



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE *Chamydia trachomatis* EN UNA COHORTE DE MUJERES INFECTADAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Edith Margarita Quiñónez Calvache

Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Biotecnología
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2016

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EN UNA COHORTE DE MUJERES INFECTADAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Edith Margarita Quiñónez Calvache

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

Sara Cecilia Soto De León, B.Sc., Dr. Sc.

Codirector:

Manuel Alfonso Patarroyo, M.D., Dr.Sc.

Línea de Investigación:

Biología Molecular

Grupo de Investigación:

Biología Molecular de Virus de Papiloma Humano

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Biotecnología

Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá, Colombia

2016

*A mi madre el pilar de mi vida, a mi padre el
cimiento de mis sueños...*

Agradecimientos

A mis padres, a mis hermanos a toda mi familia.

A mis Profesores.

A mi directora Sara Cecilia Soto-De León, A mi tutor Manuel Alfonso Patarroyo y mis compañeras del Laboratorio de HPV Milena Camargo Luisa Del Río-Ospina.

A Ricardo Sánchez por su colaboración en la el análisis estadístico.

A Marina Muñoz, Andrea Estefanía Ramos, Darwin Andrés Moreno Pérez, Johanna Forero and Diego Garzón por su colaboración en relación con el análisis experimental.

A mis compañeras de maestría a Natalie Castro y Mary Lilian Carabali Isajar

A todas las personas que me dieron su apoyo, especialmente mi amigo Wilmer Riascos Castañeda.

Agradezco al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional por haberme otorgado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría que complementan mi formación académica y profesional,

Además expreso mis más sinceros agradecimientos a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por haberme acogido y permitirme realizar mi trabajo de investigación, que culmina finalmente con esta tesis de maestría.

Resumen

Chlamydia trachomatis (C.t.) es el agente bacterial infeccioso más común de transmisión sexual en todo el mundo. La presencia de esta bacteria en el cuello uterino representa un riesgo en cuanto a la persistencia del VPH y desarrollo de cáncer cervical (CC). Las tasas de prevalencia de la infección por C.t. pueden variar de 2% a 17% en mujeres asintomáticas.

En este estudio, se determinó la presencia de C.t. en una cohorte de 219 mujeres infectadas con VPH. La frecuencia de C.t. se detectó mediante la amplificación de una secuencia del plásmido críptico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando dos juegos de cebadores: KL5/KL6 y KL1/KL2. Se utilizaron modelos de riesgo proporcional de Cox para evaluar la asociación entre la aparición de la infección y el conjunto de variables independientes estudiadas.

La frecuencia de C.t. en línea de base fue del 28% (n=61), presentándose con mayor frecuencia en mujeres con infecciones múltiples para VPH (77,42%), donde VPH-16 fue el principal tipo encontrado en coinfección (19,18%), seguido por el VPH-58 (17,81%). Se observó que las mujeres con mayor número de compañeros sexuales presentaron mayor riesgo de desarrollar infección por C.t. (HR = 6,44: 1,59 a 26,05 IC del 95%), así como aquellas con infecciones múltiples con VPH (HR = 2,85: 1,22-6,63 IC del 95%).

Este estudio involucra tres poblaciones heterogéneas socio-demográficamente de Colombia y proporciona datos sobre la epidemiología de la coinfección C.t./VPH, contribuyendo a la comprensión de la historia natural de la infección por C.t.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, frecuencia, prevalencia, Infección de Transmisión Sexual, Virus del Papiloma Humano -Alto Riesgo, ADN, PCR.

Abstract

Chlamydia trachomatis (C.t.) is the most common infectious bacterial agent of sexual transmission throughout the world. It has been shown that the presence of this bacteria in the cervix represents a risk regarding HPV persistence and, thereafter, in developing cervical cancer (CC). Prevalence rates may vary from 2% to 17% in asymptomatic females.

This study reports the identification of C.t. in a cohort of 219 HPV-infected Colombian females. C.t. infection frequency was detected by amplifying the cryptic plasmid sequence by polymerase chain reaction (PCR) using two sets of primers: KL5/KL6 and KL1/KL2. Cox proportional risk models were used for evaluating the association between the appearance of infection and the group of independent variables studied.

Base line C.t. infection frequency was 28% (n=61). Most females infected by C.t. were infected by multiple types of HPV (77.42%), greater prevalence occurring in females infected with HPV-16 (19.18%), followed by HPV-58 (17.81%). It was observed that females having had the most sexual partners (HR=6.44: 1.59-26.05 95%CI) or infection with multiple types of HPV (HR=2.85: 1.22-6.63 95%CI) had the greatest risk of developing *C. trachomatis*.

This study involves data regarding the epidemiology of C.t./HPV coinfection in three different population groups of Colombian females and contributes to the understanding the natural history of C.t. infection.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, frequency, prevalence, STI, High Risk- Human Papillomavirus, DNA, PCR.

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico.....	3
1.1 Generalidades de <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
1.1.1 Descripción del patógeno	3
1.1.2 Ciclo de vida	3
1.1.3 Plásmido críptico conservado	5
1.1.4 Factores de virulencia.....	6
1.1.5 Métodos de detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>	6
1.2 Importancia en la salud pública	7
1.2.1 Transmisión y síntomas de la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	8
1.2.2 Tratamiento de la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
1.2.3 <i>Chlamydia trachomatis</i> y VPH	9
1.2.4 Prevalencias en Latinoamérica de <i>Chlamydia trachomatis</i> VPH.....	10
2. Pregunta de Investigación y Justificación	11
2.1 Pregunta de Investigación	11
2.2 Justificación.....	11
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. Metodología	15
4.1 Población de Estudio.....	15
4.2 Consentimiento informado, fundamento ético, médico y legal	15
4.3 Obtención del Material Biológico	16
4.4 Caracterización Molecular de <i>Chlamydia trachomatis</i>	16
4.5 Análisis Estadísticos.....	17
5. Resultados y Discusión	21
5.1 Resultados	21
5.2 Discusión	29
6. Conclusiones y Recomendaciones.....	33
6.1 Conclusiones.....	33
6.2 Recomendaciones.....	34
Anexo 1: Consentimiento Informado	35
Anexo 2: Artículo Publicado	40

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Representación gráfica del ciclo de desarrollo bifásico de <i>Chlamydia trachomatis</i> (19).....	4
Figura 1-2: Representación Gráfica del Plásmido Críptico de C.t. (Adaptado de Thomas and Clarke, 1997 (22)).	5
Figura 1-3: Representación Gráfica MOMP (16).....	6
Figura 5-1: Porcentaje de mujeres infectadas con C.t. por visita.	22
Figura 5-2: Gráfico de infección.....	26
Figura 5-3: Gráfico de depuración.	26

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Sensibilidades y especificidades de las pruebas de detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> , traducido de Land <i>et al.</i> 2010 (30).....	7
Tabla 1-2: Cuadro de estudios de <i>Chlamydia trachomatis</i> en Latinoamérica.	10
Tabla 4-1: Cebadores utilizados para la amplificación de <i>Chlamydia trachomatis</i>	16
Tabla 5-1: Distribución de las características socio-demográficas y factores de riesgo	23
Tabla 5-1: Distribución de las características socio-demográficas y factores de riesgo (Continuación).....	24
Tabla 5-2: Modelo de Cox	28

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
C.t.	<i>Chlamydia trachomatis</i>
VPH	Virus del Papilloma Humano
OMS	Organización Mundial de la Salud
FIDIC	Fundación Instituto Inmunología de Colombia
VPH-AR	Virus del Papilloma Humano de Alto Riesgo
ITS	Infección de Transmisión Sexual
CC	Cáncer cervical
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
CE	Cuerpo Elemental
CR	Cuerpo Reticular
CIN	Neoplasia cervical intraepitelial, siglas en inglés de Cervical Intraepithelial Neoplasia
LGV	Linfogranuloma Venéreo
MOMP	Proteína Principal de la Membrana Externa, siglas en inglés de Major Outer Membrane Protein
LPS	Lipopolisacáridos
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ATP	Adenosina Trifosfato, siglas en inglés de Adenosine Triphosphate
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction
ORF	Marco abierto de lectura, siglas en inglés de Open Reading Frame
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
SD	Desviación Estándar, siglas en inglés de Standard Deviation
EIA	Inmunoensayo enzimático, siglas en inglés de Enzyme-Immuno Assay
DFA	Ensayo de anticuerpos de fluorescencia directa, siglas en inglés de Direct. Fluorescent Antibody
NAAT	Test de amplificación de ácidos nucleicos, siglas en inglés de Nucleic Acid amplification Test
CI	Intervalo de confianza, siglas en inglés de Confidence Interval
BSA	Albúmina sérica bovina, siglas en inglés de Bovine serum albumin
HR	Estimador de riesgo, siglas en inglés de Hazard Ratio
L-SIL	Lesiones intraepiteliales de bajo grado, siglas en inglés de low squamous intraepithelial lesion
H-SIL	Lesiones intraepiteliales de alto grado, siglas en inglés high squamous intraepithelial lesion
ASC-H	Células escamosas atípicas no excluyen H-SIL, siglas en inglés de Atypical Squamous Cells not exclude H-SIL
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, siglas en inglés de Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.

Introducción

Chlamydia trachomatis (C.t.) es una bacteria intracelular obligada, que puede infectar tanto tejido ocular como genital. Las infecciones por C.t. se relacionan con inflamación crónica, daños a los tejidos epiteliales y enfermedad inflamatoria pélvica. Al ser intracelular obligado, este patógeno puede persistir en el hospedero a pesar que se desencadene una respuesta inmune, produciendo así una enfermedad crónica, causando daño al tejido y afectando la capacidad del hospedero para depurar otras infecciones de transmisión sexual (ITS) (1, 2).

C.t. es el agente infeccioso bacteriano más común de transmisión sexual en todo el mundo (3, 4). La OMS estima que para el 2005, aproximadamente 98 millones de adultos estaban infectados con C.t. y anualmente ocurren 101 millones de nuevos casos de C.t. a nivel mundial (4, 5).

Las tasas de prevalencia pueden variar dependiendo de la población y el país evaluado, en Europa se reportan tasas de 2% a 17% en mujeres asintomáticas y en los centros de detección de ITS, las prevalencias evidenciadas para C.t. se encuentran alrededor del 15% (6). Para América latina se han reportado tasas en promedio rangos desde 4,7% hasta 20,7% (7-10) donde, al igual que en Europa, estos valores varían en función de la población estudiada. Para Colombia, se reporta un único estudio de cohorte llevado a cabo en la ciudad de Bogotá, donde se observó una prevalencia entre 6,9% y 9,5% en una población de mujeres infectadas con el VPH (7).

En Colombia, la prevalencia y determinantes de la infección por C.t. no han sido descritos ampliamente. Existen datos publicados por el Ministerio de Salud y Protección Social donde se indica que esta es la infección de transmisión sexual más prevalente, con diagnóstico de 1.538, 1.525 y 1.313 casos para los años 2009, 2010 y 2011 respectivamente (11).

La naturaleza asintomática de la infección por C.t., su persistencia a largo plazo y su capacidad de inducir inflamación crónica y metaplasia, han llevado a considerar a esta bacteria como un potencial cofactor en las infecciones de VPH de alto riesgo, ya que podría promover la persistencia del virus y/o potenciar la oncogenicidad del mismo (2). Adicionalmente, al inducir inflamación del tejido, se afecta la capacidad del hospedero de depurar las infecciones por VPH, contribuyendo a la persistencia viral e incrementando el riesgo de desarrollar lesiones de mal pronóstico (12).

Los tipos de alto riesgo de VPH son considerados como los agentes etiológicos principales de neoplasia cervical (13). Sin embargo, sólo una porción de las mujeres infectadas por VPH progresan a un cáncer cervical invasivo, por lo que el desarrollo del mismo ha sido asociado a otros cofactores que actúan en conjunto con el VPH (14), como aquellos ligados al hospedero (hormonas endógenas, antecedentes genéticos, la respuesta inmune, entre otros), al virus (como la carga y la integración viral), así como otros factores como las infecciones concomitantes con otros agentes de transmisión sexual, entre ellos VIH y C.t. (15).

La importancia de estas infecciones en términos de salud pública hace necesaria la estimación de las frecuencias de coinfección entre el VPH y C.t. en mujeres con o sin lesiones cervicales (13), asociadas con posibles reinfecciones y el desenlace final de las mismas, teniendo en cuenta que la identificación de C.t., cuando existe coinfección con VPH, ha sido poco evaluada en nuestro país (7).

El objeto de este estudio fue determinar la frecuencia de C.t. en una población de mujeres infectadas con VPH que habitan en tres ciudades de Colombia (Bogotá, Chaparral y Girardot).

1. Marco teórico

1.1 Generalidades de *Chlamydia trachomatis*

1.1.1 Descripción del patógeno

Chlamydia trachomatis pertenece al género *Chlamydia*, familia *Chlamydiaceae*, orden *Chlamydiales*. Es una bacteria Gram negativa o Gram variable, de vida parasitaria intracelular obligada porque carece de habilidad para sintetizar ATP. Además no cuenta con la capa de peptidoglicano rígida y su núcleo denso central se rodea de una membrana citoplasmática y de una membrana externa de doble capa; no tiene vida libre y coloniza el citoplasma de las células. Estas bacterias presentan una morfología esférica u ovalada y se observan como cocos, son inmóviles, no ciliadas, poseen una membrana interna y otra externa, la cual se asemeja a la pared celular de las Gram negativas. Se dividen por fisión binaria y contienen ribosomas similares a los de otras bacterias (16, 17).

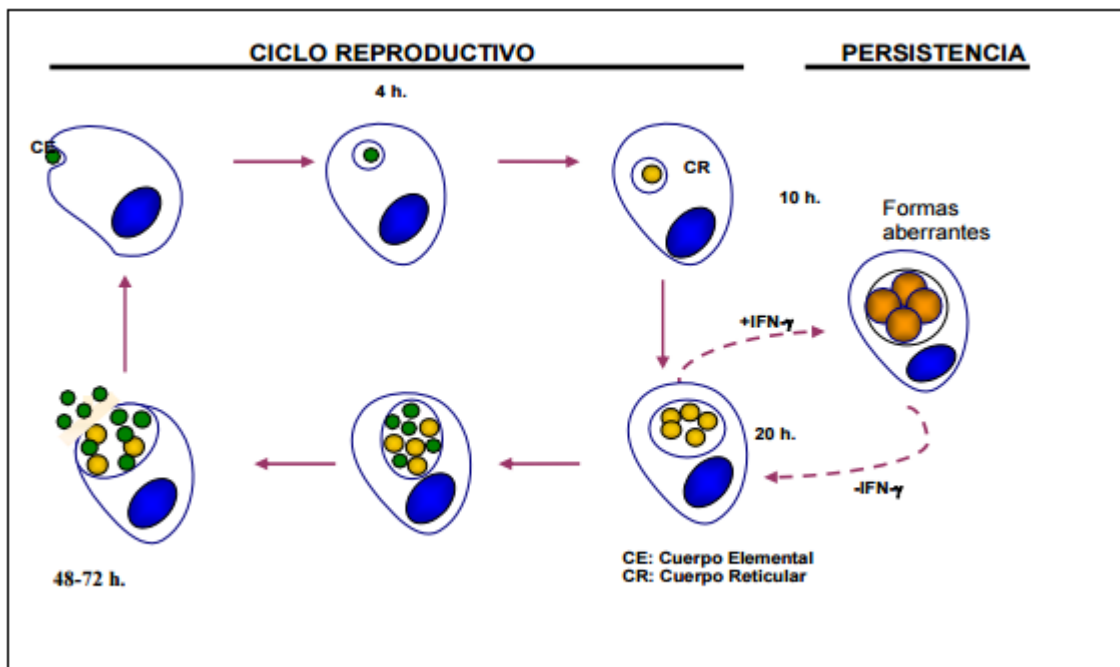
Por su condición de ser patógeno intracelular obligado, persiste en el hospedero después del desarrollo de una respuesta inmune, por lo que puede producir enfermedad crónica, causando daño tisular, afectando así la capacidad del hospedero de depurar otras infecciones como aquellas producidas por VPH (1, 2).

1.1.2 Ciclo de vida

C.t. presenta un ciclo biológico diferente a todas las bacterias, el cual está compuesto por la parte infecciosa, denominada cuerpo elemental (CE) y un cuerpo reticular (CR). El cuerpo elemental es resistente a factores ambientales adversos de forma semejante a una spora, con un diámetro de 0,2 a 0,4 μm . Los CE se liberan de las células del

hospedero al final del ciclo de infección e invaden nuevas células blanco. Una vez dentro de estas células, C.t. se transforma en cuerpos reticulares, cuyo diámetro es de 0,6 a 1,0 μm . Estos CR tienen actividad metabólica y se multiplican dentro de las vacuolas formadas por endocitosis en las células del hospedero (18).

Figura 1-1: Representación gráfica del ciclo de desarrollo bifásico de *Chlamydia trachomatis* (19).



La infección inicia por contacto del CE inactivo con la superficie apical del epitelio de la célula blanco. La interacción específica inicia los eventos de programación de C.t. y de sensibilización de la célula hospedera a la infección. Esta sensibilización es llevada a cabo para poder desarrollar la inclusión en la célula sana. Se desarrolla una única inclusión, en la que se retiene glicógeno, fuente extra de energía del patógeno, ya que éste no posee mitocondrias asociadas. Posteriormente, el microorganismo realiza una transformación a vacuola, lo que asegura el tránsito del cuerpo elemental inactivo hacia la vía exocítica. C.t. ingresa a un ciclo de desarrollo, con transiciones de CE a CR por fisión binaria, maduración de CR a CE y la posterior liberación del CE infeccioso (20).

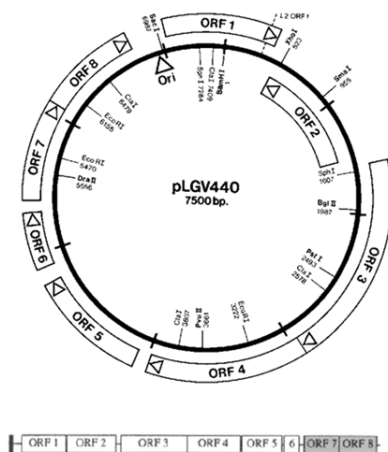
1.1.3 Plásmido críptico conservado

Con la excepción de un único aislado, todas las cepas humanas de *C.t.* reportadas contienen un plásmido conservado, pC.T., descrito previamente como pCHL1, pC.T.T1 y pLGV440; éste presenta una longitud aproximada de 7,5 kb y está compuesto por ocho grandes marcos abiertos de lectura (ORFs) (21).

El ORF1 y ORF 2 están involucrados en la replicación del plásmido, siendo más importante el ORF2 en este proceso (22). Se ha descrito en la literatura que el ORF 3 puede estar relacionado con el desenrollamiento del ADN de doble cadena durante la replicación (22, 23). La función de ORF 4 no está bien descrita (22). El ORF 5 codifica una proteína de 28 kDa, (pgp3); esta proteína puede ser un marcador para la infección por *C.t.* (24), sin embargo, el papel de pgp3 en el ciclo de vida de *C.t.* sigue siendo desconocido (22). El ORF 6 codifica para una proteína de 101-102 aminoácidos, cuya función se desconoce. El ORF 7, interviene en la regulación de repartición del número de copias plasmídicas en la bacterias hijas luego de la división (22). El ORF 8 es conservado y al parecer actúa junto con el ORF 7 en la misma función (21).

El plásmido críptico es utilizado como blanco de amplificación para las pruebas de diagnóstico basadas en ácidos nucleicos en la infección por *C.t.* (25, 26). Se encuentran aproximadamente de 7 a 10 copias del plásmido críptico por bacteria (25), éstos también han sido utilizados para desarrollar microarreglos de ADN (27).

Figura 1-2: Representación Gráfica del Plásmido Críptico de *C.t.* (Adaptado de Thomas and Clarke, 1997 (22)).

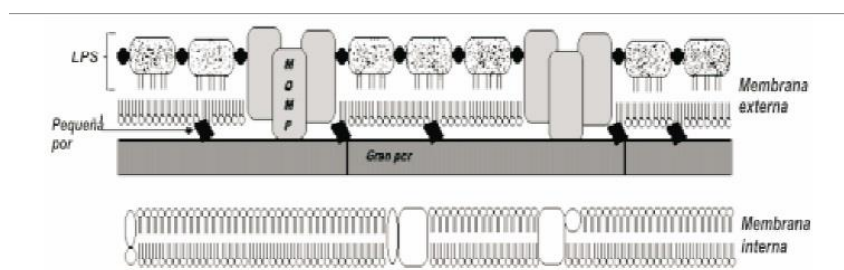


1.1.4 Factores de virulencia

Chlamydia trachomatis se ha clasificado en 19 serotipos de acuerdo a la especificidad de la proteína principal de membrana (MOMP): A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3, L3a (6). Los serotipos ocasionan diferentes tipos de enfermedades; los relacionados con el epitelio genital son los que van de la D a la K, incluyendo Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J; sin embargo, existe una enfermedad de transmisión sexual que presenta una diferencia significativa con respecto a los serotipos del epitelio genital mencionados, que es el linfogranuloma venéreo. Lo anterior se debe a que el LGV se extiende sistémicamente en los macrófagos y otros tipos de células hospederas a través de los ganglios linfáticos (28) y son los serotipos L1, L2 y L3 los que lo producen. Por otro lado, los serotipos A, B y C se relacionan con el epitelio ocular y producen tracoma (29).

Esta clasificación basada en el análisis de la proteína MOMP se basa en epítopes antigénicos que son sitios blanco para la serotipificación (16). En la bacteria C.t. se pueden identificar diferentes blancos para las pruebas de diagnóstico además de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) como los lipopolisacáridos (LPS), los plásmidos (ADN y ARN) y el cromosoma (ADN y ARN) (30).

Figura 1-3: Representación Gráfica MOMP (16).



1.1.5 Métodos de detección de *Chlamydia trachomatis*

Después de la detección de inclusiones de *Chlamydia* por tinción de Giemsa en 1907, los métodos de detección han mejorado con respecto a la sensibilidad, la especificidad, el tiempo por ensayo y estandarización en el laboratorio (30). La detección de C.t. se realiza comúnmente por medio de cultivos celulares, inmunoensayo (EIA por sus siglas en inglés: Enzyme-Immuno Assay EIA), ensayos de anticuerpos de fluorescencia directa (Direct Fluorescent Antibody, DFA), y el test de amplificación de ácidos nucleicos

(Nucleic Acid amplification Test, NAAT). Las características de las diferentes pruebas mencionadas disponibles en el mercado se resumen en la Tabla 1 – 1.

Tabla 1-1: Sensibilidades y especificidades de las pruebas de detección de *Chlamydia trachomatis*, traducido de Land *et al.* 2010 (30).

Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Límite de detección (no. org.)
NAAT	90-95	>99	1-10
DFA	80-85	>99	10-500
EIA	60-85	99	500-1000
DNA-probe	75-85	>99	500-100
Cell Culture	50-85	100	5-100
POC	25-55	>90	>10000

De las metodologías existentes en la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más sensible y satisfactoria en aplicaciones relacionadas con la microbiología clínica. En particular, en el caso de patógenos a los que se les atribuye ser agentes causales de infecciones clínicas como lo es el caso de C.t. (31). Diversas publicaciones aportan diferentes protocolos usando metodologías de detección de C.t. sola o en confección con otros patógenos por medio de PCR (2, 7, 13, 24, 32-35).

1.2 Importancia en la salud pública

Actualmente la infección por C.t. representa la ITS más prevalente a nivel mundial, siendo identificada como un importante problema de salud pública. En el mundo, la OMS estima que se producen aproximadamente 100 millones casos nuevos por año de la infección por C.t (15). En los EE.UU. durante el año 2006, el CDC informó más de un millón de casos de infección por C.t, lo que corresponde a una tasa de 347,8 casos /100 000 habitantes, un incremento del 5,6% en comparación con la tasa del año 2005 (6).

En América latina, la intervención actual para la detección y tratamiento de la *Chlamydia trachomatis* no se acompaña de programas de tamización que garanticen la detección de la infección en estadios tempranos o asintomáticos (36). Además, C.t. se ha asociado con diferentes secuelas adversas en la reproducción tales como la infertilidad de origen tubárico y la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) (1), afectando la salud de miles de mujeres.

Colombia no es un país ajeno a este panorama latinoamericano y existen pocos estudios relacionados con C.t. En el año 2003 (7), se llevó a cabo un estudio que incluyó una población de mujeres residente en la capital, por lo que la situación real en términos epidemiológicos y de salud pública en el resto del país es desconocida.

1.2.1 Transmisión y síntomas de la infección por *Chlamydia trachomatis*

La transmisión se da principalmente durante el sexo vaginal, oral o anal con una pareja infectada. Se forman inclusiones intra-citoplasmáticas de la célula del hospedero y se generan cuerpos infecciosos elementales. Tanto hombres como mujeres con C.t. pueden tener flujo genital anormal o dolor leve en la micción, durante la primera a tercera semana de exposición. Generalmente, la infección es asintomática y la mayoría de casos ocurre en la población femenina (70%) (7, 37).

La enfermedad puede no ser diagnosticada y tratada hasta que se desarrollen complicaciones. La infección ascendente desde el cérvix produce enfermedad pélvica inflamatoria, mientras tanto durante la gestación conduce a la ruptura prematura de membranas, carioamniotitis, parto prematuro, infección puerperal e infección neonatal. Mujeres en gestación pueden transmitir la infección a sus hijos durante el parto, ocasionando infección ocular o neumonía neonatal (20).

Dentro de las secuelas de la infección por C.t., se encuentran la EPI, el embarazo ectópico, la infertilidad de origen tubárico, la epididimitis, proctitis y la artritis reactiva. Así mismo, C.t. es un cofactor con el virus de papiloma humano en la génesis del cáncer de cuello uterino (3, 7, 37).

1.2.2 Tratamiento de la infección por *Chlamydia trachomatis*

Los medicamentos más utilizados son azitromicina 1 gramo en una sola toma, doxiciclina 200 mg por día durante 7 días, eritromicina 500 mg cuatro veces al día, durante 7 días, u ofloxacina 300 mg dos veces por día, durante 7 días (38). Es posible que un grupo de pacientes no llegue a completar el tratamiento con doxiciclina, por lo que en estos casos se aseguraría mejor el tratamiento con azitromicina (39).

Las gestantes pueden ser tratadas con azitromicina, eritromicina o amoxicilina sin perjuicio de sus productos de concepción (40). En las gestantes con posible resistencia a C.t., se sugiere iniciar el tratamiento con amoxicilina 500 mg 3 veces por día, durante 7 días, seguida de una dosis única de 1 g de azitromicina, lo que resulta en una estrategia costo-efectiva (41).

1.2.3 *Chlamydia trachomatis* y VPH

El virus del papiloma humano (VPH) ha sido identificado como la principal causa del cáncer cervical (CC) (2). Los estudios recientes de la etiología del CC tienen como objetivo identificar los factores que pueden influir en la susceptibilidad por la progresión de la infección por VPH a neoplasia cervical o cáncer cervical invasivo. Esta identificación de cofactores en el desarrollo de CC ha relacionado las coinfecciones con otras ITS, donde se ha observado que C.t. puede ser un importante cofactor del VPH en el desarrollo de la carcinogénesis cervical (1).

Estudios de cohorte demuestran que la infección por *Chlamydia trachomatis* es un factor de riesgo tanto para la infección primaria como para la infección persistente por VPH (42-44). Adicionalmente, se ha demostrado que esta bacteria tiene una actividad citotóxica que predispone al epitelio cervical a la infección por VPH. Investigaciones recientes sugieren que las infecciones por C.t. y VPH pueden tener una vía oncogénica común en el tejido cervical, dado que tienen una modulación similar en la expresión de genes como el supresor tumoral caveolina-1 y el oncogén c-myc (45).

Una infección previa por C.t. se asocia con infecciones subsecuentes derivadas de los tipos de VPH de alto riesgo (20). La infección por C.t. puede jugar un rol importante facilitando la entrada de VPH de alto riesgo y su persistencia, probablemente como

consecuencia de la inflamación crónica inducida por la bacteria, además de la resistencia a la apoptosis de las células con infecciones persistentes (2).

Se ha descrito una asociación moderada entre una infección por C.t. recurrente y la infección por VPH, donde la asociación entre estos dos agentes patógenos genera una potenciación mutua, ya que comparten una ruta común de transmisión. Sin embargo, la información actual disponible sobre este tema es controvertida y discordante, dado que el papel de C.t. en la historia natural de la infección por VPH no es suficientemente claro aún (2).

1.2.4 Prevalencias en Latinoamérica de *Chlamydia trachomatis* VPH

Tabla 1-2: Cuadro de estudios de *Chlamydia trachomatis* en Latinoamérica.

País	Criterios de selección	Población	Prevalencia <i>Chlamydia trachomatis</i>		Referencia
Manaus-AM Brasil	Muestras aleatorias en mujeres (otorgadas por: Institute of Dermatology and Venereology and the Institute of Tropical Medicine in Manaus)	121 (Rango edades 14 y 63 años)	20,7 %	80% de los casos positivos fueron encontrados en el grupo ≤ 23 años	(8)
Bogotá Colombia	Muestras de mujeres activas sexualmente (las muestras fueron otorgadas por: Colombian National Institute of Cancer and the International Agency for Research on Cancer (IARC))	1829 (Rango edades 18-44 años)	5,0%	Las prevalencias más altas (7,9 %) fueron encontrada en mujeres de edades entre 30 - 34 años, seguido del grupo >25 años con una prevalencia de 6,5%	(7)
Región Metropolitana Chile	Origen y edad. Muestras de mujeres pacientes control de Papanicolaou, contracepción, planificación, consulta rutina (las muestras fueron otorgadas por servicio de ginecología hospital San José, General Science centro ginecológico privado, centro de medicina reproductiva de adolescentes (CEMERA))	403 (Rango edades 15 - 46)	4,7%	Las mayores prevalencias (8,3%, 7,3% respectivamente) se presentaron en el grupo de mujeres de 21-26 años y adolescentes	(9)
Maracaibo Venezuela	Mujeres sexualmente activas. (Muestras Otorgadas por dos centros de salud de carácter privado del municipio de Maracaibo, Estado Zulia)	168 (Rango edades 18-46)	7,7%	El grupo de pacientes de 18 - 28 años exhibió la más alta prevalencia, 13,7%	(10)

2.Pregunta de Investigación y Justificación

2.1 Pregunta de Investigación

¿Cuál es la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en una cohorte de mujeres infectadas con VPH en línea de base, pertenecientes a diferentes poblaciones de Colombia?

2.2 Justificación

Mundialmente, la coinfección bacteriana de C.t. en mujeres con antecedentes de VPH ha sido estudiada como un potencial factor que contribuye al desarrollo de enfermedades malignas y cáncer de cuello uterino (3).

Autores alrededor del mundo, han sugerido que las mujeres positivas para C.t. se encuentran en un riesgo mayor para el desarrollo de cáncer de cuello uterino además de otras enfermedades y recalcan la importancia de realizar una detección temprana dado las repercusiones que tiene este patógeno en la salud pública general, como por ejemplo las que afectan la salud la salud sexual y reproductiva en las mujeres (20, 46).

Para la detección de C.t., la literatura recomienda según su naturaleza asintomática y de difícil diagnóstico (7, 37), métodos con una alta sensibilidad y especificidad como el uso de la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (2, 13).

En Colombia, la prevalencia y los factores determinantes de la infección por C.t. y su asociación a infecciones por VPH, aún no se han descrito completamente. La identificación de los tiempos de infección, persistencia y depuración de C.t son datos importantes para estimar poblaciones en riesgo de desarrollar cáncer cervical.

Bajo esta perspectiva, conocer en una población de mujeres infectadas por VPH el estado de infección por C.t. por medio de la identificación molecular (PCR), es un avance en el conocimiento de estas frecuencias y un punto de partida para ahondar en la información disponible en nuestro país sobre las dinámicas de coinfección, que pueden afectar gravemente a la población.

Es por esto que, en este estudio, se evaluó una cohorte de mujeres provenientes de diferentes regiones del país, a la cual se le hizo la determinación de la frecuencia de C.t. y se identificaron las variables que describen asociaciones entre C.t. y VPH. De esta manera, se aportan datos de frecuencias para ampliar el conocimiento de la epidemiología de C.t. en Colombia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en una cohorte de mujeres colombianas infectadas por VPH.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Describir la población de la cohorte de estudio.
- II. Identificar por biología molecular *Chlamydia trachomatis* en las muestras de mujeres infectadas con VPH.
- III. Determinar la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en las mujeres de la cohorte de estudio para cada una de las visitas del seguimiento.
- IV. Establecer tiempos de duración de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la población de estudio.

4. Metodología

4.1 Población de Estudio

La población que se incluyó en este estudio fue de 219 mujeres con un rango de edades entre 17–71 años. Esta cohorte se estableció para la identificación de VPH y contempló toma de muestras cada 6 meses (\pm 3 meses), con un mínimo de tres seguimientos (47).

Las mujeres participantes en el estudio habitan en tres ciudades de Colombia: Bogotá, ciudad capital, la cual posee mayoritariamente población urbana; Chaparral: localizada en el departamento del Tolima, habitada principalmente por mestizos que llevan un estilo de vida sedentario y Girardot que pertenece al departamento de Cundinamarca, población de tipo turístico que ha presentado en estudios previos características intrínsecas de riesgo para infecciones por VPH (48).

4.2 Consentimiento informado, fundamento ético, médico y legal

Las mujeres que participaron en el estudio llevado a cabo por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), voluntariamente decidieron participar en el muestreo realizado entre abril del 2007 y Marzo del 2010, firmaron un consentimiento informado donde se les explicó los factores de riesgo asociados a los exámenes y toma de muestras. Para las mujeres menores de 18 años de edad, se requirió su asentimiento y la firma del padre o tutor.

Todos los procedimientos fueron aprobados por los comités de ética de los hospitales participantes en el estudio: Hospital de Engativá Nivel II (en Bogotá), Hospital San Juan Bautista (en Chaparral, en el departamento de Tolima) y Nuevo Hospital San Rafael (en Girardot, en el departamento de Cundinamarca).

4.3 Obtención del Material Biológico

La obtención del material biológico se tomó de las muestras de cepillado cervical recogidas a partir de la toma de la citología, las cuales se conservaron a la temperatura de almacenamiento (-20°C). Las muestras fueron procesadas y el ADN extraído según las técnicas previamente estandarizadas y publicadas por el grupo de Biología Molecular de VPH de la FIDIC (47).

4.4 Caracterización Molecular de *Chlamydia trachomatis*

Se realizó la determinación de C.t. a todas las muestras proporcionadas por las 219 mujeres participantes en el estudio, tanto para línea de base, como para los diferentes seguimientos que completaron.

La detección de C.t. en las muestras se llevó a cabo por medio de la amplificación a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de una secuencia del plásmido críptico del microorganismo. Se utilizaron dos juegos de cebadores previamente reportados en la literatura, denominados KL5/KL6 (49, 50) y KL1/KL2 (2, 8, 51), los cuales amplifican 350pb y 241pb del fragmento multicopia del plásmido críptico conservado, respectivamente (Tabla 4 – 1). Las reacciones con cada uno de los juegos de cebadores se llevaron a cabo por separado, simultáneamente para cada muestra.

Tabla 4-1: Cebadores utilizados para la amplificación de *Chlamydia trachomatis*

Región	Cebadores	Secuencia
pLGV440	KL5	5'- TTT GCC TTA ACC CCA CCA TT-3'
	KL6	5'- CGT CCT TCC TAA AAG AGC TA -3'
pLGV440	KL1	5'- TCC GGA GCG AGT TAC TAA GA -3'
	KL2	5'- AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT -3'

Las condiciones de las amplificaciones se escogieron y ajustaron de acuerdo a las metodologías descritas para la detección de C.t. (2, 8, 13, 51). Para cada amplificación,

se utilizó como control positivo la cepa ATCC UW-36/Cx (ATCC® VR-886D™) de C.t. y como control de reactivos, agua libre de ADN (agua grado biología molecular). Las PCR para cada juego de cebadores, fueron llevadas a cabo a un volumen final de 20 μ L, usando 3 μ L de muestra de ADN, con aproximadamente 900 ng de ADN.

Para KL5 y KL6, las condiciones de reacción fueron: Buffer Bioline (KCl, Tris HCl pH=8,3) 1X; 3mM MgCl₂; 1,25mM Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs); 20 pmol de cada cebador; 1,25 mM de Taq DNA polymerase (5U/ μ L) (Bioline®). El perfil térmico para este juego de cebadores fue llevado a cabo mediante un ciclo inicial a 94° C por 5 minutos; 35 ciclos constituidos de: 1 minuto a 93° C; 1 min a 56,8° C, 1 min a 72° C y la extensión final fue llevada a cabo mediante un ciclo a 72° C durante 10 minutos.

Para KL1 y KL2 las condiciones de reacción fueron: Buffer Bioline (KCl, Tris HCl pH=8,3) 1X; 3mM MgCl₂; 1,25mM Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP); 20 pmol de cada cebador; 1,25 mM de Taq DNA polymerase (5U/ μ L) (Bioline). El perfil térmico para este juego de cebadores fue llevado a cabo mediante un ciclo inicial a 94° C por 5 minutos; 35 ciclos constituidos de: 1 minuto a 93° C; 1 min a 55° C, 1 min a 72° C y la extensión final fue llevada a cabo mediante un ciclo a 72° C durante 10 minutos.

Al agua grado biología molecular utilizada en la reacciones de PCR se le agregó BSA, (Bovine serum albumin) a una concentración de 0,8 μ g/ μ L. Este aditivo se utilizó para incrementar la eficiencia de la PCR, ya que actúa como una proteína captadora de iones y de otros inhibidores de la polimerasa como la melanina (52).

4.5 Análisis Estadísticos

Se determinó la frecuencia de infección por C.t. en cada una de las visitas de seguimiento de la cohorte de estudio. Para la descripción de las variables continuas se utilizaron medias junto con sus correspondientes medidas de dispersión (desviación estándar). Las variables categóricas se expresaron en términos de frecuencias y proporciones.

Se evaluó la asociación entre presencia de infección y un grupo de variables categóricas, la cuales fueron: fumar, ciudad, etnia, edad de la primera relación sexual, número de

compañeros sexuales, método de planificación familiar, presencia de infecciones de transmisión sexual (ITS), número de hijos, historia de abortos, coinfecciones con VPH-AR, VPH16, VPH18, VPH31, VPH45, VPH33, VPH58, número de tipos de VPH infectantes, citología (Negativo, ASC-H, ASC-US, LIE-BG, LIE-AG), colposcopia (Negativo, LIE-BG, LIE-AG, Sugestiva, Insatisfactoria); utilizando pruebas χ^2 (x^2) y test exacto de Fisher, dependiendo de las características de las tablas de contingencia.

Se definió como infección por C.t. el hallazgo positivo por cualquiera de los dos juegos de cebadores en cualquier momento del estudio. Se definió depuración como la ausencia de detección de C.t. por ambos juegos de cebadores tras un hallazgo positivo en la visita previa. Se definió persistencia como la presencia de la infección en dos visitas consecutivas. La coinfección se definió como la presencia simultánea de infecciones por C.t. y VPH, mientras que la coexistencia de dos o más tipos de VPH fue definida como infección múltiple. Estas definiciones se utilizan de acuerdo a lo establecido en estudios previos (53-55).

Para este estudio de cohorte se definieron dos subpoblaciones, la primera con las pacientes que no inician la cohorte infectadas con C.t. (para evaluar incidencia de infección) y la segunda subpoblación fue establecida con las mujeres que presentan infección desde el inicio (para evaluar la depuración). Con los tiempos de seguimiento se estimaron funciones de supervivencia de Kaplan-Meier para cada uno de los desenlaces (infección o depuración).

Se estimaron tasas de infección (para las que iniciaron sin C.t) y depuración (para las que iniciaron infectadas) según la información obtenida. Se calculó el tiempo en meses transcurrido desde el inicio del seguimiento hasta el evento (infección o depuración). Los casos en los que no se presentó evento y se terminó el seguimiento, se manejaron como censuras a la derecha para fines del análisis de supervivencia.

Para evaluar la asociación entre aparición de infección y un grupo de variables independientes como raza, fumar, edad de la primera relación sexual, método de planificación familiar, número de compañeros sexuales, edad, número de hijos, presencia de infecciones de transmisión sexual (ITS) y coinfecciones con VPH-AR, se utilizaron

modelos de riesgos proporcionales de Cox. Como inicio del riesgo se asumió el momento de inicio de la cohorte sin infección y con seguimiento hasta la presencia del evento infección, o terminación del estudio para las que nunca presentaron evento de infección lo que fue considerado como caso censurado.

La fuerza de la asociación entre las variables independientes y el riesgo de tener una infección se cuantificó mediante el uso del estimador de riesgo: hazard ratio (HR).

Para los estimadores se reportaron intervalos de confianza (IC) al 95%. Las pruebas de hipótesis se manejan con un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0,05$) e hipótesis a dos colas. STATA 12® se utilizó para todos los análisis estadísticos.

5.Resultados y Discusión

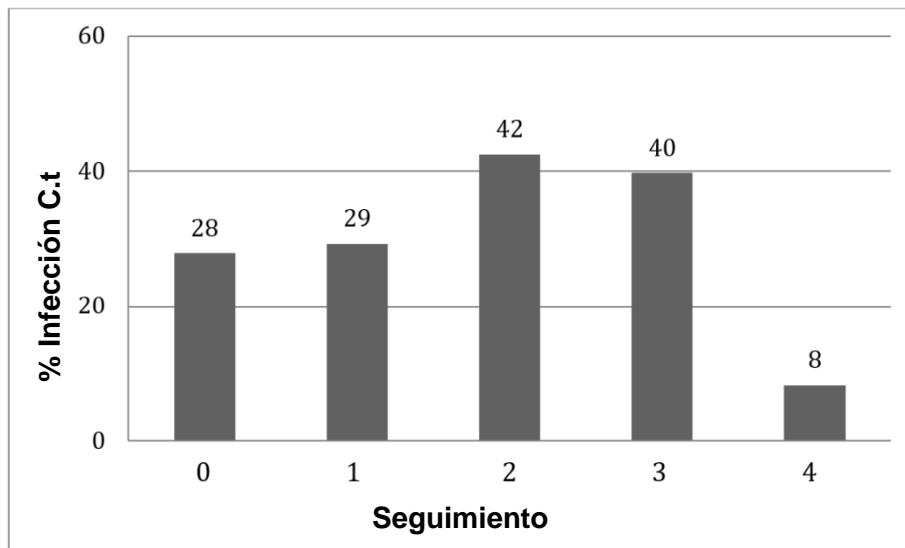
5.1 Resultados

Se analizaron muestras cervicales de 219 mujeres que inician la cohorte infectadas con VPH de alto riesgo (VPH-16, -18, -31, -33, -45 y -58) a las cuales se les realizaron seguimientos cada 6 meses con un intervalo de 3 a 9 meses (± 3). Todas las mujeres tuvieron como mínimo tres visitas, sin embargo, algunas presentaron 5 visitas (n=49). Los análisis se hicieron sobre la base del hallazgo de la infección por C.t. en la visita cero o visita de línea de base. En esta visita, se encontraron 57 mujeres que tuvieron identificación positiva para C.t., mientras que 157 no presentaron C.t.

De las 219 mujeres, 68 pertenecen a la población bogotana y 151 pertenecen a la categoría “otra ciudad”. El 59,68% (n=37) de las mujeres infectadas con C.t. al inicio de la cohorte reside en una población fuera de Bogotá. En la Tabla 5 – 1 se describen las variables sociodemográficas, clínicas y factores de riesgo de la información suministrada al inicio del seguimiento, según el estado de infección por C.t.

Las frecuencias más altas se obtuvieron en la visita de seguimiento 2, donde se presentó el mayor número de mujeres infectadas por C.t. (Figura 5 – 1). En este seguimiento, se presentaron porcentajes de infección de 42%, seguido por el seguimiento tres con 40%.

En el grupo que presentó infección positiva por C.t, la proporción de mujeres con infecciones con múltiples tipos de VPH (77,42%) fueron mayores que aquellas que presentaban infecciones únicas por VPH (22,58%).

Figura 5-1: Porcentaje de mujeres infectadas con C.t. por visita.

En lo que se refiere a los diferentes tipos de VPH-AR, se encontró que el tipo VPH-16, está presente en la mayoría de las mujeres de la cohorte con un porcentaje de 71,97% respecto al total de población, seguido por los tipos -18 (56,69%), -45 (51,59%), -58 (38,85%), -31 (33,12) y -33 (7,64%).

En lo que se refiere a la coinfección de C.t. y los diferentes tipos de VPH-AR, se encontró que el tipo VPH-16 presenta el porcentaje más alto con 67,74% respecto al total de población, seguido por los tipos -58 (62,90%), -31 (48,39%), -18 (43,55%), -45 (22,58%) y -33 (3,23%), siendo este último escasamente encontrado en coinfección con C.t.

Tabla 5-1: Distribución de las características socio-demográficas y factores de riesgo

		Identificación de <i>Chlamydia trachomatis</i>				P
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
Ha fumado	No	117	84,78	50	89,29	0,42
	Si	21	15,22	6	10,71	
Ciudad	Bogotá	43	27,39	25	40,32	0,062
	Otra	114	72,61	37	59,68	
Etnia	Blanca	3	1,91	0	0	0,606
	Indígena	1	0,64	1	1,61	
	Mestiza	151	96,18	61	98,39	
	Negra	2	1,27	0	0	
Edad primera relación sexual	<=18	112	71,34	38	61,29	0,149
	>18	45	28,66	24	38,71	
No. de compañeros sexuales	1	77	49,04	25	40,98	0,057
	2-3	56	35,67	18	29,51	
	>3	24	15,29	18	29,51	
Método de planificación familiar	Sin Método	69	43,95	28	45,90	0,957
	Hormonal	17	10,83	6	9,84	
	Otro	71	45,22	27	44,26	
ITS	VIH	1	0,65	0	0	0,789
	Ninguna	124	80,52	48	78,69	
	Otra	29	18,83	13	21,31	
No. de hijos	0	8	5,10	3	4,92	0,495
	1 - 2	82	52,23	36	59,02	
	3 - 4	59	37,58	17	27,87	
	>4	8	5,10	5	8,20	
Abortos	No	93	62	38	64,41	0,746
	Si	57	38	21	35,29	
Infecciones Múltiples VPH	No	38	24,20	14	22,58	0,799
	Si	119	75,80	48	77,42	

Tabla 5-2: Distribución de las características socio-demográficas y factores de riesgo (Continuación)

		Identificación de <i>Chlamydia trachomatis</i>				P
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
VPH-16	No	44	28,03	20	32,26	0,535
	Si	113	71,97	42	67,74	
VPH-18	No	68	43,31	35	56,45	0,079
	Si	89	56,69	27	43,55	
VPH-31	No	103	66,88	32	51,61	0,079
	Si	51	33,12	30	48,39	
VPH-45	No	76	48,41	48	77,42	0,000
	Si	81	51,59	14	22,58	
VPH-33	No	145	92,36	60	96,77	0,359
	Si	12	7,64	2	3,23	
VPH-58	No	96	61,15	23	37,10	0,001
	Si	61	38,85	39	62,90	
Numero de tipos de VPH infectantes	1	38	24,20	14	22,58	0,119
	2	34	21,66	22	35,48	
	3	54	34,39	12	19,35	
	4	18	11,46	11	17,74	
	5	9	5,73	2	3,23	
	6	4	2,55	1	1,61	
Citología ^a	Negativa	551	94,67	287	93,79	0,76
	ASC-H	1	0,17	0	0,00	
	ASC-US	14	2,41	6	1,96	
	L-SIL	15	2,58	12	3,92	
	H-SIL	1	0,17	1	0,33	
Colposcopia	Negativa	477	89,66	259	90,88	0,296
	L-SIL	53	9,96	23	8,07	
	H-SIL	1	0,19	2	0,70	
	Sugestiva	0	0,00	1	0,35	
	Insatisfactoria	1	0,19	0	0,00	

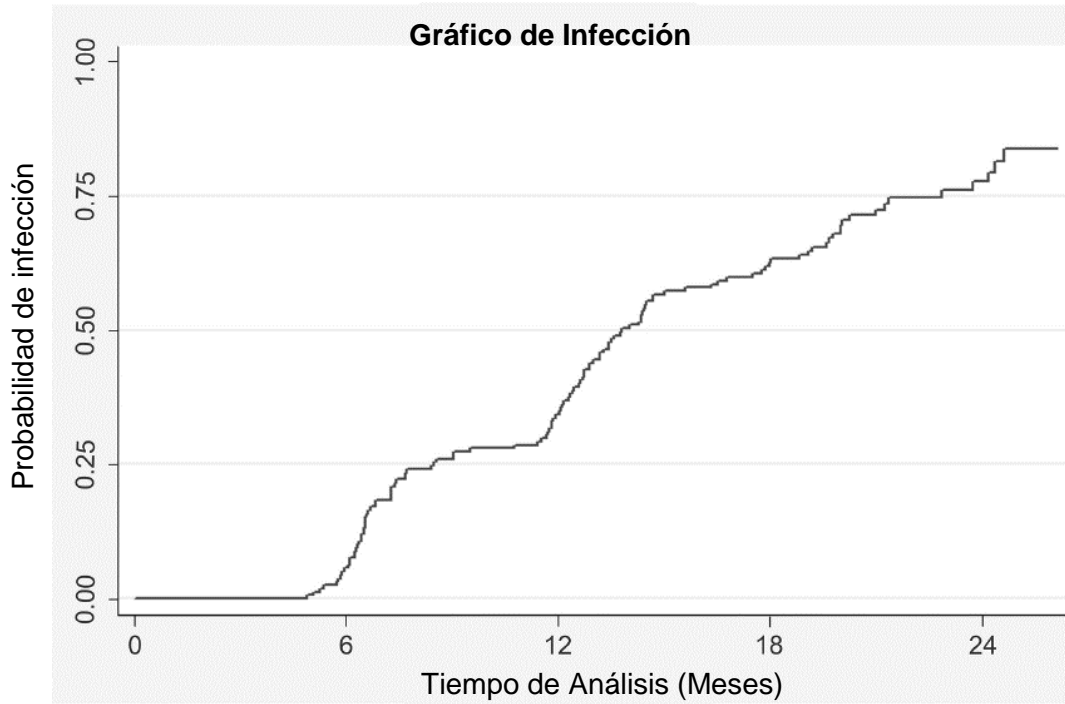
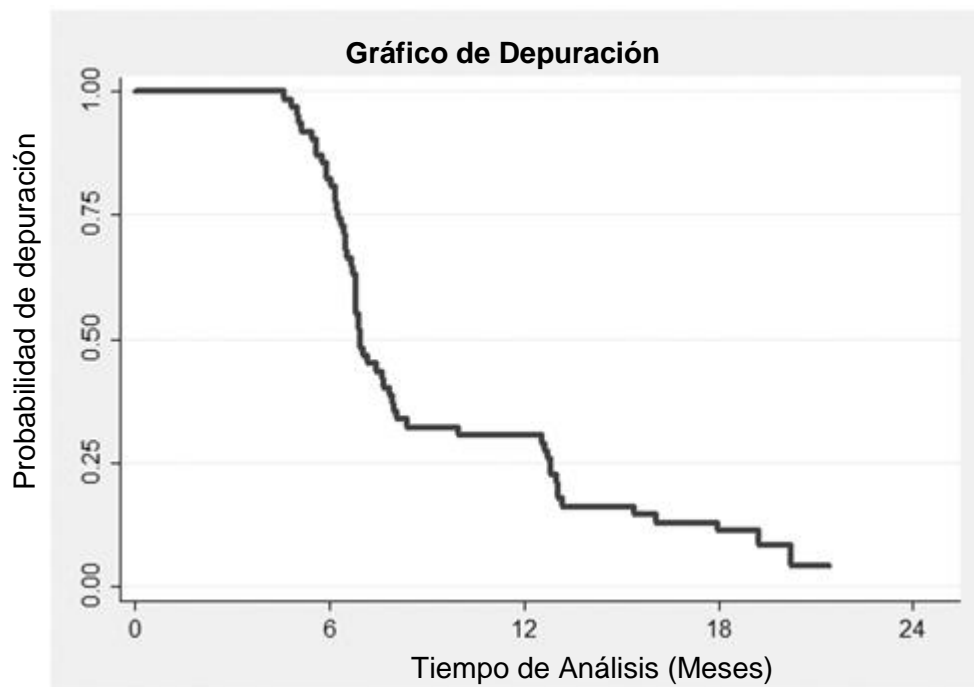
Nota: ^a ASC-H: células escamosas atípicas no excluyen H-SIL; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; L-SIL: Lesiones de bajo grado; H-SIL: Lesiones de Alto grado.

Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones infectadas por C.t. y aquellas sin infección para las mujeres infectadas con VPH-AR 45 y 58. Para el tipo específico de VPH-AR 45 la correlación respecto a la coinfección con C.t. es negativa y esta misma correlación para el tipo específico VPH-AR 58 es positiva.

Para las mujeres que iniciaron sin infección, el tiempo total que aportaron a la cohorte del estudio fue de 2.281 meses. De estas mujeres, el 74,52 % (n=117) se infectaron con C.t. en algún momento del seguimiento (2 años aproximadamente). La tasa de infección fue 5,1 por cada 100 personas en un mes (4,27 - 6,14 95% CI).

La Figura 5 – 2 muestra la probabilidad del riesgo de adquirir la infección durante todo el período de seguimiento para el grupo de mujeres en la cohorte que comenzó sin tener la infección por C.t.. En esta figura se observa que a los seis meses de estudio aproximadamente el 25 % de las mujeres que inician infectadas con VPH se infectan con C.t., y a los 12 meses aproximadamente el 50 % resulto infectada por C.t.

Por su parte, la imagen de la Figura 5 – 3 muestra la probabilidad de depurar la infección por C.t. en el tiempo, donde se observa que aproximadamente seis meses después de iniciar la cohorte estudiada, las mujeres que inician infectadas con C.t. depuran la infección.

Figura 5-2: Gráfico de infección.**Figura 5-3:** Gráfico de depuración.

Con respecto a las mujeres que iniciaron con infección, el tiempo total que aportaron a la cohorte del estudio fue de 587 meses en riesgo, con una tasa de depuración de 9,7 por cada 100 personas en un mes (7,48 – 12,58 95% CI). Durante el desarrollo de este estudio, 8,06% (n=5) de las mujeres de las que iniciaron infectadas no depuraron la infección.

En la línea base la frecuencia de infección por C.t. fue del 28% (n=61). Los porcentajes de identificación de C.t. con cada juego de cebadores en los datos de línea base fueron 85% (n=52) para KL1/KL2, 29% (n=18) con KL5/KL6. Se calculó el límite de detección por cada juego de cebadores donde KL1/KL2 detectó menores cantidades de DNA de C.t. (48,2 µg/µL) comparada con el juego de cebadores KL5/KL6 (57,6 µg/µL).

En este estudio, se analizaron diferentes variables asociadas al riesgo de infección por C.t., las variables incluidas en el análisis fueron: la raza, el hábito de fumar, la edad de la primera relación sexual, el método de planificación, el número de compañeros sexuales, la edad, el número de hijos, la relación de coinfección de C.t. con infecciones múltiples por VPH y la presencia o ausencia de otras enfermedades de transmisión sexual.

Se observó que las mujeres que tienen mayor número de compañeros sexuales (HR = 6,44: 1,59 – 26,05 95% CI) y coinfección de C.t. con múltiples tipos de VPH (HR = 2,85: 1,22 – 6,63 95% CI), presentaron mayor riesgo en el desarrollo de la infección por C.t. (Tabla 5 – 3).

Por otra parte, se observó en esta cohorte que las mujeres cuyo método de planificación era de tipo hormonal (HR = 0,33: 0,13 – 0,79 95% CI) presentaron una reducción en el riesgo de infección por C.t., comparado con aquellas que no utilizan algún método anticonceptivo (Tabla 5 – 3).

Tabla 5-3: Modelo de Cox

Factores de riesgo de infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>			
		HR (95%CI) ^a	P
Raza	Mestiza	Referencia	0,343
	Otra	1,71 (0,56-5,22)	
Ha fumado	No	Referencia	0,110
	Si	0,26 (0,04-1,35)	
Edad primera relación sexual	<=18	Referencia	0,345
	>18	1,26 (0,77-2,06)	
Método de planificación familiar	Sin Método	Referencia	0,013
	Hormonal	0,33 (0,13-0,79)	
	Otro	0,85 (0,52-1,38)	
No. de compañeros sexuales	1	Referencia	0,221
	2-3	2,11 (0,63-7,00)	
	>3	6,44 (1,59-26,05)	
Edad	<=35	Referencia	0,804
	36-45	0,92 (0,50-1,68)	
	>45	0,52 (0,26-1,04)	
No. de hijos	0	Referencia	0,455
	1-2	1,29 (0,43-3,85)	
	>3	1,54 (0,49-4,79)	
Coinfección con tipos de VPH-AR	=1	Referencia	0,738
	2-4	0,90 (0,51-1,60)	
	>4	2,85 (1,22-6,63)	
ITS	1	Referencia	0,168
	2	0,63 (0,33-1,20)	

Nota: Valores en negrita = $p < 0.05$. ^a Hazard ratio (HR) ajustado para: fumar, ciudad, etnia, edad de la primera relación sexual, número de compañeros sexuales, método de planificación familiar, presencia de infecciones de transmisión sexual (ITS), número de hijos, historia de abortos, coinfecciones con VPH-AR, VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-45, VPH-33, VPH-58, Número de Tipos de VPH infectantes, citología (Negativo, ASC-H, ASC-US, LIE-BG, LIE-AG), coloscopia (Negativo, LIE-BG, LIE-AG, Sugestiva, Insatisfactoria).

5.2 Discusión

El estudio realizado en un grupo de 219 mujeres con un rango de edades entre 17–71 años, mostró que la estimación de la frecuencia de C.t. en la cohorte de mujeres infectadas por VPH en la línea de base perteneciente a diferentes poblaciones de Colombia fue de 28%. Estos datos son superiores a los reportados en estudios realizados en países como Italia, donde el 17% de las muestras examinadas presentaban coinfección C.t./VPH (56) y en Argentina, que reporta porcentajes del 16,3% (2). En Colombia, el estudio realizado por Molano *et al.* (2003) en mujeres residentes en Bogotá, reportó porcentajes inferiores a lo encontrado en este estudio, siendo de 6,9% para las mujeres que presentaban coinfección con cualquier tipo de VPH y de 9,5% para mujeres con infección múltiple (coinfección por C.t. y múltiples tipos de VPH) (7).

La identificación de una mayor frecuencia que la reportada en otros estudios se justifica bajo dos factores importantes: el primero es que esta cohorte representa una población en riesgo, ya que todas las mujeres comienzan la cohorte con infección por VPH, por lo que esta población puede presentar comportamientos de riesgo para la adquisición de infecciones de transmisión sexual. Por otra parte la metodología utilizada en este trabajo implicó la identificación de C.t. utilizando una técnica altamente sensible y reportando positividad por la identificación por cualquiera de los dos juegos de cebadores, lo que amplía la oportunidad de encontrar muestras positivas. Previamente se ha reportado el uso individual de cada uno de los juegos de cebadores utilizados para este estudio en muestras de mujeres infectadas con VPH, donde se reportan frecuencias de 13% para KL5/KL6 y 34,9% para KL1/KL2 (2, 35).

El hallazgo de mayor riesgo de desarrollar C.t. con el aumento en el número de compañeros sexuales, puede observarse en estudios, tanto para Chlamydia, como lo descrito para para casi todas las enfermedades de transmisión sexual (57-59). El hecho de presentar mayor número de compañeros sexuales involucra un comportamiento sexual de riesgo, lo cual puede facilitar el contagio de más de un tipo de microorganismo y dificultar las depuraciones de las infecciones (3, 13, 46, 60, 61).

Otro factor relevante que se encontró fue la infección múltiple con diferentes tipos de VPH-AR, lo cual ya ha sido descrito en otros países de América Latina (13, 35, 62). El

incremento del riesgo puede ser biológicamente explicado por estudios que muestran que la infección por C.t. favorece la entrada y la persistencia de múltiples tipos de VPH-HR, lo que conduce a la integración viral, la sobreexpresión de los oncogenes E6 / E7 y la transformación celular (63). Teniendo en cuenta la patogenia de la C.t y el daño tisular que se produce en las infecciones crónicas, este epitelio puede ser afectado por varios tipos de virus de VPH, dando como resultado infecciones múltiples, lo cual se observó en este estudio. Esto fue reportado en un estudio previo donde se encuentra detección múltiple de los genotipos VPH-16 y -18 (61).

En lo referente a la coinfección C.t. y los diferentes tipos de VPH-AR, se encontró que tipos como VPH-16 y -18 son los más frecuentes, similar a lo reportado en una población de mujeres aborígenes en el norte de Argentina (15). Sin embargo, en poblaciones diferentes como la Egipcia, se encontró que los tipos VPH-18 y -52 son los más frecuentes (61). Según estos datos, podría sugerirse que existen posibles factores genéticos que pueden modular esta asociación, o que depende de la distribución tipo específica de VPH en la región analizada, sin embargo, haría falta más estudios en población infectada con VPH para dilucidar estas diferencias.

La confección más común en la cohorte estudiada fue de C.t. con el VPH-AR tipo 16. Se ha reportado en la literatura que la infección por C.t. mejora la expresión de la proteína Ki67, la cual es un marcador de proliferación celular del epitelio cervical, así como también lo hacen las infecciones por VPH, especialmente la causada por el tipo 16 (15). Adicionalmente, se ha observado que la infección por C.t. aumenta la expresión de VPH-16 en CIN I, lo que sugiere una modulación por parte de C.t. de la actividad viral. Por otra parte, la infección por C.t. aumenta la expresión de EGFR y TGF-alfa, lo cual hace pensar que C.t. puede promover la carcinogénesis cervical a través de diferentes mecanismos (64).

La segunda frecuencia de infección más alta de este estudio se presentó en las mujeres infectadas con VPH-AR de tipo 58. Lo anterior puede tener relación con el patrón que sigue la distribución de las infecciones múltiples por VPH en nuestra población. Reportes previos han mostrado que VPH-58 y -45 están generalmente presentes en infecciones múltiples (47).

En nuestra cohorte de estudio, se puede observar que al cabo de seis meses aproximadamente, una cuarta parte las mujeres infectadas con VPH ya presentaban infección por C.t. y al transcurrir un año de seguimiento, la mitad de la población resultaba infectada. Por otro lado, la mitad de la población de mujeres que inician infectadas requirió de un tiempo aproximado de seis meses para depurar la infección. Este resultado concuerda con un estudio previo realizado en Bogotá, en el cual se encontró que 54% de las mujeres infectadas que no recibieron tratamiento, resolvieron la infección en un año.

Datos de C.t. en mujeres asintomáticas infectadas en Amsterdam muestran una tasa de depuración espontánea del 44,7% por persona / año. Sin embargo, esta investigación reportó que la duración de la infección genital causada por C.t. no ha sido completamente dilucidada. No obstante, los estudios disponibles a largo plazo sugieren que la infección por C.t. sin tratamiento puede durar un año o más, antes de que se lleve a cabo la depuración por parte del hospedero (55, 65).

En este estudio se encontró que las mujeres de la cohorte que utilizan un método hormonal de planificación, presentan menor riesgo de desarrollar infección por C.t. Lo anterior está soportado por estudios previos realizados en modelos animales, donde concluyen que el estradiol disminuye la susceptibilidad a la infección por C.t. intrauterina en un modelo con ratas (66). Otros autores han reportado que el uso de anticonceptivos orales está asociado con una mayor tasa de depuración de la infección por C.t. (54).

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

El estudio mostró que la estimación de la frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en una cohorte de mujeres infectadas con VPH en línea de base, pertenecientes a diferentes poblaciones de Colombia fue de 28%, este valor es más alto a lo reportado por la literatura en un estudio similar realizado en nuestro país y se puede explicar debido a que la población de la cohorte estudiada se define como una población de alto riesgo, dado que todas las participantes seleccionadas inician infectadas con ITS.

El análisis de la cohorte estudiada muestra que las frecuencias más altas se obtuvieron en la visita de seguimiento 2, donde se presentaron los niveles más altos de infección por C.t, con porcentajes de infección de 42%, seguido por la visita del seguimiento tres con 40%; para el seguimiento 1, se obtuvo 29% y el seguimiento cuatro 8%.

De acuerdo a la evaluación de la asociación entre presencia de infección y las variables categóricas de distribución de las características socio-demográficas de este estudio, se determinó que las variables que representan factores de riesgo para el desarrollo de la infección por C.t. son: tener un número mayor de compañeros sexuales y presentar más de cuatro tipos de VPH infectantes. También se observó que la variable Método de planificación hormonal se presenta como factor de protección.

Se observó que, al cabo de seis meses, aproximadamente una cuarta parte las mujeres infectadas con VPH ya presentaban infección por C.t. y al transcurrir un año de seguimiento, la mitad de la población resultaba infectada. Por otro lado, la mitad de la población de mujeres que inician infectadas, requirió de un tiempo aproximado de seis meses para depurar la infección.

El estudio permitió aportar datos importantes sobre la epidemiología de la infección por C.t./VPH en tres grupos poblacionales de mujeres colombianas y aportar al conocimiento de la historia natural de la infección causada por C.t.

6.2 Recomendaciones

Debemos considerar que este trabajo estudió una cohorte de mujeres con VPH, se recomienda realizar la investigación de C.t. en una población de mujeres que no estén infectadas con este virus, para poder correlacionar estadísticamente las frecuencias en estos dos grupos y así conocer los valores de frecuencias de la infección por C.t. en Colombia. Determinar los tipos de C.t. y realizar el análisis en pacientes con hallazgos citológicos, permitiría establecer si la relación de los dos agentes se da por una potenciación mutua, más que con el hecho de que comparten una ruta de transmisión común.

Actualmente en Colombia, la cantidad de estudios de frecuencias y de seguimiento sobre la historia natural de la infección por C.t. es muy baja, y es necesario realizar un mayor número de investigaciones para poder conocer más acerca de epidemiología, de la transmisión, eliminación, complicaciones y factores de riesgo asociados a la infección por C.t.

A. Anexo 1: Consentimiento informado para tomar muestras de las mujeres del estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

No. _____

Para participar en el proyecto:
“DESARROLLO DE UN PLAN DE MANEJO PARA EL CONTROL DEL CÁNCER DE CÉRVIX”

Desarrollado por:
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA (FIDIC)

DETECCIÓN MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN CÉLULAS CERVICALES

Este formulario de consentimiento informado está diseñado para ser aplicado a mujeres que hayan iniciado su vida sexual, a las cuales se les invita a participar en el proyecto.

Es importante que lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- a. La participación en este estudio es totalmente voluntaria, está en libertad de retirar su consentimiento para el uso de los datos y las muestras en cualquier momento.
- b. La naturaleza de esta investigación, el propósito, las limitaciones, riesgos e inconvenientes, además de cualquier información pertinente al resultado de la prueba, les serán explicadas por el equipo de atención (personal capacitado y autorizado por el proyecto).
- c. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quienes con mucho gusto, le contestaran sus preguntas.
- d. **CONFIDENCIALIDAD:** Toda la información que usted nos brinde será de carácter confidencial y para propósitos exclusivos de la *Línea de Investigación de Epidemiología Molecular*, de manera que solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Los resultados de éste estudio ingresarán a la base de datos y serán confidenciales. Su nombre no será usado en ninguna parte de este estudio. Los registros médicos derivados serán archivados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y se emplearán con fines exclusivos de

la *Línea de Investigación de Epidemiología Molecular*. Si la información derivada del estudio se publica o se presenta en reuniones científicas, no se usará ningún tipo de información personal, en su lugar se utilizarán códigos.

- e. Este estudio se clasifica como una “**Investigación con riesgo mínimo**” y se cumplirá con las normas establecidas por el Ministerio de protección social colombiano (Resolución 008430 de 1993).
- f. Los datos recopilados durante la ejecución del proyecto son de carácter personal y por lo tanto estarán bajo la Ley 1581 de 2012, Decreto 1377 de 2013, de Protección de datos personales. Adicionalmente, estos no serán empleados para otros fines sin el consentimiento del titular del dato, serán conservados por el tiempo requerido para la investigación y no serán entregados a terceros sin autorización.
- g. El estudio sigue los lineamientos jurídicos y éticos contemplados en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (“Principios éticos para la investigación que involucra sujetos humanos”).

SOLO INGRESARÁ AL ESTUDIO LA PERSONA QUE FIRME ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO. SE LE RECUERDA QUE SU PARTICIPACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA.

INFORMACIÓN AL PACIENTE

Justificación y objetivos de la investigación

El Cáncer de Cérvix (CC) ocupa el primer lugar en mortalidad en países como el nuestro. El examen disponible para detectar esta enfermedad es la citología cervical, que permite identificar anomalías en el cérvix. Sin embargo, en Colombia el uso de citología cervical no ha reducido la mortalidad por CC.

El VPH es el agente causal del CC, las infecciones persistentes por VPH de alto riesgo están relacionadas con el desarrollo de lesiones cervicales. En la actualidad se están empleando técnicas de biología molecular que permiten la detección de este virus incluso antes de que se produzcan anomalías celulares.

Su participación en este estudio le permitirá beneficiarse con la detección de este virus. El resultado de esta prueba será tenido en cuenta por su médico tratante para la toma de decisiones clínicas. Su participación en este estudio es una generosa contribución al desarrollo de la ciencia y a la salud del país

Procedimiento

Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, se le solicitará llenar un cuestionario que recopila información socio-demográfica y comportamental, además de la donación de una (1) muestra de células cervicales (obtenida durante la toma de la citología cervical) para la detección del VPH.

Período de participación

Tiempo necesario para completar el cuestionario y la toma de la muestra cervical (*Aproximadamente 20 minutos*).

Riesgos

Este estudio se considera de bajo riesgo. La colecta de la muestra cervical no presenta molestias adicionales a la de la citología cervical.

Beneficios

Usted recibirá a través de su servicio de salud los resultados de los exámenes practicados.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Recibí una copia de las dos páginas de este formulario, las he leído (o me fueron leídas y/o traducidas), he entendido la información y me han respondido claramente las preguntas e inquietudes acerca de los asuntos relacionados con la investigación. Además, mi participación en este estudio es totalmente voluntaria y tengo el derecho de abandonarlo en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión me afecte a futuro. Por lo anterior, acepto participar voluntariamente en este estudio y a través de la firma de este documento declaro que aportaré la información y la muestra requerida.

Nombres

Completos _____

Dirección

Teléfono

Lugar y

Fecha _____

Firma del participante del estudio

Documento:

EXCLUSIVO PARA LA INCLUSIÓN DE PARTICIPANTES MENORES DE EDAD

Asentimiento para menores de edad

El presente estudio tiene como objetivo detectar el Virus de Papiloma Humano, agente causal del Cáncer de Cérvix en la muestra de cérvix que usted aportará.

Las dudas e interrogantes que surjan, pueden ser realizadas al personal encargado del proyecto, las veces que quiera y en cualquier momento del estudio. Además, si decide que no quiere completar el proceso, se respetará su decisión, sin que esto le traiga algún tipo de consecuencia.

Al firmar este documento se acepta como leído e indicara su participación en el estudio. Si no desea participar no lo firme.

Declara que acepta participar voluntariamente en este estudio?

Si _____ No _____

Firma de la participante del estudio

Documento:

Teléfono:

Consentimiento del representante legal de la menor de edad

Yo, _____ identificado con C.C.

No. _____ de _____, representante legal de la menor

_____ identificada con _____

No. _____; manifiesto que se ha obtenido su asentimiento y otorgo de manera voluntaria mi permiso para que se le incluya como sujeto de estudio en este proyecto. Declaro que recibí una copia de las tres páginas de este formulario, las he leído (o me fueron leídas y/o traducidas), he entendido la información y me han respondido claramente las preguntas e inquietudes acerca de los asuntos relacionados con la investigación. Además, soy consciente que la participación en este estudio de la menor de edad que represento, es totalmente voluntaria y tiene el derecho de abandonarlo en cualquier momento y por cualquier razón, sin que esta decisión afecte la atención médica futura.

Por lo anterior, estando en pleno uso de mis facultades y siendo responsable de la menor de edad, acepto su participación firmando este documento.

Apellidos y Nombres del Representante de la Menor

C.C.

Teléfono:

AUTORIZACIÓN PARA USO DE LA MUESTRA

Una vez procesada la muestra y realizada la prueba molecular, es posible que la muestra restante sea empleada en nuevos análisis. En este contexto, su aprobación para que la muestra sea preservada para nuevos estudios constituye un generoso aporte de su parte para el avance del conocimiento sobre CC.

Por lo anterior, sírvase marcar su decisión con respecto al manejo de la muestra restante y su posible utilización en estudios de investigación en un futuro:

Autorizo conservar el volumen restante y/o los productos obtenidos de la muestra que he aportado para estudios de investigación complementarios, colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista: (i) acuerdo interinstitucional entre las entidades participantes; (ii) aprobación por un comité de ética para la realización del estudio y (iii) se conserve en anonimato mis datos de identificación.

Si ____ No ____

Firma del participante del estudio
Documento:

Datos del Investigador que administra el consentimiento

Firma: _____

Nombre: _____

Cargo: _____

_____, día _____, del mes de _____, del año _____.

Si tiene cualquier pregunta acerca de este estudio puede comunicarse con el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) en Bogotá, al teléfono 3244671/72/73/74 extensión 132, y preguntar por las coordinadoras del proyecto de VPH.

B. Anexo 2: Artículo Publicado.

Bibliografía

References

1. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004;111(3):431-9. Epub 2004/06/29.
2. Deluca GD, Basiletti J, Schelover E, Vasquez ND, Alonso JM, Marin HM, et al. Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(6):567-72. Epub 2012/01/06.
3. Calil LN, Igansi CN, Meurer L, Edelweiss MI, Bozzetti MC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):126-31. Epub 2011/04/20.
4. WHO. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis. Methods and results used by WHO to generate 2005 estimates [Internet]. 2005 07/06/2015 [cited 2015 12/11/2015]. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502450eng.pdf>.
5. 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. Epub 2014/12/10.
6. Bebear C, de Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(1):4-10. Epub 2009/02/18.
7. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morre SA, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogota, Colombia. *Sex Transm Infect*. 2003;79(6):474-8. Epub 2003/12/10.
8. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(2):91-5. Epub 2003/09/10.
9. Martinez TM, Reid SI, Arias C, Napolitano RC, Sandoval ZJ, Molina CR. [Prevalence of cervical infection by Chlamydia trachomatis among Chilean women living in the Metropolitan Region]. *Rev Med Chil*. 2008;136(10):1294-300. Epub 2009/02/06. Prevalencia de infección cervical por Chlamydia trachomatis en mujeres de la Region Metropolitana.

10. Arraiz N, Marcucci R, Colina S, Reyes F, Rondon N, Bermudez V, et al. [Chlamydia trachomatis infection in females consulting health centres in Maracaibo, Venezuela]. Rev Salud Publica (Bogota). 2008;10(4):615-24. Epub 2009/04/11. Infeccion por Chlamydia trachomatis en mujeres consultantes en Maracaibo, Venezuela.
11. Gov. Situación de las Infecciones de Transmisión Sexual diferentes al VIH, Colombia 2009 - 2011. 2012 [cited 2015 11 agosto]; Available from: https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/monitoreo_evaluacion/1_vigilancia_salud_publica/a_situacion_epidemiologica/SITUACION%20DE%20LAS%20INFECCIONES%20DE%20TRANSMISION1.pdf.
12. Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Tornberg S, Hansson BG, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. Int J Cancer. 2005;116(1):110-5. Epub 2005/03/10.
13. Tavares MC, de Macedo JL, de Lima Junior SF, de Andrade Heraclio S, Amorim MM, de Mascena Diniz Maia M, et al. Chlamydia trachomatis infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. Mol Biol Rep. 2014;41(2):865-74. Epub 2014/01/08.
14. Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis. 2002;185(3):324-31. Epub 2002/01/25.
15. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. Arch Gynecol Obstet. 2014;289(4):715-23. Epub 2013/12/19.
16. Ostos OL, Sánchez RM. Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. NOVA. 2003;1(1):1794-2370.
17. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica In: Elsevier, editor. Microbiología de Murray 6ta Edición. Barcelona España: GEA Consultoria Editorial; 2009. p. 441-50.
18. Cervantes E. Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* Rev Fac Med UNAM. 2009;52(1):18 - 22
19. Alonso R, Galán J, Fernández JG, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Gámez SS. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. seimc, 2012.
20. Pacheco J. Infección por chlamydia trachomatis. Ginecología y Obstetricia. 1999;45(3):159 - 66.
21. Ricci S, Ratti G, Scarlato V. Transcriptional regulation in the Chlamydia trachomatis pCT plasmid. Gene. 1995;154(1):93-8. Epub 1995/02/27.
22. Thomas NS, Lusher M, Storey CC, Clarke IN. Plasmid diversity in Chlamydia. Microbiology. 1997;143 (Pt 6):1847-54. Epub 1997/06/01.
23. Hatt C, Ward ME, Clarke IN. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of Chlamydia trachomatis serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. Nucleic Acids Res. 1988;16(9):4053-67. Epub 1988/05/11.

24. Comanducci M, Manetti R, Bini L, Santucci A, Pallini V, Cevenini R, et al. Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun*. 1994;62(12):5491-7. Epub 1994/12/01.
25. 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(3):231-6. Epub 1992/05/01.
26. Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, Marsh P, Barron A, Bignell A, et al. Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics*. 2009;10:239. Epub 2009/05/23.
27. Westin L, Miller C, Vollmer D, Canter D, Radtkey R, Nerenberg M, et al. Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1097-104. Epub 2001/03/07.
28. Abdelsamed H, Peters J, Byrne GI. Genetic variation in Chlamydia trachomatis and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol*. 2013;8(9):1129-46. Epub 2013/09/12.
29. Lagergard T, Hadad R, Tunback P, Lindholm L, Lowhagen GB, Unemo M. Distribution of Chlamydia trachomatis ompA genovars and the new variant of C. trachomatis in the Goteborg area, Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(5):609-11. Epub 2010/03/03.
30. Land JA, Van Bergen JE, Morre SA, Postma MJ. Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update*. 2010;16(2):189-204. Epub 2009/10/16.
31. Mendez-Alvarez S, Perez-Roth E. [Multiplex PCR in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(3):183-91; quiz 92. Epub 2004/02/28. La PCR multiple en microbiologia clinica.
32. Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, Giuliani MM, Ricci S, Scarlato V, et al. Expression of a plasmid gene of Chlamydia trachomatis encoding a novel 28 kDa antigen. *J Gen Microbiol*. 1993;139(5):1083-92. Epub 1993/05/01.
33. Welsh LE, Quinn TC, Gaydos CA. Influence of endocervical specimen adequacy on PCR and direct fluorescent-antibody staining for detection of Chlamydia trachomatis infections. *J Clin Microbiol*. 1997;35(12):3078-81. Epub 1997/12/17.
34. Gaydos CA, Crotchfelt KA, Shah N, Tennant M, Quinn TC, Gaydos JC, et al. Evaluation of dry and wet transported intravaginal swabs in detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections in female soldiers by PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):758-61. Epub 2002/03/07.
35. de Paula FD, Fernandes AP, Carmo BB, Vieira DC, Dutra MS, Santos CG, et al. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and HPV infections in cervical samples with normal and abnormal cytopathological findings. *Diagn Cytopathol*. 2007;35(4):198-202. Epub 2007/03/14.
36. CAMACHO AM. NECESIDAD DE UN PROGRAMA DE TAMIZAJE PARA CHLAMYDIA TRACHOMATIS PARA COLOMBIA [Trabajo de Investigación]: Universidad Nacional de Colombia; 2012.

37. Pickett MA, Everson JS, Peard PJ, Clarke IN. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology*. 2005;151(Pt 3):893-903. Epub 2005/03/11.
38. Hillis SD, Coles FB, Litchfield B, Black CM, Mojica B, Schmitt K, et al. Doxycycline and azithromycin for prevention of chlamydial persistence or recurrence one month after treatment in women. A use-effectiveness study in public health settings. *Sex Transm Dis*. 1998;25(1):5-11. Epub 1998/01/23.
39. Augenbraun M, Bachmann L, Wallace T, Dubouchet L, McCormack W, Hook EW, 3rd. Compliance with doxycycline therapy in sexually transmitted diseases clinics. *Sex Transm Dis*. 1998;25(1):1-4. Epub 1998/01/23.
40. Adair CD, Gunter M, Stovall TG, McElroy G, Veille JC, Ernest JM. Chlamydia in pregnancy: a randomized trial of azithromycin and erythromycin. *Obstet Gynecol*. 1998;91(2):165-8. Epub 1998/02/20.
41. Hueston WJ, Lenhart JG. A decision analysis to guide antibiotic selection for Chlamydia infection during pregnancy. *Arch Fam Med*. 1997;6(6):551-5. Epub 1997/11/26.
42. Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2000;85(1):35-9. Epub 1999/12/10.
43. Hakama M, Luostarinen T, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Lehtinen M, et al. Joint effect of HPV16 with Chlamydia trachomatis and smoking on risk of cervical cancer: antagonism or misclassification (Nordic countries). *Cancer Causes Control*. 2000;11(9):783-90. Epub 2000/11/15.
44. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P, Leinonen M, Carter JJ, et al. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer*. 2007;120(3):650-5. Epub 2006/11/11.
45. Frontela M, Rodríguez Y, Ríos M, Hernández M. Chlamydia trachomatis: a cofactor in the etiology of cervical cancer. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 2014;40(1).
46. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angstrom T, Anttila T, Bergman F, et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer*. 2002;101(4):371-4. Epub 2002/09/05.
47. Soto-De Leon SC, Del Rio-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, Perez-Prados A, et al. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:395. Epub 2014/07/18.
48. Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Perez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann Epidemiol*. 2011;21(3):204-13. Epub 2011/02/08.

49. Cribb P, Scapini JP, Serra E. One-tube nested polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(6):897-900. Epub 2002/10/19.
50. Deluca GD, Alonso JM, Marin HM, Schelover E, Vicente A. Epidemiología molecular de *Chlamydia trachomatis* en las provincias de Chaco y Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y tecnológicas 2005 Resumen. 2005;M-016.
51. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Jang D, Chernesky MA. Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. J Clin Microbiol. 1992;30(9):2241-5. Epub 1992/09/01.
52. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol. 1996;62(3):1102-6. Epub 1996/03/01.
53. Joyner JL, Douglas JM, Jr., Foster M, Judson FN. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. Sex Transm Dis. 2002;29(4):196-200. Epub 2002/03/26.
54. Molano M, Meijer CJ, Weiderpass E, Arslan A, Posso H, Franceschi S, et al. The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. J Infect Dis. 2005;191(6):907-16. Epub 2005/02/18.
55. Geisler WM, Wang C, Morrison SG, Black CM, Bandea CI, Hook EW, 3rd. The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. Sex Transm Dis. 2008;35(2):119-23. Epub 2007/09/28.
56. Bellaminutti S, Seraceni S, De Seta F, Gheit T, Tommasino M, Comar M. HPV and *Chlamydia trachomatis* co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer. J Med Virol. 2014;86(11):1920-5. Epub 2014/08/19.
57. Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocencio 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. Epub 2011/09/22.
58. Castellsague X, Paavonen J, Jaisamrarn U, Wheeler CM, Skinner SR, Lehtinen M, et al. Risk of first cervical HPV infection and pre-cancerous lesions after onset of sexual activity: analysis of women in the control arm of the randomized, controlled PATRICIA trial. BMC Infect Dis. 2014;14:551. Epub 2014/01/01.
59. Gravningen K, Aicken CR, Schirmer H, Mercer CH. Meeting sexual partners online: associated sexual behaviour and prevalent chlamydia infection among adolescents in Norway: a cross-sectional study. Sex Transm Infect. 2015. Epub 2015/08/14.
60. de Abreu AL, Nogara PR, Souza RP, da Silva MC, Uchimura NS, Zanko RL, et al. Molecular detection of HPV and *Chlamydia trachomatis* infections in

Brazilian women with abnormal cervical cytology. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(6):1149-51. Epub 2012/11/07.

61. Girgis SA, Kassem NN, Eltohamy OA. Chlamydia trachomatis and Human Papilloma Virus (HPV) infection in Egyptian Patients with Invasive Cancer Cervix - A Case Control Study. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(6):937-49.

62. Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol.* 2005;96(1):181-6. Epub 2004/12/14.

63. Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjanen K, et al. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology.* 2008;51(4):230-4. Epub 2008/09/25.

64. Fischer N. Chlamydia trachomatis infection in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002;23(3):247-50. Epub 2002/07/04.

65. Gottlieb SL, Berman SM, Low N. Screening and treatment to prevent sequelae in women with Chlamydia trachomatis genital infection: how much do we know? *J Infect Dis.* 2010;201 Suppl 2:S156-67. Epub 2010/05/28.

66. Kaushic C, Zhou F, Murrin AD, Wira CR. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to Chlamydia trachomatis infection in the female reproductive tract. *Infect Immun.* 2000;68(7):4207-16. Epub 2000/06/17.