

## INFECCION POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y PAPILOMAVIRUS EN MUJERES CON ALTERACIONES CITOHIISTOLOGICAS DE CUELLO UTERINO

GERARDO D. DELUCA<sup>1</sup>, HECTOR M. MARIN<sup>1</sup>, EDUARDO SCHELOVER<sup>1</sup>, ESTELA M. CHAMORRO<sup>2</sup>, LILIAN VICENTE<sup>3</sup>, MONICA ALBHOM<sup>4</sup>, JOSE M. ALONSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Biología Molecular, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia,

<sup>2</sup>Servicio de Obstetricia, Hospital Dr. J.R. Vidal, Corrientes, <sup>3</sup>Instituto de Diagnóstico 9 de Julio, Resistencia, Chaco, <sup>4</sup>Servicio de Ginecología, Hospital A. I de Llanos, Corrientes

**Resumen** Se estudió mediante técnica de PCR la presencia de *Chlamydia trachomatis* y de papilomavirus humano (HPV) en 189 mujeres sexualmente activas de entre 15 y 58 años de edad, con alteraciones citológicas del epitelio cérvico-uterino, provenientes de una región con alta incidencia de cáncer de cuello uterino de Argentina, y se analizaron los factores de riesgo. La prevalencia global por *C. trachomatis* fue de 24.9%; observándose una diferencia significativa de la prevalencia entre las mujeres de bajo nivel socio-económico (32.9%) y las de nivel medio o alto (17.7%). En cuanto a la infección por HPV, la prevalencia fue de 52.9% y se pudo observar que las mujeres infectadas con *C. trachomatis* presentan un mayor riesgo de infección por este virus que las no infectadas (OR=2.27 / IC 95%=1.10-4.73) con una diferencia estadísticamente significativa (p=0.016).

**Palabras clave:** *Chlamydia trachomatis*, HPV, infecciones de transmisión sexual, cáncer de cuello de útero

**Abstract** *Chlamydia trachomatis* and papillomavirus infection in women with cytohistological abnormalities in uterine cervix. The presence of *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus (HPV) was evaluated by PCR technique in 189 sexually active women, between 15 and 58 years old, with cytological abnormalities in their uterine cervical epithelium and belonging to a region of Argentina with high incidence of cervical cancer. Risk factors in relation to chlamydial infection were also analyzed. Total prevalence for *C. trachomatis* infection was 24.9%, but there was a significant difference between prevalence in low socio-economical level (32.9%) and high or medium socio-economical level (17.7%). Total prevalence for DNA of HPV was 52.9%, but women infected with *C. trachomatis* showed a higher risk for viral infection than non-infected ones (OR=2.27 / CI 95%=1.10-4.73), with statistical significant difference (p=0.016).

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*, HPV, STD, uterine cervical cancer

*Chlamydia trachomatis* es uno de los agentes más comunes de infecciones de transmisión sexual<sup>1,2</sup> y la OMS estima en 89 millones los casos nuevos por año<sup>3</sup>. Las infecciones del tracto genital femenino pueden producir cervicitis crónica, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis y uretritis, aunque un gran número de casos pueden cursar con infecciones asintomáticas<sup>4,5</sup>. Otras complicaciones son la infertilidad, embarazo ectópico, ruptura prematura de membranas e infecciones puerperales<sup>6-8</sup>. Algunos estudios demuestran que este agente incrementa el riesgo de infección con el virus de la

inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus papiloma humano (HPV)<sup>9,10</sup> y en este último caso, sería también un factor importante en la activación oncogénica del virus<sup>9,11</sup>.

No se registran estudios epidemiológicos que permitan evaluar el verdadero impacto de este agente entre la población femenina del noreste de Argentina, que es la región con la mayor tasa de mortalidad por cáncer de cuello de útero del país<sup>12</sup>. Este trabajo tiene como objetivo estudiar la prevalencia de este agente entre mujeres con citología alterada del cuello uterino, pertenecientes a dos estratos socio-económico diferentes, y analizar su asociación con la infección por HPV.

Recibido: 23-XI-2005

Aceptado: 4-IV-2006

**Dirección postal:** Dr. Gerardo Deluca, Área de Biología Molecular, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Las Heras 727, 3500 Resistencia, Argentina.

Fax: (54-3722) 422793

e-mail: gerdeluca@bib.unne.edu.ar

### Materiales y métodos

**Muestras:** En el período comprendido entre enero de 2004 y julio de 2005 se estudiaron 189 muestras de cepillados endocervicales de mujeres con un rango de edad entre 16 y

58 años y en las que previamente se observaron alteraciones en su epitelio cervical mediante examen citológico con coloración de Papanicolau y/o biopsia. De éstas, 47 fueron obtenidas en el Servicio de Obstetricia del Hospital Dr. J.R. Vidal, 35 en el Servicio de Ginecología del Hospital A. I. de Llanos, ambos de la ciudad de Corrientes, y 107 en un centro médico privado de la ciudad de Resistencia.

Previo a la toma de la muestra se solicitó el consentimiento informado para efectuar la investigación de *C. trachomatis* y de HPV, completándose una ficha con datos clínico-epidemiológicos y datos personales entre los que se incluía el ingreso mensual medio del grupo familiar primario de la paciente.

**Extracción de ADN:** Las muestras de células endocervicales exfoliadas fueron tomadas con cepillo cervical, eluidas en 3 ml de tampón fosfato salino (PBS), centrifugadas y guardadas a -70°C hasta su procesamiento. Los *pellets* fueron lavados 3 veces con PBS, tratados con 300 µl de solución de digestión (2% de bromuro de metiltricetilamonio, 1.4 M NaCl, 0.2% de β-mercaptoetanol, 20 mM EDTA y 100 mM TRIS-HCl pH 5.0) por 1 hora a 60°C. Posteriormente el digesto fue purificado con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y el material genómico precipitado con alcohol isopropílico frío. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron lavados con etanol 70% y finalmente suspendidos en 50-100 µl de agua bidestilada estéril. Para controlar la calidad e integridad del ADN obtenido, todas las muestras fueron amplificadas para el exon III del gen de la β-actina humana.

**Detección de *C. trachomatis*:** Se realizó mediante PCR utilizando los cebadores KL1 y KL2 descritos por Mahony et al<sup>13</sup>, en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 mM TRIS-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 3.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 5 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 20 pmol de cada cebador, 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa (*Go-Taq*, *Promega*) y 3 µl de suspensión de ADN. Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 93°C, luego 35 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 64°C y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se corrieron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 95 V durante 40 min, luego se tiñeron con solución de bromuro de etidio y se observaron por exposición a UV (320 nm).

**Detección de HPV:** Se efectuó mediante técnica de PCR utilizando los cebadores consenso MY9 y MY11<sup>14</sup>. La tipificación de los genotipos de HPV se realizó mediante la

técnica del análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP) del producto de amplificación según lo descrito por Bernard et al<sup>15</sup>.

## Resultados

Las 189 mujeres estudiadas correspondieron a 53 casos de inflamación inespecífica, 5 de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), 108 de lesiones cervicales intraepiteliales de bajo grado (L-SIL), 14 de lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado (H-SIL) y 9 de carcinomas de cuello uterino.

Se encontró infección por *C. trachomatis* en 47 mujeres (24.9%), con una mediana de edad de 30 años en la población total, de 28 años entre las positivas y de 30 años entre las negativas. Al mismo tiempo, en 100 mujeres (52.9%) se demostró la presencia de ADN del HPV y de éstas, 52 (52%) estaban infectadas con genotipos de alto riesgo, lo que corresponde a un 27.5% del total de la población estudiada. Estos resultados, analizados de acuerdo al grado de alteración cervical se presentan en la Tabla 1.

Los genotipos de alto y bajo riesgo de mayor frecuencia encontrados se distribuyeron de la siguiente manera: HPV-6 (7%), 11 (3%), 16 (15%), 18 (4%), 31 (6%), 53 (8%), y 58 (7%).

En relación con la infección por *C. trachomatis* se analizaron los siguientes factores de riesgo: edad, nivel socio-económico, inicio de relaciones sexuales (IRS), número de parejas a lo largo de la vida sexual y paridad. El nivel socio-económico fue calculado en base al ingreso medio del grupo familiar y según parámetros del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), tomando como referencia el segundo semestre de 2003<sup>16</sup>.

TABLA 1.- Infección por *Chlamydia trachomatis* y por HPV, clasificado según tipo de alteración histopatológica del epitelio cervical uterino

| Histopatología                    | Mediana de edad | <i>C. trachomatis</i> Positivo (%) | HPV Positivo (%) | HPV alto riesgo Positivo/total (%) |
|-----------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|
| Inflamatorio (n=53)               | 30 (16-58)      | 11 (20.8)                          | 9 (17.6)         | 2/53 (3.8)                         |
| ASCUS (n=5)                       | 32 (27-56)      | 0 (0)                              | 2 (40)           | 0/5 (0)                            |
| L-SIL (n=108)                     | 28 (17-51)      | 30 (27.8)                          | 69 (65.7)        | 35/108 (32.4)                      |
| H-SIL (n=14)                      | 31 (18-55)      | 5 (35.7)                           | 12 (85.7)        | 9/14 (64.3)                        |
| Carcinoma de cuello uterino (n=9) | 45 (30-51)      | 0 (0)                              | 8 (88.9)         | 6/9 (66.6)                         |
| Total (n =189)                    | 30 (16-58)      | 47 (24.9)                          | 100 (52.9)       | 52/189 (27.5)                      |

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado.

L-SIL: Lesiones cervicales intraepiteliales de bajo grado.

H-SIL: Lesiones cervicales intraepiteliales de alto grado.

Al analizar la frecuencia de casos con ambas infecciones, se observó que entre las 47 mujeres infectadas con *C. trachomatis* había 32 también infectadas por HPV (68.1%) y 15 negativas (31.9%), mientras que en las 142 no infectadas por *C. trachomatis* se encontraron 68 HPV positivas (47.9%) y 54 negativas (52.1%) (Tabla 2). El análisis estadístico de estas cifras revela un riesgo mayor de infección por HPV en las infectadas por *C. trachomatis* que en las no infectadas (OR=2.27/IC 95%=1.10-4.73 / p=0.016).

El análisis de los factores de riesgo en relación con la infección por *C. trachomatis* se presenta en la Tabla 3. Se puede observar que existe una prevalencia de infección significativamente mayor entre la población de bajo nivel socio-económico; con respecto a la edad, se observa un mayor riesgo de infección entre las menores de 25 años, aunque no alcanza un nivel de significación

TABLA 2.- Asociación entre infección por Chlamydia trachomatis y HPV

|                           | HPV (-) |      | HPV (+) |      | Total |       |
|---------------------------|---------|------|---------|------|-------|-------|
|                           | n       | %    | n       | %    | n     | %     |
| <i>C. trachomatis</i> (-) | 74      | 39.2 | 68      | 36.0 | 142   | 75.1  |
| <i>C. trachomatis</i> (+) | 15      | 7.9  | 32      | 16.9 | 47    | 24.9  |
| Total                     | 89      | 47.0 | 100     | 53.0 | 189   | 100.0 |

TABLA 3.- Factores de riesgo de infección por Chlamydia trachomatis en mujeres con alteraciones histopatológicas de cuello uterino

| Factor de Riesgo       | <i>C. trachomatis</i> Positivos/total (%) | OR (IC 95%)      | p     |
|------------------------|---|------------------|-------|
| Edad (años)            |   |                  |       |
| < 25                   | 15/42 (35.7)                              | 1*               | 1     |
| ≥ 25                   | 31/147 (21.1)                             | 0.48 (0.21-1.08) | 0.051 |
| Nivel socio-económico  |   |                  |       |
| Medio/Alto             | 19/107 (17.7)                             | 1                | 1     |
| Bajo                   | 27/82 (32.9)                              | 2.27 (1.10-4.73) | 0.016 |
| IRS (años)             |   |                  |       |
| < 20                   | 40/149 (26.8)                             | 1                | 1     |
| ≥ 20                   | 7/40 (17.5)                               | 0.58 (0.21-1.41) | 0.22  |
| Nº de parejas sexuales |   |                  |       |
| 1                      | 14/53 (26.4)                              | 1                | 1     |
| ≥ 2                    | 32/136 (23.5)                             | 0.86 (0.39-1.89) | 0.68  |
| Paridad                |   |                  |       |
| < 3                    | 33/137 (24.1)                             | 1                | 1     |
| ≥ 3                    | 14/52 (26.9)                              | 1.16 (0.53-2.54) | 0.687 |

\* El número 1 corresponde a la línea de base o grupo de referencia  
IRS: Edad de inicio de las relaciones sexuales

estadística. El número de parejas a lo largo de la vida sexual, la paridad y el IRS no mostraron asociación significativa con la prevalencia de infección.

## Discusión

Este es el primer estudio publicado sobre las infecciones por *C. trachomatis* empleando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, en población del noreste argentino, lo cual puede servir como antecedente para futuras investigaciones epidemiológicas de enfermedades de transmisión sexual mediante estas metodologías.

La población femenina del norte argentino presenta una alta prevalencia de infección por HPV<sup>17-19</sup>, habiéndose demostrado la circulación de varios genotipos de alto riesgo además del 16 y del 18, clásicamente implicados en la génesis del cáncer de cuello de útero<sup>20</sup>. Por otra parte, la infección por *C. trachomatis* es considerada un elemento facilitador del ingreso del virus al epitelio cervical y ha sido implicada como un posible cofactor en la etiología del cáncer escamoso cervical, efecto mediado por la inflamación crónica<sup>11, 21</sup>.

La prevalencia global de infección por *C. trachomatis* encontrada en esta serie es alta, y está claramente asociada con el nivel socio-económico bajo. Esto se correlaciona bien con la realidad social de esta región del país, que presenta altos niveles de pobreza y con más del 20% de su población con necesidades básicas insatisfechas<sup>22</sup>.

La infección por *C. trachomatis* es frecuente entre mujeres jóvenes, lo cual puede explicarse biológicamente por la diferencia anatómica en la unión escamoso-columnar del cérvix que está evertida y expuesta favoreciendo así la infección<sup>23</sup>. En el presente trabajo, si bien se observa un probable mayor riesgo de infección entre las menores de 25 años, no alcanza un valor estadísticamente significativo por lo cual resulta necesario analizar un mayor número de muestras en esta franja.

La prevalencia global de infección por HPV encontrada en nuestra serie es similar a lo informado en otro estudio efectuado en la misma región geográfica<sup>17</sup> y es consistente con la alta tasa de cáncer de cuello uterino que se observa en el área, como ya fuera mencionado.

En un estudio seroepidemiológico realizado por Smith y col. en mujeres de Brasil y de Filipinas, encontraron que aunque la mayor seropositividad para *C. trachomatis* estaba asociada con la conducta sexual y no con la infección por HPV, su presencia aumentaba el riesgo de cáncer cervical entre las mujeres HPV positivas<sup>11</sup>. Sin embargo, en nuestro trabajo se encuentra una asociación significativa entre la infección por *C. trachomatis* y la infección por HPV. Esto resulta importante en una población con las características de la analizada en esta serie, ya que impone que frente a la detección de la pre-

sencia de uno de estos agentes se debería evaluar la presencia del otro. En tal sentido, es también consistente con lo informado por Koskela et al., quienes encuentran evidencias seroepidemiológicas acerca de que *C. trachomatis* aumenta el riesgo de desarrollo de carcinoma invasor del cuello uterino<sup>24</sup>.

Se espera que esta investigación sea un aporte de información útil para el sector responsable de la salud pública y que ayude para la implementación de medidas adecuadas de control de las enfermedades de transmisión sexual en una región donde las mismas son frecuentes protagonistas.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue parcialmente financiado con recursos de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste y de la Fundación Alberto J. Roemmers.

## Bibliografía

- Deák J, Nagy E, Véreb I, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in a low-risk population in Hungary. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 538-42.
- De Schryver A, Meheus A. Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bull WHO* 1990; 68: 639-54.
- World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. WHO, Geneva 2001. En: [http://www.who.int/hiv/pub/sti/who\\_hiv\\_aids\\_2001.02.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf).
- Schachter JE, Stoner E, Moncada J. Screening for Chlamydial infection in women attending family planning clinics. *West J Med* 1983; 138: 375-9.
- Zelin, JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E, Williams P. Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. *Int J STD AIDS* 1995; 6: 27-30.
- Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *The Brazilian J Infect Dis* 2003; 7: 91-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. *Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* 1993; 42: 1-39.
- Walter E, Stamm MD. *Chlamydia trachomatis*-The persistent pathogen. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 684-9.
- Giuliano A, Denman C, Guernsey de Zapien J, et al. Design and results of the USA-Mexico border human papillomavirus (HPV), cervical dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* study. *Rev Panam Salud Pública* 2001; 9: 172-181.
- Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7: 95-102.
- Smith J, Muñoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185: 324-31.
- Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. Programa Nacional de Estadísticas de Salud. Estadísticas vitales - Buenos Aires, Serie 5, N° 41-43 (1992-2000).
- Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Jang D, Chernesky MA. Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2241-5.
- Mannos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer cells* 1989; 7: 209-14.
- Bernard HU, Chan S-Y, Mannos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1995; 170: 1077-85.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) - Ministerio de Economía y Producción, Argentina. Incidencia de la pobreza y de la indigencia en 28 aglomerados urbanos - Resultados semestrales año 2003. Información de prensa. Buenos Aires, 25 de marzo de 2004.
- Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB. Prevalence of cervical infection by human papillomavirus (HPV) in the Caucasian and Guarani populations residing in the province of Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35: 205-13.
- Jantus Lewintre E, Martín de Civetta MT, Picconi MA, et al. Cáncer de cuello uterino en Corrientes (Argentina): tipificación de virus papiloma humano en lesiones cervicales por PCR-hibridación. *Rev Latinoam de la European School of Oncology* 1998; 7: 134-39.
- Picconi MA, Gronda J, Alonío LV, et al. Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de HPV16. *Medicina* (Buenos Aires) 2002; 62: 209-20.
- Deluca GD, Lucero RH, Martín de Civetta MT, et al. Human papillomavirus genotypes in women with cervical cytological abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2004; 46: 1-5.
- Gravitt P, Castle E, Smith J. *Chlamydia trachomatis* and cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001; 285: 1703-6.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) - Ministerio de Economía y Producción, Argentina. Incidencia de la pobreza y de la indigencia en 28 aglomerados urbanos - Resultados del 1° semestre de 2005. Información de prensa. Buenos Aires, 22 de septiembre de 2005.
- Black CM. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10: 160-84.
- Koskela P, Antilla T, Bjorge T. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000; 85: 35-9.