTATGATC GACGACGGA	(Stothard D, 1998)
OMPA	RVS	TCTTCGAYTT TAGGTTTAGA TTGA	(Stothard D, 1998)

Gen: Es una unidad de información en un locus de ácido desoxirribonucleico que codifica un producto génico, ya sea proteínas o ARN

METODOLOGÍA

IDENTIFICAR MUESTRAS POSITIVAS AL PATÓGENO

Para la identificación de muestras positivas de CT, Central ADN, el laboratorio donde se ejecutó el proyecto, cuenta con un área específica de muestras y derivados (material genético restante de la muestra después de haber procesada) perteneciente al área de ETS. Primeramente se identificaron las placas de análisis a las que las muestras positivas a CT pertenecen, tal como se muestra en la figura 7.

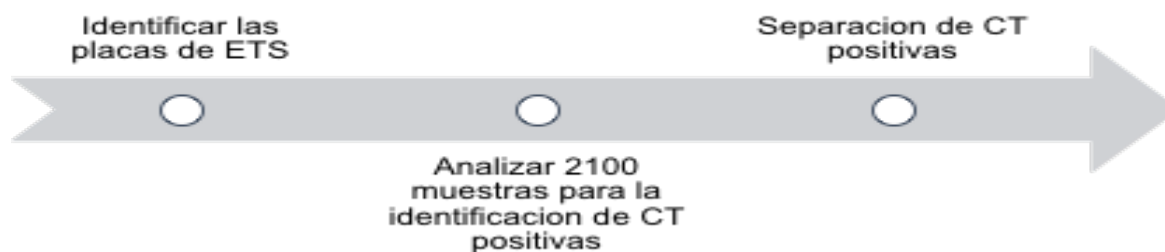


Figura 7. Flujo de identificación de muestras positivas a CT. Paso 1; identificar placas ETS; 2; identificación de CT positivas; 3; separación de CT

GENERAR UNA BASE DE DATOS CON MUESTRAS POSITIVAS AL PATÓGENO

Se generó una base de datos con todas las muestras positivas a CT localizadas. Para considerar candidata un código de muestra reportada con un resultado positivo a CT, debía estar presente al menos el derivado o en su defecto muestra del paciente; es decir, aquellas muestras o derivados que no era visibles en el tubo, se descartaron.

EJEMPLO DE BASE DE DATOS

No de muestra	Id muestrasa	Placa	sexo	Si hay muestra	Si hay derivado	Es viable	Otros patogenos	Sitio anatomico
1	Sa12229	PI3450	F	Si	no	si	ureaplasma	cervix

ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL SEROVAR

Las muestras positivas a CT se sometieron a la técnica de PCR, el cual permite generar muchas copias de una secuencia blanco para posteriores aplicaciones en biología molecular. En breve, nuestro proceso de PCR constó de la separación de la muestra, la cual fue colocada en un microtubo de 200 ul, al cual se le agregaron la 1 unidad de Taq polimerasa, dNTP's, MgCl₂, agua grado molecular. Posteriormente, se colocaron en el termociclador, donde la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C durante 1 minuto, seguido del alineamiento a 58 °C y finalmente con una ronda de 72 °C para la elongación del material genético; estos últimos 3 pasos se llevaron a cabo durante 35 ciclos consecutivos. Una vez terminado el programa de PCR, los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% a través del fotodocumentador Enduro (USA). Para corroborar que el amplicón correspondía al tamaño esperado, en el gel se utilizó una escalera de

100 pares de bases (bp). Por último, con base en estas imágenes de los amplicones y las muestras viables, se seleccionaron aquellas muestras viables para la secuenciación automatizada en el laboratorio MacroGen Inc. (Seoul, KR). Una vez obtenida la secuencia de los amplicones en formato FASTA, esta se analizó mediante la plataforma nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Aleksandr 2008) (Zhang, 2000) con el objetivo de conocer a qué serovar o genotipo pertenece esa muestra analizada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM SPSS Versión 25 para Windows. Para la distribución de las variables cualitativas categóricas y dicotómicas se describió mediante frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas continuas se describieron como medias $\pm$ desviación estándar bajo el supuesto de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Los datos de las variables cualitativas se registraron y analizaron en tablas de contingencia. Los datos discretos se compararon en un análisis univariado mediante la prueba Chi-Square (X^2) y la prueba exacta de Fisher. El nivel de significancia se estableció con un valor de $P < 0.05$. Ver tabla 6

Tabla 6 Análisis Estadístico	
Variables cualitativas categoricas y dicotomicas	Variables cuantitativas continuas
Se utilizaron frecuencias y porcentajes	Se utilizo medias $\pm$ desviación estándar
Registro de datos fue en tablas de contingencia	
Datos discretos se compararon en un analisis univariado mediante la prueba Chi- Square y la prueba exacta de Fisher	

ASPECTOS BIOÉTICOS

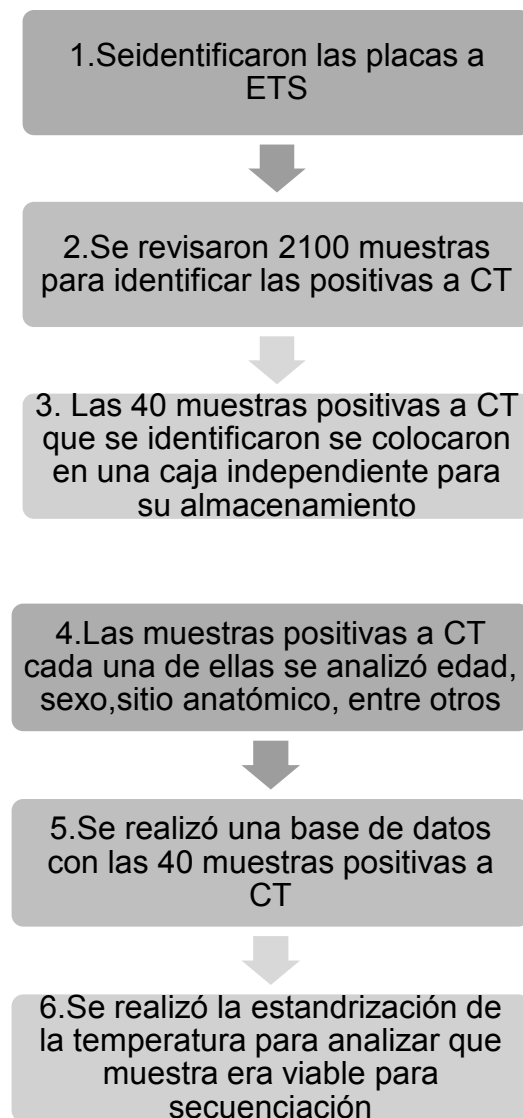
Los procedimientos para la obtención de las muestras se apegaron a las normas éticas de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a la Declaración de éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I, Disposiciones Comunes, Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Esta investigación se considera como riesgo mínimo de acuerdo con el artículo 17, Capítulo I, sección II, de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Artículo 21.

De igual manera se protegió la confidencialidad de los registros que pudieron identificar a los sujetos del ensayo, respetando la privacidad, integridad y las normas de confidencialidad. El trabajo representó el extracto del proyecto de investigación perteneciente a la línea de investigación Enfermedades Infecciosas en laboratorios Central ADN S.A. de C.V. Todas las muestras colectadas, fueron obtenidas mediante la carta de consentimiento informado.

RESULTADOS

MUESTRAS CLÍNICAS POSITIVAS A CT

Para identificar las muestras positivas a CT, se encontró que con base en los resultados de ETS básico ejecutados en el laboratorio de CENTRAL ADN SA DE C.V Ver figura 8 y la tabla 7.



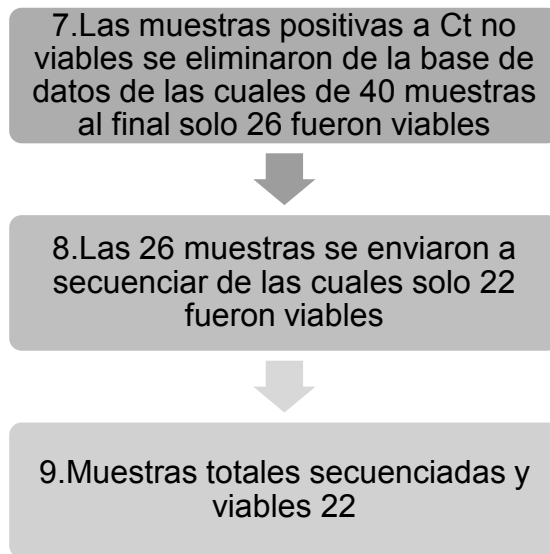


Figura 8. Proceso de selección de muestras CT

Tabla 7. Base de datos CT muestras positivas

No. de muestra	Id muestra	Edad	Sexo	sitio anatómico	Solicitud firmada (Sí o No)	Resultado ETS COMPLETO 1= POSITIVO 2=NEGATIVO	Candida spp. 1= Positiv 2 negativo	Ureaplasma spp. 1= Positiv 2 negativo	T. vaginalis 1= Positiv 2 negativo	N. gonorrhoeae 1= Positiv 2 negativo	Chlamydia trachomatis 1= Positiv 2 negativo	HSV 1/2 1= Positiv 2 negativo	Mycoplasma spp. 1= Positiv 2=negativo	MCV 1= Positiv 2=negativo	Treponema pallidum 1= Positiv 2=negativo	Haemophilus spp. 1= Positiv 2=negativo	S. aureus 1= Positiv 2=negativo	Klebsiella spp. 1= Positiv 2=negativo
1	SAI2229	31	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
2	SAI0093	28	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
3	SAI2616	34	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
4	AAS865	X	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
5	AAS839	40	MUJER	CERVIX	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
6	SAD6792	23	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
7	SAD6854	26	MUJER	CERVIX	SI	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
8	SAS865	X	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
9	SAI1191.1	X	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
10	SAI1846	29	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
11	SAI2049	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
12	SAI0308	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
13	SAI1816	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
14	SAI2617	29	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
15	SAI1112	29	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
16	SAI0097	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
17	SAI0347	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
18	SAI0076	29	MUJER	CERVIX	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
19	AC29009	23	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
20	SAI2369	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
21	26449	28	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
22	SAI1928	X	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
23	AAS554	19	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
24	SAI2059	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
25	SAI2296	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
26	SAI1652	29	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
27	SAI1816	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
28	SAI0283H	35	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
29	SAI1048	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
30	SAI2156	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
31	SAI2089	34	HOMBRE	GLANDE	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
32	SAI1191	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
33	SAI1613	X	MUJER	CERVIX	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
34	SAI1047	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
35	SAI2186	X	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
36	29058	21	HOMBRE	URETRAL	SI	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2

ETS: enfermedad de transmisión sexual, base de datos que consta de no. muestra, id muestra, edad, sexo, sitio anatómico, patógenos concomitantes.

DETECCIÓN DEL GEN *OmpA* E IDENTIFICACIÓN DEL SEROVAR DE CT

Para conocer el serovar de CT, se requiere la amplificación de la secuencia blanco, que en el estudio, corresponde al gen *Ompa*, mediante la utilización de los oligonucleótidos MOMP 87+ RVS y P1 + OMP2. Ambos pares de oligonucleótidos lograron amplificar la secuencia blanco; sin embargo, la amplificación del amplicón con los oligos o P1+ OMP2 necesitan un nivel de pureza para su amplificación, a diferencia del par de oligonucleótidos MOMP 87 + RVS con base en este resultado, este análisis fue sometido a secuenciación automatizada para la identificación del serovar. ver figura 9 .

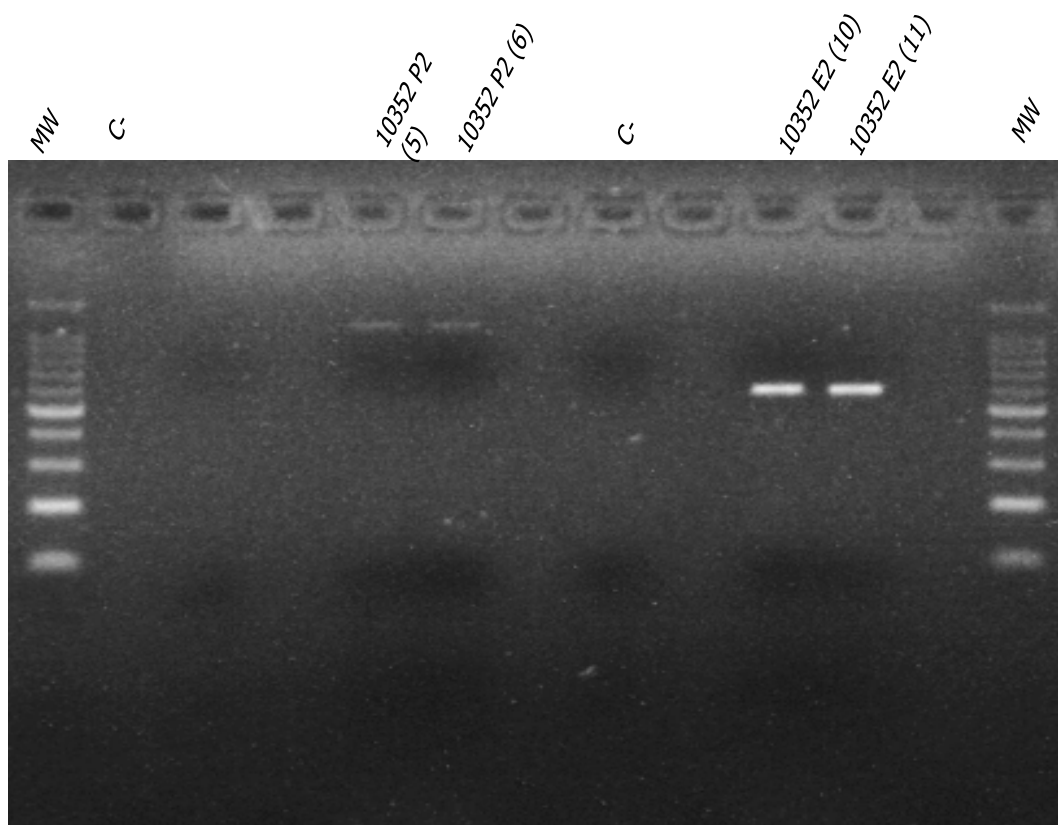


Figura 9. PCR en punto final del gen *ompA* M: Ladder 100bp marker (iNtRON Biotechnology, KR); 1: negative control (molecular grade water); muestra 10352 P2 (5) y 10352 P2 (6) (duplicado) positiva utilizando los oligonucleótidos P1 + OMP2; seguido de un C- y las muestras 10352 E2 (10) y 10352 E2 (11) (duplicado) positiva utilizando los oligonucleótidos MOMP 87 + RVS; Estandarización de temperatura de oligos MOMP 87+RVS Y P1+OMP2

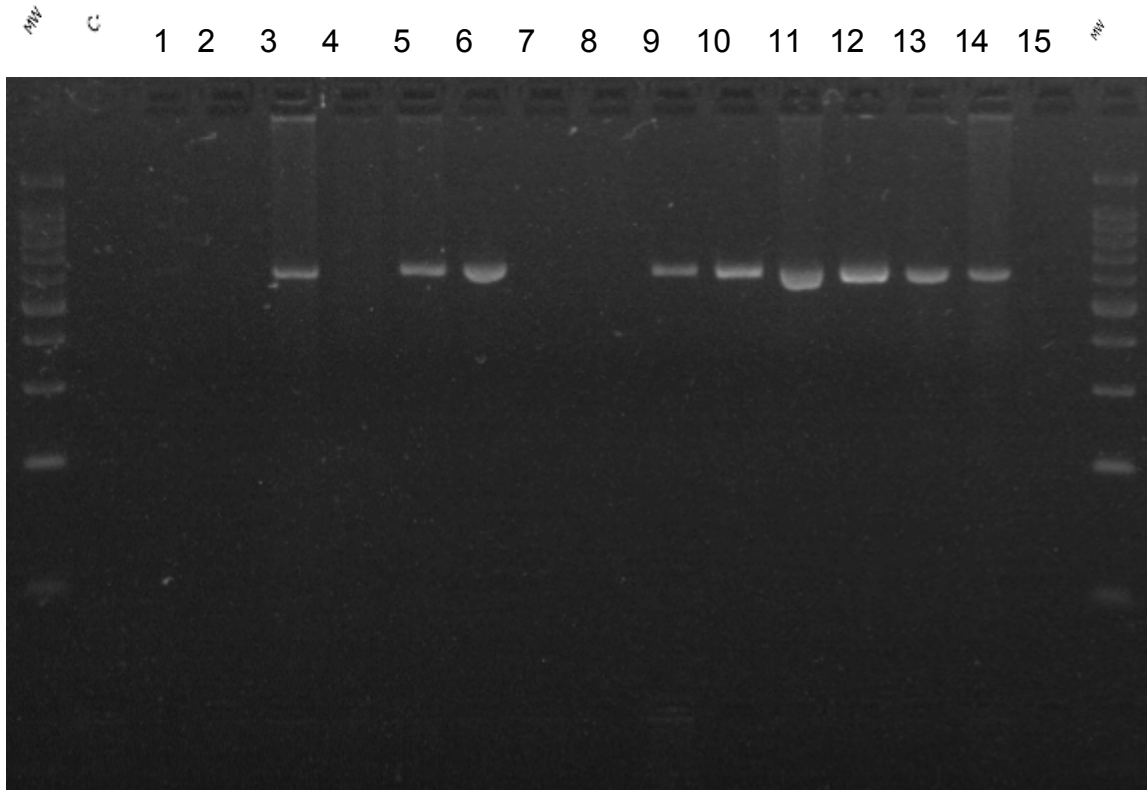


Figura 10. Muestras positivas a CT, estandarización MOMP 87 + RVS. PCR en punto final del gen *ompA* M: Ladder 100bp marker (iNtRON Biotechnology, KR); 1: negative control (molecular grade water); muestras positivas a CT 3, 5, 6 y de la muestra 9-14, estandarización de los oligonucleótidos MOMP 87 + RVS

Posteriormente, los amplicones fueron enviados a secuenciación automatizada al laboratorio MACROGEN (Seoul, KR). Una vez las secuencias enviadas en formato FASTA, se utilizó el programa nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) program para analizar la secuencia y obtener la identidad de los serovares con otros reportados en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para definir el serovar al que pertenece la muestra positiva a CT, Ver figura 11.

A)

The screenshot shows the BLASTn web interface. At the top, there are tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. Below these, a text box contains a query sequence: GCTCAATCTTCATCTTAATTCGGATCTCGTTTCGATTCCCTCGTCTTTTCTGGATCATCGATCAATATCATCGATTCTCGTCGGTTTCATTCTCTTTGTTAATTGTCTCTCTCACTCGATTCTTAGTCGCTTACATTGATCGTCGTC. To the right of the text box are fields for 'Query subrange' (From and To) and a 'Query subrange' link. Below the text box is a section for 'Or, upload file' with a button 'Seleccionar archivo' and a message 'No se eligió archivo'. There is also a 'Job Title' field and a checkbox for 'Align two or more sequences'. On the right side, there is a 'New columns added to the Description Table' notification. Below the 'Enter Query Sequence' section is the 'Choose Search Set' section, which includes a 'Database' dropdown set to 'Nucleotide collection (nr/nt)', an 'Organism' field, and several checkboxes for 'Exclude' and 'Limit to'. At the bottom, there is a 'Program Selection' section with radio buttons for 'Optimize for'.

B)

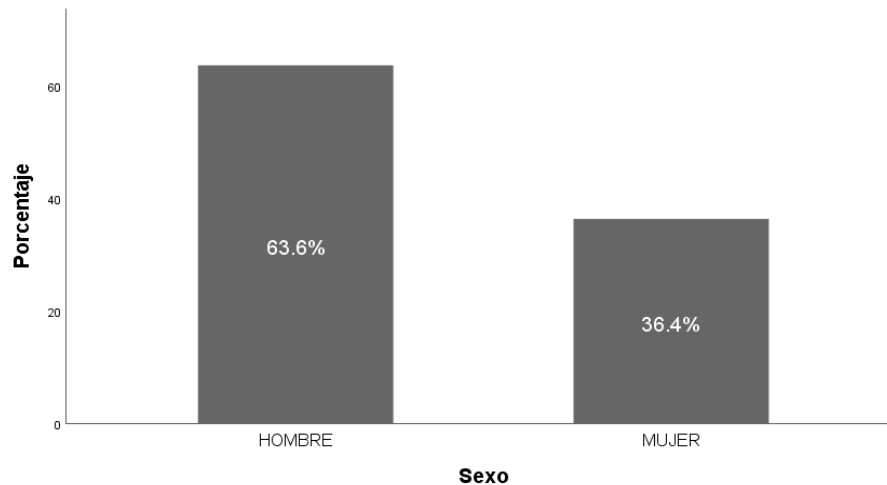
The screenshot shows the BLAST results page. At the top, there is a header 'Sequences producing significant alignments' and a 'Download' button. Below the header, there is a table with columns: 'select all', '100 sequences selected', 'GenBank', 'Graphics', 'Distance tree of results', and 'MSA Viewer'. The table contains 100 rows of results, each with a checkbox, a description, a scientific name, and various alignment statistics. The first row is: ☒ Chlamydia trachomatis F1_730 ompA gene for major outer membrane protein, partial cds. The last row is: ☒ Chlamydia trachomatis RC-F(s)/852, complete genome. At the bottom right, there is a 'Feedback' button.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Chlamydia trachomatis F1_730 ompA gene for major outer membrane protein, partial cds	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1020	LC498802.1
☒	Chlamydia trachomatis ompA gene, major outer membrane porin, partial sequence, isolate: 269	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1024	LC269944.1
☒	Chlamydia trachomatis ompA gene, major outer membrane porin, partial sequence, isolate: 228	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1021	LC269942.1
☒	Chlamydia trachomatis ompA gene, major outer membrane porin, partial sequence, isolate: 65	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1030	LC269934.1
☒	Chlamydia trachomatis ompA gene, partial sequence, isolate: 664m	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1040	LC031856.1
☒	Chlamydia trachomatis serovar F major outer membrane protein gene, partial cds	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1185	JN795437.1
☒	Chlamydia trachomatis isolate Saratov F1/61.26-M47 major outer membrane protein (ompA) gene, partial cds	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1162	KU963178.1
☒	Chlamydia trachomatis strain F-6068, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042738	CP015306.1
☒	Chlamydia trachomatis isolate F/L1bf major outer membrane protein (ompA) gene, complete cds	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1188	KM369937.1
☒	Chlamydia trachomatis isolate F/U29bf major outer membrane protein (ompA) gene, complete cds	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1188	KM369936.1
☒	Chlamydia trachomatis strain F/CS847/08, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1043060	CP010569.1
☒	Chlamydia trachomatis ompA gene for major outer membrane protein, partial cds, strain: F/UW-6/CX	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1025	AB915586.1
☒	Chlamydia trachomatis F/SWFPminus high quality draft genome sequence	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042731	HE605380.2
☒	Chlamydia trachomatis F/11-96, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042853	CP006674.1
☒	Chlamydia trachomatis strain F/6-94, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042767	CP006673.1
☒	Chlamydia trachomatis strain F/2-93 genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042619	CP006672.1
☒	Chlamydia trachomatis strain F/1-93, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1042588	CP006671.1
☒	Chlamydia trachomatis RC-F(s)/342, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1083842	CP002677.1
☒	Chlamydia trachomatis RC-F(s)/852, complete genome	Chlamydia trach...	974	974	95%	0.0	99.08%	1083842	CP002677.1

Figura 11. Blastn program search. A) Plataforma nBlast con las secuencias blanco para buscar homología e identidad en GENE BANK. B) Secuencias con los alineamientos encontrados con su nombre científico y porcentaje de alineamiento

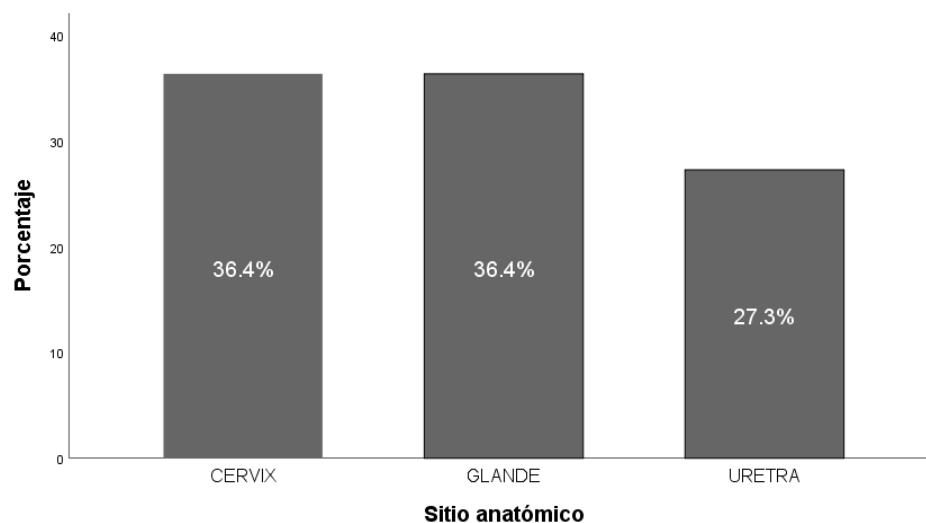
RESULTADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

La población de estudio incluyó 22 hombres y mujeres entre 19 a 31 años, con una edad media de 27.8 ± 3.6 años y detección por PCR positiva a CT. En la mayoría de los casos se trató de pacientes del sexo masculino (63.6%) (Gráfica 1)



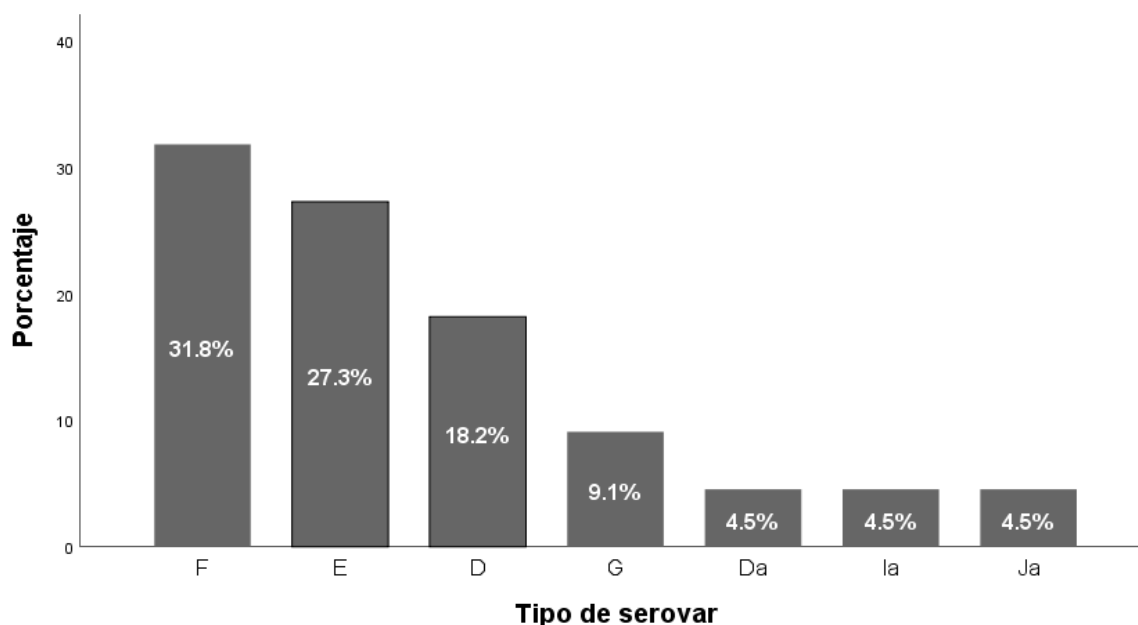
Gráfica 1. Frecuencia del sexo en la población de estudio.

Se incluyeron muestras biológicas de tres sitios anatómicos: cérvix (36.4%), glándula (36.4%) y uretra (27.3%) (Gráfico 2).



Gráfica 2. Frecuencia de los sitios anatómicos de los que se obtuvo la muestra.

La identificación de los serovares, es la parte medular de este proyecto de investigación. Se encuentra que el serovar más frecuente fue el F (31.8%), seguido de E (27.3%) y D (18.2%). También se detectaron en menor frecuencia: G, Da, la y Ja (Gráfica 3).

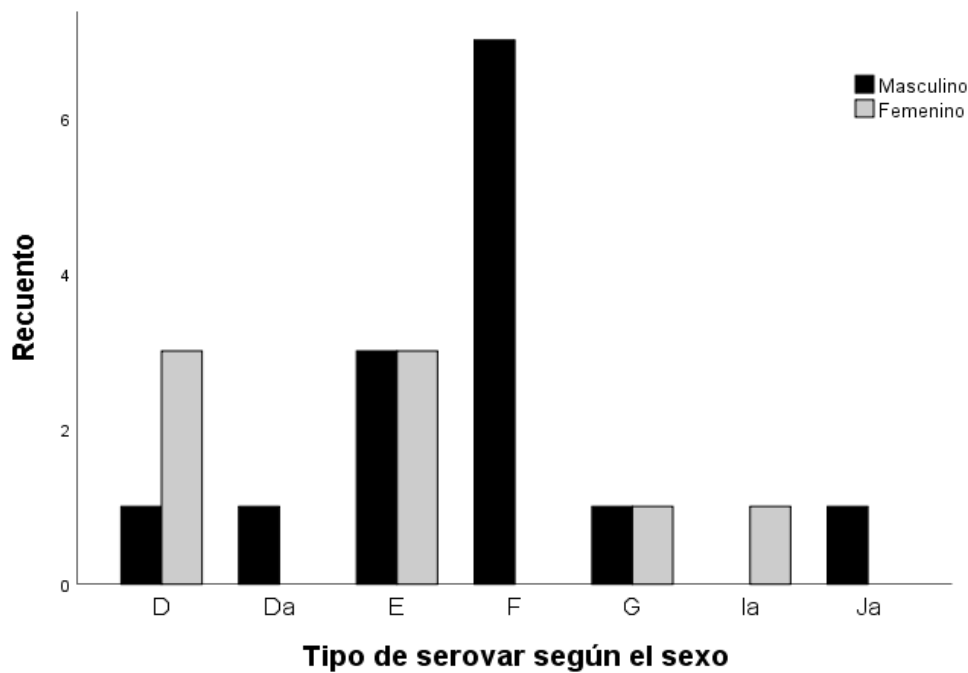


Gráfica 3. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* en la población de estudio.

En la tabla 1 se describe la frecuencia de los serovares de CT en relación con el sexo del paciente. Se observa que todos los casos identificados con Serovar más frecuente F fueron del sexo masculino (n=7; 31.8%), mientras que, la mayoría de los casos con Serovar D fueron mujeres (n=3; 13.6%). Además, el Serovar E se distribuyó de igual forma en hombres y mujeres (n=3; 13.6%) (Tabla 1; Gráfica 4).

Al asociar el tipo de Serovar con el sexo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.120$) (Tabla 8).

Tabla 8. Serovar de CT según el sexo del paciente (n=22)						
Serovar	Hombre		Mujer		Total	
	N	%	n	%	N	%
D	1	4.5	3	13.6	4	18.2
Da	1	4.5	0	0.0	1	4.5
E	3	13.6	3	13.6	6	27.3
F	7	31.8	0	0.0	7	31.8
G	1	4.5	1	4.5	2	9.1
Ia	0	0.0	1	4.5	1	4.5
Ja	1	4.5	0	0.0	1	4.5
Xi ² = 0.120 gl=6						



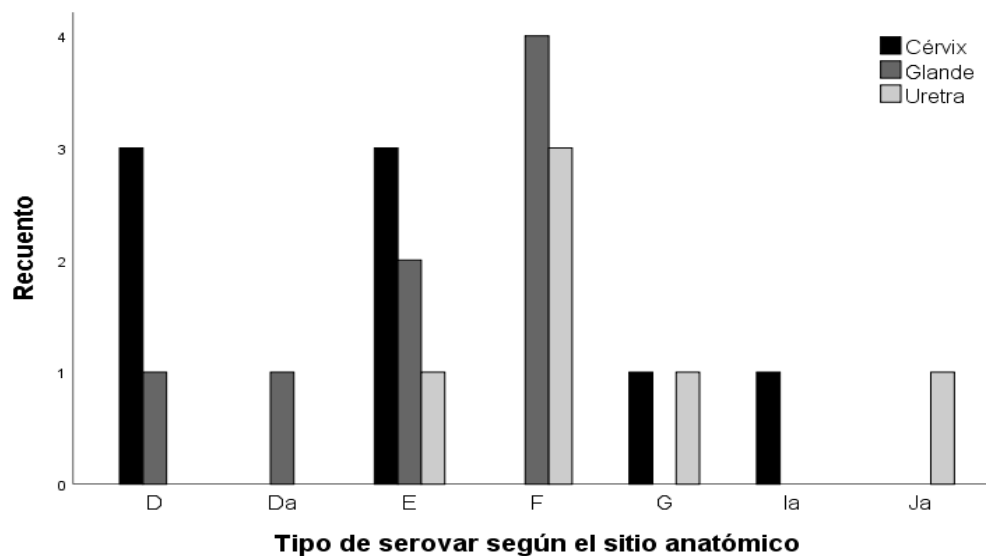
Gráfica 4. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* según el sexo del paciente.

Al analizar la distribución de los serovares detectados en relación con los sitios anatómicos de los que se obtuvo la muestra biológica, se encontraron que los sitios más frecuentes fueron el cérvix y el glande. El Serovar F se encontró principalmente

en el glande (18.2%), mientras que los Serovares E y D fueron más frecuentes en cérvix (13.6%, respectivamente) (Tabla 9; Gráfica 5).

Más allá de estos datos, se dio a la tarea de comparar el sitio anatómico con los serovares detectados mediante la secuenciación automatizada. Los resultados muestran que no existe una asociación estadísticamente significativa entre estos grupos ($p=0.251$) (Tabla 9).

Tabla 9. Variantes de CT según el sitio anatómico (n=22)						
Variante	Cérvix		Glande		Uretra	
	N	%	n	%	N	%
D	3	13.6	1	4.5	0	0.0
Da	0	0.0	1	4.5	0	0.0
E	3	13.6	2	9.1	1	4.5
F	0	0.0	4	18.2	3	13.6
G	1	4.5	0	0.0	1	4.5
Ia	1	4.5	0	0.0	0	0.0
Ja	0	0.0	0	0.0	1	4.5
Xi ² = 0.251 gl=12						

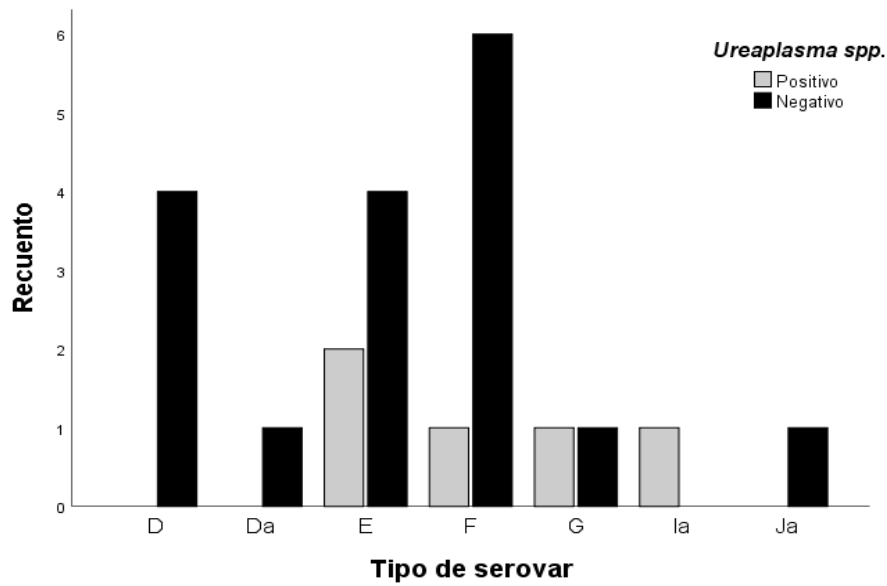


Gráfica 5. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* según el sitio anatómico del que se obtuvo la muestra.

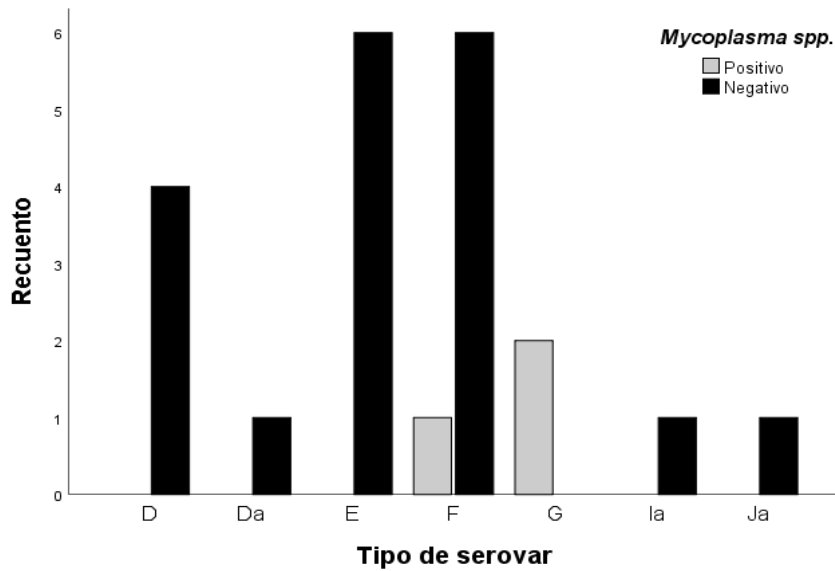
Finalmente, la distribución de la frecuencia de los serovares de CT y los patógenos concomitantes detectados con mayor frecuencia por PCR multiplex. La Tabla 10 y las gráficas 6 a 8 muestran los serovares presentes en casos con coinfección por *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Haemophilus spp.*

Los resultados mostraron que, en la mayoría de los casos, los pacientes con Serovar E de CT presentan coinfección con *Ureaplasma spp.* (9.1%) y *Haemophilus spp.* (9.1%), mientras que, los pacientes con Serovar G presentan coinfección con *Mycoplasma spp.* (Tabla 10).

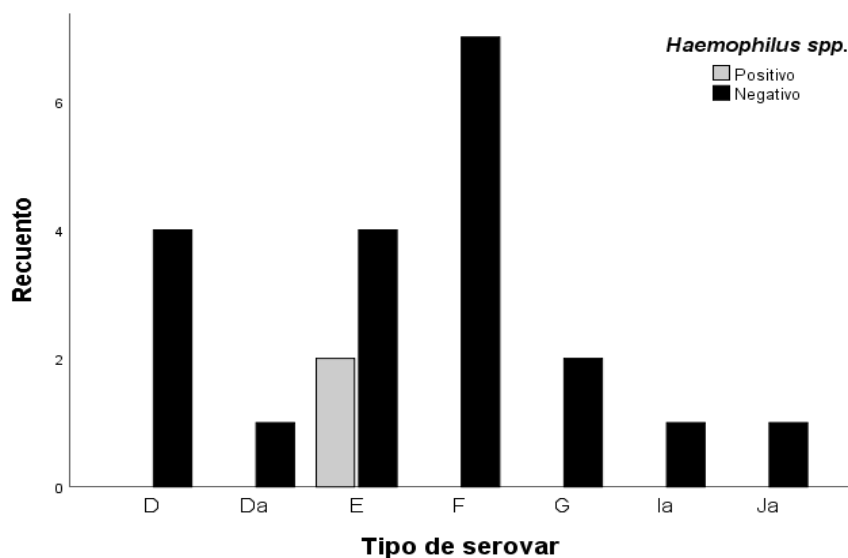
Tabla 10. Variante en pacientes con CT en el patógeno asociado más frecuente (n=22)						
Variante	<i>Ureaplasma spp.</i>		<i>Mycoplasma spp.</i>		<i>Haemophilus spp.</i>	
	N	%	N	%	N	%
D	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Da	0	0.0	0	0.0	0	0.0
E	2	9.1	0	0.0	2	9.1
F	1	4.5	1	4.5	0	0.0
G	1	4.5	2	9.1	0	0.0
Ia	1	4.5	0	0.0	0	0.0
Ja	0	0.0	0	0.0	0	0.0



Gráfica 6. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con *Ureaplasma spp.*



Gráfica 7. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con *Mycoplasma spp.*



Gráfica 8. Frecuencia del tipo de Serovar de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con *Haemophilus spp.*

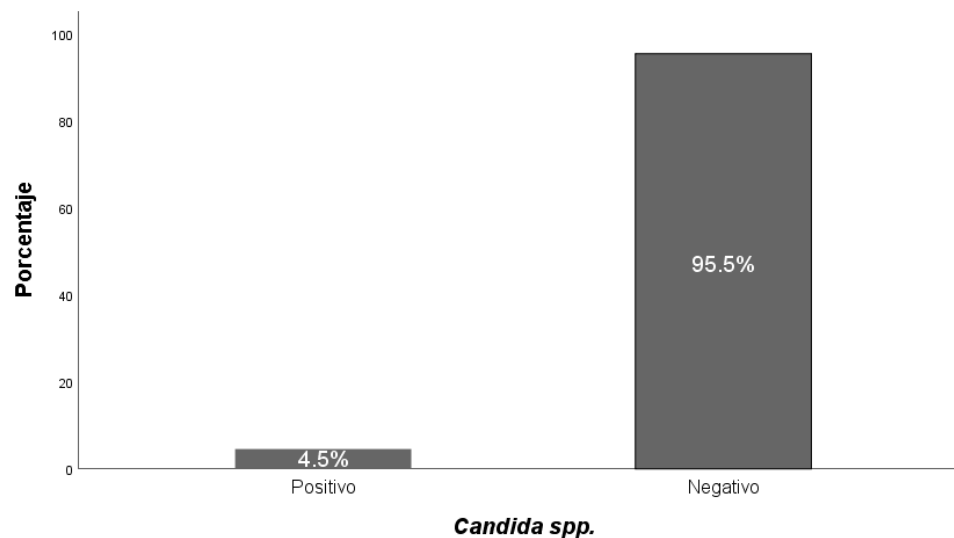
A partir de las muestras urogenitales de los pacientes estudiados se realizó la detección simultánea de: *Candida spp.*; *Ureaplasma spp.*; *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HSV 1 y 2, *Mycoplasma spp.*; MCV, *Treponema pallidum*, *Haemophilus spp.*; *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella spp.* utilizando una PCR multiplex.

En la Tabla 11 y en las gráficas 9-14 se describe la frecuencia de los patógenos detectados en nuestro estudio. *Ureaplasma spp.* (22.7%), *Mycoplasma spp.* (13.6%) y *Haemophilus spp.* (9.1%) fueron los patógenos más frecuentemente detectados en pacientes que cursan con infección por CT. No se detectaron casos positivos para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*; *Treponema pallidum*, HSVy 1y 2, ni para MCV (Tabla 11).

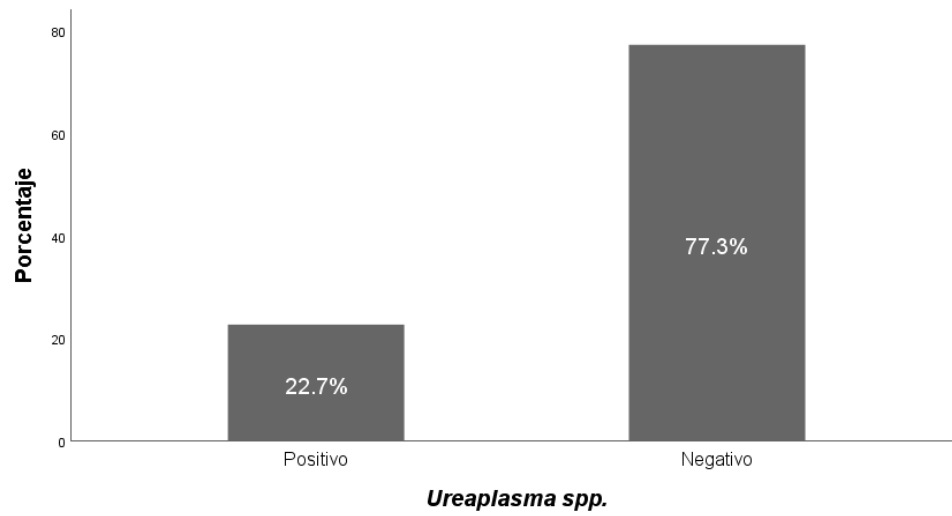
Al investigar la posible asociación entre la detección positiva a los patógenos incluidos en el estudio y el sexo, encontramos que no existen diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencia de los patógenos detectados en pacientes con CT (n=22)							
Patógeno	Hombre		Mujer		Total		P
	N	%	N	%	N	%	
<i>Candida spp.</i>	0	0.0	1	4.5	1	4.5	0.176
<i>Ureaplasma spp.</i>	2	9.1	3	13.6	5	22.7	0.211
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0	0.0	1	4.5	1	4.5	0.364
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0.0	1	4.5	1	4.5	0.364
<i>Mycoplasma spp.</i>	2	9.1	1	4.5	3	13.6	0.709
<i>Haemophilus spp.</i>	1	4.5	1	4.5	2	9.1	0.606
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-
<i>Treponema pallidum</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-
HSV ½	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-
MCV	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-

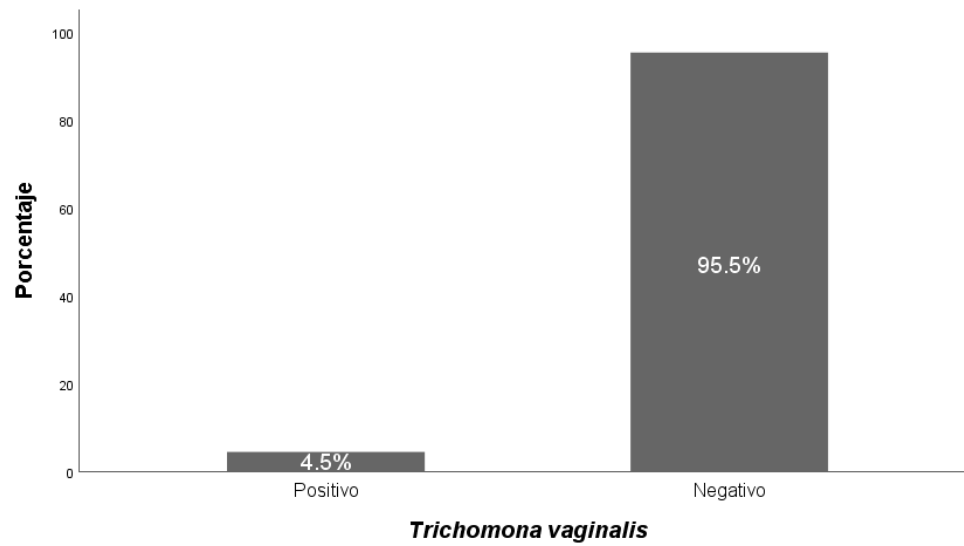
Abreviaturas: HSV, virus del herpes simple; MCV, virus del molusco contagioso.



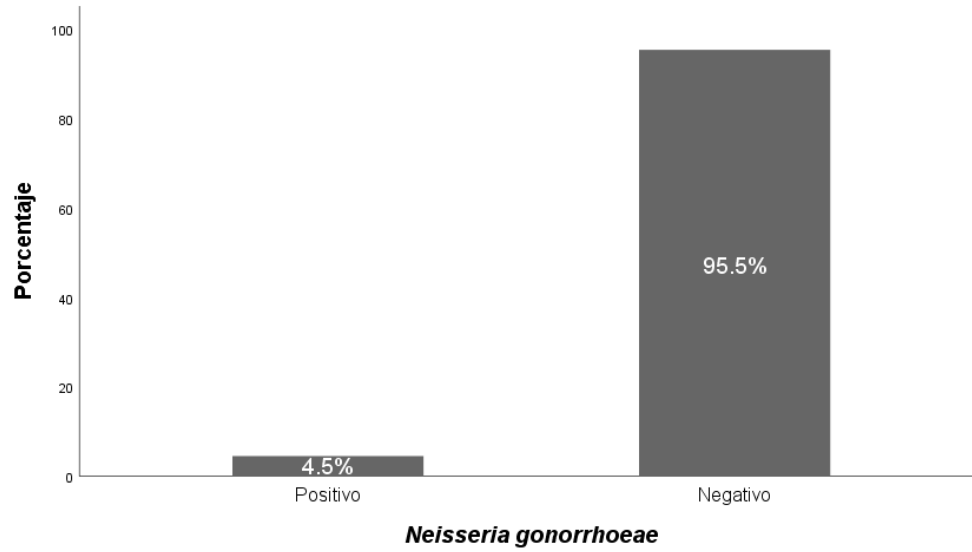
Gráfica 9. Frecuencia de *Candida spp.* en la población de estudio.



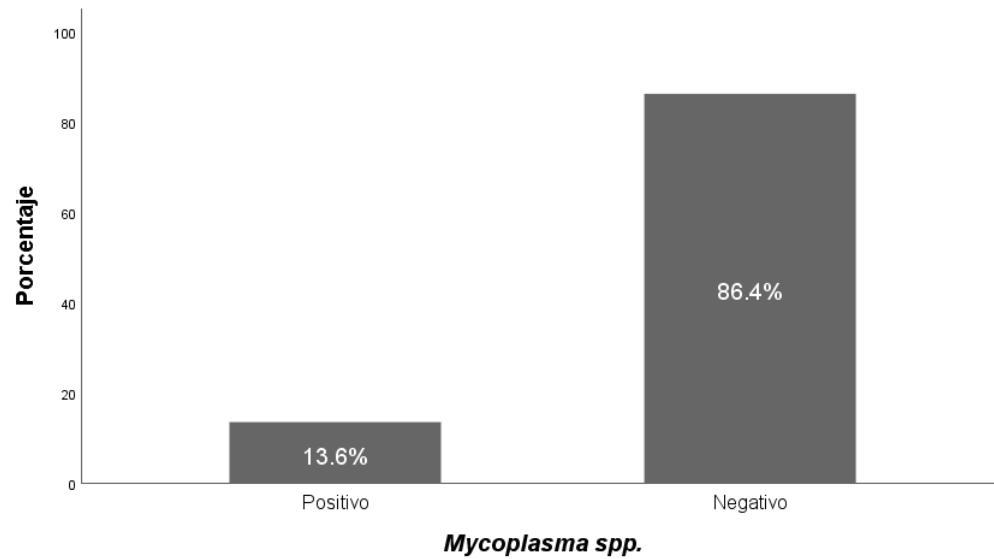
Gráfica 10. Frecuencia de *Ureaplasma spp.* en la población de estudio.



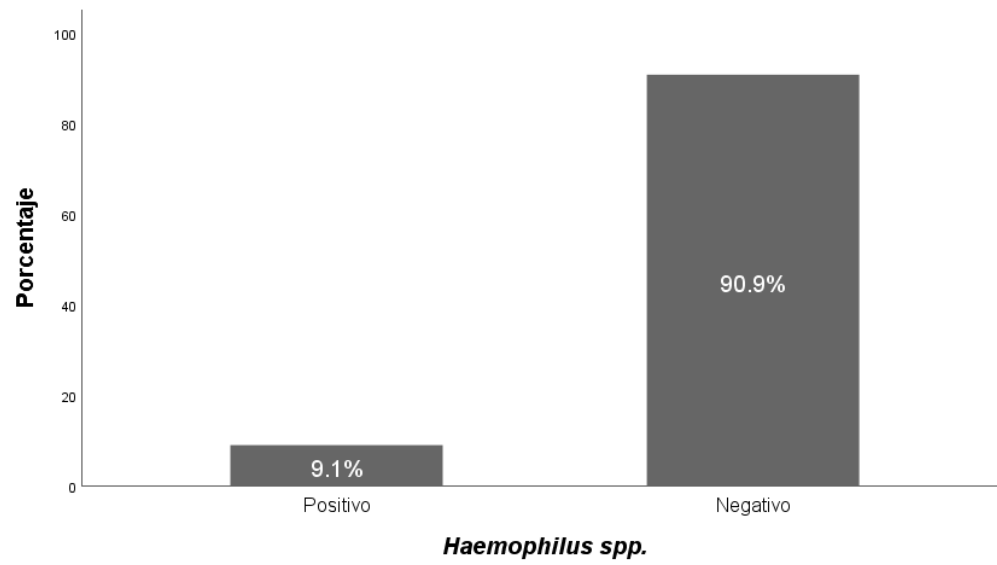
Gráfica 11. Frecuencia de *Trichomonas vaginalis* en la población de estudio.



Gráfica 12. Frecuencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la población de estudio.



Gráfica 13. Frecuencia de *Mycoplasma spp.* en la población de estudio.



Gráfica 14. Frecuencia de *Haemophilus* spp. en la población de estudio.

DISCUSIÓN

CT es un patógeno intracelular que consta de una membrana externa, la cual incluye una proteína MOMP, que es altamente inmunogénica y que le permite adherirse a cualquier célula eucariota humana. Posteriormente, CT depende de la célula hospedera para obtener los elementos moleculares indispensables para sobrevivir y mantener su ciclo biológico.

La variación antigénica por la moléculas MOMP, presenta una gran diversidad de serovares en todo el mundo, debido a que el gen *OmpA* que codifica para esta proteína tiene una diversidad de secuencias nucleotídicas recombinadas ocasionando una presión de selección inmune del huésped; es decir, que el hospedero será capaz o no de resolver la infección por sí mismo. (Cordeiro, 2019) Por lo tanto, nuestros esfuerzos investigativos, se centraron en fortalecer la detección de los genotipos de CT en el tracto urogenital de las muestras donadas al banco de muestras del laboratorio CENTRAL ADN SA DE C.V. con el objetivo de conocer la variabilidad de serovares en la población estudiada; además de conocer estadísticamente la importancia de los sitios anatómicos y los serovares más comunes relacionados con el sexo.

Aunque nuestra población de estudio fue pequeña, demostramos que la variedad de serovares por frecuencia fueron F, E y D; no obstante, también se detectaron los serovares D, G, Da, Ia y Ja, en menor proporción y en total ausencia los serovares L1-L3. Estos datos son equiparables en población mexicana, ya que en 2019, se demostró en un estudio que incluyó 69 muestras positivas a CT, la identificación de una variante perteneciente al serovar D, con una homología compartida con la variante nvCT-sueca. (Guerra, 2019) Esta prevalencia reiterada y representada por el serovar D, es posible explicarse puesto que éste es más frecuente en sitios como el cérvix, que fue la principal fuente de aislamiento de este genotipo, al igual que en

el otro estudio mexicano. Estos hallazgos equiparables, subrayan la necesidad de testar otros sitios anatómicos para conocer, tanto los efectos clínicos como, la implicación de otros serovares en estos tejidos, debido a que las condiciones ambientales y microambientales condicionan y estimulan la adaptación de todos los patógenos.

En otro estudio donde la detección de serovares se enfocó en una población austriaca conformada por 401 muestras positivas a CT, se describió que la prevalencia de sus serovares fue E y F; a su vez, en esta muestra representativa, tampoco se encontraron los serovares L1-L3. Nuestros hallazgos también demostraron ausencia de estos serovares, debido a que es poco frecuente que este tipo de serovares sean aislados de los sitios anatómicos que nosotros incluimos en nuestro estudio; es decir, cérvix, uretra y glánde; que aunque son transmisibles a través de este tipo de mucosas, es mucho más común encontrarlos en sus fases secundarias o terciarias, causando linfadenopatías inguinales-femorales y fibrosis o fístulas anogenitales, respectivamente. (Thandra 2021) Otro hecho que reafirma nuestros hallazgos referente a los serovares no detectados, fue en una población brasileña que incluyó 17 muestras positivas a CT. (Brasillense, 2016,) Es importante recalcar que, aunque las poblaciones mencionadas tienen diferencias étnicas distintas, ecológicas, de alimentación y de conductas sexuales de apertura, comparten la presencia de serovares como el D, E y F, de manera reiterada. Esto puede deber a que la presencia de citocinas proinflamatorias se ve afectada dependiendo del serovar presente; es decir, se ha evidenciado que los serovares L2 tiene una implicación importante debido a que presenta una favorable replicación y proliferación a las citocinas y quimiocinas, incrementando la probabilidad de resolución de la enfermedad y quizás por ese motivo, no sea tan frecuente encontrar linfogranulomas venéreos en la etapa primaria, en las mucosas como el cérvix, ano o uretra. Más allá de esto, también se ha demostrado que las células epiteliales urogenitales de la vagina, cérvix y uretra son permisivas para que el serovar D y E infecte este tipo de tejidos. (Anderson,2019) (Mously, 2007)

Los sitios anatómicos son parte clave de la infección para un serovar u otro de CT, y con base en nuestros resultados el serovar más prevalente en hombres fue el serovar F, este hecho es controversial cuando se compara entre otras poblaciones; esto pudo deberse a que nuestra población de muestras fue pequeña; (Quint 2009) sin embargo, es posible postular que este tipo de serovar depende de algún estímulo hormonal dependiente del sexo o de la microbiota en sitios anatómicos como la uretra o cervix, que indiscutiblemente, son diferentes. (Rakhmatulina 2019)

Finalmente, encontramos que *Ureaplasma spp*, *Mycoplasma spp.* and, *Haemophilus spp.* fueron los patógenos concomitantes con la infección por CT. En otras poblaciones se ha observado que la combinación de CT con *Ureaplasma spp.* es común, (Pan,2020) incluso postulándose que, esta combinación puede ser un factor protector para la adquisición de virus del papiloma 16. (Kim, 2018) Esta oportunidad de investigación debería ser analizada con mayor profundidad, ya que nuestro grupo de trabajo ha demostrado este hecho (información en proceso de publicación) en respaldo con los hallazgos de otras poblaciones. *Haemophilus spp.* es uno de los patógenos asociado con uretritis no gonocócica, (Da Silva 2021), (Tapial, 2019) aunque faltan más estudios para reforzar estos datos. *Mycoplasma spp.* es uno de los microorganismos que por excelencia acompaña a CT en muchas poblaciones puesto que se ha evidenciado en mujeres con STI e infertilidad. (Cetik,2019) (Zhang 2017) Este estudio sugiere fuertemente que CT debe buscarse de manera intencionada en conjunto con otros patógenos, ya sea para monitorear la resistencia a los antimicrobianos, como para determinar las prevalencias en diferentes regiones del mundo y los factores de riesgo asociados a la salud reproductiva y sexual.

Contrastando esta información podemos analizar que existe una semejanza en los serovares encontrados con esta información obtenida analizamos que es importante el conocer los distintos tipos de serovares que prevalecen para tener una mejor vigilancia sobre CT en la población mexicana y así dar un mejor tratamiento y evitar

la resistencia a medicamentos. Finalmente, se podría tener un gran impacto en el desarrollo de vacunas para CT.

CONCLUSIÓN

Los serovares o genotipos de CT fue diversa en la población estudiada, con mayor prevalencia, E, F y D; es decir, al realizar nuestra base de datos, la estandarización de la amplificación y la identificación de los genotipos, por lo cual nuestra hipótesis se aceptó y cumplió debido a que se demostró que hay una diversidad de genotipos en la población estudiada; además, se observó que el sexo juega un papel importante en el aislamiento de estos serovares, así como se pudo analizar que el serovar F predominó en hombres el D en mujeres y el serovar E en ambos sexos. También se concluyó que los patógenos concomitantes de mayor prevalencia fueron *Ureaplasma*, *Mycoplasma* y *Haemophilus*. En síntesis, la vigilancia epidemiológica va más allá de la simple detección de CT para el desarrollo de medidas preventivas y disminuir las complicaciones sexuales y reproductivas.

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Con este proyecto de investigación se pretende demostrar que una prueba diagnóstica para CT debe identificar el tipo de serovar, para conocer la ecología de la infección en nuestra población y respaldar el desarrollo de vacunas, lo que será un acierto en el campo del desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas. Finalmente, este trabajo deriva en la necesidad de desarrollar técnicas moleculares para la detección de CT e identificación de serovar o genotipo en una sola reacción, abriendo brechas de oportunidad clínica y de vigilancia epidemiológica en la línea de investigación ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL.

LIMITACIONES

Las limitantes del proyecto principalmente fueron los recursos financieros; sin embargo, los hallazgos son impactantes y de aplicación clínica y experimental..

REFERENCIAS

Altamirano, m. a. (noviembre 2015). Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes microscopía óptica de campo claro . Instituto Potosino de investigacion cientifica y tecnologica A.C, 106 .

Al-Mously, N., & Eley, A. (2007). Interaction of Chlamydia trachomatis serovar E with male genital tract epithelium results in secretion of proinflammatory cytokines. Journal of medical microbiology, 56(Pt 8), 1025–1032. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47241-0>

Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

Butler, J. C. (n.d.). Compendium of Measures To Control Chlamydia psittaci Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis). CDC.

Brasiliense DM, Borges Bdo N, Ferreira WA. Genotyping and prevalence of Chlamydia trachomatis infection among women in Belem, Para, northern Brazil. J Infect Dev Ctries. 2016;10(2):134-7.

Bugalhão, J. N., & Mota, L. J. (2019). The multiple functions of the numerous *Chlamydia trachomatis* secreted proteins: the tip of the iceberg. *Microbial cell* (Graz, Austria), 6(9), 414–449. <https://doi.org/10.15698/mic2019.09.691>

Brunelle, B. W., & Sensabaugh, G. F. (2012). Nucleotide and phylogenetic analyses of the *Chlamydia trachomatis* ompA gene indicates it is a hotspot for mutation. *BMC research notes*, 5, 53. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-53>

Borges, V., Cordeiro, D., Salas, A. I., Lodhia, Z., Correia, C., Isidro, J., Fernandes, C., Rodrigues, A. M., Azevedo, J., Alves, J., Roxo, J., Rocha, M., Côte-Real, R., Vieira, L., Borrego, M. J., & Gomes, J. P. (2019). *Chlamydia trachomatis*: when the virulence-associated genome backbone imports a prevalence-associated major antigen signature. *Microbial genomics*, 5(11), e000313. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000313>

Czeyda-Pommersheim, F., Kalb, B., Costello, J., Liao, J., Meshksar, A., Arif Tiwari, H., & Martin, D. (2017). MRI in pelvic inflammatory disease: a pictorial review. *Abdominal radiology* (New York), 42(3), 935–950. <https://doi.org/10.1007/s00261-016-1004-4>

Chlamydia trachomatis in Heterosexual Men Who Report Cunnilingus. *Sex Transm Dis*. 2019 Jul;46(7):440-445. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000998. PMID: 31194715; PMCID: PMC6578585.

Cai, S., Pan, J., Duan, D., Yu, C., Yang, Z., & Zou, J. (2020). Prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, and *Neisseria gonorrhoeae* in

gynecological outpatients, Taizhou, China. Journal of clinical laboratory analysis, 34(2), e23072. <https://doi.org/10.1002/jcla.23072>

Deza, G., Martin-Ezquerro, G., Gómez, J., Villar-García, J., Supervia, A., & Pujol, R. M. (2016). Isolation of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae in urethral exudates from men with acute urethritis: a descriptive study of 52 cases. Sexually transmitted infections, 92(1), 29–31. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2015-052135>

Elizabeth Torrone, J. P. (26 de septiembre de 2014). CDC. Obtenido de centers for disease control and prevention :<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6338a3.htm>

Escobedo-Guerra, M. R., Katoku-Herrera, M., Lopez-Hurtado, M., Villagrana-Zesati, J. R., de Haro-Cruz, M. J., & Guerra-Infante, F. M. (2019). Identification of a new variant of Chlamydia trachomatis in Mexico. Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.), 37(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>

Ewig, C. C. (2011). Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. CDC.

Escobedo-Guerra, M. R., Katoku-Herrera, M., Lopez-Hurtado, M., Villagrana-Zesati, J. R., de Haro-Cruz, M. J., & Guerra-Infante, F. M. (2019). Identification of a new variant of Chlamydia trachomatis in Mexico. Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.), 37(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>

Eder, T., Kobus, S., Stallmann, S., Stepanow, S., Köhrer, K., Hegemann, J. H., & Rattei, T. (2017). Genome sequencing of *Chlamydia trachomatis* serovars E and F reveals substantial genetic variation. *Pathogens and disease*, 75(9), ftx120. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx120>

Escobedo-Guerra, M. R., Katoku-Herrera, M., Lopez-Hurtado, M., Villagrana-Zesati, J. R., de Haro-Cruz, M. J., & Guerra-Infante, F. M. (2019). Identification of a new variant of *Chlamydia trachomatis* in Mexico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed.), 37(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>

Faris, R., Andersen, S. E., McCullough, A., Gourronc, F., Klingelutz, A. J., & Weber, M. M. (2019). *Chlamydia trachomatis* Serovars Drive Differential Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines Depending on the Type of Cell Infected. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 399. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00399>

Gautam J, Krawiec C. *Chlamydia Pneumonia*. [Updated 2021 Jun 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560874/>

Guía de práctica clínica. (2009). Obtenido de diagnostico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria pelvica en mujeres mayores de 14 años con vida sexual activa: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/072_GP_C_EnfInfPelvica/ENF_INFLAMATORIA_PELVICA_R_CENETEC.pdf

Jennings LK, Krywko DM. Pelvic Inflammatory Disease. [Updated 2021 May 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499959/>

Kenneth J, R. C. (2017). microbiología médica. Mc Graw Hill.MD, G. W. (2016). Elsevier.

Kim, S. I., Yoon, J. H., Park, D. C., Lee, D. S., Lee, S. J., Choe, H. S., Kim, J. H., Park, T. C., & Lee, S. J. (2018). Co-infection Of Ureaplasma urealyticum And Human Papilloma Virus In Asymptomatic Sexually Active Individuals. International journal of medical sciences, 15(9), 915–920. <https://doi.org/10.7150/ijms.26523>

Lesiak-Markowicz, I., Schötta, A. M., Stockinger, H., Stanek, G., & Markowicz, M. (2019). Chlamydia trachomatis serovars in urogenital and ocular samples collected 2014-2017 from Austrian patients. Scientific reports, 9(1), 18327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54886-5>

Lesiak-Markowicz I, Schötta AM, Stockinger H, Stanek G, Markowicz M. Chlamydia trachomatis serovars in urogenital and ocular samples collected 2014-2017 from Austrian patients. Sci Rep. 2019 Dec 4;9(1):18327. doi: 10.1038/s41598-019-54886-5. PMID: 31798000; PMCID: PMC6892924.

Li, M., Zhang, X., Huang, K., Qiu, H., Zhang, J., Kang, Y., & Wang, C. (2017). Presence of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma spp., but not Neisseria gonorrhoeae and Treponema pallidum, in women undergoing an infertility

evaluation: high prevalence of tetracycline resistance gene tet(M). *AMB Express*, 7(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0510-2>

Mummert T, Gnugnoli DM. Ectopic Pregnancy. [Updated 2020 Nov 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539860/>

Mahony, J.B., Luinstra, K.E., Sellors, J.W. & Chernesky, M.A. (1993). Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J Clin Microbiol* 31, 1753-1758

Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* (Oxford, England), 24(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>

Magdaleno-Tapial, J., Valenzuela-Oñate, C., Giacaman-von der Weth, M. M., Ferrer-Guillén, B., Martínez-Domenech, Á., García-Legaz Martínez, M., Ortiz-Salvador, J. M., Subiabre-Ferrer, D., & Hernández-Bel, P. (2019). Haemophilus Species Isolated in Urethral Exudates as a Possible Causative Agent in Acute Urethritis: A Study of 38 Cases. Aislamiento de Haemophilus spp. en exudados uretrales como posible agente etiológico de uretritis aguda: estudio de 38 casos. *Actas dermo-sifiliograficas*, 110(1), 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2018.09.003>

Ngandjio, A., Clerc, M., Fonkoua, M. C., Thonnon, J., Lunel, F., Bébéar, C., Bianchi, A., & de Barbeyrac, B. (2004). Restriction endonuclease patterns of the omp1 gene of reference *Chlamydia trachomatis* strains and characterization of isolates from Cameroonian students. *Journal of medical microbiology*, 53(Pt 1), 47–50. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05333-0>

Nakashima, K., Shigehara, K., Kawaguchi, S., Wakatsuki, A., Kobori, Y., Nakashima, K., Ishii, Y., Shimamura, M., Sasagawa, T., Kitagawa, Y., Mizokami, A., & Namiki, M. (2014). Prevalence of human papillomavirus infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., and *Ureaplasma* spp. *BMC infectious diseases*, 14, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-43>

O'Connell, C. M., & Ferone, M. E. (2016). *Chlamydia trachomatis* Genital Infections. *Microbial cell* (Graz, Austria), 3(9), 390–403. <https://doi.org/10.15698/mic2016.09.525>

Philips, T. R. (2019, diciembre 23). Bacterial Load of *Chlamydia trachomatis* in the Posterior Oropharynx, Tonsillar Fossae, and Saliva among Men Who Have Sex with Men with Untreated Oropharyngeal Chlamydia. *Journal of clinical microbiology*.

Philips, T. R. (2019, diciembre 23). Bacterial Load of *Chlamydia trachomatis* in the Posterior Oropharynx, Tonsillar Fossae, and Saliva among Men Who Have Sex with Men with Untreated Oropharyngeal Chlamydia. *Journal of clinical microbiology*.

Queremel Milani DA, Jialal I. Urinalysis. [Updated 2021 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557685/>

Rakhmatulina, M. R., Boldyreva, M. N., Lipova, E. V., Chekmarev, A. S., & Galkina, I. S. (2019). *Urologiia* (Moscow, Russia: 1999), (6), 31–37.

Rawla, P., Thandra, K. C., & Limaiem, F. (2021). Lymphogranuloma Venereum. In StatPearls. StatPearls Publishing.

"Reacción en cadena de la polimerasa.". Encyclopedia Britannica. Britannica, T. E. (2019).

Radomski, N., Eienkel, R., Müller, A., & Knittler, M. R. (2016). Chlamydia-host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from Chlamydia psittaci. FEBS letters, 590(21), 3920–3940. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12295>

Stothard, D. R., Boguslawski, G. & Jones, R. B. (1998). Phylogenetic analysis of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. Infect Immun 66, 3618-3625

Tsevat, D. G., Wiesenfeld, H. C., Parks, C., & Peipert, J. F. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. American journal of obstetrics and gynecology, 216(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.08.008>

Vives, A., da Silva, G., Alonso-Tarrés, C., Suarez, J. B., Palmisano, F., & Cosentino, M. (2021). Haemophilus urethritis in males: A series of 30 cases. Revista internacional de andrologia, 19(3), 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.androl.2020.01.002>

Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J., & Linhares, I. M. (2017). Chlamydia trachomatis: The Persistent Pathogen. Clinical and vaccine immunology: CVI, 24(10), e00203-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00203-17>

Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J., & Linhares, I. M. (2017). Chlamydia trachomatis: The Persistent Pathogen. Clinical and vaccine immunology: CVI, 24(10), e00203-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00203-17>

Zarakolu, P., Çetik, S., İnkaya, A. Ç., & Ünal, S. (2019). HIV ile enfekte erkeklerde Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp. ve Mycoplasma spp. varlığının aranmasında İmmünokromatografik (İK) ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rt-PCR) testlerinin kıyaslanması [Comparison of immunochromatographic (IC) and real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) tests for screening Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp. and Mycoplasma spp. in HIV-infected men]. Mikrobiyoloji bulteni, 53(1), 37–42. <https://doi.org/10.5578/mb.67694>

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology, 7(1-2), 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>