



**Universitat**  
de les Illes Balears

**Título: Incidencia de genotipos causantes de linfogranuloma venéreo (LGV) en pacientes con infección por *Chlamydia trachomatis* (CT) en el área de atención del laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Son Espases en Mallorca**

**AUTOR: María Cristina Taboada Ruiz**

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Biotecnología, Genética y Biología Celular

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2015/2016

*Fecha: 09/09/2016*

*Nombre Tutor del Trabajo: Dra. María Dolores Macià Romero*

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
<i>Infecciones causadas por CT.....</i>	4
<i>Diagnóstico microbiológico de CT.....</i>	5
<i>Tratamiento de las infecciones por variedades LGV y no-LGV de CT....</i>	6
<i>Patogénesis del LGV.....</i>	6
<i>Manifestaciones clínicas del LGV.....</i>	7
<i>Diagnóstico del LGV.....</i>	8
<i>Epidemiología del LGV.....</i>	9
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
<i>Recogida de muestras clínicas.....</i>	12
<i>Detección de CT en muestras clínicas.....</i>	13
<i>Detección de genotipos causantes de LGV.....</i>	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
<i>Diagnóstico microbiológico de las infecciones por CT mediante</i>	
<i>PCR Multiplex en tiempo real.....</i>	15
<i>Análisis de la incidencia de genotipos causantes de LGV mediante</i>	
<i>PCR en tiempo real.....</i>	17
<i>Datos clínicos y características de los pacientes positivos para</i>	
<i>genotipos de CT causantes de LGV.....</i>	18
CONCLUSIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	21

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un importante problema de salud. Existen grupos de elevado riesgo, como trabajadores del sexo, u hombres que tienen sexo con hombres (HSH), pero no son los únicos grupos afectados, últimamente ha habido una reemergencia, afectando a prácticamente todas las capas de la población, sobre todo en los grupos de edad más joven.

En la última década se ha observado un aumento progresivo de los casos de ITS en el territorio europeo. Entre las posibles causas se encuentran los cambios en las conductas sociales, los fenómenos migratorios y los viajes internacionales, así como la aparición de centros especializados para el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades, que ha llevado a un mayor control y seguimiento de los grupos de riesgo.<sup>1</sup>

Además, la introducción de técnicas moleculares también ha mejorado notablemente la sensibilidad del diagnóstico microbiológico, permitiendo emplear muestras no invasivas, lo que ha contribuido, sin duda, a este aumento de casos<sup>1</sup>.

Hay que tener en cuenta, que muchas de estas ITS, como las úlceras genitales, facilitan la transmisión y adquisición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que hace muy frecuentes las coinfecciones.

La notificación de casos de infección genital por *C. trachomatis* (CT) no es obligatoria en la mayoría de los países de la Unión Europea. Por lo tanto, hay poca información disponible a partir de los sistemas de vigilancia. En los pocos países que sí la hay, la infección genital causada por CT es la ITS más comúnmente diagnosticada<sup>1</sup>.

También se observa un aumento en la proporción de casos entre mujeres jóvenes, aunque este incremento en la notificación puede estar sesgado por el aumento de estudios de cribado y el empleo de técnicas moleculares altamente sensibles. Pese a estos hechos, también existe un aumento real en el número de casos, acorde con la tendencia general en las ITS<sup>2</sup>.

### ***Infecciones causadas por CT.***

CT es una bacteria con similitudes morfológicas y estructurales con las bacterias Gram negativas. Pese a que su genoma contiene los genes necesarios para su síntesis, no contiene peptidoglucano en su pared celular, por lo que carece de rigidez y estabilidad osmótica.<sup>3</sup>

Su genoma es muy pequeño, con 894 genes codificantes de proteínas, lo que hace que sea auxótrofa para muchos aminoácidos y nucleótidos, y por lo tanto sean microorganismos intracelulares obligados.<sup>3</sup>

Se distinguen distintos serovares dentro de CT en base a la reactividad cruzada antigénica en el test de inmunofluorescencia de Wang y Grayston<sup>4</sup>, con tropismo por diferentes tejidos y distintas manifestaciones clínicas.

Los serovares A-C, que se corresponden con el biovar asociado a tracoma, tienen tropismo fundamentalmente por la conjuntiva y causan afectación ocular, siendo una de las principales causas de ceguera adquirida en algunos países en vías de desarrollo.

Los serovares de la D a la K, tienen tropismo por la mucosa anogenital, infectando tanto uretra, como cérvix y recto. Son la principal causa de uretritis no gonocócica (NGU), siendo responsables de entre el 30 y el 50% de las NGU, además de causar otras infecciones como cervicitis mucopurulenta, epididimitis, prostatitis aguda e infecciones oculares en neonatos<sup>3</sup>. Son frecuentes las coinfecciones con otros patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium*. También pueden causar proctitis o proctocolitis, pero en términos generales suele ser mucho más leve que la producida por los serovares causantes de linfogranuloma venéreo (LGV). Se estima que dos tercios de todos los casos de infertilidad debido a un factor tubárico y una tercera parte de todos los casos de embarazo ectópico pueden ser debidos a una infección por CT no diagnosticada. Esta es la razón de recomendar el cribado sistemático a mujeres en edad fértil. Sin embargo la persistencia y por tanto la mayor probabilidad de desarrollar complicaciones puede estar relacionada también con el tipo de serovar. Así, se ha documentado que los serovares B, D, E H, I, J y K son 2 veces más propensos a la

persistencia que los serovares F y G, revelando la importancia del subtipado de los serovares de CT en las infecciones genitales en mujeres.<sup>5</sup>

Los serovares L1, L2 y L3, se corresponden con el biovar causante de LGV, infectan la mucosa genital, así como células del sistema inmunitario (linfocitos y monocitos), causando las úlceras genitales y las linfadenopatías propias del LGV clásico. Actualmente la manifestación clínica más frecuente es la proctitis, principalmente en hombres que tienen sexo con hombres.<sup>3</sup>

### ***Diagnóstico microbiológico de CT.***

Actualmente, los métodos moleculares son la técnica de elección para el diagnóstico microbiológico de CT en muestras endocervicales, uretrales y de orina, presentando elevada sensibilidad y especificidad (grado de recomendación A). Sin embargo, estas técnicas no están validadas para muestras rectales ni faríngeas, pese a ello, los datos disponibles en la práctica clínica aprueban su uso (nivel de evidencia III, grado B)<sup>6</sup>.

En el año 2006 se detectó en Suecia una nueva variante de CT (variante swCT) que contienen una supresión de 377 pares de bases en el plásmido críptico, que es la región diana de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) fabricados por Roche (Cobas Amplicor y Cobas Taqman 48), por lo que estos sistemas pueden dar falsos resultados negativos en pacientes infectados con estas cepas. Sin embargo, la mayoría de los sistemas comerciales actuales, utilizan dianas de amplificación diferentes y sí que pueden detectar esta variante.(Probetec®-B-D; Gen Probe® Tec; Gen Probe® Áptima Combo 2; Real Art Ct Kit , Quiagen®)<sup>7</sup>.

Las TAAN empleadas en la práctica diaria para el diagnóstico de infecciones por CT, pueden detectar las variantes causantes de LGV, pero no son capaces de distinguir entre serovariedades LGV y no-LGV. Además, como ya hemos comentado, estas técnicas no están validadas para muestras rectales, que son en las que más frecuentemente se detectan las variantes de LGV, dada su elevada asociación a proctitis.

### ***Tratamiento de las infecciones por variedades LGV y no-LGV de CT.***

El tratamiento para las serovariedades LGV y no-LGV es diferente.

En la actualidad el tratamiento de elección para las infecciones urogenitales por CT de las serovariedades no causantes de LGV es azitromicina 1g en una sola dosis, aunque se está discutiendo la superioridad del tratamiento con doxiciclina 100 mg, 2 veces al día durante 7 días, sobre todo por la frecuencia de coinfecciones con *Mycoplasma genitalium*, que podría estar desarrollando resistencias a azitromicina<sup>8</sup>.

En cambio, el tratamiento de las infecciones causadas por serovariedades causantes de LGV es más prolongado, siendo el recomendado de 21 días de doxiciclina 100 mg /2 veces al día<sup>9</sup>.

Por lo tanto, dado el aumento de prevalencia de los genotipos causantes de LGV y las diferencias en el tratamiento, se hace necesaria su diferenciación sistemática.

### ***Patogénesis del LGV.***

CT no puede atravesar la barrera epitelial si ésta está intacta, por lo que el acceso a los vasos linfáticos lo consigue a través de microtraumas en la piel o en las mucosas. Una vez atravesada la barrera epitelial, la bacteria entra en los nódulos linfáticos y produce linfangitis o linfadenitis<sup>10</sup>. Los nódulos linfáticos afectados dependen de la vía de entrada de la bacteria. Si la bacteria penetra por la uretra, los nódulos afectados son los inguinales; si la entrada es vía vulvar, se afectan los nódulos inguinales y femorales; cuando el contagio es vía rectal, se afectan los nódulos ilíacos profundos, y, por último, cuando es vaginal o cervical, el obturador y los nódulos ilíacos. Pero la forma de presentación más característica es la inguinal, inicialmente los nódulos linfáticos son discretos pero por la peridadenitis el proceso inflamatorio se extiende al tejido circundante, y se forma una masa inflamatoria, se forma un bubón que se puede romper espontáneamente con formación de abscesos fístulas o sinus<sup>3</sup>.

Si el proceso continúa, al cabo de meses, puede producirse fibrosis y destrucción de los nódulos, produciendo diversas complicaciones como elenfantiasis o estiomene.

El LGV es primariamente un proceso patológico local, pero la infección sistémica se puede producir como resultado de una diseminación hematogena del microorganismo. Los principales factores de riesgo para esta diseminación sistémica son la persistencia del patógeno y las infecciones repetidas. Las manifestaciones sistémicas más frecuentes son, fiebre, dolor de cabeza y mialgias, pudiendo aparecer también meningitis<sup>10</sup>.

### ***Manifestaciones clínicas del LGV.***

Las manifestaciones clínicas del LGV dependen del sexo del paciente y de sus prácticas sexuales (coito anal o vaginal) y del estadio de la enfermedad. La inmunosupresión también resulta en síntomas más graves y más prolongados.<sup>10</sup>

El LGV tradicionalmente se divide en tres estadios, primario, secundario y terciario.

La lesión primaria aparece como una pequeña pápula o úlcera herpetiforme que transcurre con frecuencia de manera asintomática o con escasos síntomas. Aparece entre 3 y 30 días después de la adquisición de la infección y cura rápido sin dejar marcas<sup>3</sup>. Ocasionalmente, los pacientes pueden presentar balanitis, balanopostitis, bubonulus, cervicitis, salpingitis o parametritis. El primer estadio solo se observa en menos del 30% de hombres heterosexuales y es menos frecuente en mujeres, siendo normalmente asintomático<sup>3</sup>.

El estadio secundario de la enfermedad se produce por la propagación de la inflamación al tejido linfático regional. Dependiendo del sitio de entrada del LGV, pueden aparecer las manifestaciones clásicas del estadio secundario, que consisten en la aparición de bubones<sup>10</sup>. La linfadenopatía es unilateral en dos tercios de los pacientes<sup>3</sup>, apareciendo de 2 a 6 semanas después del inicio de los síntomas primarios y causando dolor extremo. En un tercio de los pacientes, los nódulos afectados se rompen espontáneamente después de abscesificarse y se desarrollan áreas de necrosis. Esto se acompaña de drenaje de pus y aparición de tejido cicatrizal<sup>11</sup>.

Actualmente la aparición de la sintomatología típica del LGV no es la presentación clínica más frecuente, en parte debido a que la enfermedad se ha detectado principalmente en HSH, por lo que generalmente la entrada del microorganismo es por vía anorrectal, con lo que el estadio secundario se manifiesta como una proctitis erosiva

y ulcerativa, con linfadenopatía perirrectal, secreción de moco o sangre, dolor y estreñimiento, lo que se conoce como síndrome anorrectal. Esta sintomatología también puede aparecer por diseminación del microorganismo desde los vasos linfáticos de la cervix o de la uretra. El estadio secundario a menudo incluye síntomas generalizados como fiebre, fatiga y letargia<sup>11</sup>.

Si la infección por el patógeno persiste, aparece el estadio terciario, que se alcanza en un 25% de los pacientes no tratados. En este estadio, la reacción inflamatoria crónica puede llevar a la formación de fístulas, estenosis rectal y linfedema. Como resultado de la linfadenopatía inguinal y el linfedema crónico con fibrosis esclerosante, puede aparecer elenfantiasis, afectando el pene y el escroto en hombres, o los labios mayores y el clítoris en mujeres. Otras complicaciones potenciales incluyen estenosis uretral y rectovaginal o fisuras uretrovaginales. La linfadenopatía anorrectal puede resultar también en estenosis y fisuras<sup>11</sup>.

### ***Diagnóstico del LGV***

Tradicionalmente, el diagnóstico del LGV se ha basado en la presentación clínica acompañada de un diagnóstico serológico (títulos por inmunofluorescencia  $>1/256$  o por fijación del complemento  $>1/64$ ). Como el LGV es una infección invasiva, los títulos de anticuerpos suelen ser superiores que en las infecciones causadas por las serovariedades D a K, sobre todo los de IgA, por lo que se podrían usar para diferenciar las proctitis causadas por serotipos LGV de los no-LGV<sup>12</sup>; pese a ello, estos tests serológicos no son específicos para LGV ni para infección aguda.

Actualmente, sin embargo, se han desarrollado numerosas técnicas moleculares para confirmar la infección por serovariedades de LGV mediante genotipado. Estos métodos se basan en la secuenciación del gen de la proteína A de la membrana externa (*ompA*), lo que permite determinar las diferentes serovariedades<sup>13</sup>.

Más recientemente, se ha desarrollado una PCR a tiempo real que detecta una delección de 36 pb en el gen *pmpH*, presente en todas las variedades causantes de LGV y que no está presente en las demás serovariedades<sup>14,15</sup>.

También se están desarrollando test serológicos específicos para LGV (p.ej.: inmunoglobulina A anti-MOMP)<sup>9</sup>.

Actualmente, no hay ningún método comercial disponible para el genotipado de CT, por lo que las técnicas se desarrollan en los laboratorios clínicos.

La falta de ensayos validados y estandarizados para todos los laboratorios hace que, en muchos casos, el diagnóstico del LGV se haga basándose en datos epidemiológicos y clínicos, junto con la confirmación de infección por CT por las TAAN disponibles en el laboratorio, y descartando otras posibles causas de proctocolitis, linfadenopatía o úlceras genitales<sup>9</sup>.

### ***Epidemiología del LGV***

El LGV es endémico en el Este y Oeste de África, la India, Sudeste asiático, y en el Caribe, donde se reporta como causante de entre el 1 y el 10% de las úlceras genitales<sup>16</sup>.

Hasta finales de 2003, solo se documentaban casos esporádicos de LGV en Europa, Norteamérica y Australia.

Desde 1950 se reportaron pequeños brotes regionales en Europa, normalmente asociados a inmigrantes o turistas procedentes de regiones tropicales.

De acuerdo a estudios epidemiológicos, el LGV es seis veces más común entre hombres que entre mujeres. Una posible explicación es que puede ser asintomático en mujeres, por lo que la infección no se detectaría. Este hecho también se apoya en que la aparición de síntomas tardíos como estenosis rectales y linfedemas son mucho más comunes entre mujeres que entre hombres, ya que éstas, al no ser diagnosticadas, no recibirían tratamiento en la mayoría de los casos, alcanzando fases más avanzadas de la enfermedad<sup>17,11</sup>.

Se documentó un brote de LGV en Rotterdam a finales de 2003 por Nieuwenhuis *et al.*<sup>18</sup>. Todos los pacientes eran hombres homosexuales con sintomatología rectal. Se detectó infección por CT en el material recogido del recto, pero no de la uretra. Un alto porcentaje de los pacientes con LGV presentaba coinfección con VIH, y más de la mitad de los pacientes presentaban coinfección con alguna otra ITS. Debido al

comportamiento promiscuo y al elevado número de contactos sexuales con habitantes de otras ciudades europeas, el brote se extendió rápidamente a otras ciudades de alrededor de Rotterdam. Ningún paciente reportó contacto con otras personas procedentes de regiones tropicales donde el LGV es endémico.

En los últimos años están aumentando los casos notificados de pacientes con LGV en Francia, Reino Unido, Alemania, Países Bajos, Suecia, Canadá, Australia, Suiza y Bélgica. Los datos demográficos de los pacientes y sus síntomas clínicos son similares, la mayoría son pacientes VIH positivos, hombres homosexuales con proctitis. Los casos de LGV clásico con formación de bubones inguinales son raros<sup>11</sup>.

El mayor número de pacientes se ha documentado en el Reino Unido. Desde octubre de 2004 a finales de abril de 2007, se diagnosticaron microbiológicamente 492 casos de LGV. El número de casos tuvo un repunte en el tercer cuarto de 2005 con una media de 32 casos al mes, mientras que en 2006 decayó a 12 casos por mes. El foco del brote se localizó en Londres, Brighton y North West. Todos los casos se presentaron en hombres, el 99% de los cuales eran HSH con una media de edad de 40 años, y predominantemente blancos (91%). Las tasas de coinfección fueron considerables, el 74% de los pacientes eran VIH positivos, el 14% tenían hepatitis C, un 5% sífilis, y también había casos de coinfección con otras ITS como gonorrea, herpes genital y hepatitis B. El número de pacientes que reportaron más de 10 contactos sexuales en los 3 meses previos se redujo de un 23% (47 pacientes) en 2005, a un 13% (15 pacientes) en 2006, lo que podría explicar el descenso de casos en ese año<sup>19</sup>.

En estudios de cohortes clínicas en Australia, Países Bajos, y Reino Unido, un número significativo de pacientes (entre 7% y el 23%) con infección rectal por CT, o con síntomas de proctitis, presentaban cepas de CT causantes de LGV<sup>11</sup>.

La prevalencia de LGV entre pacientes con sintomatología rectal causada por CT en Estados Unidos es desconocida, debido a la ausencia de sistemas de vigilancia sistemáticos o pruebas diagnósticas comerciales<sup>11</sup>.

En España también se han documentados un brote de LGV. Rodríguez-Domínguez *et al.* analizaron la prevalencia de casos de LGV en Madrid entre marzo de 2009 y noviembre de 2011<sup>14</sup>. El diagnóstico de CT se realizó mediante kits comerciales, seguido de una PCR a tiempo real del gen *pmpH* para discriminar las cepas causantes de

LGV, y finalmente la secuenciación del gen *ompA* para realizar una reconstrucción filogenética. Se detectaron 94 infecciones por LGV. El número de casos se incrementó de 10 en 2009, a 30 en 2010 y a 54 en 2011. La incidencia de LGV estaba fuertemente asociada a HSH, pero en 2011, se describieron casos de LGV en mujeres y en hombres heterosexuales (HTS). Setenta y nueve pacientes presentaban coinfección con VIH, con cargas virales detectables en el momento del diagnóstico del LGV, sugiriendo un alto riesgo de cotransmisión, de hecho, 4 pacientes se diagnosticaron simultáneamente de VIH y LGV. El tratamiento convencional con doxiciclina durante 21 días se prescribió en 75 pacientes, pero en 3 pacientes el tratamiento falló. Mediante la secuenciación del gen *ompA* se observó que durante el brote cocirculaban 2 variantes de LGV, la variante L2b y L2.

En un estudio posterior, realizado por los mismos autores sobre el mismo brote de LGV en Madrid<sup>20</sup>, se analizó la prevalencia de coinfecciones de variedades de CT causantes de LGV y variedades no causantes de LGV; ya que la infección simultánea con diferentes cepas de CT podría suponer un escenario favorable para la aparición de eventos de recombinación de material genético, con la consiguiente aparición y selección de nuevas variantes, con resultados impredecibles en la patogénesis y transmisibilidad de la infección. En el período comprendido entre 2009 y 2013, se seleccionaron 287 muestras clínicas con presencia demostrada de CT y se dividieron en dos grupos. El primero constituido por 137 muestras de CT de genotipos LGV, y un segundo de 150 muestras en las que se había excluido la presencia de LGV. Estas muestras se analizaron para detectar la presencia simultánea de distintos genotipos de CT no-LGV, mediante análisis de los genes *pmpH* y *ompA*. En el primer grupo, se detectaron coinfecciones en un 10,9% de los casos, mientras que en segundo grupo en el 14,6%. También se detectó la presencia de una variante recombinante del gen *pmpH*, similar a una cepa descrita en Seattle en 2002, que resulta del intercambio genético entre genotipos de LGV y miembros del genotipo G. La secuenciación de otros genes confirmó que la cepa recombinante encontrada en Madrid podría tener un origen común con la descrita en Seattle.

En otro estudio llevado a cabo en Barcelona, se analizó la incidencia de LGV en HSH en el periodo comprendido entre 2007 y 2012<sup>21</sup>. Se describieron 206 casos de LGV en este periodo. La tasa de incidencia de LGV en HSH de edades comprendidas entre 15 y

69 años aumentó de un 32.1 / 10<sup>5</sup> HSH por año en 2007 a 182.7 / 10<sup>5</sup> HSH por año en 2012. La edad media de los casos fue de 36 años (rango de 19 a 58 años), el 76,7% tenían estudios secundarios o universitarios, y el 58,7% eran españoles. La coinfección con el VIH se observó en un 84% de los casos, y la mayor proporción se encontró en 2011, con un 92,6%. La mayoría de los casos fueron sintomáticos (94,2%) y sólo un 5,8% asintomáticos. Durante los 12 meses anteriores, el 34,1% de los pacientes habían sido diagnosticados de otra ITS.

## **OBJETIVOS**

- Determinar la prevalencia de la infección por CT en el área de atención del laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Son Espases en el periodo comprendido entre noviembre de 2012 y septiembre de 2015
- Determinar la incidencia de genotipos causantes de LGV en todas las muestras positivas para CT en el periodo de estudio.
- Analizar la distribución según tipo de muestra y sexo del paciente de las muestras positivas para CT y para genotipos causantes de LGV.
- Analizar las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con infección por LGV, incluyendo: edad, centro médico de procedencia, lugar de origen, cuadro clínico, presencia de coinfecciones, prácticas sexuales de riesgo y si recibió tratamiento adecuado para LGV.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

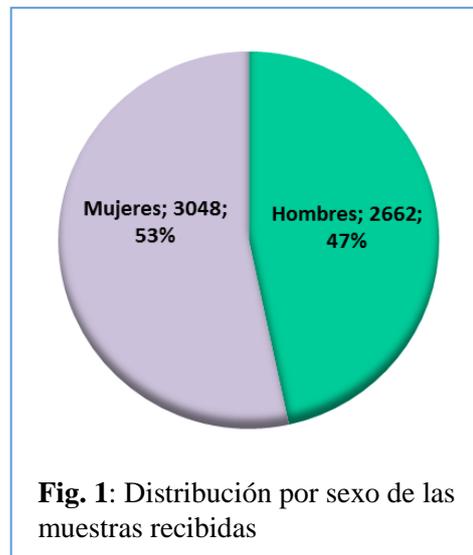
### ***Recogida de muestras clínicas.***

Las muestras analizadas fueron las recibidas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) en el periodo de estudio (noviembre de 2012 a septiembre de 2015). Se recibieron un total de 5710 muestras procedentes de 4075 pacientes en este periodo.

De las muestras recibidas, 2626 eran frotis endocervicales (45,6%), 1152 exudados uretrales (20,2%), 670 frotis faríngeos (12,4%), 667 orinas (11,7%), 414 muestras rectales (incluyendo frotis y biopsias rectales, 7,2%), 45 frotis conjuntivales (1,7%), 25 úlceras genitales (0,9%), y 111 muestras diversas (incluyendo abscesos, adenopatías, muestras respiratorias de vías bajas, y muestras sin especificar, 4,2%).

En cuanto a la distribución por sexo de las muestras, 3048 procedían de mujeres (53%) y 2662 de hombres (47%). (**Figura 1**)

Las muestras analizadas procedían del Centro de Atención de Infecciones de Transmisión Sexual (CAITS), de centros de atención primaria del área correspondiente al hospital, de diferentes servicios del HUSE (principalmente urgencias, ginecología y urología), y de otros hospitales de las islas (Hospital Son Llàtzer, Hospital Can Misses, Hospital de Inca y Hospital de Manacor).



Los criterios para la recogida de muestras fueron clínicos, de acuerdo con la valoración del médico. Muchas de las muestras procedentes de centros de salud, sobre todo los escobillones endocervicales, se corresponden con muestras recogidas dentro de los protocolos de cribado sistemático.

Las muestras se almacenaron en nevera a 4°C hasta su análisis.

### ***Detección de CT en muestras clínicas***

Todas las muestras recibidas fueron agitadas en vórtex durante 30 segundos y centrifugadas a 900 rpm durante otros 30 segundos.

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial (Versant® Sample Preparation 1.0 Reagents, Siemens Diagnostics).

La amplificación y la detección mediante PCR multiplex en tiempo real, con detección simultánea de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* se realizó con el kit comercial de Versant® CT/GC DNA 1.0; Siemens Diagnostics.

### ***Detección de genotipos causantes de LGV***

Todas las muestras positivas para CT fueron analizadas para la detección de genotipos causantes de LGV mediante una PCR en tiempo real desarrollada en nuestro laboratorio a partir de la técnica descrita en el PNT-DC-01 de los Procedimientos en Microbiología de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) basada en la PCR en tiempo real descrita por Morré *et al.* en 2005, y revisada por Schaeffer en 2008<sup>5,15,22</sup>

La extracción de ADN se realizó con el mismo kit comercial utilizado para el diagnóstico de CT (Versant® Sample Preparation 1.0 Reagents, Siemens Diagnostics).

La PCR en tiempo real comentada previamente consiste en la detección de una delección de 36 pb en el gen *pmpH* de CT, que aparece en todos los genotipos causantes de LGV, L1, L2 y L3, pero en ninguno de los que no lo causan.

Para ello, se amplifica un fragmento de 60 pb utilizando los siguientes cebadores y sonda TaqMan:

*Cebador F:* 5'-CTGTGCCAACCTCATCAT CAA-3'

*Cebador R:* 5'AGACCCTTTCCGAGCATCACT-3'

Sonda: FAM-5'-CCGCCTGCTCCAACAGTTAGTGATG- 3'-TAMRA

Además, como control interno, se amplifica un fragmento del gen que codifica para la proteína GAPDH de origen humano. Para ello se utilizan los siguientes cebadores y sonda TaqMan:

*Cebador F:* 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'

*Cebador R:* 5'-ATGGGATTTCCATTGATGAC AAG-3'

Sonda: HEX-5'-TGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG-3' TAMRA

Para la reacción se emplea un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , con 2,5  $\mu\text{L}$  de Standard Taq Buffer (10x) de BioLabs® Inc., 0,5 $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polymerase de BioLabs® Inc., 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM, 0,15  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,1  $\mu\text{M}$  de sonda (tanto para la amplificación del gen *pmpH* como del control interno) y 5  $\mu\text{L}$  de ADN extraído de la muestra.

En cada ensayo se incluyeron un control positivo y un control negativo.

El protocolo de amplificación consistió en 12 minutos a 95°C, y 4 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (la lectura de fluorescencia se realizó en este último paso).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Diagnóstico microbiológico de las infecciones por CT mediante PCR Multiplex en tiempo real*

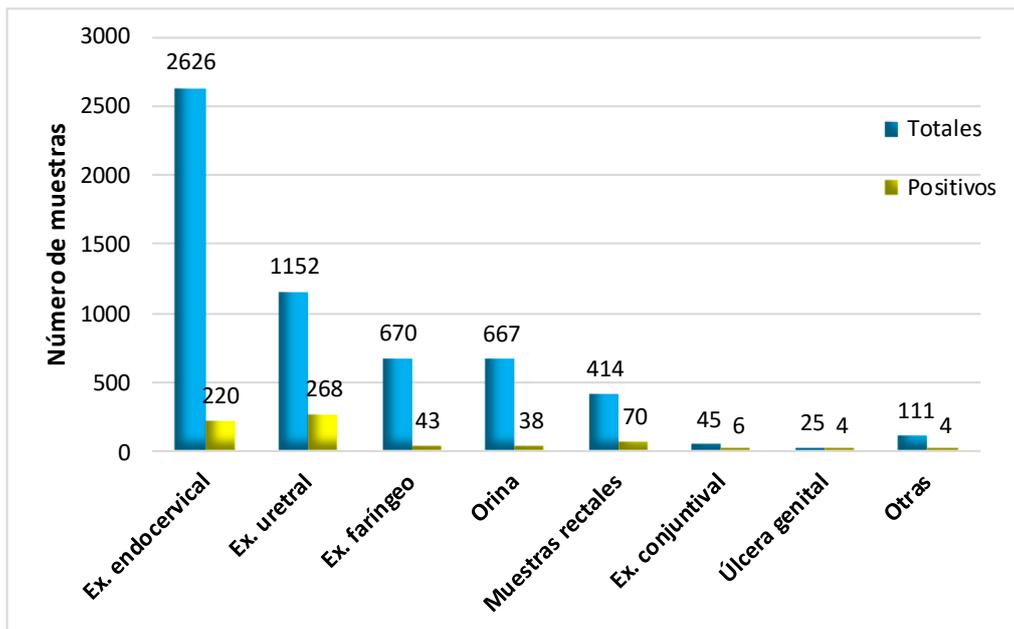
De las 5710 muestras analizadas, 653 fueron positivas para CT, lo que supone un 11,4% del total.

Pese a que las muestras más abundantes fueron los frotis endocervicales, se detectaron 220 positivos, lo que supone un 33,7%, mientras que en los frotis uretrales, de los que se recibieron considerablemente menos muestras, resultaron positivos 268, lo que supone un 41% del total de positivos. Este hecho se debe, en parte, a que la mayoría de las muestras endocervicales proceden del cribado sistemático que se realiza en los centros de atención primaria, mientras que, en general, los exudados uretrales se recogen por criterios clínicos basados en la presencia de síntomas de uretritis.

En cuanto a las muestras rectales, fueron positivas 70 (10,7%); de los frotis faríngeos 43 (6,6%), y 37 orinas (5,7%).

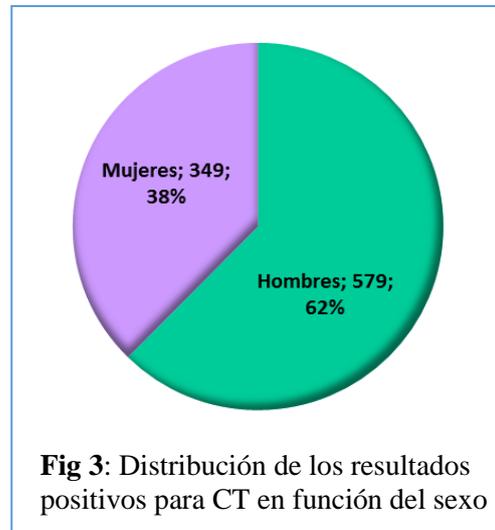
El resto de muestras positivas se reparten entre exudados conjuntivales (n=6; 0,9%), úlceras genitales (n=4; 0,6%), y otras muestras, entre las que se incluyen abscesos, muestras respiratorias de vías bajas, y muestras sin especificar (n=4; 0,6%)

La distribución de los tipos de muestras analizadas y de los positivos para CT se pueden observar en la **figura 2**.



**Fig. 2:** Distribución de los tipos de muestras analizadas y con resultado positivo para CT

Las 653 muestras positivas corresponden a 579 pacientes, de los cuales 349 eran hombres (60,3%) y 230 eran mujeres (39,7%), una representación gráfica de estos resultados puede verse en la **figura 3**. Pese al aumento de la incidencia de ITS en mujeres que se ha observado a nivel general en Europa, las



**Fig 3:** Distribución de los resultados positivos para CT en función del sexo

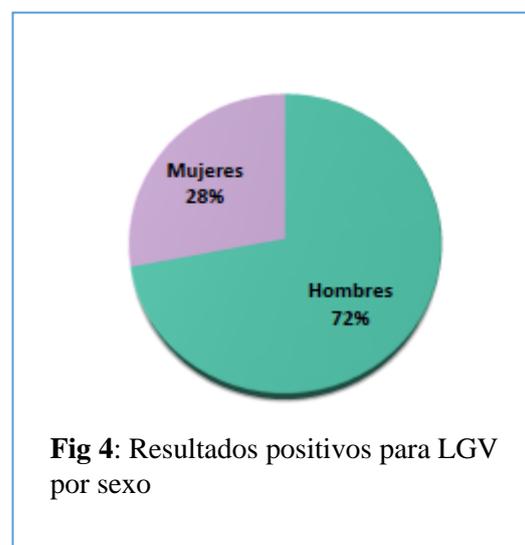
infecciones por CT siguen siendo notablemente más prevalente en varones, esto puede deberse, en parte, a factores comportamentales, ya que

dentro de los varones se incluyen los HSH un grupo de alto riesgo de contracción de ITS por sus prácticas sexuales altamente promiscuas; pero también puede deberse a un infradiagnóstico en las mujeres, debido a la ausencia de síntomas en la mayoría de los casos.

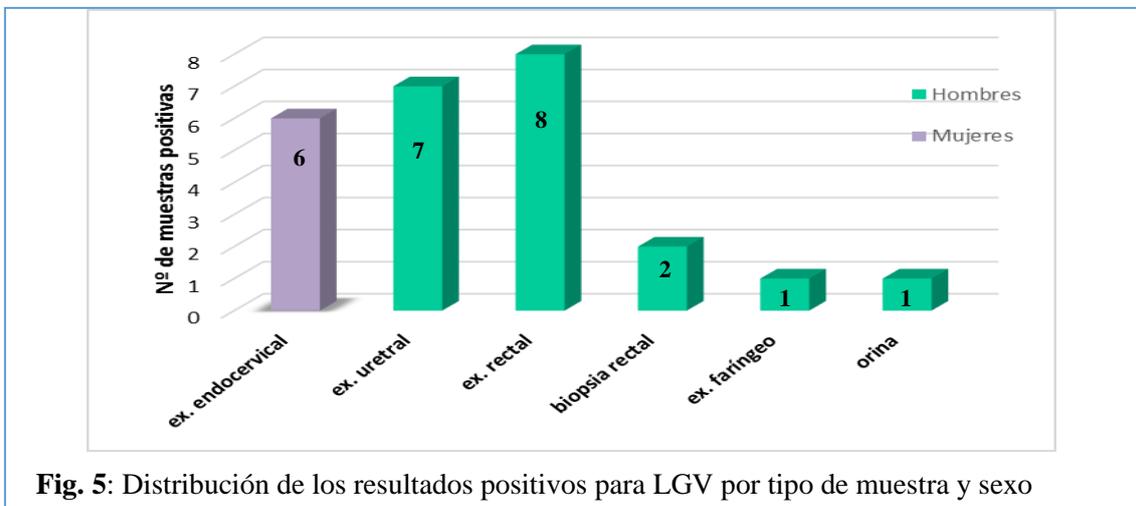
### ***Análisis de la incidencia de genotipos causantes de LGV mediante PCR en tiempo real***

De las 653 muestras positivas para CT, se realizó la PCR en tiempo real para detectar genotipos causantes de LGV a un total de 560 muestras. El resto de las muestras positivas no estaban disponibles en el momento del análisis, o bien por que la cantidad de muestra era insuficiente, o por problemas logísticos en la conservación de la muestra. De las muestras a las que se le realizó la PCR se obtuvieron resultados interpretables en 433. El elevado número de resultados inválidos, ya fuera por error en el proceso de extracción, o porque no se obtuvo resultado positivo en el control interno, puede deberse, en parte, al almacenamiento de las muestras en nevera, en lugar de en congelador. Se decidió almacenar las muestras de esta forma por los resultados obtenidos por Dommelen *et al.*, que no encontraron degradación significativa en el ADN de muestras de orina y de exudados vaginales almacenados a 4° C durante periodos de hasta 2 años <sup>23</sup>. Pese a los resultados obtenidos en el mencionado estudio, en base a nuestra experiencia, el estado de conservación de algunas de las muestras sí que podría influir en la obtención de resultados inválidos, por lo que, recomendamos almacenar las muestra a temperaturas inferiores o iguales a -20°C.

Se detectaron genotipos causantes de LGV en 25 muestras (5,8%) procedentes de 25 pacientes, la mayoría varones (72%) (Ver **figura 4**). Como cabría esperar, la mayoría de las muestras en las que se detectaron estos genotipos fueron rectales (32%), con un total de 8 exudados y 2 biopsias, todas procedentes de pacientes varones. Sin embargo, llama la atención la elevada frecuencia de muestras uretrales (25%) y de frotis endocervicales (24%) positivos. El resto de positivos se detectaron en un exudado faríngeo y en una orina, ambos de pacientes varones. En la



**figura 5** se puede ver la distribución en función del tipo de muestra y del sexo de los pacientes con muestras positivas.



**Fig. 5:** Distribución de los resultados positivos para LGV por tipo de muestra y sexo

#### ***Datos clínicos y características de los pacientes positivos para genotipos de CT causantes de LGV.***

Respecto a los datos de los pacientes, la mayoría eran jóvenes, con una media de edad de 31,8 (rango de edad de 18 a 55 años).

La gran mayoría fueron atendidos en las consultas del Centro de Atención de ITS (CAITS) (68%), que es un centro de prevención y control de las infecciones de transmisión sexual (ITS), que comenzó a funcionar en Palma de Mallorca en el año 2010. Está dirigido especialmente a la atención de aquellas personas que actúan como núcleo de transmisión y que no tienen relación con el sistema sanitario público, así como aquellas que por cuestiones de intimidad, horarios o condiciones sociales escogen ser atendidas en este servicio. Cabe señalar que un porcentaje de los pacientes que padecen ITS son inmigrantes, en muchas ocasiones no legalizados, y que pueden tener dificultades, culturales o administrativas, de acceso a los servicios sanitarios. Colabora con distintas ONG que trabajan habitualmente con el colectivo de prostitutas o personas en situación irregular. Además, el centro atiende a los pacientes del centro penitenciario de Palma de Mallorca. Los pacientes se pueden registrar de forma anónima, además, las historias clínicas son exclusivas del centro y no se integran en la historia de salud. Los pacientes reciben una atención integrada e inmediata, con una intervención conjunta de personal de diferentes áreas, como son la primaria, medicina interna (sección de

enfermedades infecciosas), microbiología, dermatología, ginecología, urología y farmacia hospitalaria. Los pacientes pueden acudir con o sin cita previa. Además, con el objetivo de que la actuación sea más rápida e integral, se realizan en la misma visita las pruebas oportunas para diagnosticar la enfermedad, se les prescribe el tratamiento (si corresponde) y medidas de prevención, y además se realiza un cribado sistemático para todas las ITS más comunes. Allí trabajan cada día dos médicos y un enfermero, aunque los profesionales que colaboran directamente en el CAITS son 15. La implantación de este centro ha supuesto una mejora considerable en el control y manejo de las ITS en la isla, por lo que, junto con la incorporación de los métodos moleculares en el diagnóstico microbiológico, ha contribuido al aumento del diagnóstico y del tratamiento adecuado de estas enfermedades.

El resto de pacientes procedían de centros de atención primaria (6; 24%) y de otros hospitales, Hospital Son Llàtzer y Hospital Can Misses, (2; 8%).

De los pacientes, 15 eran españoles (60%), 8 de diferentes países sudamericanos (32%), entre los que se incluyen Colombia, Brasil, Argentina, Ecuador, Chile y Venezuela, un paciente procedente de Níger (4%) y uno de Italia (4%).

Ocho de los pacientes fueron asintomáticos (32%), de los cuales, 3 eran mujeres. De los pacientes con manifestaciones clínicas, las más frecuentes fueron la proctitis que aparecía en 7 casos (28%), todos varones, y la uretritis, también en 7 pacientes (28%). Dentro de las proctitis, hubo un caso de proctitis ulcerativa crónica, y en otros tres casos, iban acompañadas de úlceras o abscesos perianales. Con respecto a las uretritis, ninguna fue acompañada de adenopatías aparentes. Dos mujeres acudieron a consulta por úlceras genitales (8%) y una por vaginitis (4%).

En cuanto a las prácticas sexuales de los pacientes, la mayoría, 13, eran HTS (52%), 9 eran HSH (40%), 1 bisexual (4%), y de 2 pacientes no se dispone de datos.

Es de resaltar en nuestro estudio el hecho de que la mayoría de pacientes eran HTS, entre ellos, 6 mujeres, mientras que en otros trabajos encontraron una gran predominancia de casos en HSH, limitándose muchos de los estudios a analizar exclusivamente a este colectivo. En el estudio de Rodríguez-Domínguez *et al.* sobre el brote acaecido en Madrid, también encontraron casos en el año 2011 en HTS y en mujeres<sup>14</sup>, lo cual, junto con nuestros datos, podría estar indicando un cambio en el patrón de transmisibilidad de los genotipos causantes de LGV de CT. Además, aunque la sintomatología típica de LGV es la más frecuente (proctitis y úlceras genitales),

también se observa un elevado número de uretritis, e incluso de pacientes asintomáticos, con lo cual sería necesario el cribado de todas las muestras positivas para CT, no sólo de aquellas de pacientes HSH o con sintomatología rectal.

El 40% de los pacientes eran VIH positivos y el 16% tenían hepatitis C. El número de coinfecciones con otras ITS también es elevado, un 28% tenía sífilis, un 12% herpes genital, un 20% gonorrea y un 12% virus del Papiloma Humano (VPH).

Cabe resaltar, que dada la falta de datos clínicos que sugiriesen infección por genotipos causantes de LGV, solamente 3 pacientes (12%) recibió tratamiento de la duración adecuada, por lo que sería fundamental que el cribado de LGV se introdujese en la rutina diaria del laboratorio de microbiología clínica.

Un resumen de los datos expuestos se puede encontrar en la **tabla 1**.

**Tabla 1:** Características de los pacientes con muestras positivas para genotipos de CT causantes de LGV

Datos de interés	Número	Porcentaje (%)
<b>Edad</b>		
18-24	8	32
25-34	7	28
35-45	7	28
45-55	3	12
<b>Centro de procedencia</b>		
CAITS	17	68
Centros de atención primaria	6	24
Centros hospitalarios	2	8
<b>Lugar de origen</b>		
España	15	60
Sudamérica	8	32
Níger	1	4
Italia	1	4
<b>Cuadro clínico</b>		
Asintomático (contacto ITS)	8	32
Proctitis	7	28
Uretritis	7	28
Úlcera	2	8
Vaginitis	1	4
<b>Coinfecciones</b>		
VIH	10	40
VHC	4	16
Sífilis	7	28
Herpes	3	12
Gonorrea	5	20
VPH	3	12
<b>Prácticas sexuales</b>		
HSH	9	36
HTS	13	52
Bisexuales	1	4
Sin datos	2	8
<b>Tratamiento de duración adecuada</b>		
Sí	3	12
No	22	88

## CONCLUSIONES

1. La infección por CT es altamente prevalente en nuestro medio (11,4%), reflejo de su importancia como ITS en la población, y de la eficacia de los programas de cribado y control poblacional.
2. En este estudio, el 5,8% de los casos de infección por CT correspondieron a genotipos causantes de LGV, la mayoría en varones jóvenes, pero también significativamente en mujeres, en consonancia con tendencias epidemiológicas recientes.
3. La infección por genotipos LGV de CT se asocia frecuentemente con otras ITS y en especial con el VIH.
4. Dada su relativa prevalencia, sería aconsejable poder diferenciar estos genotipos de manera sistemática, no sólo por razones epidemiológicas, sino con el fin de establecer el régimen y la duración correcta del tratamiento antibiótico.
5. En nuestro estudio hemos observado la aparición de genotipos causantes de LGV en localizaciones diferentes de la rectal y en pacientes que no presentaban una sintomatología propia del LGV, por lo tanto, de acuerdo con nuestros datos estaría justificado que el genotipado se realizase sistemáticamente a todas las muestras positivas para CT, independientemente del tipo de muestra y del sexo del paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lepe, J.A. Otero, L. Blanco, M.A. Aznar, J. Vazquez F. Panorama actual de la epidemiología , diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;Supl(13):25-31.
2. WHO. Trends in sexually transmitted infections and HIV in the European Region, 1980-2005. *Tech Brief Doc*. 2006;01B/06.

3. Gerald L. Mandell, John E. Bennett RD, ed. Chlamydia trachomatis (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum, and Other Genital Infections). In: *Mandell, Douglas, AND Bennett's: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Seventh Ed. ; 2010:2443-2461.
4. Wang S, Kuo C, Barnes RC, Stephens RS, Grayston JT. Immunotyping of Chlamydia trachomatis with Monoclonal Antibodies. 1985;152(4):791-800.
5. Alonso, R., Galán, J.C, Gutiérrez, J., Rodríguez-Domínguez, M., Salinas, J., Sanbonmatsu S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. In: Cercenado, E., Canton R, ed. *Procedimientos En Microbiología Clínica. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. ; 2012:1-43.
6. Carder C, Mercey D, Benn P. Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect*. 2006;82(Suppl IV):10-12. doi:10.1136/sti.2006.023069.
7. Grillner L. High Occurrence of a New Variant of Chlamydia trachomatis Escaping Diagnostic Tests Among STI Clinic Patients in Stockholm , Sweden. 2008;35(1):61-64. doi:10.1097/OLQ.0b013e318141feac.
8. Perry RCW, Kadrnka CM, Kerndt PR. Azithromycin versus Doxycycline for Urogenital. *N Engl J Med*. 2015;373:26. doi:10.1056/NEJMoa1502599.
9. Stoner BP, Cohen SE. Lymphogranuloma Venereum 2015 : Clinical Presentation , Diagnosis , and Treatment. *Clin Infect Dis*. 2015;61(Suppl 8):65-73. doi:10.1093/cid/civ756.
10. Perine PL SW. Lymphogranuloma venereum. In: *Holmes KK: Sexually Transmitted Diseases*. 3rd Editio. ; 1999:423-432.
11. Sary G, Sary A. Lymphogranuloma venereum outbreak in Europe. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008;2(1):935-939. doi:10.1111/j.1610-0387.2008.06742.x.
12. Snoek EM Van Der, Ossewaarde JM, Meijden WI Van Der, Mulder PGH. The use of serological titres of IgA and IgG in (early) discrimination between rectal infection with non- lymphogranuloma venereum and lymphogranuloma venereum serovars of Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect*. 2007;83:330-

334. doi:10.1136/sti.2006.024372.
13. Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, et al. among Sexually Transmitted Disease Patients in Sweden. 2001;39(11):3915-3919. doi:10.1128/JCM.39.11.3915.
  14. Rodriguez-domínguez M et al. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid , Spain : co-circulation of two variants. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:219-225. doi:10.1111/1469-0691.12256.
  15. Schaeffer A, Henrich B. Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan. *BMC Infect Dis.* 2008;8:56. doi:10.1186/1471-2334-8-56.
  16. Mabey, DCW Wall RA, Bello CSS. Aetiology of genital ulceration in the Gambia. *Genitourin Med.* 1987;63:10-13.
  17. Schaechter J. Lymphogranuloma venereum and other nonocular Chlamydia trachomatis infections, in nongonococcal urethritis and related infections. In: *Hobson D, Holmes KK: American Society for Microbiology.* ; 1997:91-97.
  18. Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Go HM, Dees J, Thio HB. Resurgence of Lymphogranuloma Venereum in Western Europe : An Outbreak of Chlamydia trachomatis Serovar L 2 Proctitis in The Netherlands among Men Who Have Sex with Men. *Clin Infect Dis.* 2004;39:996-1003.
  19. Jebbari H, Alexander S, Ward H, et al. Update on lymphogranuloma venereum in the United Kingdom. *Sex Transm Infect.* 2007;83:324-326. doi:10.1136/sti.2007.026740.
  20. Rodriguez-domínguez M, Gonzalez-alba JM, Puerta T. High Prevalence of Co-Infections by Invasive and Non-Invasive Chlamydia trachomatis Genotypes during the Lymphogranuloma Venereum Outbreak in Spain. *PLoS One.* 2015;10(5):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0126145.
  21. REYES-URUEÑA, J.M. GARCIA DE OLALLA, P. VALL-MAYANS M, ARANDO, M. CABALLERO, M. CAYLA JA. SHORT REPORT Lymphogranuloma venereum in Barcelona , 2007 – 2012 : the role of seroadaptation in men who have sex with men. *Epidemiol Infect.* 2015;143:184-188. doi:10.1017/S0950268814000545.

22. Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA PA. Real-time Polymerase Chain Reaction To Diagnose Lymphogranuloma Venereum SARS Vaccine Protective in Mice. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1311-1312.
23. Dommelen L Van, Wolffs PFG, Tiel FH Van, et al. Influence of Temperature , Medium , and Storage Duration on Chlamydia trachomatis DNA Detection by PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):990-992. doi:10.1128/JCM.02631-12.