

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CEPA
CIRCULANTE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN ADOLESCENTES,
PANAMÁ 2016-2018.**

JESSICA LINETH GÓNDOLA ORTEGA

3-726-1402

**TESIS COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE MAESTRÍA

TRIBUNAL EXAMINADOR

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuente de vida, amor, sabiduría, gracia y favor. A mis padres por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años. A mi esposo, por su amor y por ser mi socio de vida. A mi familia por su motivación y siempre estar presente.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a Dios, por cada una de sus bendiciones, por ser mi guía y fortaleza para culminar una meta más. A mis padres, por ser mi mayor motivación, motores de cada uno de mis sueños, por sus consejos, valores y por siempre creer en mí. A mi esposo por todo su apoyo y paciencia para lograr este proyecto. A mis hermanos y sobrinos por su motivación y siempre estar allí para mí.

De manera especial a mi tutor de tesis, Dr. Alexander Martínez por su tiempo, confianza, que con su experiencia, conocimiento y paciencia me orientó en esta investigación. A cada uno de mis profesores por la enseñanza de sus valiosos conocimientos, hicieron que pueda crecer día a día como profesional, en especial a la Dra. Griselda Arteaga, directora del programa de maestría, por su motivación, dedicación y su infinita paciencia en alentarme a culminar este proyecto.

A mis compañeros de maestría y colegas de trabajo por su ayuda y conocimientos compartidos, a ustedes mi reconocimiento y gratitud.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEÓRICO	6
1.1 Generalidades de <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
1.1.1 Epidemiología.....	7
1.1.2 Descripción del patógeno	10
1.1.3 Clasificación	11
1.1.4 Plásmido Críptico	11
1.1.5 Ciclo de vida	13
1.2 Presentaciones clínicas	15
1.3 Tratamiento	17
1.4 Métodos de detección.....	19
1.4.1 Ensayos específicos	19
1.4.2 Ensayos no específicos	21
1.4.3 Pruebas de puntos de atención rápida (POC)	21
1.4.4 Serológicas.....	22
1.5 Importancia de la vigilancia molecular	22
1.5.1 Monitorear la introducción de nuevas cepas (tipificación).....	22
1.5.2 Identificar el surgimiento de nuevas variantes	23
1.5.3 Vigilancia de posible emergencia de resistencia terapéutica.....	25
1.5.4 Identificación de mutaciones en los genes rplD, rplV, ARNr 23S y su asociación con resistencia a macrólidos	26
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA.....	29
2.1 Hipótesis de trabajo	30
2.2 Objetivos	30
2.3 Descripción del tipo de estudio	30
2.4 Selección y tamaño de muestra:	31
2.5 Criterios de inclusión:	31
2.6 Criterios de exclusión:.....	31
2.7 Reactivos	31

2.8 Materiales	32
2.9 Procedimientos	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
RESULTADOS	51
3.1 Datos demográficos	51
3.2 Calidad de lectura de las secuencias	55
3.3 Análisis filogenéticos y genotipos circulantes	56
3.4 Presencia de mutaciones descritas.....	58
DISCUSIÓN.....	63
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
ANEXOS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de las lecturas, cobertura y profundidad de las secuencias	56
Cuadro 2. Distribución geográfica de genotipos encontrados.	56
Cuadro 3. Resultado de genotipos encontrados y mutaciones en los genes rplD y rplV...	59

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1: Estimación de ITS curables.....	8
Figura 2: Estimación de las ITS curables por región y sexo.....	9
Figura 3: Conformación del plásmido de Chlamydia.	12
Figura 4: Desarrollo del ciclo de vida de <i>C. trachomatis</i>	14
Figura 5: Nueva variante de <i>C. trachomatis</i>	24
Figura 6. Esquema del filtrado y selección de muestras analizadas.	52
Figura 7. Muestras utilizadas para la determinación de la variabilidad genética.....	52
Figura 8. Imágenes de electroforesis en gel de agarosa.....	53
Figura 9. Mapa de distribución geográfica de muestras secuenciadas	54
Figura 10. Distribución de muestras secuenciadas según sexo.	54
Figura 11. Árbol filogenético obtenido del análisis de una región del gen ompA.	57
Figura 12. Alineamiento de secuencias del gen ARNr 23S.....	60
Figura 13. Mutaciones encontradas en las secuencias de San Miguelito.....	61
Figura 14. Mutaciones encontradas en las secuencias de Colón.....	62
Figura 15. Mutaciones encontradas en las secuencias de Panamá Oeste.....	62

ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ITS	Infecciones de Transmisión Sexual
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
CE	Cuerpo Elemental
CR	Cuerpo Reticular
LGV	Linfogranuloma Venereo
MOMP	Proteína Principal de la Membrana Externa, siglas en inglés de Major Outer Membrane Protein
LPS	Lipopolisacáridos
VIH	Virus de Inmuno Deficiencia Humana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction
NAAT	Test de amplificación de ácidos nucleicos, siglas en inglés de Nucleic Acid Amplification Test
ARN	Ácido Ribonucleico
EIA	Inmunoensayo enzimático, siglas en inglés de Enzyme-Immuno Assay
rplD	Gen que codifica a la Proteína ribosómica 50S L4
rplV	Gen que codifica a la Proteína ribosómica 50S L22
ATP	Adenosina Trifosfato, siglas en inglés de Adenosine Triphosphate
ompA	Gen que codifica la proteína externa de membrana A, siglas en inglés de Outer membrane protein A
CDS	Región de codificación, siglas en inglés de Coding Sequence
HSPG	Proteoglicanos Heparán Sulfatos, siglas en inglés de Heparan sulfate proteoglycan
DFA	Ensayo de anticuerpos de fluorescencia directa, siglas en inglés de Direct. Fluorescent Antibody
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, siglas en inglés de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
LE	Prueba de Leucocitos Esterasa
POC	Pruebas de Puntos de Atención Rápida, siglas en inglés de Point of Care
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, siglas en inglés de Restriction Fragment Length Polymorphism
nvCt	Nueva Variante de <i>Chlamydia trachomatis</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico

RESUMEN

C. trachomatis (*Chlamydia trachomatis*) es uno de los patógenos más prevalentes causantes de infecciones de transmisión sexual, afecta principalmente al grupo de población adulta joven y aunque la mayoría de las personas que la padecen no presentan síntomas, al no ser tratadas a tiempo genera serias complicaciones a nivel del sistema reproductor, embarazos ectópicos, complicaciones en el neonato e incluso infertilidad.

En este estudio, se determinó los genotipos circulantes de 32 muestras de adolescentes infectados con *C. trachomatis* utilizando análisis filogenéticos. Utilizamos el material genómico de *C. trachomatis*, amplificado por técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y preparación de bibliotecas que fueron secuenciadas por medio de secuenciación de nueva generación, tecnología que nos permitió obtener información genómica. Mediante el uso de paquetes informáticos, se evaluó la variabilidad de los genes ARNr 23S, rplD y rplV en busca de mutaciones descritas causantes de resistencias a macrólidos.

Encontramos 4 genotipos diferentes de *C. trachomatis* en las diferentes provincias: genotipos D (46%), F (28%), E (12%), I (6%). Se observó la triple mutación G52S, R65C, V77A que corresponde a las substituciones descritas para el gen rplV, sin embargo, para los genes rplD y ARNr 23S no se encontraron variaciones de interés que representen un riesgo para el esquema terapéutico mayormente prescrito.

Este estudio piloto proporciona una herramienta metodológica a disposición para futuros estudios y datos de importancia sobre la epidemiología de la infección aportando a la toma

de decisiones e implementación de guías que permitan un mejor manejo de esta infección en la población.

ABSTRACT

C. trachomatis (*Chlamydia trachomatis*) is one of the most prevalent pathogens causing sexually transmitted infections, it mainly affects young adult population and although most of the people who suffer from it do not present symptoms, serious complications at the level of the reproductive system, ectopic pregnancies, complications in the newborn and even infertility, since the infection is not treated in a timely manner.

In this study, circulating of *C. trachomatis* genotypes was determined on 32 samples from adolescents. We used the genomic material of *C. trachomatis*, amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques for preparing the sequencing libraries for next-generation sequencing. Using bioinformatic pipelines published elsewhere, the variability of the 23S rRNA, rplD and rplV genes was evaluated focusing on mutations described as causing resistance to macrolides.

We found 4 different genotypes of *C. trachomatis* in the different provinces: genotypes D (46%), F (28%), E (12%), I (6%). The triple mutation G52S, R65C, V77A was observed, which corresponds to the substitutions described for the rplV gene, however, for the rplD and 23S rRNA genes, no variations of interest were found that represent a risk for the most prescribed therapeutic scheme.

This pilot study provides a methodological tool now available for future studies of molecular epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection, contributing to decision-making and implementation of guidelines that allow better management of this infection in the population.

INTRODUCCIÓN

C. trachomatis (*Chlamydia trachomatis*) es un microorganismo intracelular obligatorio que forma parte de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más prevalentes reportadas a nivel mundial, cursa un cuadro que en su mayoría es asintomático por lo que su diagnóstico no es realizado de manera oportuna, aumentando el riesgo de daño al sistema reproductor, complicaciones en el embarazo e incluso infertilidad.

El Estado Panameño invierte en programas de prevención, en proporcionar medicamentos a los pacientes afectados, sin embargo, estudios realizados evidencian la alta prevalencia de ITS en nuestro país. A pesar de las campañas que incluyen distintos métodos de prevención, estas se observan en distintos grupos de población, sin saber el origen o el patrón de circulación (contagio).

La clamidiasis (infección causada por *C. trachomatis*), a pesar de ser una de las infecciones más común dentro de la población, muchos de los laboratorios no cuentan con método diagnóstico, esta infección tampoco forma parte de las enfermedades de notificación obligatoria, por lo que no se cuentan con registros de la prevalencia, genotipos circulantes, cambios significativos en su plásmido o genoma y si estos conllevan a algún tipo de resistencia, por lo tanto, es pertinente la implementación de nuevos estudios enfocados a la población que padece de estas infecciones.

Mediante la aplicación de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del material genético, secuenciación genómica y análisis bioinformáticos, este estudio busca contribuir de manera significativa con una

herramienta científica que permita trazar una línea base de información en relación a las cepas circulantes y la resistencia antimicrobiana de *C. trachomatis* e impactar de manera directa las políticas de salud pública en cuanto a la elección de los esquemas de tratamientos, el establecimiento de programas de prevención enfocados en población clave, detección oportuna de la infección y así contribuir de un mediano a largo plazo en un ahorro económico por la mejora en el uso de antibióticos.

Abordamos los objetivos planteados y organizamos el informe de la siguiente manera: Primero presentamos una revisión bibliográfica describiendo las características generales de *C. trachomatis*, sus complicaciones a nivel de salud, estudios que sustentan las variaciones genéticas y las preocupaciones que ha generado en otros países. Segundo, se expone la metodología que fue implementada para abordar y responder el vacío en conocimiento con respecto a este microorganismo en Panamá. Luego, exponemos los resultados y el análisis obtenido al realizar este estudio y finalmente las conclusiones que sintetizan los puntos relevantes de los hallazgos en el desarrollo de esta investigación.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Generalidades de *Chlamydia trachomatis*

1.1.1 Epidemiología

Estudios realizados a nivel mundial muestran una alta prevalencia de infecciones de transmisión sexual (ITS) como: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* y *Trichomonas vaginalis*. Los adultos jóvenes menores de 25 años de edad presentan la mayor prevalencia por estas infecciones por encontrarse en el rango etario de mayor actividad sexual con patrones de alto riesgo (Occhionero et al., 2015) (Wiesenfeld, 2017) (Torreone et al., 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en la estrategia mundial del sector de la salud contra las infecciones de transmisión sexual, 2016 – 2021 indica que cada día, más de 1 millón de sujetos se infectan de alguna ITS a nivel mundial y se estima que, anualmente, unos 357 millones de sujetos contraen alguna de las cuatro ITS más frecuentes, entre ellas está la clamidiasis (131 millones) siendo una de las más prevalentes junto a otras infecciones como gonorrea (78 millones), sífilis (5,6 millones) o tricomoniasis (143 millones) (Torgovnik, 2016). En América para el 2012 se reportan 64 millones de ITS curables (Ver figura 1 y 2) es por ello que se crea la estrategia para que una vez aplicadas contribuyan a disminuir las ITS y muertes causadas por estas infecciones, al mismo tiempo que mejorara la salud de la población en general.

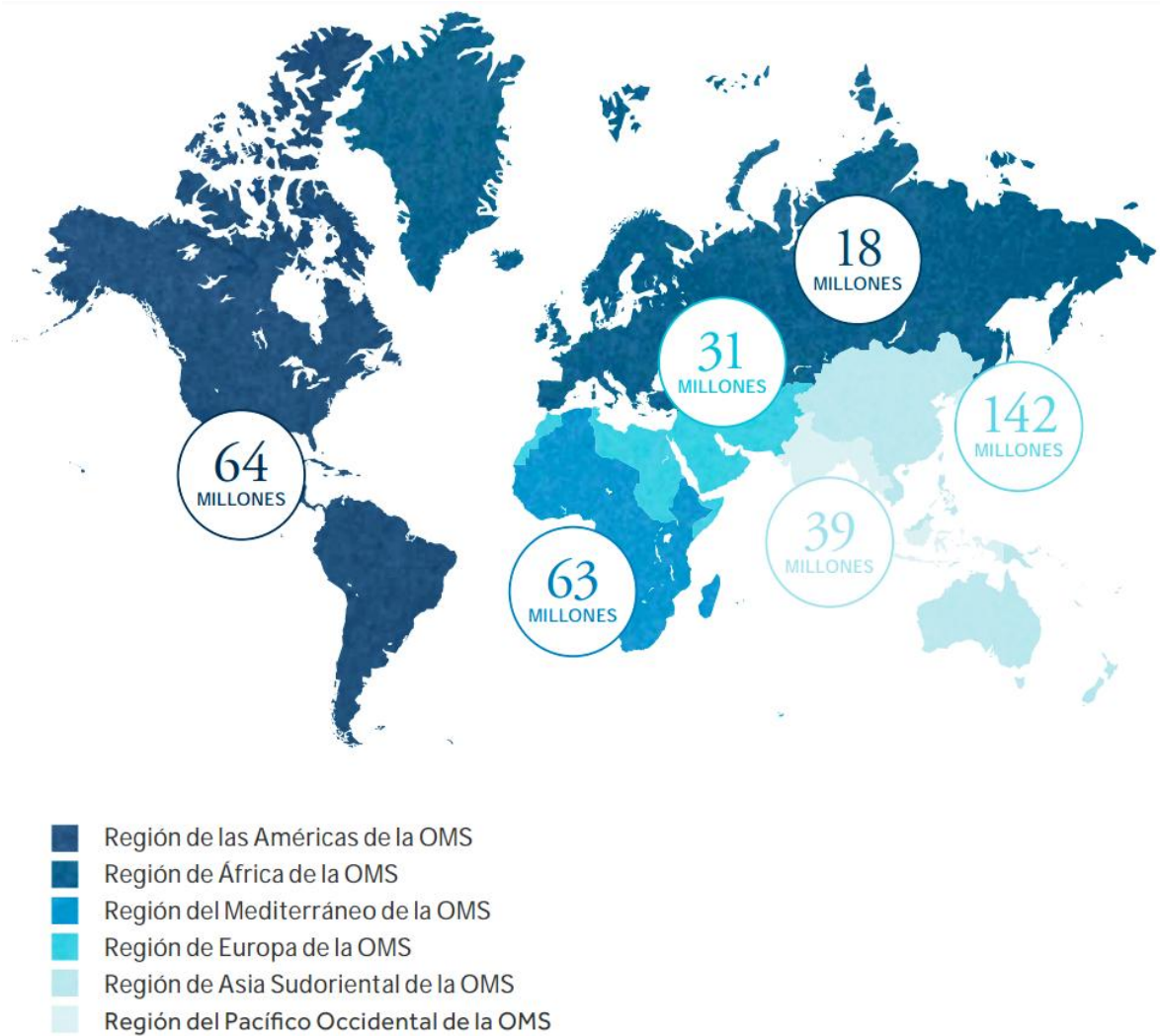


Figura 1: Estimación de ITS curables. El mapa muestra la estimación de ITS curables (clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomoniasis), los círculos muestran la estimación de la prevalencia en el año 2012 en cada región. Imagen tomada de OMS, 2016.

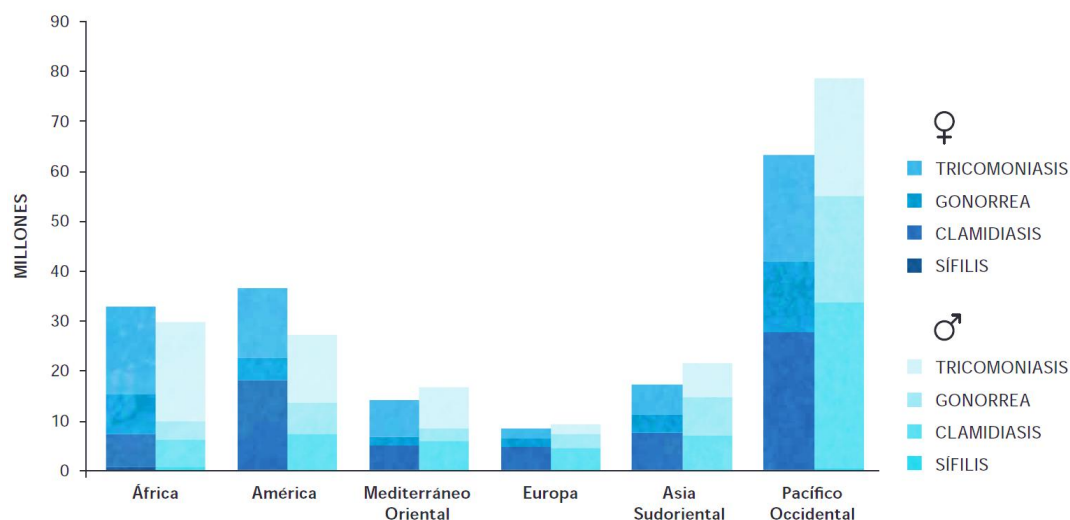


Figura 2: Estimación de las ITS curables por región y sexo. Imagen tomada de OMS, 2016.

En 2018, un estudio evaluó la incidencia de *Chlamydia trachomatis* en adolescentes de 10 a 19 años del Centro de Atención Integral del Adolescente en la provincia de Colón, el estudio abarcó un total de 52 adolescentes femeninas dando como resultado una incidencia de 15 (28.85%) casos positivos por *C. trachomatis*, de estos casos 11 (73.3%) estaban embarazadas (Cedeño et al., 2020).

Otro estudio evaluó la prevalencia y la correlación de las ITS asociadas a los adolescentes de escuelas oficiales en Panamá, un total de 592 participantes fueron evaluados, de ellos, 360 participantes (60,8%) informaron mantener relaciones sexuales, en su mayoría informaron prácticas sexuales de riesgo y relaciones sexuales con tres o más parejas, 88 (24,4%) de los participantes con antecedentes informados de actividad sexual dieron positivo por al menos una ITS, donde *C. trachomatis* se encontró en 72/337 (21,4%) de los participantes (Gabster et al., 2016). Años más tarde, se realizó otro estudio con un mayor

números de adolescentes (1924) que incluía otras regiones del país, se obtuvo que de ellos, 303 dieron positivo por *C. trachomatis*, prevalencia general del 15,8% (Gabster et al., 2020).

En Panamá, la mayoría de los laboratorios no realizan el diagnóstico de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, por lo tanto, no se cuenta con un registro o estimación de la prevalencia de estas infecciones en la población. La OMS reconoce la importancia de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, aún están por definir las mejores estrategias para controlar y cuantificar estas infecciones, recomienda realizar más investigaciones y análisis costoeficaces.

1.1.2 Descripción del patógeno

C. trachomatis es un patógeno intracelular obligado perteneciente al orden Chlamydiales, familia Chlamydiaceae, género Chlamydia y especie *Chlamydia trachomatis* (Dean, 2009)(Bavoil et al., 2010). Fue clasificada como Bacteria alrededor del año 1966, con características clásicas de bacterias Gram negativas, microorganismo intracelular obligado, poseen dos membranas (interna y externa) y presentan ambos ácidos nucleicos, posee un cromosoma y un plásmido de aproximadamente 1 Mb y 7 Kb respectivamente(Hadfield et al., 2017), sin embargo, por su tamaño de 0.2 a 1.3 micras, ausencia de sus propios mecanismos para producir energía y un ciclo intracelular usando la energía de la célula huésped fue clasificada inicialmente como un virus(Choroszy-KRÓL et al., 2012)(G, 2009).

1.1.3 Clasificación

Basado en la genotipificación del gen *ompA* de *C. trachomatis* se ha clasificado en tres genotipos dependiendo del lugar que infecta (Harris et al., 2012)(Abdelsamed et al., 2013):

- Genotipos A, B y C: infectan las células epiteliales conjuntivales, están asociados con tracoma que es la infección ocular crónica con el potencial de causar ceguera.
- Genotipos D, E, F, G, H, I, J y K: infectan las células epiteliales del tracto genital, asociados con las infecciones urogenitales y neonatales.
- Genotipos L1, L2, L2b y L3: infectan macrófagos y se diseminan sistémicamente a través de los ganglios linfáticos, asociadas a linfogranuloma venéreo (LGV) causante de úlceras genitales.

1.1.4 Plásmido Críptico

Los plásmidos funcionan como herramientas de variación genética, se pueden transferir horizontalmente por lo que constituyen una rápida distribución o reasociación de fenotipos, a menudo los factores de virulencia y la transmisión de resistencia se da debido a este intercambio, sin embargo, esta variabilidad no se encuentra en el plásmido de *C. trachomatis*, son ubicuos, no son conjugativos ni integradores, no codifican genes de resistencia y no muestran signos de flexibilidad genética(Rockey, 2011).

El plásmido de *C. trachomatis* posee un tamaño de 7.5 Kb aproximadamente, la secuencia del plásmido se asemeja a la homología de la secuencia del genoma. Poseen 8 secuencias codificantes (CDS) (Ver figura 3) que se traducen en proteínas, lo que sugiere que participa en funciones fundamentales en la infección por Chlamydia, aunque en aislados clínicos realizados comparados con cepas que no poseen el plásmido no se observan diferencias por

lo que se concluye que no es necesario para el crecimiento in vitro del organismo(Guangming Zhong, M.D., 2017).

La CDS 1, CDS 2 y CDS 3 codifican las glicoproteínas plasmídicas 7, 8 y 1 respectivamente que tienen como principal función la replicación del plásmido; la CDS 4 codifica la glicoproteína 2 pero no posee una función conocida; CDS 5 codifica la glicoproteína 3 el cual posee un papel esencial en la virulencia y la infectividad in vivo ; CDS 6 codifica la glicoproteína 4 importante en la regulación transcripcional de la proteína de virulencia plasmídica Pgp3 y de la expresión génica cromosómica; CDS 7 CDS 8 codifican la glicoproteína 5 y 6 respectivamente, participan en la regulación de partición y número de copia(Jones et al., 2020).

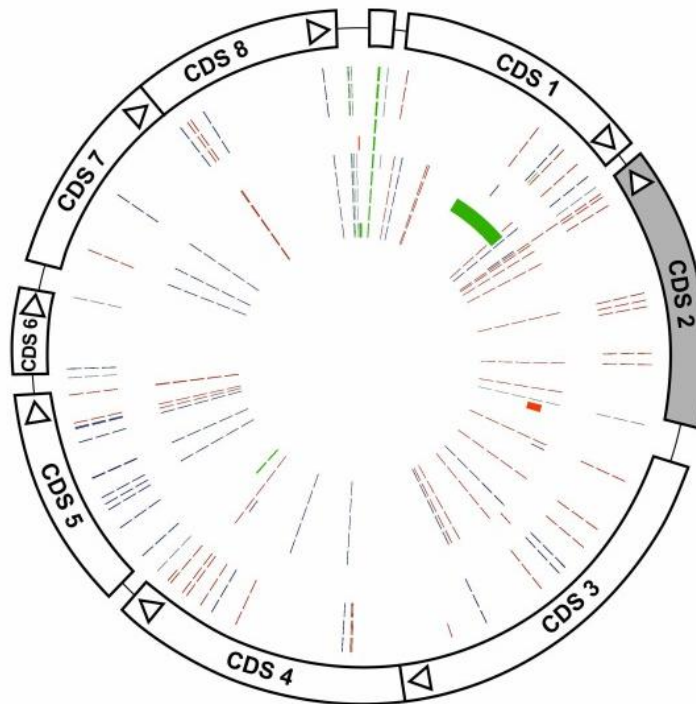


Figura 3: Conformación del plásmido de Chlamydia. En los recuadros se muestran las 8 secuencias codificantes y su ubicación dentro del plásmido. Imagen tomada de Seth-Smith HM, et al. 2009.

1.1.5 Ciclo de vida

La infección inicia cuando *C. trachomatis* utiliza las células del huésped para desarrollar su ciclo de vida, se caracteriza debido a las dos formas que presenta, denominados cuerpos elementales y cuerpos reticulares.

El cuerpo elemental con un tamaño de 0.2 a 0.4 μm es la forma infectante de transmisión de una persona a otra, se encuentra en el medio externo (fuera de la célula) y es resistente a factores ambientales semejante a una espora. Estos cuerpos no pueden replicarse fuera de las células del huésped, infectan membranas de células epiteliales mediadas por las adhesinas de la bacteria, los receptores y proteoglicanos heparán sulfatos (HSPG) de la célula, se inyectan efectores pre sintetizados del sistema de secreción tipo III para iniciar reordenamiento citoesquelético que va a facilitar la internalización e iniciar la señalización mitogénica para entrar en un estado antiapoptótico, una vez dentro de las células se transforman en cuerpo reticular.

El cuerpo reticular con un tamaño de 0.6 a 1.0 μm es la forma no infectante, son activos metabólicamente utilizando el ATP del huésped por lo que son capaces de reproducirse intracelularmente por fisión binaria produciendo el llamado cuerpo de inclusión donde las proteínas de la membrana de inclusión (Inc.) secretadas van a redirigir las vesículas exocíticas proveniente del aparato de Golgi a las membrana plasmática para favorecer la entrada de nutrientes, los cuerpos reticulares se replican de manera exponencial secretando moléculas efectoras que median los procesos en la célula. En condiciones de estrés, los cuerpos reticulares pasan a un estado de persistencia formando cuerpos aberrantes agrandados que pueden reactivarse al eliminarse el estrés (Xue et al., 2017). Al culminar este proceso, los cuerpos reticulares mediados por efectores se convierten nuevamente en

cuerpos elementales que son expulsados por medio de lisis o extrusión capaces de infectar nuevas células del huésped (Redgrove & McLaughlin, 2014)(Elwell et al., 2016).

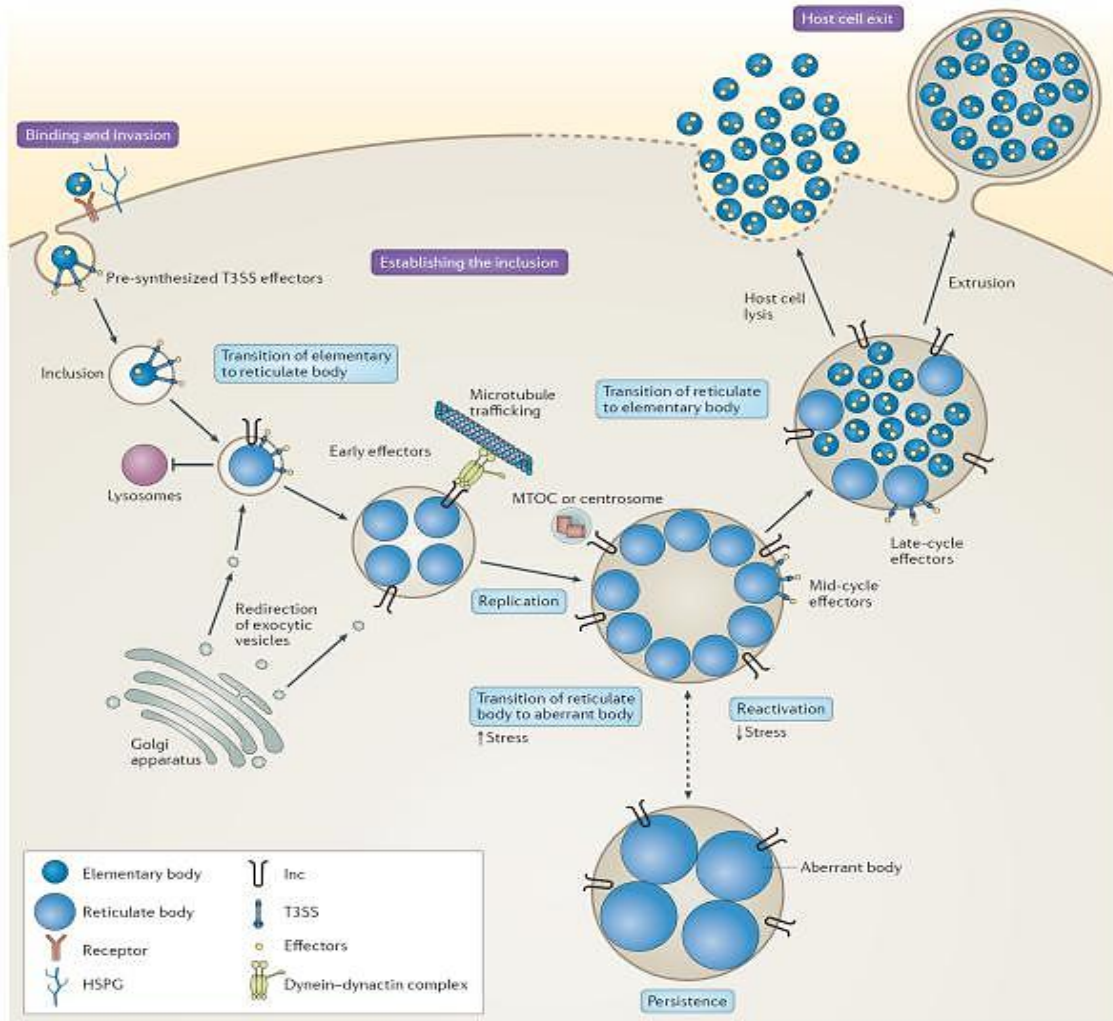


Figura 4: Desarrollo del ciclo de vida de *C. trachomatis*. Se da la unión e invasión de los cuerpos elementales a la célula huésped, se establece la inclusión donde los cuerpos elementales se transforman en cuerpos reticulares para dar inicio a la replicación, luego los cuerpos reticulares se transforman a cuerpos elementales para ser expulsados por lisis. Imagen tomada de Cherilyn Elwell et al. 2016.

1.2 Presentaciones clínicas

En su mayoría la infección por *C. trachomatis* tanto en mujeres como en varones es asintomática, sin embargo, al no ser tratadas, estas infecciones pueden traer complicaciones afectando la calidad de vida de quien la posee, incluso facilitar la transmisión del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o desarrollo de cáncer(Paba et al., 2008).

Algunas de las presentaciones clínicas que se dan en mujeres, hombres y neonatos se presentan a continuación(Mohseni et al., 2020):

- Cervicitis: inflamación del cuello uterino, sin embargo, el 70% suele ser asintomática o presentar signos y síntomas leves como secreción vaginal anormal, dolor durante el acto sexual o sangrado entre periodos menstruales.
- Uretritis: inflamación de la uretra que se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres causando micción dolorosa, frecuencia urinaria y secreción uretral.
- Enfermedad inflamatoria pélvica (EPI): inflamación del útero, trompas de Falopio u ovarios que ocurre cuando la bacteria asciende al tracto reproductor superior. Se presenta dolor abdominal inferior, flujo vaginal con mal olor, fiebre, micción dolorosa, sangrado intermenstrual o durante las relaciones sexuales. Puede conducir a la formación de tejido cicatricial dentro y fuera de las trompas obstruyéndolas, embarazo ectópico o infertilidad.
- Prostatitis: inflamación de la próstata que causa micción dolorosa, dificultad para orinar, dolor en la ingle, dolor pélvico, dolor al eyacular, entre otros.

- Epididimitis: inflamación del epidídimo que presenta fiebre, enrojecimiento e hinchazón del escroto, dolor y sensibilidad testicular generalmente de un solo lado.
- Proctitis: inflamación propia de la mucosa del recto que causa dolor al defecar, tenesmo, puede o no presentar heces mucopurulentas o hemorrágicas, signos y síntomas principalmente asociados a los genotipos causantes de linfogranuloma venéreo, sin embargo, se ha observado que si la infección es causada por los genotipos urogenitales la misma es asintomática.
- Artritis reactiva: inflamación de las articulaciones presente en el 1% de los hombres con uretritis por Clamidiasis y un tercio presentara la triada que consiste en uretritis, conjuntivitis y artritis.
- Conjuntivitis: inflamación de la conjuntiva o los párpados comúnmente presente en los neonatos con inoculación directa de la bacteria con secreciones genitales de la madre infectada con los genotipos urogenitales.
- Neumonía: inflamación de uno o ambos pulmones de neonatos nacidos de madres con una infección cervical por *C. trachomatis*, los bebés presentan tos, congestión nasal, dificultad respiratoria, secreciones, entre otros.

- Linfogranuloma venéreo (LGV): ampollas genitales indoloras causadas por los genotipos L1-L3 que originan úlceras seguidamente de linfadenopatía inguinal comúnmente unilateral (World Health Organization, 2016).

1.3 Tratamiento

La guía de la OMS para el tratamiento de *C. trachomatis* proporciona las recomendaciones para contrarrestar esta infección basadas en la evidencia mundial disponible. La guía recomienda realizar estudios de gran impacto para obtener información de tal manera que cada país pueda adaptar estas directrices a la situación local porque se conoce que la epidemiología y la resistencia varían dependiendo de la geografía. Los tratamientos deben cumplir tanto criterios como sea posible teniendo en cuenta la disponibilidad local, la eficacia, la vía y la frecuencia de administración (World Health Organization, 2016).

El tratamiento recomendado dependiendo el tipo de infección se detalla a continuación:

- Infecciones no complicadas

1g de azitromicina oral como única dosis

100mg de doxiciclina oral 2 veces al día por 7 días

Alternativas:

500mg de tetraciclina oral por 7 días

500mg de azitromicina oral por 7 días

200-400mg ofloxacina oral 2 veces al día por 7 días

- Infección anorectal

100mg de doxiciclina oral dos veces al día por 7 días

- Infecciones en mujeres embarazadas

1g de azitromicina oral como única dosis

500mg de amoxicilina oral divididos en tres 3 al día por 7 días

500mg de eritromicina oral cuatro veces al día por 7 días

- Linfogranuloma venéreo

100mg de doxiciclina oral dos veces al día por 21 días

1g de azitromicina oral semanalmente por 3 semanas

- Oftalmía neonatal

20mg/kg de azitromicina oral una vez al día por 3 días

50mg/kg de eritromicina oral 4 veces al día por 14 días

Se recomienda profilaxis ocular tópica para la prevención de oftalmía neonatal gonococcica y Clamidial. Se debe aplicar en ambos ojos inmediatamente después del nacimiento.

Ungüento ocular de clorhidrato de tetraciclina 1%

Ungüento ocular de eritromicina 0,5%

Solución de povidona yodada 2,5%

Solución de nitrato de plata 1%

Ungüento ocular de cloranfenicol 1%

1.4 Métodos de detección

La vigilancia y monitoreo de las infecciones por *C. trachomatis* son relevantes para reducir las complicaciones y el riesgo de adquirir otras enfermedades(Wiesenfeld, 2017)(Levy et al., 2019). Las muestras utilizadas para el cribado en mujeres pueden ser hisopados cervicales, vaginales o muestras de orinas de primer vaciado, en hombres pueden ser hisopados uretrales o muestras de orina de primer vaciado, sin embargo, las muestras optimas en hombres es la orina de primer vaciado y para las mujeres el hisopado vaginal que puede ser de fácil toma por la misma paciente(Workowski et al., 2021). Las muestras de orinas son de fácil recolección pero estas pueden no detectar la infección en un 10%(Wiesenfeld, 2017). A continuación, se detallan los ensayos utilizados para detectar la infección por *C. trachomatis* y cuáles son los más recomendados.

1.4.1 Ensayos específicos

- Cultivo celular: el aislamiento sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico, sin embargo, es realizada en laboratorios de referencias ya que una técnica laboriosa, engorrosa, costosa, que requiere de experticia(Levy et al., 2019), posee muchas limitaciones por la necesidad de mantener viables los microorganismos desde la toma de muestra hasta su crecimiento en el cultivo ya que su crecimiento se da intracelularmente, por lo que se han adaptado sistemas in vitro como inoculación en ratón, en saco vitelino y líneas de cultivo celular (células HeLa 229, células McCoy, células BHK21 y células BGMK). A pesar de ser la técnica estándar para el diagnóstico con una especificidad de 100%, se ha demostrado que

su sensibilidad oscila entre 70% y 85% dependiendo del sistema utilizado por lo que es complejo para la capacidad de los laboratorios.

- Prueba de fluorescencia directa (DFA): técnica inmunológica con gran impacto en el diagnóstico de Clamidiasis por la accesibilidad para un mayor número de laboratorios en comparación con el cultivo. Utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína de la membrana externa de Clamidia (MOMP) o contra los lipopolisacáridos específicos de género que permiten observar los cuerpos elementales teñidos verde manzana en forma de disco (30nm) y los cuerpos reticulares se aprecian 3 veces más grandes. La sensibilidad oscila entre 80% - 90% y la especificidad 98% - 99%, este último se le atribuye a la tinción ya que se puede observar la morfología de las inclusiones.
- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): detecta la membrana externa de Clamidia (MOMP) o los lipopolisacáridos (LPS) por medio de anticuerpos ligados a enzimas. Es la técnica que cuenta con mayores pruebas comerciales para el diagnóstico. La sensibilidad oscila entre 62% - 96% y la especificidad entre 86% - 99% en comparación con el cultivo celular. Posee una baja sensibilidad en comparación con la prueba de fluorescencia directa.
- Citología: Técnica fácilmente disponible, las tinciones más usadas son Giemsa, inmunofluorescencia y yodo las cuales permiten la observación de las inclusiones

con el uso de microscopía. No se recomienda para el diagnóstico de conjuntivitis e infecciones genitales en adultos.

- Métodos moleculares: debido a la baja sensibilidad de las pruebas convencionales, la técnica de amplificación de ácidos nucleicos se ha convertido en la herramienta de diagnóstico más recomendada y utilizada (Levy et al., 2019). La más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y dependiendo del diseño de los cebadores detectan genes presentes en la bacteria como gen MOMP, gen de la fosfolipasa, plásmido endógeno y el gen del ARNr 16S o 23S.

1.4.2 Ensayos no específicos

- Prueba de leucocitos esterasa (LE): prueba realizada por medio de una tira reactiva que se sumerge directamente en la muestra de orina, detecta la enzima producida por las células polimorfonucleares que indica una infección, sin embargo, la positividad de la misma no indica el agente causal.

1.4.3 Pruebas de puntos de atención rápida (POC)

Pruebas que se caracterizan por ser rápidas y que no se requieren de equipos sofisticados. El resultado es cualitativo donde su principio es la utilización de tecnología inmunoenzimática (EIA) en captura de membrana o inmunodifusión en látex. Son relativamente menos sensibles y específicas que las pruebas EIA realizadas en el laboratorio. La positividad de este tipo de pruebas debe siempre ir acompañada de una prueba confirmatoria realizada en el laboratorio.

1.4.4 Serológicas

Las pruebas serológicas no son recomendadas para el diagnóstico en infección rectal en hombres ni en tracto vaginal superior en mujeres (Levy et al., 2019) ya que un resultado positivo no es indicativo si la infección es pasada o reciente.

1.5 Importancia de la vigilancia molecular

1.5.1 Monitorear la introducción de nuevas cepas (tipificación)

La proteína principal de la membrana externa (MOMP) codificada por el gen ompA constituye aproximadamente el 60% de peso seco de la membrana en los cuerpos elementales manteniendo la integridad estructural de la bacteria y se ha implicado en los mecanismos de unión, infección y / o patogénesis (Nunes et al., 2009) (Abdelsamed et al., 2013). Es la proteína que define la serovariedad dada por la gran cantidad de acumulaciones puntuales (Abdelsamed et al., 2013) y con gran importancia para la comprensión clínica, epidemiológica y de salud pública por su alta variabilidad en comparación con el resto del genoma (Hadfield et al., 2017).

Debido a la importancia en la tipificación, inicialmente se desarrollaron métodos de serotipificación como inmunofluorescencia que se basó en la inmunoreactividad de MOMP utilizando anticuerpos policlonales y posteriormente se desarrolló con anticuerpos monoclonales siendo estos muchos más específicos y sensibles, luego se desarrollaron otros métodos como el radioinmunoensayo y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, sin

embargo, estos generaban reactividad cruzada, dando como resultados falsos positivos y negativos, además que requerían de cultivos(Nunes & Gomes, 2014).

Los métodos de serotipificación fueron reemplazados por método moleculares con la llegada de la amplificación de ácidos nucleicos. Algunos de los métodos desarrollados fueron el

polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR (RFLP), PCR fluorescente, secuenciación de PCR, hibridación de ADN, microarrays de ADN(Nunes & Gomes, 2014) (Rawre et al., 2017) pero con el repunte de la secuenciación de nueva generación ha sido el método de elección por muchos investigadores ya que permite analizar y comprender la evolución, diversidad y epidemiología(Rawre et al., 2017), además, al secuenciar su genoma completo proporciona datos relevantes generando una mayor comprensión de la epidemiología y patrones de infección dentro de la población.

1.5.2 Identificar el surgimiento de nuevas variantes

En el año 2006, en Suecia hubo un decremento en el número de casos diagnosticados por *C. trachomatis*, posteriormente se informó que era una nueva variante (nvCt) que no había sido detectada por los métodos diagnóstico en ese momento (Roche Diagnostics y Abbott Laboratories) dando como resultados falsos negativos en los reportes diagnósticos de la región(T. Ripa & Nilsson, 2006). La nueva variante de genotipo E presentaba una delección de 377pb en el plásmido dentro de la secuencia codificante 1 (CDS1) (Ver figura 5) (Unemo et al., 2010), dentro de esta delección estaba incluida la secuencia diana para la prueba de amplificación de ácidos nucleicos de los métodos utilizados en dos terceras parte de los condados en Suecia, lo que generó un impacto en las tasas de detección en los condados

donde se utilizó esta prueba(T. Ripa & Nilsson, 2006)(Torvald Ripa & Nilsson, 2007). Esta nvCt se extendió en Suecia y otros países europeos(Unemo & Clarke, 2011), sin embargo, la nueva variante no muestra ninguna ventaja biológica obvia(Unemo et al., 2010).

Otra diferencia de la variante descubierta en Suecia fue reportada en estudios posteriores donde se muestra una duplicación en tándem de 44pb ubicadas dentro de las secuencias codificantes 2 y 3 (CDS2 y CDS3) (Ver figura 5) (Seth-Smith et al., 2009).

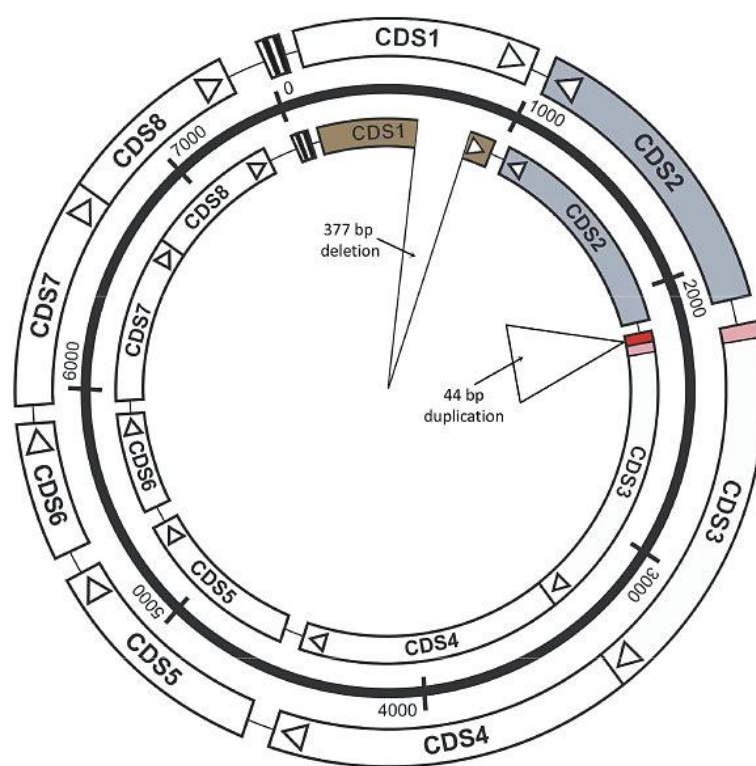


Figura 5: Nueva variante de *C. trachomatis*. Esquema del plásmido de la bacteria con la delección y duplicación en las secuencias codificantes. Imagen tomada de Helena MB Seth-Smith (2009).

En el año 2017 un estudio en México identificó una nvCt de genotipo D con la misma delección que la nvCt de Suecia, sin embargo esta no presentaba la duplicación en tándem

de 44pb en la CDS2 y CDS3, por lo tanto, se concluyó que al tener un genotipo diferente y no presentar la duplicación de la variante identificada Suecia, esta se trataba a una nvCt mexicana y pudo ser producto de una recombinación genética o intercambio de plásmidos de la nvCt Sueca a la nvCt mexicana (Escobedo-Guerra et al., 2019).

El surgimiento y la propagación de la nueva variante en Suecia ha permitido obtener lecciones importantes en la implementación de múltiples blancos de detección en las diferentes pruebas diagnósticas. La epidemiología juega un papel fundamental en la vigilancia de la incidencia en el número de casos, pudiendo prever que se repitan casos similares en un futuro, por lo tanto, es de importancia el constante monitoreo molecular, la investigación y el cultivo en laboratorios de referencias para identificar nuevas variantes, mutaciones o resistencias a antibióticos que puedan surgir (Unemo & Clarke, 2011).

1.5.3 Vigilancia de posible emergencia de resistencia terapéutica

Los antibióticos utilizados para el tratamiento de la infección causada por *C. trachomatis* son los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (Fluoroquinolonas y Rifampicinas), los inhibidores de la síntesis de proteínas (Tetraciclinas y Macrólidos) y los inhibidores de la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular (betalactámicos), aunque estos últimos se ha visto que generan persistencia in vitro e in vivo, la amoxicilina se recomienda como tercera opción en embarazadas (Mestrovic & Ljubin-Sternak, 2018).

Se ha documentado fracaso terapéutico entre un 5% a 23% dependiendo de la población de estudio y el antibiótico utilizado (P. J. Horner, 2012), sin embargo, las pruebas de detección como el cultivo o la amplificación de ácidos nucleicos no permiten discriminar entre una

reinfección o una falta de adherencia al tratamiento, lo que requiere de un seguimiento del paciente(Aghaizu et al., 2014). Se recomienda una prueba de reinfección a los 3 meses del tratamiento en lugar de una prueba de curación mayor a 4 semanas para descartar falsos positivos por restos de ADN de la bacteria que puede tardar hasta 3 semanas en eliminarse(Kong & Hocking, 2015), además, la utilización de técnicas más complejas como el genotipado.

A pesar de que *C. trachomatis* es un microorganismo altamente susceptible a los antibióticos utilizados, desde hace muchos años se han reportados casos de infección persistente tratados con doxiciclina, azitromicina y ofloxacina(Bhengraj et al., 2010)(Somani et al., 2000) donde se utilizó el genotipado para descartar posible reinfección(Somani et al., 2000). Se han descrito dos patrones de resistencia para Chlamydias, las resistencias homotípicas donde la mayoría de los microorganismos sobreviven a concentraciones mayores a la concentración inhibitoria mínima de antibióticos y las resistencias heterotípicas donde solo menos del 1% de la población sobrevive, dado que los estudios realizados solo muestran resistencia heterotípica se sugiere que puede ser producto de su desarrollo del ciclo(Mestrovic & Ljubin-Sternak, 2018)(Kong & Hocking, 2015).

1.5.4 Identificación de mutaciones en los genes rplD, rplV, ARNr 23S y su asociación con resistencia a macrólidos

Se conoce que las mutaciones en las proteínas ribosómicas L4 y L22 junto con dos mutaciones en el dominio V o II del gen del ARNr 23S pueden generar resistencia a macrólidos(Christiansen et al., 2014).

- **Mutaciones en el gen rplD**

El gen rplD codifica a la proteína ribosomal 50S L4, una de las principales proteínas de unión al ARNr, se une inicialmente cerca del extremo 5' del ARNr 23S. Es importante durante las primeras etapas del ensamblaje de la subunidad 50S. Hace múltiples contactos con diferentes dominios del ARNr 23S en la subunidad 50S ensamblada y el ribosoma. Contribuye a la integridad estructural del ribosoma y forma parte del túnel de salida del polipéptido.

Es de conocimiento que la sustitución de Gln a Lys en la proteína ribosomal L4 en la posición 66 confiere una disminución de ocho veces en las sensibilidades de azitromicina y eritromicina y una disminución de cuatro veces en las sensibilidades de josamicina y espiramicina, sin embargo, esta mutación afecta la infectividad de Chlamydia por lo que se sugirió una posible respuesta a la limitación en la aparición de clones altamente resistentes por estos microorganismos (Binet & Maurelli, 2007). También se encontró una mutación cuádruple: G274A, C276T, C339T, C466G, pero estas mutaciones también se encontraron en cepas parentales (Zhu et al., 2010).

- **Mutaciones en el gen rplV**

El gen rplV codifica a la proteína ribosómica 50S L22, esta proteína se une específicamente al ARNr 23S; su unión es estimulada por otras proteínas ribosómicas, por ejemplo, L4, L17 y L20. Es importante durante las primeras etapas del ensamblaje de la subunidad 50S. Hace múltiples contactos con diferentes dominios del ARNr 23S en la subunidad 50S ensamblada y el ribosoma. El dominio globular de la proteína se encuentra cerca del túnel de salida del polipéptido en el exterior de la subunidad, mientras que se encuentra una

horquilla beta extendida que recubre la pared del túnel de salida en el centro del ribosoma 70S.

La proteína L22 también se ha visto asociada a varias resistencias a macrólidos. En *C. trachomatis* se ha descrito una triple mutación en la proteína L22, Gly52 (GGC) → Ser (AGC), Arg65 (CGT) → Cys (TGT) y Val77 (GTC) → Ala (GCC)(Christiansen et al., 2014)(Misyurina et al., 2004) que reside en una region no conservada. El papel exacto de estas mutaciones aún no ha sido dilucidado, pero se cree que son mutaciones compensatorias que mantienen la virulencia de las cepas que las poseen. Esta triple mutación se ha observado frecuentemente junto a mutaciones en la proteína L4 que están asociadas a resistencia a macrólidos in vitro.

- **Mutaciones en el gen ARNr 23S**

El ARN ribosómico 23S (ARNr 23S) es parte de la subunidad ribosómica 50S. Mide aproximadamente 2800 pb siendo el ARNr más grande del ribosoma microbiano. Participa en la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas y es el principal blanco de acción de los antibióticos que actúan inhibiendo la traducción. En la literatura se encuentra descrito cuales son las mutaciones en el gen ARNr 23S que confieren resistencia a macrólidos en patógenos clínicos como son *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros (Vester & Douthwaite, 2001). Por otro lado, las mutaciones en el gen ARNr 23S en *C. trachomatis* resistentes a macrólidos fueron introducidas por primera vez en el año 2004 donde se encontraron las mutaciones A2058C y T2611C (numeración de *Escherichia coli*) posiciones que son significativas para desarrollar resistencia a macrólidos(Misyurina et al., 2004).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Hipótesis de trabajo

La elevada prevalencia y transmisión de la infección por *C. trachomatis* en la población panameña crea un aumento en la variabilidad del genoma de la bacteria y la probabilidad de adquisición de resistencia a los medicamentos que se utilizan actualmente para su tratamiento.

2.2 Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la variabilidad genética de las cepas circulantes de *C. trachomatis* en adolescentes de Panamá

Objetivos Específicos:

- Identificar los genotipos circulantes en Panamá
- Detectar variaciones a nivel de secuencias en genes asociados a resistencia.
- Evaluar los patrones de circulación de *C. trachomatis* usando información genética.

2.3 Descripción del tipo de estudio

- **Tipo de estudio:** Retrospectivo transversal descriptivo.
- **Universo de estudio:** Adolescentes de 14-19 años de los centros educativos de Panamá, San Miguelito, Colón, Panamá Oeste.

2.4 Selección y tamaño de muestra

Se utilizó la base de datos de los resultados de las pruebas analizadas en el estudio de infecciones de transmisión sexual en adolescentes, se realizó un filtro de las muestras positivas por *C. trachomatis* comprendida en los años 2016 a 2018.

2.5 Criterios de inclusión

Adolescentes de 14-19 años que contaran con el consentimiento informado firmado por sus padres en caso de ser menores de edad y el asintieron por parte de cada adolescente.

2.6 Criterios de exclusión

Adolescentes que no contaran con el consentimiento o asentimiento informado.

2.7 Reactivos

- QIAamp RNA Mini Kit (Reactivos del kit)
- Etanol grado molecular al 96-100%
- Agua grado molecular libre de nucleasas
- Agua destilada
- Cebadores ompA
- Cebadores rplD
- Cebadores rplV
- Taq PCR Master Mix (Qiagen)
- AccessQuick RT-PCR System (Promega)

- Buffer TBE 0.5X
- Agarosa
- Bromuro de etidio o gel red
- Buffer de corrida
- Escaleras de peso molecular de 100pb
- Preparación de bibliotecas Nextera XT de Illumina
- Reactivo de secuenciación Miseq v2 de Illumina
- Perlas para purificación de ADN AMPure
- NaOH 0.1 N
- Control PhiX

2.8 Materiales

- Kit de QIAmp Viral RNA (Insumos del kit)
- Microtubos cónicos de 0.2 ml, 0.5 y 1.5 ml
- Tubos cónicos de 15 ml y 50 ml
- Platos para PCR de 0.2ml
- Tapas en tiras de 8
- Cabina de bioseguridad nivel 2 (CBS II)
- Cabina de extracción de gases
- Microcentrífuga
- Vortex
- Centrífuga refrigerada

- Cronómetro
- Micropipetas de 100-1000 ul, 10-100ul, 0.5-10ul y las respectivas puntillas
- Gradilla para tubos de 1.5 ml
- Gradillas para tubos de PCR la cual mantenga la temperatura en frio
- Solución de cloro al 10%
- Solución etanol al 70%
- Bata de laboratorio
- Guantes sin polvo
- Papel toalla
- Termociclador
- Bolsas de bioseguridad rojas
- Bolsa negra de eliminación de la basura común
- Marcador
- Cristalería (Erlemmeyer)
- Materiales para pesar
- Cámara de electroforesis
- Fuente de Poder
- Sistema de Fotodocumentador
- Termomixer
- Balanza
- Bata de laboratorio
- Hielera

- Microondas
- Parafilm
- TruSeq Index Plate Fixture
- Plato MIDI
- Soporte magnético
- Pipetas serológicas de 10ml y 25ml
- Thermomixer (bloque de calor)

2.9 Procedimientos

Extracción del material genómico de *C. trachomatis*

El ADN de *C. trachomatis* se extrajo utilizando QIAamp RNA Mini Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- Se realizó un listado con la identificación de las muestras a procesar
- Se descongeló las muestras en una cubeta con hielo
- Se Limpió la cabina de bioseguridad utilizando una solución de cloro al 10% y luego alcohol al 70%. Se colocó la luz ultravioleta por 15 minutos.
- Se limpió la centrífuga con cloro al 10% y alcohol al 70%. Se colocó la centrífuga a 4°C con la opción de enfriado rápido.
- Se rotuló tubos de 1,5ml con la identificación de cada muestra

- Una vez descongelada las muestras, se mezcló utilizando un vortex y se sirvió 1ml de muestra a los tubos de 1.5ml rotulados previamente con su identificación correspondiente.
- Se centrifugó a 13,200 rpm por 90 minutos.
- Una vez centrifugadas las muestras se tomó 360 μ l del sobrenadante y se descartó.
- Seguidamente se agregó 560 μ l de buffer a las muestras. Luego se mezcló con el vortex por 15 segundos aproximadamente de forma no continua.
- Luego se incubó las muestras por 10 minutos para realizar un lisado completo.
- Se removi6 las gotas de la tapa utilizando la centrifuga a 2,000 rpm y presion6 el botón spin por 10 segundos.
- Se a6adi6 560ml de etanol grado molecular al 96-100% a cada muestra, se mezcl6 por vortex por 15 segundos aproximadamente y se removi6 las gotas de la tapa.
- Se agregó 630ml de la mezcla a la columna QIamp contenida en un tubo colector y se centrifug6.
- Después de la centrifugaci6n se descart6 el tubo colector con el eluido y se coloc6 la columna “QIamp” en un nuevo tubo colector.
- Se agregó la cantidad restante de la mezcla a la columna QIamp con el nuevo tubo colector y se centrifug6 nuevamente a 8000 rpm (6000 x g) por un minuto.
- Después de la centrifugaci6n se descart6 el tubo colector con el eluido y se coloc6 la columna “QIamp” en un nuevo tubo colector.
- Se agregó 500 μ l de Buffer AW1 y se centrifug6 a 8000 rpm (6000 x g) por un minuto.

- Después de la centrifugación se descartó el tubo colector con el eluido del buffer AW1 y coloqué la columna “QIamp” en un nuevo tubo colector.
- Se agregó 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a velocidad máxima 14000 rpm (20,000 x g) por 3 minutos.
- Después de la centrifugación se descartó el tubo colector con el eluido del buffer AW2, se colocó la columna “QIamp” en un nuevo tubo colector y se centrifugó 1 minuto adicional a 14,000 rpm (20,000 x g) para eliminar restos de etanol.
- Después de la centrifugación, se descartó el tubo colector con el eluido y se colocó la columna “QIamp” en un tubo de 1.5ml rotulado con identificación y fecha de la extracción.
- Se agregó 50 µl de buffer AVE o agua grado molecular libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) por 2 minutos.
- Se almacenó el extraído a -20 para su posterior proceso de amplificación.

Amplificación de los genes ompA, rplD, rplV, ARNr 23S

- La amplificación por PCR al ADN extraído se realizó utilizando cebadores directos e inversos específicos para cada gen (ompA, rplD, rplV, ARNr 23S) en un volumen final de 32µL.
- Los cebadores utilizados para la amplificación de los genes se detallan a continuación:

Región	Dirección	Cebadores	Tamaño	Referencia
rplDc (L4)	L4-F	5' acgttcttcgaggagtag 3'	595704	H. Zhu, 2009.
	L4-R	5' gccttctcgggtcacataatgtc 3'	594936	
rplDc (L22)	l22-f	5' agctgcaggattgatgagaaa 3'	54–74a	O. Y. Misyurina, 2003.
	l22-r	5' gttagatgactcgtgcgcttc 3'	308–288a	
ompA	Se-f	5' ccaatatgctcaatctaacc 3'	1932–1951	
	Se-r	5' aattgcaaggagacgatttg 3'	2656–2647	
23S ARNr	rr-f	5' aagttccgacctgcacgaatgg 3'	1952–1973	
	rr-r	5' tcattccgggtcctctcgtag 3'	2675–2656	

- Se descongeló los extraídos almacenados utilizando un envase con hielo
- Se descongeló los reactivos a utilizar para la PCR: Taq PCR Master Mix (Qiagen) para los genes ompA, rplD, rplV y AccessQuick RT-PCR System para el gen ARNr 23S.
- Se limpió la cabina de bioseguridad libre de ácidos nucleicos utilizando una solución de cloro al 10% y luego alcohol al 70%. Se colocó la luz ultravioleta por 15 minutos.
- Se Llenó el cuadro de trabajo y se calculó el volumen a utilizar por muestra donde se preparó la mezcla de reacción.

Mezcla para ompA, rplD,rplV		
N° de muestras	1	
Agua libre de nucleasas	5	
Primer A	1	
Primer B	1	
Taq Master Mix	13	
ADN	12	
Volumen final	32	

Mezcla para ARNr 23S		
N° de muestras	1	
Agua libre de nucleasas	12	
Primer A	1	
Primer B	1	
AccessQuick MM2x	25	
AMV RT	1	
ADN	10	
Volumen final	50	

- Se rotuló un tubo de 1.5ml donde para la mezcla de reacción.
- Una vez descongelados los reactivos, se procedió a preparar el mix de reacción de acuerdo a los volúmenes calculados. Se utilizó bloques fríos para mantener la temperatura de los reactivos.
- Se rotuló las tiras de 8 pocillos de 0.2ml y se procedió a agregar 20ul de la mezcla preparada a cada pocillo. Se taparon los pocillos con las tiras correspondientes.
- Se limpió la cabina de bioseguridad destinada para amplificación utilizando una solución de cloro al 10% y luego alcohol al 70%. Se colocó la luz ultravioleta por 15 minutos.
- Se mezclaron los extraídos gentilmente y se añadió 12ul a cada pocillo de acuerdo a su identificación.
- Se inició los ciclos de amplificación programando el termociclador con las siguientes temperaturas:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	2 min
40 ciclos de amplificación	94°C	30 seg
	55°C	30 seg
	72°C	1 min
	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞

Detección de productos de PCR

- Se limpió la cabina de extracción de gases utilizando una solución de alcohol al 70%.
- Se preparó el buffer TBE 0.5X.
- Se preparó gel de agarosa al 1% con el buffer TBE 0,5X para un volumen final de 50ml (cámara de 60ml).
- Se calentó la mezcla en el microondas hasta que estuviera completamente homogéneo. Se dejó enfriar un poco.
- Se utilizó la cabina de extracción de gases para agregar 2,5 ul de bromuro de etidio a la mezcla.
- Se vertió la mezcla en la cámara de electroforesis y se colocó los peines para formar los pocillos.
- Se dejó enfriar dentro del extractor hasta que la mezcla estaba completamente polimerizada.

- Se descongeló el buffer de carga y la escalera de peso molecular de 100pb.
- Una vez polimerizó, se colocó el gel dentro de la cámara con buffer TBE 0,5X
- Se utilizó parafilm para mezclar 3ul del buffer de corrida y 5ul de amplificado.
- Se cargó la mezcla en los pocillos en el gel dejando libre el primer pocillo de cada fila.
- Se sirvió 3ul de escaleras de peso molecular de 100pb en el primer pocillo de cada fila.
- Se conectaron los electrodos y se programó la fuente de poder a 85 voltios por 50 minutos.
- Al terminar la corrida, se utilizó un fotodocumentador para observar y tomar foto de los productos obtenidos.
- Los productos obtenidos con el tamaño esperado se procedieron a secuenciar.

Tamaños de productos esperados	
ompA	715 pb
rplD	768 pb
rplV	234 pb
ARNr 23S	704 pb

Preparación de bibliotecas y secuenciación de nueva generación

Dilución de todos los amplicones a 0.2 ng/μl

- Los amplicones se cuantificaron utilizando Qubit dsDNA HS kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- Se preparará la solución de trabajo diluyendo el reactivo (Qubit dsDNA HS) 1:200 con el Qubit dsDNA HS tampón (Qubit dsDNA HS Buffer) en un tubo cónico.
- Se calculó la cantidad de solución de trabajo para todas las muestras de la siguiente manera: 199 µl Qubit dsDNA HS Buffer + 1 µl Qubit dsDNA reagent.

Reactivo	Tubos de estándar	Tubos de muestras
Volumen de la solución de trabajo	190 µl	198 µl
Volumen del estándar	10 µl	----
Volumen del amplicón	----	2 µl
Total	200	200

- Se mezclaron los tubos brevemente y se incubó a temperatura ambiente protegiendo los tubos de la luz por al menos 2 minutos antes de realizar la medición.
- En el Qubit se seleccionó la opción DNA, luego dsDNA High Sensitivity. Luego se procedió a leer los estándares 1 y 2. El Qubit automáticamente generó una curva estándar de las lecturas realizadas.
- Se realizó la lectura de cada tubo conteniendo las muestras (ng/ml) y se guardó el resultado en la lista de trabajo.
- Se igualaron las concentraciones de los genes ompA, rplD, rplV de una misma muestra y luego se realizó la agrupación de los genes. El gen ARNr 23S se procesó de manera individual.

- Se diluyeron las agrupaciones a una concentración de 0,2 ng/μl, se calcularon en base a un volumen de 5 μl.
- A este punto todos los amplicones de la PCR cuantificados estaban ordenados en el plato de 96 pocillos de acuerdo al mapa del plato. El orden de este plato lo mantuvo para el paso de la preparación de la biblioteca Nextera XT.

Preparación de las Bibliotecas con Nextera XT

La preparación de la librería fue realizada utilizando Nextera XT Library Prep Kit (caja 1 y 2) de Illumina.

Tagmentación

- En un plato de PCR se agregó 10μl de TDB dentro de cada pocillo + 5μl del ADN 0.2 ng/μl (1 ng en total), luego se añadió 5μl ATM.
- Se selló el plato con una cinta de sellado y se centrifugó a 280 x g por 1 minuto.
- Se programó el termociclador con las siguientes temperaturas:

Paso	Temperatura	Tiempo
Tagmentación	55	5 min
Conservación (Hold)	10	∞

- Se colocó el plato en el termociclador y se inició la incubación.

- Una vez el plato llegó a 10°C, inmediatamente se añadió 5µl NTB (Neutralize Tagment Buffer) a cada pocillo del plato y se mezcló por pipeteo.
- Se selló el plato y se centrifugó a 280 x g por 1 minuto.
- Se incubó el plato a temperatura ambiente por 5 minutos y se mantuvo a 4°C mientras se preparaba el siguiente paso.

Index PCR

- Se ordenaron los tubos de Index en orden numérico en el **TruSeq Index Plate Fixture**, de acuerdo al plato de muestras.
- Se pipeteó 5µl del primer **i7** index (Tapa naranja) a cada fila del plato y se mezcló por pipeteo.
- Se pipeteó 5µl del primer **i5** index (Tapa Blanca) a cada columna del plato y se mezcló por pipeteo aproximadamente 5 veces.
- Se pipeteó 15µl de NPM en cada pocillo del plato y se mezcló por pipeteo aproximadamente 5 veces.
- Se selló el plato y se centrifugó a 280 x g por 1 minuto.
- Se realizó la PCR usando el siguiente programa en un termociclador pre calentado

Paso	Temperatura	Tiempo
Inactivación de la enzima de tagmentación	72	3 min
Desnaturalización y Activación	95	30 segundos
12 ciclos de PCR	95	10 segundos
	55	30 segundos
	72	30 segundos
Extensión final	72	5 min
Conservación (Hold)	4	∞

Purificación de bibliotecas

- Se transfirió 50µl del producto de NTA-Index PCR al nuevo plato MIDI.
- Se agregó 30 µl de las perlas AMPure dentro de cada pocillo del plato MIDI.
- Se cubrió el plato MIDI con sello adhesivo y se mezcló utilizando el agitador de plato a 1800 rpm por 2 minutos.
- Se incubó el plato MIDI a temperatura ambiente sin mezclar por 5 minutos.
- Se colocó el plato en el soporte magnético y se descartó cuidadosamente el sobrenadante.
- Con el plato MIDI aún en el soporte magnético, se dispensó 200µl de etanol al 80% dentro de cada pocillo.
- Se incubó el plato por 30 segundos sobre el soporte magnético. Una vez completado el tiempo, se removió y se descartó el sobrenadante.
- Se realizó un segundo lavado con etanol y se repitieron los dos pasos previos.

- Con el plato MIDI aun en el soporte magnético, se dejó secar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Removí el plato MIDI del soporte magnético y se transfirió 52.5µl del buffer de resuspensión (RSB) dentro de cada pocillo del plato MIDI.
- Se mezcló a 1800 rpm por 2 minutos y se incubó el plato a temperatura ambiente por 2 minutos y se colocó el plato dentro del soporte magnético.
- Se transfirió 45µl del sobrenadante del plato MIDI a un nuevo plato de PCR.

Normalización de Bibliotecas

- Se transfirió 20µl del purificado a un nuevo plato MIDI.
- Se agregó 44 µl de LNA1 por muestra a un tubo cónico estéril de 15 ml.
- Se transfirió 8µl de LNB1 por muestra al tubo cónico de 15 ml conteniendo LNA1.
- Se transfirió 45 µl de la mezcla LNA1/B1 a cada pocillo del plato MIDI.
- Se selló el plato y se colocó en el agitador a 1800 rpm por 30 minutos.
- Con el plato MIDI en el soporte magnético, se removió y se descartó el sobrenadante.
- Se transfirió 45 µl LNW 1 dentro de cada pocillo del plato MIDI
- Se selló el plato y se colocó el plato en el agitador a 1800 rpm por 5 minutos.
- Se colocó el plato en el soporte magnético, se removió y descartó el sobrenadante.
- Se realizó un segundo lavado repitiendo los puntos anteriores.
- Se pipeteó 30 µl de 0.1 N NaOH dentro de cada pocillo.
- Se selló el plato y se colocó en el agitador a 1800 rpm por 5 minutos.

- Mientras el plato estaba en el agitador, se rotuló un nuevo plato de 96 y se transfirió 30 µl de LNS1 dentro de cada pocillo.
- Se colocó el plato en el soporte magnético, y se transfirió 30 µl del sobrenadante del plato MIDI al plato con LNS 1.

Agrupación de bibliotecas

- Se descongeló el cartucho MiSeq usando una envase con agua a temperatura ambiente se requieren cerca de 1 hora para descongelar completamente el cartucho.
- Se rotuló un tubo eppendorf limpio con “PAL” para la agrupación de las bibliotecas.
- Se mezcló cada biblioteca de 3 a 5 veces por pipeteo de arriba abajo. Luego se transfirió 5 µl de cada pocillo al tubo PAL.
- Se rotuló un nuevo tubo eppendorf con “DAL” para las bibliotecas diluidas.
- Se añadió 580 µl del buffer de hibridización al tubo DAL.
- Se transfirió 20ul del tubo PAL al tubo DAL. Se mezcló bien el tubo DAL por vortex.
- Se incubó el tubo DAL en un bloque de calor a 96°C por 2 minutos.
- Luego de la incubación, se invirtió el tubo DAL de 1-2 veces para mezclar, luego se colocó el tubo inmediatamente dentro del baño de agua fría por 5 minutos.
- Se removió 60 µl del tubo DAL y se descartó.
- Se agregó 60 µl del control PhiX a 12.5pM.
- Se mezcló muy bien la solución y se centrifugó brevemente. Se Dejó la solución en un baño de agua fría hasta que se requiriera cargar.

Secuenciación

Las bibliotecas preparadas se secuenciaron en el equipo MiSeq de Illumina utilizando Miseq v2 reagent kit.

- Usando unas pinzas para limpieza, se retiró la celda de flujo del recipiente de almacenaje.
- Se utilizó el agua ultra pura para limpiar completamente la celda de flujo y se removió el exceso de sales.
- Se utilizó papel lente para remover gentilmente el exceso de agua del marco alrededor del empaque.
- Se limpió el vidrio utilizando una toallita (kim-wipe) humedecida con etanol al 70% o una toallita para lentes con ethanol. Se apoyó la celda de flujo contra una superficie limpia sin que nada estuviera tocando el vidrio y se dejó secar al aire.
- Una vez la celda de flujo estuvo seca, se levantó hacia la luz y visualmente se inspeccionó que no hubiera restos de polvo o suciedad en la superficie del vidrio.
- Una vez descongelado el cartucho, se mezcló invirtiendo gentilmente 10 veces.
- Suavemente se dió golpecitos al cartucho contra la mesa de trabajo, con el fin de remover cualquiera burbuja que se haya formado.
- Utilizando una punta limpia de 1000, se perforó la lámina en el pocillo #17 del cartucho MiSeq.
- Se utilizó una nueva punta para cargar todo el contenido (600 µl) del tubo eppendorf (DAL) dentro del pocillo para cargar la muestra.
- En este punto, el cartucho estaba listo para ser colocado en el equipo MiSeq.

- Se inició el programa MiSeq Control Software (MCS). Desde la pantalla de bienvenida, se seleccionó “Sequence”.
- Seguí las indicaciones del MCS para cargar en el MiSeq.
- El equipo realizó una verificación antes de la corrida para asegurarse que todas las líneas de fluidos estuvieran trabajando adecuadamente y que hubiera suficiente espacio en el disco para la data resultante.
- Se seleccionó en iniciar corrida (Start run).

Análisis bio-informático

Las lecturas obtenidas se filtraron con un puntaje de calidad mínimo de Q30 y 120 pb de longitud, con algoritmos Quasitools-hydra (<https://github.com>) utilizando las secuencias de referencias para los diferentes genes (gen ompA acceso U78528, genes rplD y rplV acceso NC_000117 y el gen ARNr 23S acceso NR_076160). Las variantes se determinaron mediante un consenso basado en una tasa de error predeterminada de 0,0021, una profundidad de lectura mínima de 10x, un recuento de alelos de 5 y una puntuación de calidad de variante de Q30.

Análisis estadísticos y filogenéticos

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base de datos. Los resultados de cada grupo se analizaron utilizando Excel.

El alineamiento de las secuencias obtenidas del gen ompA de *C. trachomatis* fueron alineadas con mafft (v7.445), para la construcción del árbol filogenético por máxima verosimilitud se utilizó IQTREE y visualizado en FigTree v1.4.4.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

3.1 Datos demográficos

Un total de 2467 participantes fueron reclutados en el estudio de ITS en adolescentes en Panamá Centro, San Miguelito, Colón y Panamá Oeste desde el año 2016 al 2018, donde se evaluaron varios microorganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, entre otros. Realizamos un filtrado de la base de datos para obtener las muestras positivas por *C. trachomatis*, obtuvimos un total de 252 muestras, sin embargo, fueron seleccionadas aquellas que se mantenían disponibles y las que cumplían con un volumen mínimo de 500µL de orina (Ver figura 6).

Un total de 161 muestras positivas fueron filtradas en la base de datos, sin embargo, en almacenamiento solo se encontraron disponibles 139 que fueron extraídas y amplificadas según el procedimiento descrito. Primero las muestras fueron amplificadas por el gen ompA y obtuvimos 32 productos de PCR con el tamaño esperado de 715 pb (Ver figura 7 y 8). Las 32 muestras amplificadas por el gen ompA fueron amplificadas para los genes rplD y rplV donde obtuvimos productos de PCR del total de muestras, para el gen RNAr 23S obtuvimos 15 amplificados. Posiblemente debido a un bajo nivel bacteriano o cantidad insuficiente de las muestras no se consiguió amplificar el resto de las muestras.

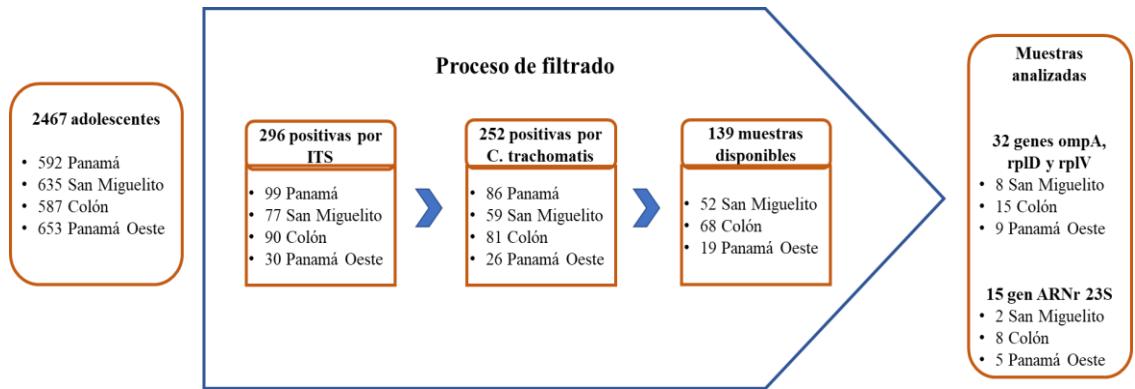


Figura 6. Esquema del filtrado y selección de muestras analizadas. Proceso de filtrado de muestras de la base de datos y selección de las muestras de interés.

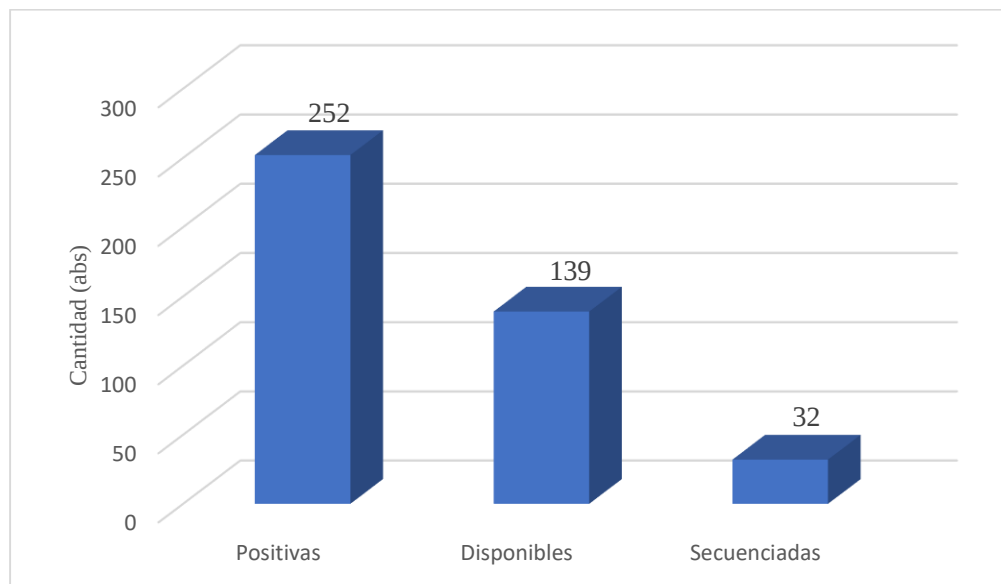


Figura 7. Muestras utilizadas para la determinación de la variabilidad genética. Gráfico de barras indica la cantidad de muestras positivas por *C. trachomatis* utilizadas en el estudio hasta las resultantes por secuenciación.

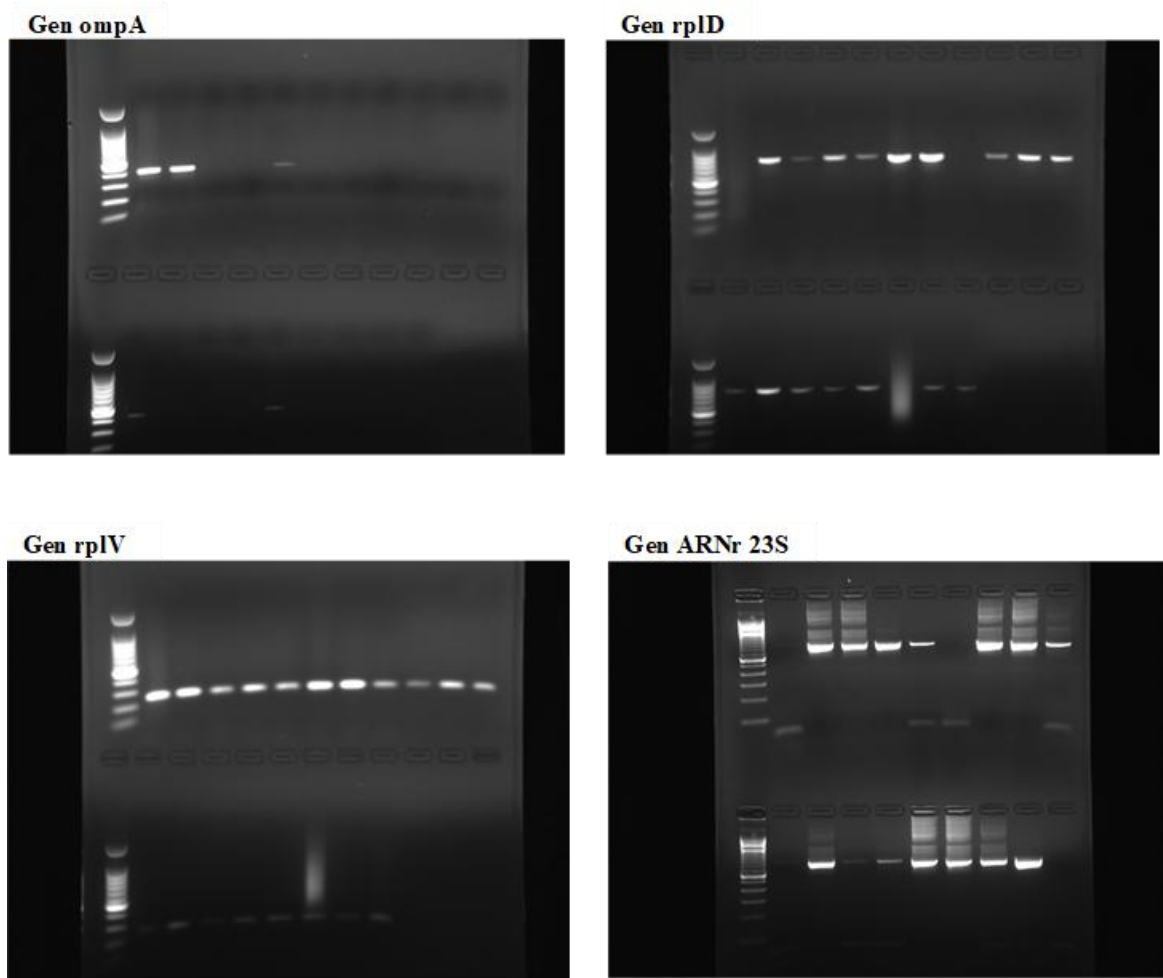


Figura 8. Imágenes de electroforesis en gel de agarosa. Las imágenes muestran los resultados de las bandas obtenidas producto de las amplificaciones de cada gen.

La provincia de Colón obtuvo el mayor número de muestras secuenciadas con un total de 46% (11 femeninas y 4 masculinos), seguido de Panamá Oeste con 28% (6 femeninas y 3 masculinos) y Panamá centro con 25% (7 femeninas y 1 masculino) Ver figura 9 y 10.

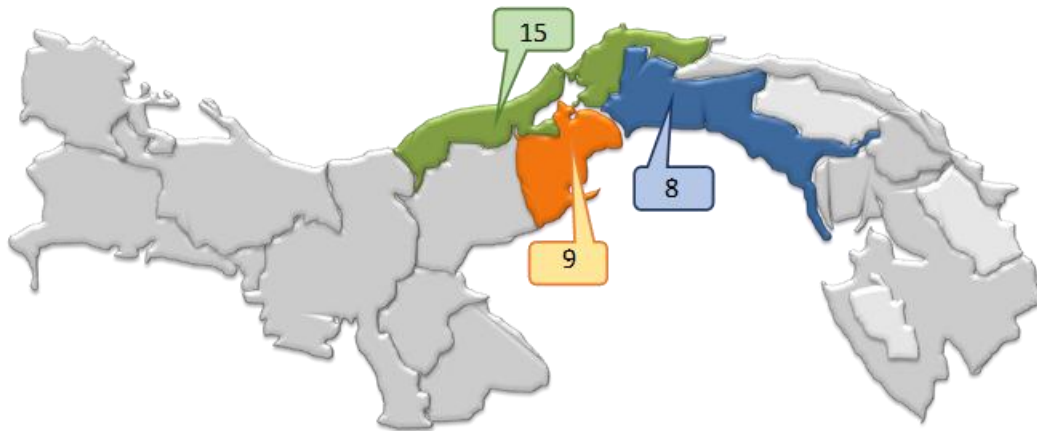


Figura 9. Mapa de distribución geográfica de muestras secuenciadas. Distribución del total de muestras analizadas por área. San Miguelito ubicado en la provincia de Panamá, se muestra de color azul, Colón de color verde y Panamá oeste de color naranja.

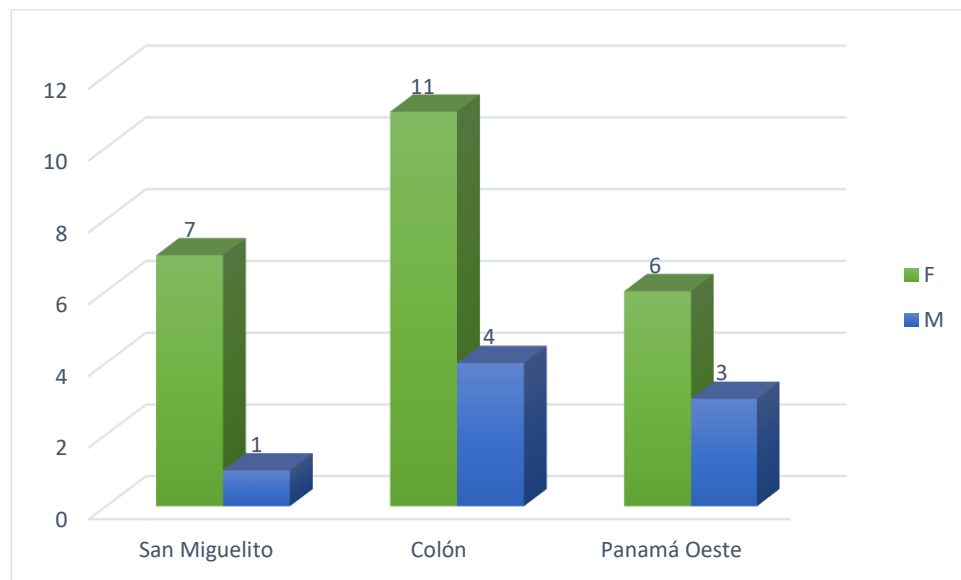


Figura 10. Distribución de muestras secuenciadas según sexo. Se indica la distribución de las muestras secuencias por región y sexo. Las bases de las barras coloreadas en azules corresponden al sexo femenino y los extremos de color rojo corresponden al sexo masculino.

3.2 Calidad de lectura de las secuencias

La secuenciación de los genes *ompA*, *rplD*, *rplV* y ARNr 23S de *C. trachomatis* se realizaron mediante la tecnología de secuenciación por síntesis utilizando la plataforma Miseq Illumina empleando lecturas emparejadas (*paired-end reads*).

Se extrajeron las secuencias crudas y se procedió a la limpieza donde se eliminan regiones que contengan bases de mala calidad, restos de adaptadores o contaminantes que puedan interferir en los análisis posteriores, luego realizamos el alineamiento y ensamblaje utilizando secuencias obtenidas del genbank para el gen *ompA* (Acceso U78528), genes *rplD* y *rplV* (Acceso NC_000117) y el gen ARNr 23S (Acceso NR_076160).

Para en análisis de las secuencias, evaluamos 3 parámetros:

- Lecturas: Números secuenciados de fragmentos que se generan en una corrida.
- Cobertura: Número de lecturas que se alinean o cubren la secuencia de referencia.
- Profundidad: Número promedio en que una única base fue secuenciada en una corrida

Analizamos la calidad de las secuencias y obtuvimos que la proporción de lecturas fue suficiente para permitir el análisis de los genes y brindar información con respecto a los genotipos circulantes y las mutaciones presentes en las cepas circulantes en nuestro país (Ver tabla 1 y anexo 2).

Cuadro 1. Análisis de las lecturas, cobertura y profundidad de las secuencias

Gen	Media de lecturas	Cobertura	Media de profundidad
ompA	93851 (1527; 195836)	34.07% (29.92%; 35.43%)	15247.2 (243.7; 33485.0)
rplD	286416 (8378; 520748)	100%	87138 (2834; 155443)
rplV	50285 (9406; 121351)	74.38% (72.92; 76.79)	23863 (4741; 55044)
ARNr 23S	88078 (35824; 139132)	24.14 (21.33; 27.45)	5446 (2357; 7901)

3.3 Análisis filogenéticos y genotipos circulantes

Para caracterizar las cepas circulantes se secuenciaron los 32 amplificadores del gen ompA, una vez se le realizó el análisis de calidad, limpieza y búsqueda de homología con la secuencia de referencia del gen ompA de *C. trachomatis* (Acceso U78528.1), las secuencias fueron alineadas con un grupo de 46 genomas obtenidos del GeneBank (Ver anexo 3) y una secuencia de *C. muridarum* (Acceso M73044.1) como grupo externo. El análisis filogenético de las secuencias alineadas mostró un 46% (15) de genotipo D, 28% (9) genotipo F, 12% (4) genotipo E y 6% (2) genotipo I (Ver figura 11). Los genotipos D y F se encontraron ubicadas en los 3 distritos estudiados que incluían Panamá Centro, Colón y Panamá Oeste, el genotipo I se encontró en 2 distritos que incluyó Panamá Centro y Colón y el genotipo E solo se encontró en el distrito de Colón (Ver tabla 2).

Cuadro 2. Distribución geográfica de genotipos encontrados.

Área	Genotipo D	Genotipo E	Genotipo F	Genotipo I
San Miguelito	5		3	
Colón	5	4	4	1
Panamá Oeste	5		2	1

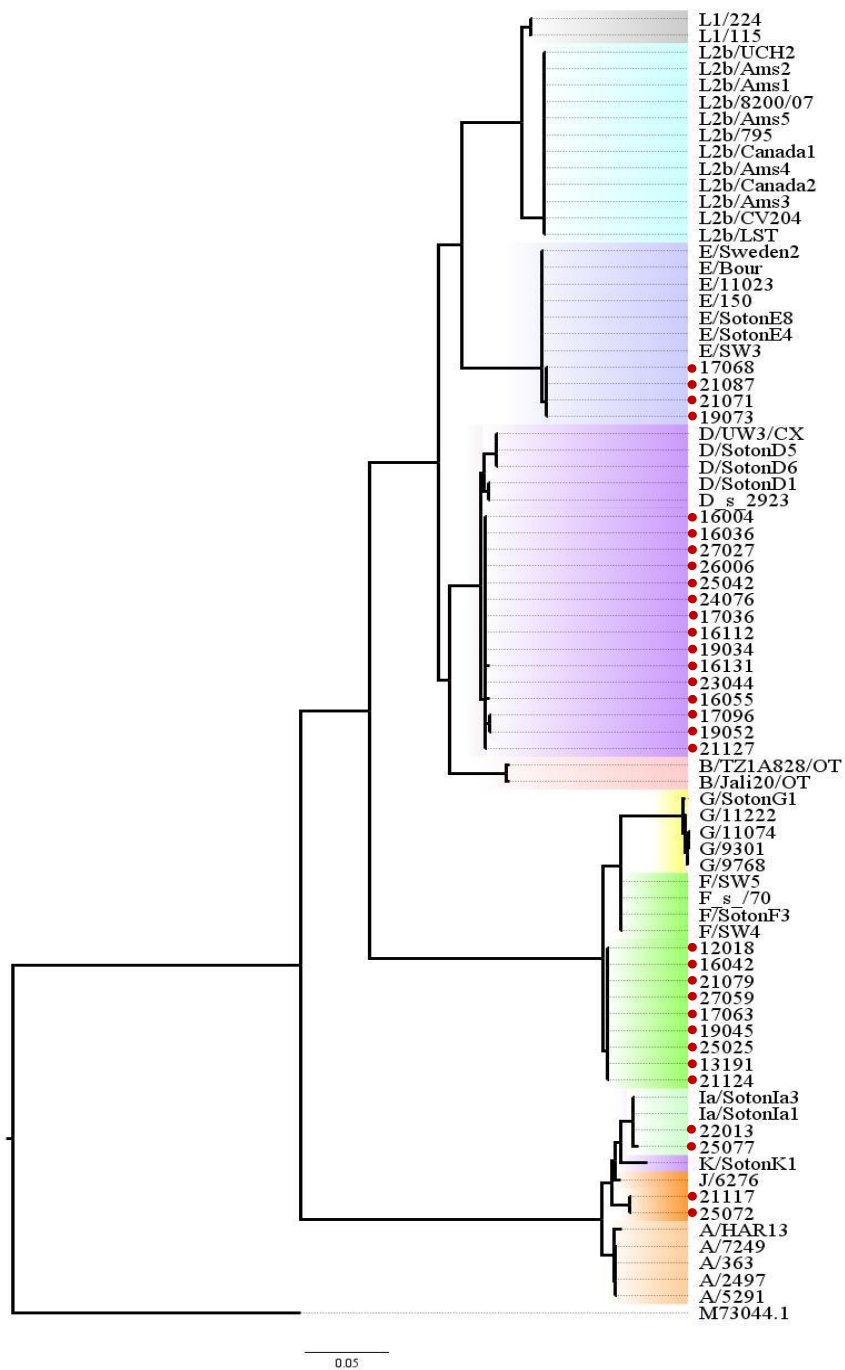


Figura 11. Árbol filogenético obtenido del análisis de una región del gen *ompA*. Se muestra la identificación del genotipo utilizando secuencias conocidas obtenidas del genbank. Las muestras analizadas en este estudio se muestran con un punto rojo.

3.4 Presencia de mutaciones descritas

Evaluamos las muestras en busca de mutaciones en los genes rplD, rplV y ARNr 23S que hayan sido descritas como relevantes para adquirir resistencia a los macrólidos, siendo la azitromicina incluida en la primera línea de las terapias utilizadas para *C. trachomatis*.

Al analizar el gen rplD que codifica para la proteína L4, las 32 secuencias al ser comparadas al gen de referencia mostraron sustituciones, las sustituciones más prevalentes fueron R11Q y V132I encontradas en 22 de las secuencias analizadas (Ver tabla 3).

Al analizar el gen rplV que codifica para la proteína L22, un total de 31 secuencias mostraron sustituciones, las más prevalentes fueron G52S, R65C, V77A encontradas en 29 de las secuencias analizadas. De las 2 muestras restantes que no presentaban las sustituciones descritas, se encontró la sustitución V29I correspondientes a la mutación A22T encontradas en las mismas muestras analizadas en el gen rplD (Ver cuadro 3).

Cuadro 3. Resultado de genotipos encontrados y mutaciones en los genes rplD y rplV.

Código	Distrito	Genovar	Mutaciones rplDc (L4)	Mutaciones rplDv (L22)
12.018	San Miguelito	F	R11Q_V132I	G52S_R65C_V77A
13.191	San Miguelito	F	R111Q_V132I_T140A	G52S_R65C_V77A
16.004	San Miguelito	D	E153G_S215G	
16.036	San Miguelito	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
16.042	San Miguelito	F	R111Q_V132I_N171S_L172S	G52S_R65C_V77A
16.055	San Miguelito	D	F24C_K33E_R111Q_V132I_T220A	V49A_G52S_R65C_V77A
16.112	San Miguelito	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
16.131	San Miguelito	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
17.036	Colón	D	A22T	V29I
17.063	Colón	F	Q74*_R111Q_V132I_N151D	G52S_R65C_V77A
17.068	Colón	E	V37A_S57N_Q97R_R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
17.096	Colón	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
19.034	Colón	D	R111Q_V132I_N190S_V204A	G52S_R65C_V77A
19.045	Colón	F	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
19.052	Colón	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
19.073	Colón	E	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
21.071	Colón	E	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
21.079	Colón	F	A22T_R111Q_V132I	V29I_G52S_R65C_V77A
21.087	Colón	E	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
21.117	Colón		R111Q_Q116K_S129P_V132I	G52S_R65C_V77A
21.124	Colón	F	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A_S100R
21.127	Colón	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A_S100R
22.013	Colón	I	K12E_A22T_R111Q_V132I_V182I	V29I_G52S_R65C_V77A
23.044	Panamá Oeste	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
24.076	Panamá Oeste	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
25.025	Panamá Oeste	F	A72V_R111Q_V132I_N171S	G52S_R65C_V77A
25.042	Panamá Oeste	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
25.072	Panamá Oeste		R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
25.077	Panamá Oeste	I	A22T_K122R	V29I
26.006	Panamá Oeste	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
27.027	Panamá Oeste	D	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A
27.059	Panamá Oeste	F	R111Q_V132I	G52S_R65C_V77A

Por otro lado, amplificamos y secuenciamos el gen ARNr 23S en 15 muestras, alineamos las secuencias obtenidas utilizando la herramienta MEGA (v.10.2.5) y comparamos con una secuencia del gen RNAr 23S de *C. trachomatis* obtenida del genbank (NR_076160). Ubicamos las posiciones 2058 y 2611 numeración de *Escherichia coli* en el gen ARNr 23S de *C. trachomatis* las cuales fueron correspondiente a la numeración 2107 y 2660 respectivamente. Una vez obtenida la ubicación en el gen de estudio, procedimos a buscar los cambios A2107C y T2660C en las 15 secuencias analizadas, sin embargo, a pesar de que en la posición 2107 de las secuencias se encontraron cambios, ninguno era de relevancia para originar resistencia de la cepa a los macrólidos (Ver figura 12).

A.

Código	Posición del nucleótido																									
	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	
NR 076160.1 strain D/UW-3/CX	A	A	A	A	G	A	C	C	C	C	G	T	G	A	A	C	C	T	T	T	A	C	T	G	T	
27059_Panamá Oeste	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
25077_Panamá Oeste	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	R	.	S	.	.	.	.	.	.	.	R	.	
25042_Panamá Oeste	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	
25025_Panamá Oeste	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	
24076_Panamá Oeste	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	
22013_Colón	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	
21127_Colón	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
21117_Colón	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
21079_Colón	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	
19052_Colón	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	
19045_Colón	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
17096_Colón	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
17068_San Miguelito	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
16131_San Miguelito	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	R	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
16004_San Miguelito	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

A.

Código	Posición del nucleótido																								
	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677
NR 076160.1 strain D/UW-3/CX	A	G	T	T	T	G	G	T	C	T	C	T	A	T	C	C	T	T	C	G	T	G	G	G	C
27059_Panamá Oeste	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
25077_Panamá Oeste	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	K	.	.	Y	.	.	.	.	.
25042_Panamá Oeste	.	.	.	.	C	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	D	K	.	Y	.	.	.	.	.
25025_Panamá Oeste	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	K	Y	Y	.	.	.	.	.	.
24076_Panamá Oeste	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	K	K	.	Y	.	.	.	.	.
22013_Colón	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y	D	Y	.	.	.	.	.	.
21127_Colón	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.
21117_Colón	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	G	C	.	.	.	.	.	Y
21079_Colón	.	.	.	.	C	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	D	K	.	Y	.	.	.	.	.
19052_Colón	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	W	Y	.	Y	.	.	.	.	.
19045_Colón	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	Y	G	Y	.	.	.	.	.	.
17096_Colón	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
17068_San Miguelito	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
16131_San Miguelito	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	W	Y	.	Y	.	.	.	.	.
16004_San Miguelito	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	W	.	.	.	C	.	.	.	.

Identico (.)Indel (-)ausente (?)

Figura 12. Alineamiento de secuencias del gen ARNr 23S. Se muestra los cambios a nivel de nucleótidos con respecto a la secuencia de referencia. El nucleótido resaltado de color amarillo indica A) la posición 2107 y B) la posición 2660 homólogas a la posición 2058 y 2611 respectivamente a la numeración en el gen ARNr 23S de *Escherichia coli*.

3.5 Evaluación de patrones de circulación

Con el fin de buscar algún tipo de patrón de circulación que se pudiera evidenciar entre las muestras, separamos el análisis por lugar y observamos que las mutaciones se distribuyen de manera similar en los 3 lugares estudiados, por lo que no se obtuvo un patrón definido en cada lugar (Ver figura 13, 14 y 15).

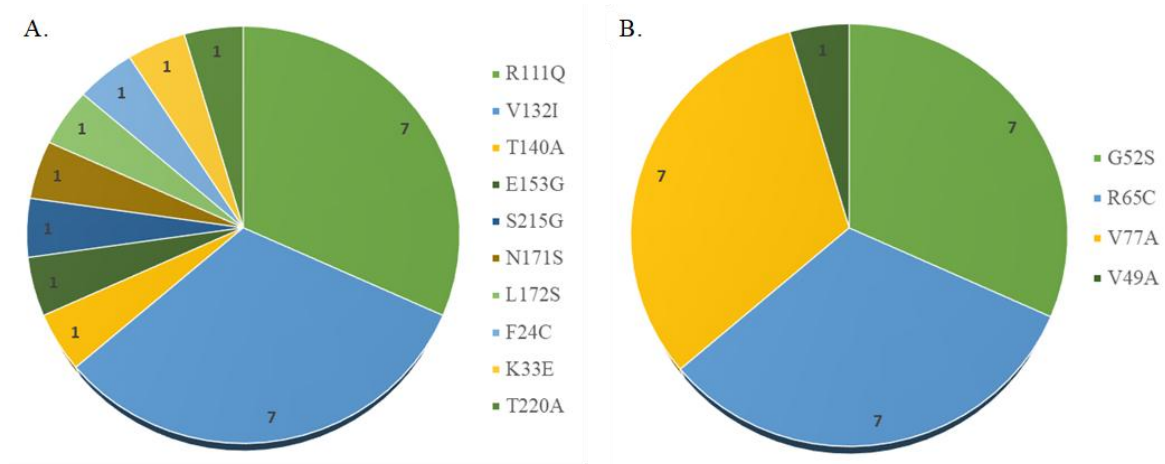


Figura 13. Mutaciones encontradas en las secuencias de San Miguelito. A. Mutaciones en el gen rplD (L4), B. Mutaciones en el gen rplV (L22).

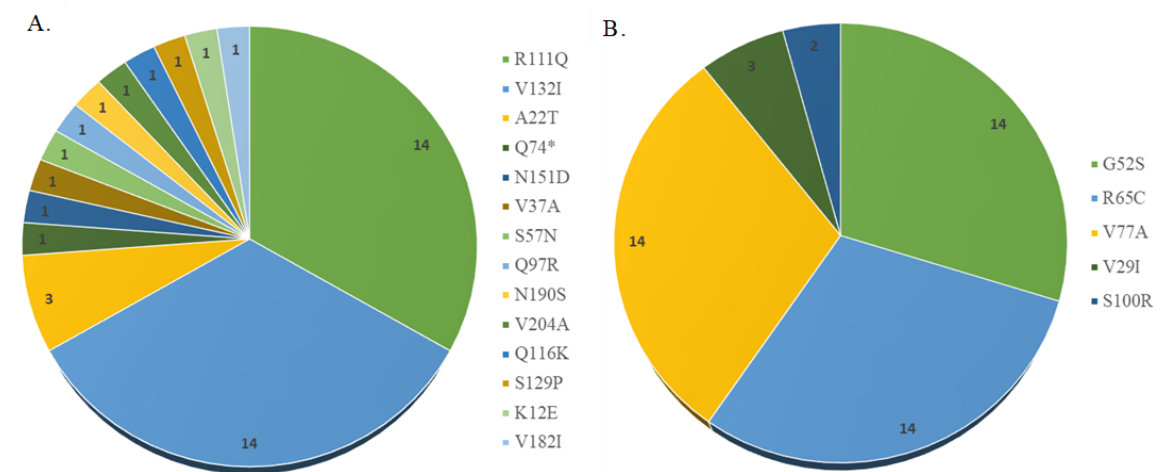


Figura 14. Mutaciones encontradas en las secuencias de Colón. A. Mutaciones en el gen rplD (L4), B. Mutaciones en el gen rplV (L22).

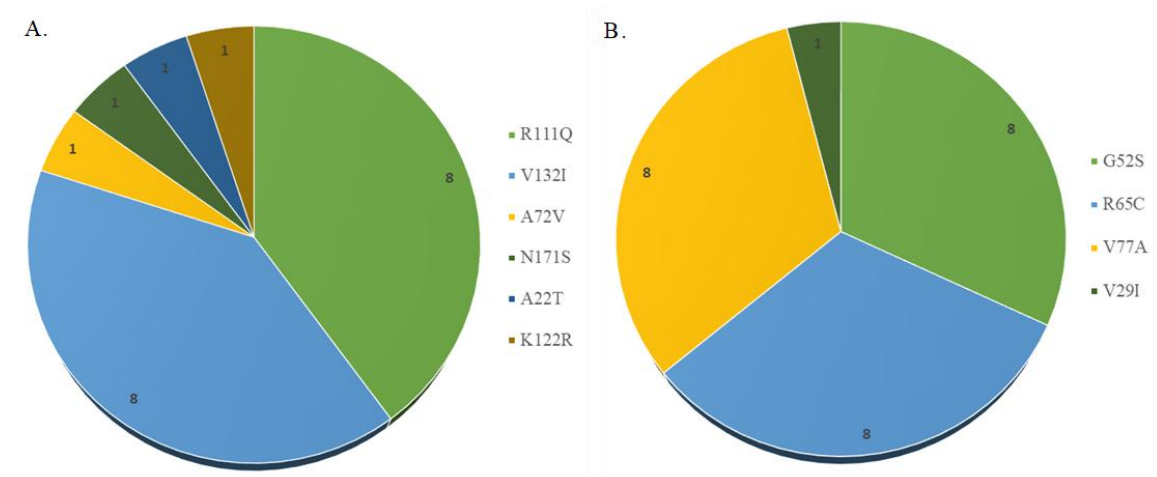


Figura 15. Mutaciones encontradas en las secuencias de Panamá Oeste. A. Mutaciones en el gen rplD (L4), B. Mutaciones en el gen rplV (L22).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, encontramos 4 genotipos diferentes de *C. trachomatis* en las diferentes provincias: genotipos D (46%), F (28%), E (12%), I (6%), los genotipos D, F y E pertenecen al linaje T1 (E, F y D) que están clasificados como los genotipos urogenitales más prevalentes y el genotipo I pertenece al linaje T2, clasificados como los genotipos más raros o menos prevalentes (Harris et al., 2012), estos datos son consecuente con los reportes realizados por otros países donde los genotipos E, F y D representan las cepas con mayor circulación dentro de la población (Millman et al., 2004)(Martínez et al., 2015)(Machado et al., 2011)(Kiguen et al., 2019) constituyendo entre el 60 y 80% de los pacientes positivos (Lagergård et al., 2010). El genotipo E, a pesar de ser uno de los más prevalentes a nivel mundial, solo se encontró en la provincia de Colón. Aunque no está claro la importancia del gen *ompA* sobre la severidad de la enfermedad, la proteína de membrana externa (MOMP) juega un papel en la respuesta inmune del huésped (Chin et al., 2018), por lo cual, también se recomienda realizar estudios sobre las cepas circulantes y su asociación clínica. Incluso, se ha observado que la tipificación por sí sola del gen *ompA*, realizadas mediante pruebas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos, puede resultar en una clasificación errónea, cuando la bacteria presenta recombinación en este gen, como fue el caso de un estudio publicado recientemente donde se caracterizó una nueva cepa recombinante L2b/D-Da causante de un brote asociado a hombres que tienen sexo con hombres (HSH) coinfectados con *Neisseria gonorrhoeae* y VIH, donde el uso de la filogenia convencional utilizando el gen *ompA* ubicó esta cepa junto a las cepas de genotipos D/Da impidiendo la notificación del brote por parte del laboratorio y a un

tratamiento incorrecto, como consecuencia se implementaron pruebas diagnósticas dirigidas a detectar blancos específicos para LGV y a su diferenciación (Borges et al., 2019).

La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos, ha generado preocupación por el frecuente fracaso terapéutico que ha tenido *C. trachomatis* en los últimos años (P. Horner, 2006), especialmente a la azitromicina y doxiciclina, antibióticos utilizados para tratar estas infecciones, este fracaso terapéutico, es atribuido principalmente a reinfecciones o recaídas cuando la bacteria presenta su forma persistente, que posteriormente puede revertirse a su forma de cuerpo reticular típicos, sin embargo, algunos estudios han registrado resistencia a la azitromicina en otras especies como *Chlamydia psittaci* con mutaciones en el gen ARNr 23S, por otro lado, se encontró la mutación Gln 66 Lys en una población de *C. trachomatis* que la hizo 8 veces menos susceptible a la azitromicina (Binet & Maurelli, 2007).

En nuestro estudio, encontramos en 29 de las 32 muestras secuenciadas la triple mutación G52S, R65C, V77A en el gen *rplV* que codifica la proteína L22, esta triple mutación es relevante para adquirir resistencia a macrólidos, sin embargo, para que se genere debe estar acompañada de las mutaciones en las posiciones 2058 y 2611 (numeración de *Escherichia coli*) en el gen ARNr 23S. Al evaluar los genes *rplD* y *RNAr 23S* no se encontraron las mutaciones accesorias en estos genes necesarias para que *C. trachomatis* adquiriera resistencia genotípica a macrólidos, sin embargo, evitar el uso de macrólidos en estos casos, reduciría la probabilidad de desarrollar las mutaciones descritas en el ARNr 23S para que se genere resistencia a macrólidos (Mette T Christiansen, 2014).

Aunque estos hallazgos no descartan la evolución de casos clínicos con resistencia, muestran que, dentro del grupo de muestras analizadas, no hay casos aún con dichas resistencias genotípicas a los antimicrobianos prescritos para contrarrestar la infección. A pesar de que *C. trachomatis* es una de las ITS más prevalentes a nivel mundial y donde muchos de los patógenos humanos se están volviendo resistentes a los antimicrobianos, no se han encontrado clones altamente resistentes a macrólidos. Esta incapacidad de desarrollar mutaciones y mantenerlas refuerza la idea del alto costo biológico a su mantenimiento que le genera a la bacteria para establecer la resistencia (James Hadfield, Angèle Bénard, 2017), otro factor que puede influir es la falta de vigilancia diagnóstica, lo que conlleva a que la bacteria no sea expuesta a los antimicrobianos y por ende no se vea en la necesidad de desarrollar cambios o mutaciones que le permitan evadir la acción que esta genera.

Actualmente en Panamá, las infecciones causadas por *C. trachomatis* no pertenecen al grupo de enfermedades de notificación obligatoria listadas en el decreto ejecutivo N° 1617, por lo tanto, el país no cuenta con información referente a prevalencia de casos y las patologías producto de las complicaciones que esta infección puede causar, es por eso, que la Estrategia Mundial del Sector Salud, propone mejorar la calidad de datos de las ITS e identificar las áreas prioritarias para actuar. Aunque en Panamá no se ha implementado métodos diagnósticos y de tipificación, en los últimos años a nivel mundial se ha visto la necesidad de implementar cambios a nivel diagnóstico, vigilancia y estrategias terapéuticas como ha sido el caso de la nueva variante encontrada en Suecia en el año 2006 donde se notó una falsa disminución de infecciones diagnosticadas de al menos 25% que fue producto de una delección de 277pb del plásmido críptico de *C. trachomatis*, siendo el área

objetivo de las pruebas diagnósticas disponibles en ese momento (Torvald Ripa & Nilsson, 2007).

Por otro lado, la tipificación y la vigilancia molecular de *C. trachomatis*, así como la de otras infecciones de transmisión sexual, basada en secuenciación de nueva generación, no es un método de uso extendido en el país, a pesar de la necesidad de caracterizar oportunamente los tipos y variantes circulantes para revelar cadenas de transmisión, estas tecnologías permitirían dirigir oportunamente los recursos a detener esas cadenas y a su vez guiar terapias de manera precisa para disminuir el impacto a nivel salud pública de esta infección. Los patrones de transmisión de agentes infecciosos están asociados con el aumento y movilidad de la población, así como en las conductas sexuales de riesgo, estos factores incrementan la propagación y recombinación de cepas por lo que se espera que la transmisión continua de esta bacteria provoque un aumento en la tasa de evolución de *C. trachomatis* en los próximos años.

No obstante, este estudio presenta algunas limitaciones a mencionar: El tamaño de la muestra, que podría ampliarse para tener una mayor representatividad entre las variables analizadas. El tipo de muestra, al ser una muestra de orina, encontramos menor concentración de la bacteria necesaria para realizar este tipo de estudio molecular, en ese caso, se podría utilizar una muestra de hisopado vaginal. La cantidad de muestra, la mayor parte de las muestras almacenadas contenían 1mL de orina, por lo que no fue posible utilizar una mayor cantidad de ADN extraído para aquellas muestras que contenían baja concentración de la bacteria.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Este estudio proporciona los primeros datos sobre la genética de *C. trachomatis* en un grupo de la población en Panamá.

La tipificación molecular de las 32 muestras secuencias mostraron los genotipos D (46%), F (28%), E (12%), I (6%) que circulan en nuestro país distribuidos en la provincia de Panamá, Panamá Oeste y Colón.

En la evaluación de las secuencias en busca de mutaciones descritas encontramos en el gen *rplV* que codifica a la proteína L22 la triple mutación G52S, R65C, V77A, sin embargo, no se encontró mutaciones en los genes *rplD* y *RNAr 23S* que son de importancia para que se genere resistencia a la azitromicina.

Queda en evidencia la falta de estudios y métodos óptimos de vigilancia que permitan monitorear y comprender la prevalencia, incidencia y secuelas a la salud ocasionadas por la infección.

La aparición de variantes en otros países con potencial patógeno y epidemiológico resalta la necesidad de realizar estudios de vigilancia en busca de capturar la evolución de *C. trachomatis*.

RECOMENDACIONES

Implementar la vigilancia de rutina en el diagnóstico y tratamiento oportuno para evitar grandes repercusiones sobre la salud reproductiva en la población, es por ello, que la guía para el tratamiento de las ITS 2021 recomienda el cribado anual a todas las mujeres menores de 25 años y a mayores de 25 años que pertenezcan a poblaciones vulnerables.

Incluir dentro de las enfermedades de notificación obligatoria en Panamá, todos los casos positivos por Clamidia y las patologías producto de las complicaciones que esta infección puede causar.

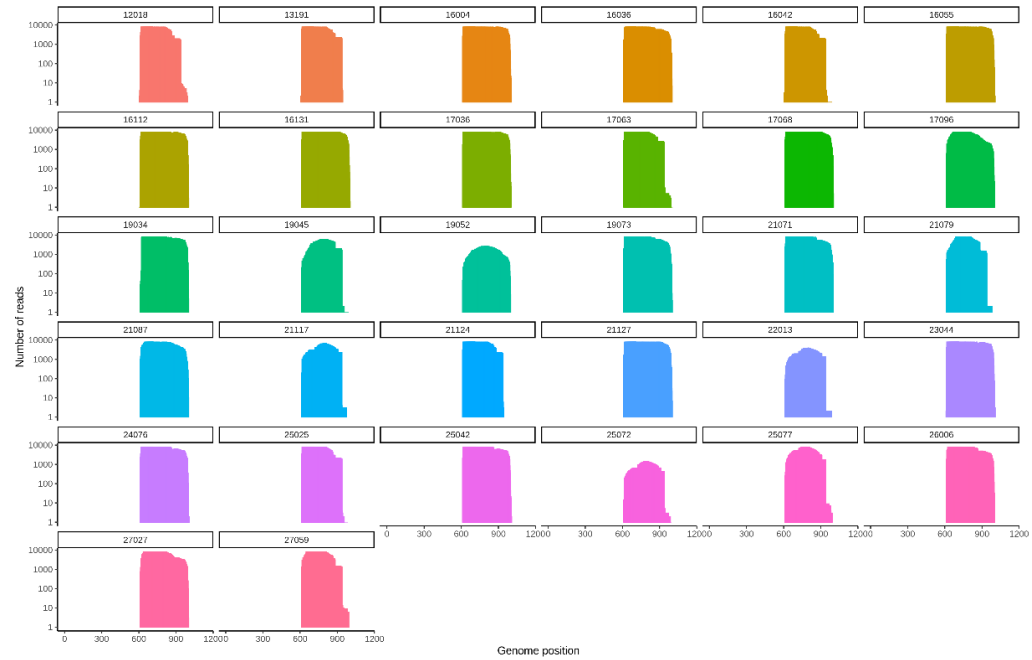
En futuros estudios realizar un mayor tamaño de la muestra y con una población en rangos de edad comprendidos entre 15 y 30 años para identificar la tipificación de más genotipos y la evaluación de variantes.

Realizar más estudios que permitan abordar importantes brechas de conocimiento en esta área y proporcionar evidencias para el desarrollo de pautas de manejo más sólidas.

ANEXOS

Anexo 1. Calidad de las secuencias obtenidas en cada gen.

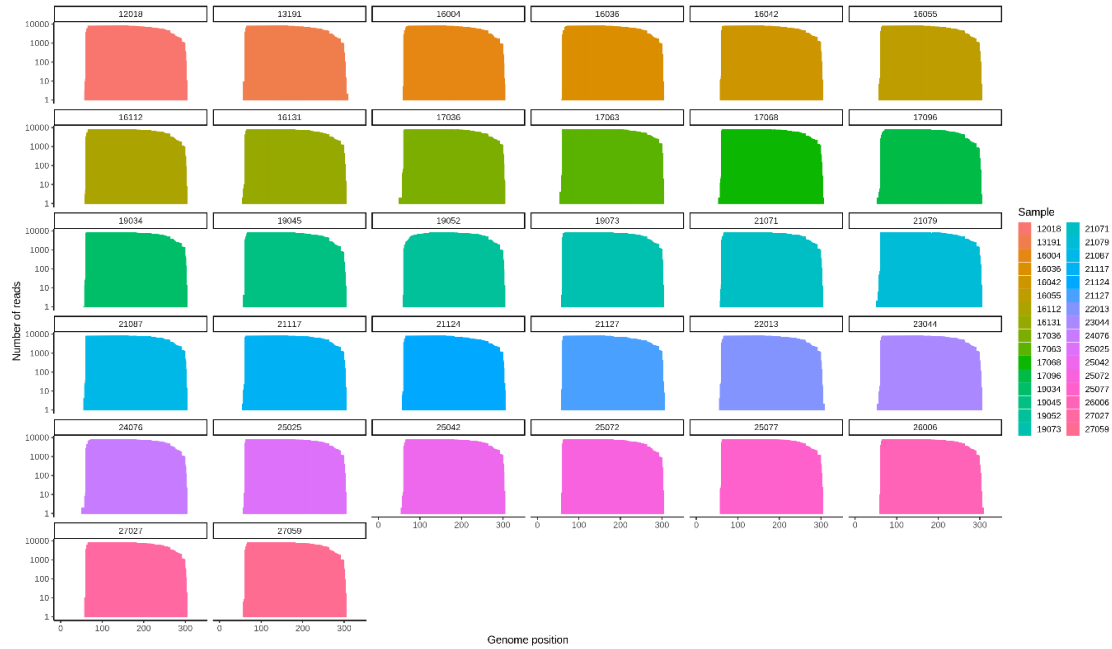
Gen ompA



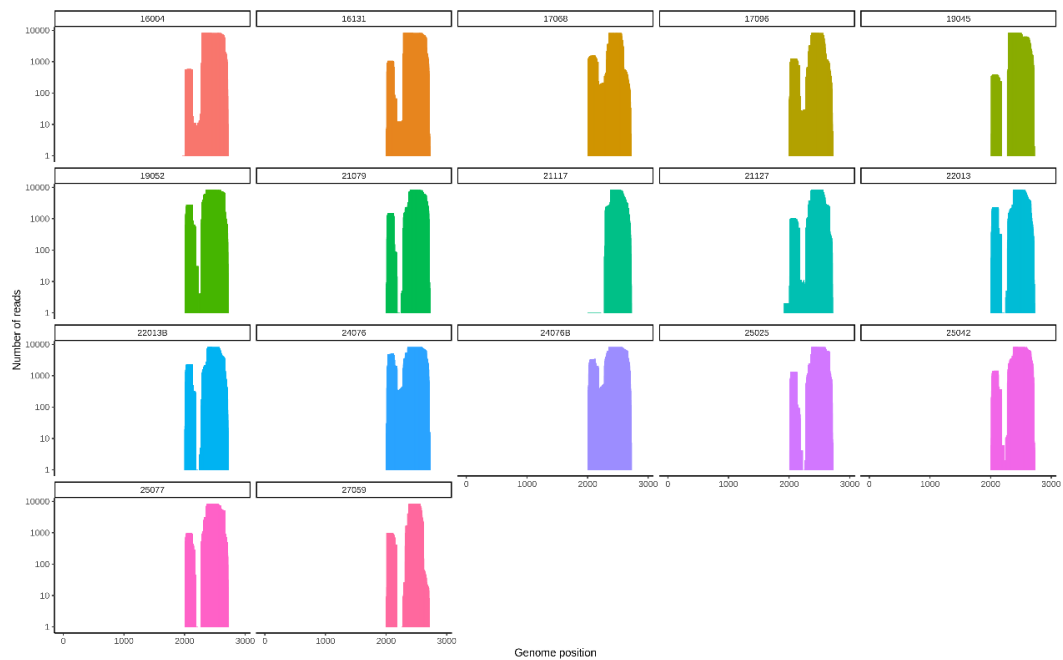
Gen rplD (L4)



Gen rpIV (L22)



ARNr 23S



Anexo 2: Información de secuencias conocidas utilizadas para identificar los genotipos

Genotipo	Identificación de la cepa	Ciudad	Tipo de muestra	Año	Acceso GenBank
A	A/HAR-13	Egypt	Conjuntiva	1958	CP000051
A	A/2497	Tanzania	Ocular	2000	FM872306
A	A/363	Tanzania	Ocular	2000	HE601796
A	A/5291	Tanzania	Ocular	2000	HE601810
A	A/7249	Tanzania	Ocular	2000	HE601797
B	B/TZ1A828/OT	Tanzania	Ocular	1998	FM872308
B	B/Jali20	The Gambia	Ocular	1985	FM872307
D	D/UW3/CX	USA	Cervix	1965	AE001273
D(s)	D(s)/2932		Cervix		ACFJ01000001
D	D/SotonD1	UK	Endocervix	2009	HE601798
D	D/SotonD5	UK	Endocervix	2009	HE601799
D	D/SotonD6	UK	Endocervix	2009	HE601800
E	E/Bour	USA	Ocular	1959	HE601870
E	E/SW2	Sweden	Urethra	2006	FN652779
E	E/SW3	Sweden	Cervix	2001	HE601801
E	E/SotonE4	UK	Endocervix	2009	HE601802
E	E/SotonE8	UK	Endocervix	2009	HE601803
E	E/11023		Cervix		CP001890
E	E/150		Rectum		CP001886
F	F/SW4	Sweden	Cervix	2002	HE601804
F	F/SW5	Sweden	Cervix	2002	HE601805
F	F/SotonF3	UK	Endocervix	2009	HE601806
F(s)	F(s)/70				ABYF01000001
G	G/9301		Urethra		CP001930
G	G/9768		Rectum		CP001887
G	G/11222		Cervix		CP001888
G	G/11074		Rectum		CP001889
G	G/SotonG1	UK	Endocervix	2009	HE601807
J	J/6276		Cervix		ABYD01000001
Ia	Ia/SotonIa1	UK	Endocervix	2009	HE601808
Ia	Ia/SotonIa3	UK	Endocervix	2009	HE601809
K	K/SotonK1	UK	Endocervix	2009	HE601794
L1/L2	L1/115	South	LGV patient	<1994	HE601952
L1/L2	L1/224	South	LGV patient	<1994	HE601953
L2b	L2b/8200/07	Sweden	Rectum	2007	HE601795
L2b	L2b/UCH-2	UK	Rectum		HE601956
L2b	L2b/Canada1	Canada	Rectum	2004	HE601963
L2b	L2b/Canada2	Canada	Rectum	2005	HE601957
L2b	L2b/LST	France	Rectum	2008	HE601958
L2b	L2b/CV204	France	Rectum	2006	HE601960
L2b	L2b/795	France	Rectum	2004	HE601949
L2b	L2b/Ams1	Netherlands	Penile ulcer	2004	HE601959
L2b	L2b/Ams2	Netherlands	Anus	2005	HE601961
L2b	L2b/Ams3	Netherlands	Anus	2004	HE601962
L2b	L2b/Ams4	Netherlands	Anus	2005	HE601964
L2b	L2b/Ams5	Netherlands	Anus	2004	HE601965

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelsamed, H., Peters, J., & Byrne, G. I. (2013). Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: Impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiology*, 8(9), 1129–1146. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.80>
- Aghaizu, A., Reid, F., Kerry, S., Hay, P. E., Mallinson, H., Jensen, J. S., Kerry, S., Kerry, S., & Oakeshott, P. (2014). *Frequency and risk factors for incident and redetected Chlamydia trachomatis infection in sexually active , young , multi-ethnic women : a community based cohort study*. 524–528. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051607>
- Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B. B., Greub, G., Everett, K. D. E., Bush, R. M., Andersen, A. A., Greub, G., Kuo Stephens, R.S., Bavoil, P.M., Kaltenboeck, B., C.-C., Sachse, K., Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B. B., Stephens, R. S., Kuo, C.-C., Rosselló-Móra, R., Horn, M., Schachter, J., Stephens, R. S., Timms, P., Kuo, C.-C., ... Bavoil, P. M. (2010). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.004>
- Bhengraj, A. R., Vardhan, H., Srivastava, P., Salhan, S., & Mittal, A. (2010). Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* obtained from recurrently infected female patients in India. *Chemotherapy*, 56(5), 371–377. <https://doi.org/10.1159/000314998>
- Binet, R., & Maurelli, A. T. (2007). Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC and *C. trachomatis* L2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4267–4275. <https://doi.org/10.1128/AAC.00962-07>
- 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). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000313>
- Cedeño, M. M., Marín, J. L., & Espino, C. I. (2020). *Incidencia de Chlamydia trachomatis y micoplasmas genitales en adolescentes de 10 a 19 años del Centro de Atención Integral del Adolescente de Colón , en los meses de julio a septiembre del año 2018* *Incidence of Chlamydia trachomatis and genital mycoplasma*. 4(1), 25–35.
- Chin, S. A., Alemayehu, W., Melese, M., Lakew, T., Cevallos, V., Lietman, T. M., & Keenan, J. D. (2018). Association of *Chlamydia trachomatis* ompA genovar with trachoma phenotypes. *Eye (Basingstoke)*, 32(8), 1411–1420. <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0069-4>
- Choroszy-KRÓL, I., Frej-MĄDRZAK, M., Jama-Kmiecik, A., Bober, T., & Sarowska, J. (2012). Characteristics of the *chlamydia trachomatis* species - Immunopathology and infections. In *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (Vol. 21, Issue 6, pp. 799–808). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-257060-5.50003-4>

- Christiansen, M. T., Brown, A. C., Kundu, S., Tutill, H. J., Williams, R., Brown, J. R., Holdstock, J., Holland, M. J., Stevenson, S., Dave, J., Tong, C. Y. W., Einer-Jensen, K., Depledge, D. P., & Breuer, J. (2014). Whole-genome enrichment and sequencing of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples. *BMC Infectious Diseases*, 14(591), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0591-3>
- Dean, D. (2009). *Chlamydia trachomatis* today: Treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. *Drugs of Today*, 45(SUPPL. B), 25–31. <https://doi.org/4598> [pii]
- Elwell, C., Mirrashidi, K., & Engel, J. (2016). Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 385–400. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.30>
- Escobedo-Guerra, M. R., Katoku-Herrera, M., Lopez-Hurtado, M., Villagrana-Zesati, J. R., de Haro-Cruz, M. de J., & Guerra-Infante, F. M. (2019). Identification of a new variant of *Chlamydia trachomatis* in Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.02.008>
- G, E. C. (2009). Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Fac Med UNAM*.
- Gabster, A., Mayaud, P., Ortiz, A., Castillo, J., Castellero, O., Martínez, A., López, A., Aizprúa, B., Pitano, S., Murillo, A., & Pascale, J. M. (2020). *Prevalence and determinants of genital Chlamydia trachomatis among school- - going , sexually experienced adolescents in urban and rural Indigenous regions of Panama*. 1–8. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054395>
- Gabster, A., Mohammed, D. Y., Arteaga, G. B., Castellero, O., Mojica, N., Dymond, J., Varela, M., & Pascale, J. M. (2016). Correlates of sexually transmitted infections among adolescents attending public high schools, Panama, 2015. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163391>
- Guangming Zhong, M.D., P. . (2017). Chlamydial Plasmid-Dependent Pathogenicity. *HHS Public Access*, 25(2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.006>
- Hadfield, J., Harris, S. R., Seth-Smith, H. M. B., Parmar, S., Andersson, P., Giffard, P. M., Schachter, J., Moncada, J., Ellison, L., Valet, M. L. G., Fermepin, M. R., Radebe, F., Mendoza, S., Ouburg, S., Morré, S. A., Sachse, K., Puolakkainen, M., Korhonen, S. J., Sonnex, C., ... Thomson, N. R. (2017). Comprehensive global genome dynamics of *Chlamydia trachomatis* show ancient diversification followed by contemporary mixing and recent lineage expansion. *Genome Research*, 27(7), 1220–1229. <https://doi.org/10.1101/gr.212647.116>
- Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M. B., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., Marsh, P., Skilton, R. J., Holland, M. J., Mabey, D., Peeling, R. W., Lewis, D. A., Spratt, B. G., Unemo, M., Persson, K., Parkhill, J., & Thomson, N. R. (2012). *Whole genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing* Europe PMC Funders Group Agronomique, USC " Mycoplasmal and chlamydial infections in humans " , *French Nationa*. 44(4), 1–16. <https://doi.org/10.1038/ng.2214>.Whole
- Horner, P. (2006). The case for further treatment studies of uncomplicated genital

- Chlamydia trachomatis infection. In *Sexually Transmitted Infections* (Vol. 82, Issue 4, pp. 340–343). <https://doi.org/10.1136/sti.2005.019158>
- Horner, P. J. (2012). *Azithromycin antimicrobial resistance and genital Chlamydia trachomatis infection: duration of therapy may be the key to improving efficacy*. 88(3), 14–17. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050385>
- James Hadfield, Angèle Bénard, D. D. and N. T. (2017). *The Hidden Genomics of Chlamydia trachomatis*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2017_39
- Jones, C. A., Hadfield, J., Thomson, N. R., Cleary, D. W., Marsh, P., Clarke, I. N., & O'Neill, C. E. (2020). The nature and extent of plasmid variation in *chlamydia trachomatis*. *Microorganisms*, 8(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030373>
- Kiguen, A. X., Marramá, M., Ruiz, S., Estofan, P., Venezuela, R. F., Mosmann, J. P., Monetti, M. S., Rivero, V., & Cuffini, C. G. (2019). Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women from Córdoba, Argentina: A prospective study. *PLoS ONE*, 14(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217245>
- Kong, F. Y. S., & Hocking, J. S. (2015). Treatment challenges for urogenital and anorectal Chlamydia trachomatis. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1030-9>
- Lagergård, T., Hadad, R., Tunbäck, P., Lindholm, L., Löwhagen, G. B., & Unemo, M. (2010). Distribution of Chlamydia trachomatis ompA genovars and the new variant of C. trachomatis in the Göteborg area, Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(5), 609–611. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-0887-1>
- Levy, S. B., Gunta, J., & Edemekong, P. (2019). Screening for Sexually Transmitted Diseases. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 46(1), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.10.013>
- Machado, A. C. S., Bandea, C. I., Alves, M. F. C., Joseph, K., Igiyetseme, J., Miranda, A. E., Guimarães, E. M. B., Turchi, M. D., & Black, C. M. (2011). Distribution of Chlamydia trachomatis genovars among youths and adults in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 60(4), 472–476. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026476-0>
- Martínez, M. A., Ovalle, A., Camponovo, R., & Vidal, R. (2015). Chlamydia trachomatis genovars causing urogenital infections in Santiago, Chile. *Infectious Diseases*, 47(3), 156–160. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.977341>
- Mestrovic, T., & Ljubin-Sternak, S. (2018). Molecular mechanisms of Chlamydia trachomatis resistance to antimicrobial drugs. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, 656–670. <https://doi.org/10.2741/4611>
- Millman, K., Black, C. M., Johnson, R. E., Stamm, W. E., Jones, R. B., Hook, E. W., Martin, D. H., Bolan, G., Tavaré, S., & Dean, D. (2004). Population-Based Genetic and Evolutionary Analysis of Chlamydia trachomatis Urogenital Strain Variation in the United States. *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2457–2465.

- <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2457-2465.2004>
- Misyurina, O. Y., Chipitsyna, E. V., Finashutina, Y. P., Lazarev, V. N., Akopian, T. A., Savicheva, A. M., & Govorun, V. M. (2004). Mutations in a 23S rRNA Gene of *Chlamydia trachomatis* Associated with Resistance to Macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1347–1349. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1347-1349.2004>
- Mohseni, M., Sung, S., & Takov, V. (2020). *Chlamydia*. 1–10.
- Nunes, A., Borrego, M. J., Nunes, B., Florindo, C., & Gomes, J. P. (2009). Evolutionary dynamics of ompA, the gene encoding the *Chlamydia trachomatis* key antigen. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7182–7192. <https://doi.org/10.1128/JB.00895-09>
- Nunes, A., & Gomes, J. P. (2014). Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 23, pp. 49–64). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.029>
- Occhionero, M., Paniccia, L., Pedersen, D., Rossi, G., Mazzucchini, H., Entrocassi, A., Vaulet, L. G., Gualtieri, V., & Fermepin, M. R. (2015). Prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y factores de riesgo de infecciones transmisibles sexualmente en estudiantes universitarios. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.11.003>
- OMS. (2016). Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra Infecciones de Transmisión Sexual para 2016-2021. Hacia el fin de las ITS. *Oms*, 64.
- Paba, P., Bonifacio, D., Di Bonito, L., Ombres, D., Favalli, C., Syrjänen, K., & Ciotti, M. (2008). 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*, 51(4), 230–234. <https://doi.org/10.1159/000156481>
- Rawre, J., Juyal, D., & Dhawan, B. (2017). Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: An overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35(1), 17–26. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_341
- Redgrove, K. A., & McLaughlin, E. A. (2014). The role of the immune response in *chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: A double-edged sword. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00534>
- Ripa, T., & Nilsson, P. (2006). A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(11), 10–11. <https://doi.org/10.2807/esw.11.45.03076-en>
- Ripa, Torvald, & Nilsson, P. A. (2007). A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sexually Transmitted Diseases*, 34(5), 255–256. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31805ce2b9>
- Rockey, D. D. (2011). Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid. *Journal of Experimental Medicine*, 208(11), 2159–2162. <https://doi.org/10.1084/jem.20112088>

- Seth-Smith, H. M. B., Harris, S. R., Persson, K., Marsh, P., Barron, A., Bignell, A., Bjartling, C., Clark, L., Cutcliffe, L. T., Lambden, P. R., Lennard, N., Lockey, S. J., Quail, M. A., Salim, O., Skilton, R. J., Wang, Y., Holland, M. J., Parkhill, J., Thomson, N. R., & Clarke, I. N. (2009). Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-239>
- Somani, J., Bhullar, V. B., Workowski, K. A., Farshy, C. E., & Black, C. M. (2000). Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *Journal of Infectious Diseases*, 181(4), 1421–1427. <https://doi.org/10.1086/315372>
- Torgovnik, J. (2016). *Infecciones de transmisión sexual*. 2(1), 1–9.
- Torreone, E., Papp, J., & Weinstock, H. (2014). Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Genital Infection Among Persons Aged 14–39 Years — United States, 2007–2012. *MMWR: Morbidity & Mortality Weekly Report*.
- Unemo, M., & Clarke, I. N. (2011). The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(1), 62–69. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834204d5>
- Unemo, M., Seth-Smith, H. M. B., Cutcliffe, L. T., Skilton, R. J., Barlow, D., Goulding, D., Persson, K., Harris, S. R., Kelly, A., Bjartling, C., Fredlund, H., Olcén, P., Thomson, N. R., & Clarke, I. N. (2010). The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology*, 156(5), 1394–1404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036830-0>
- Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001>
- Wiesenfeld, H. C. (2017). Screening for *Chlamydia trachomatis* Infections in Women. *New England Journal of Medicine*, 376(8), 765–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1412935>
- Workowski, K. A., Bachmann, L. H., Chan, P. A., Johnston, C. M., Muzny, C. A., Park, I., Reno, H., Zenilman, J. M., & Bolan, G. A. (2021). Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. In *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* (Vol. 70, Issue 4). <https://doi.org/10.15585/mmwr.r7004a1>
- World Health Organization. (2016). WHO GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS. *World Health Organization*.
- Xue, Y., Zheng, H., Mai, Z., Qin, X., Chen, W., Huang, T., Chen, D., & Zheng, L. (2017). An in vitro model of azithromycin-induced persistent *Chlamydia trachomatis* infection. *FEMS Microbiology Letters*, 364(14), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx145>
- Zhu, H., Wang, H. P., Jiang, Y., Hou, S. P., Liu, Y. J., & Liu, Q. Z. (2010). Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in *Chlamydia trachomatis*

strains selected in vitro by macrolide passage. *Andrologia*, 42(4), 274–280.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.01019.x>