

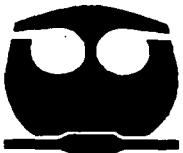


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LOS TRES PRINCIPALES AGENTES ETIOLOGICOS DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE TRANSMISION SEXUAL

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: IRAIS GOMEZ PEREZ



MEXICO, D.F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Saturnino De León Chapa
Vocal	Prof. Raúl Garza Velasco
Secretario	Prof. Alejandro Camacho Cruz
1er. Suplente	Prof. Antonio Castillo Durán
2o. Suplente	Profra. Carmen Basualdo Sigales

Sitio donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud


QFB. Raúl Garza Velasco
Asesor


Irais Gómez Pérez
Sustentante

DEDICATORIAS

A mis padres

Por darme la gran oportunidad de tener una carrera universitaria, por su apoyo en todo momento, su cariño incondicional, su ejemplo y sus consejos invaluable.

A mis hermanos

Por que hemos compartido momentos irrepitibles, esperando que este trabajo y todo lo que representa les demuestre que ningún esfuerzo es en vano.

A Oswaldo

Por su forma muy personal de apoyarme, por el cariño que me ha brindado siempre y por ayudarme a crecer como persona.

A mamá Juana, tías, tíos y primos

Por que siempre estuvieron pendientes de mi desarrollo personal y profesional.

A mis mejores amigas

Eli, Oli, Sofi y Tere, por que juntas formamos el mejor equipo de trabajo, pero sobre todo por su gran amistad, apoyo, comprensión y palabras de aliento.

A mis amigos de la facultad

Por interesarse en mi progreso profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al QBF. Raúl Garza Velasco, por su apoyo en este proyecto, además de ser un gran amigo y consejero.

A la Universidad Nacional Autónoma De México y en especial a la Facultad de Química que fue mi casa por 5 años.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	9
I. <i>Treponema pallidum</i> y LA SÍFILIS	10
i. Características microbiológicas del género <i>Treponema</i>	11
Especies principales	11
Morfología y estructura	14
Cultivo	16
Metabolismo	17
Diferenciación	18
ii. Sífilis	19
Patología y patogenia	19
Respuesta inmune	27
Sífilis y VIH	28
Sífilis congénita	29
Epidemiología	31
Tratamiento	33
Prevención	37
iii. Factores de virulencia del microorganismo	39
Quimiotaxis	40
Adherencia e invasión	41
Evasión de la respuesta inmune	42
Ensayos asociados al eventual desarrollo de vacunas	47
iv. Diagnóstico de laboratorio de la Sífilis	49
Detección de <i>Treponema pallidum</i>	52
Pruebas serológicas	56
Nuevas pruebas para diagnóstico de sífilis	64
II. <i>Chlamydia trachomatis</i> y LAS CLAMIDIASIS GENITALES	69
i. Características microbiológicas del género <i>Chlamydia</i>	70
Especies principales	70

Morfología	70
Ciclo de crecimiento	72
Estructura antigénica	74
Cultivo e identificación	75
ii. Enfermedades de transmisión sexual asociadas a <i>Chlamydia trachomatis</i>	76
Patología	76
Respuesta inmune	79
Epidemiología	82
Tratamiento	84
Prevención	86
iii. Factores de virulencia	87
Adhesinas	87
Invasión	91
Mecanismos para establecer persistencia	91
Regulación de la apoptosis	94
Desarrollo de eventuales vacunas	98
iv. Diagnóstico de laboratorio de las clamidiasis genitales	100
Recolección y transporte de las muestras	102
Métodos culturales	104
Métodos no culturales	105
Pruebas serológicas	110
Nuevos métodos de diagnóstico	111
III. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y LA BLENORRAGIA	113
i. Características microbiológicas del género <i>Neisseria</i>	114
Especies principales	114
Micro y macromorfología	115
Identificación	118
ii. Características de la gonorrea	123
Patología	123
Epidemiología	130

Tratamiento	132
Prevención	134
iii. Factores de virulencia	135
Adherencia e invasión	136
Rmp y el bloqueo de anticuerpos	142
IgA1 proteasa	143
Procuración de hierro	144
Resistencia al suero	146
Reclutamiento directo de proteínas del hospedero	149
Desarrollo de eventuales vacunas	150
iv. Diagnóstico de laboratorio de la gonorrea	152
Diagnóstico con técnicas microbiológicas	154
Diagnóstico con otras técnicas	156
Recolección de la muestra	158
CONCLUSIONES	160
LISTA DE ABREVIATURAS	164
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) representan un grupo de padecimientos infecciosos, algunos de los cuales son clasificados como de notificación obligatoria en la mayoría de los países, y su elevada frecuencia incide fundamentalmente entre la gente joven con vida sexual activa y en edad reproductiva.

La especialidad clínica en las ETS ha evolucionado en los últimos tiempos, abarcando desde las afecciones clásicas tales como la gonorrea, sífilis, chancroide, linfogranuloma venéreo y granuloma inguinal, hasta enfermedades producidas por múltiples bacterias (incluyendo a las bacterias entéricas), hongos, ectoparásitos, protozoarios y virus. Es decir, actualmente las ETS incluyen a todos los patógenos capaces de ser transmitidos entre los humanos a través de las relaciones sexuales (15, 100).

Las ETS se han agrupado o clasificado con base en la entidad clínica y/o los signos que provocan al individuo, en enfermedades genitales ulcerativas, de la mucosa genital, epidérmicas, vaginales y con síndrome de enteritis/diarrea. La tabla 1 enumera a las ETS, asociándolas a su respectivo agente causal y a su clasificación según Shulman y cols. (100).

Tabla 1. Clasificación de las ETS y su agente causal (100).

CLASIFICACIÓN	NOMBRE	AGENTE CAUSAL
Enfermedades genitales ulcerativas	Sifilis	<i>Treponema pallidum</i> (B)
	Chancroide	<i>Haemophilus ducreyi</i> (B)
	Granuloma inguinal	<i>Calymmatobacterium granulomatis</i> (B)
	Herpes	Virus herpes simplex VHS-1 y VHS-2 ⁽¹⁾
Enfermedades de la mucosa genital	Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (B)
	Clamidiasis	<i>Chlamydia trachomatis</i> (B)
	Micoplasma	<i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma genitalum</i> , <i>Ureoplasma urealyticum</i> (B)
Enfermedades epidérmicas	Papilomavirus humano	Virus del papiloma humano (VPH)
	Molusco contagioso	<i>Molluscum contagiosum</i> (V)
	Enfermedades ectoparasitarias: piojos y sarna ⁽²⁾	<i>Phthirus pubis</i> (ladilla) <i>Sarcoptes Scabiei</i> (acaros)
Enfermedades vaginales	Candidiasis vulvovaginal	<i>Candida albicans</i> (L)
	Tricomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i> (P)
	Vaginosis bacteriana	<i>Gardenella vaginalis</i> (B) ⁽³⁾
Enfermedades con síndrome de enteritis/diarrea ⁽⁴⁾	Shigelosis	<i>Shigella sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> (B)
	Salmonelosis	Especies de <i>Salmonella</i> (B)
	Campilobacteriosis	<i>Campylobacter jejuni</i> (B)
	Amibiasis	<i>Entamoeba histolytica</i> (P) ⁽⁵⁾

CLAVES: (B) = bacteria; (P) = parásito; (V) = virus; (L) = levadura.

(1) = La gran mayoría de las infecciones genitales primarias y recurrentes son producidas por el VHS-2

(2) = Se transmiten por cualquier contacto personal estrecho y también por animales, en particular perros.

(3) = Por su interacción con bacterias anaerobias y micoplasmas genitales.

(4) = Por contacto anogenital u oroanal.

(5) = Aún no existen claras evidencias.

Si bien en los últimos años han surgido nuevos padecimientos sexuales, destacan sobre todo otros tres aspectos que han resultado cruciales para mantener e incrementar el interés de los infectólogos en las enfermedades adquiridas por contacto sexual:

- a) La permanencia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- b) La resistencia progresivamente creciente a los antimicrobianos, principalmente por parte de especies tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* y algunos otros patógenos urogenitales.
- c) Las fuertes evidencias de que las ETS (ulcerativas y no ulcerativas) representan factores predisponentes críticos en la adquisición y transmisión del VIH, ya que proporcionan una puerta de entrada más accesible a las secreciones genitales y al VIH, así como al reclutamiento de linfocitos T activados CD4⁺ (15).

Las ETS y sus complicaciones no están distribuidas uniformemente entre la población, en virtud de que sólo ciertos grupos se encuentran en riesgo de adquirirlas o transmitir las y, de ellos, hay algunos subgrupos específicos que sufren las complicaciones. Se ha estimado que se diagnostican anualmente 330 millones de casos de ETS en todo el mundo, 5 a 12 millones de los cuales ocurren en Estados Unidos; esta cifra es rebasada en el sureste de Asia

donde se detectaron alrededor de 150 millones de casos nuevos en el año de 1995.

Adicionalmente, las enfermedades ocasionadas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (clamidiasis genital y gonorrea, respectivamente), representan las infecciones bacterianas más comunes transmitidas sexualmente a nivel mundial. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades calcularon que, en el año 1996, se presentaron en EUA de 2.5 a 3.3 millones de infecciones clamidiales, 660,000 gonocócicas y 130,000 casos de sífilis (15, 59, 67, 88, 117).

En los países pobres o subdesarrollados, los datos sobre las ETS y sus complicaciones son muy limitados, lo que podría significar que su incidencia es subestimada. Ello incluye a México, en donde el problema de las ETS no se conoce debidamente, aún cuando su frecuencia en la población general fluctúa entre 0.1 y 0.5 %, cifras que se incrementan a 10-20 % en los grupos considerados de alto riesgo; evidentemente el grupo etario más afectado es el de 18 a 24 años y la relación hombre-mujer varía entre 7:1 y 10:1 (15, 88).

Por lo regular, las ETS son asintomáticas y su diagnóstico resulta difícil y costoso. Hace 15 años, aquél dependía en gran medida de métodos

tradicionales tales como el cultivo, el ensayo inmunoenzimático y la inmunofluorescencia directa o indirecta; no obstante, en el lustro más reciente han habido importantes avances en cuanto a la detección de dichas patologías, con base en el advenimiento de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos y en la introducción de pruebas no invasivas que emplean muestras urinarias (67, 88).

A pesar de la disponibilidad de regímenes terapéuticos eficaces, es importante subrayar que la prevención y el control resultan más económicos y saludables. En EUA, el Comité Asesor sobre prevención del VIH y ETS de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC Advisory Committee on HIV and STD Prevention), fomenta intensamente diversos programas activos de control destinados como medida primaria a las infecciones transmitidas sexualmente (117).

La mujer embarazada es parte de un grupo especial para el control de las ETS, ya que estas patologías pueden llegar a alterar el curso normal del embarazo, el parto, el puerperio y la lactancia, situación que compromete la salud del binomio madre-hijo. Las ETS suelen significarse como un evento de inter-recurrencia, ya que los patógenos transmitidos sexualmente llegan a desempeñar papeles relevantes en la etiología del embarazo ectópico, el

aborto espontáneo, los mortinatos, el parto prematuro, las infecciones congénitas y en las infecciones puerperales maternas (15).

En relación con la edad pediátrica, las ETS son más frecuentes en los dos extremos de dicho lapso: en recién nacidos y en adolescentes. En cuanto al recién nacido, estas afecciones se pueden adquirir *in utero* o al paso a través del canal vaginal durante el parto; en lactantes mayores, preescolares y adolescentes, la transmisión tiene lugar debido a abuso sexual (59)

Por otro lado, los adolescentes son considerados de alto riesgo, en virtud de los motivos siguientes: desarrollan diversas afecciones a temprana edad; practican relaciones sexuales sin medio de protección alguno; son biológicamente más susceptibles a la infección; tienen mayores probabilidades de contraer padecimientos asintomáticos; son más reuentes a acudir a consulta médica, ya que enfrentan múltiples obstáculos para utilizar los servicios de salud; se aplican tratamientos empíricos (sin establecer la etiología correspondiente); no son sujetos a vigilancia epidemiológica en pareja; y suelen experimentar complicaciones tempranas o tardías durante su vida sexual (15).

Otro muy destacado grupo de interés es el constituido por los(as) trabajadores(as) sexuales, entre los cuales la prevalencia de ETS es particularmente elevada, sobre todo cuando no se implementan estrategias

efectivas de prevención; por obvio, la adecuada difusión acerca de la creciente información que se genera en torno a dichos padecimientos, a las practicas sexuales de estas personas y a la necesidad de adoptar diversas medidas protectoras, resulta de gran importancia en el desarrollo de cualquier programa de control (88).

Es decir, se pretende que la prevención y control de las ETS estén fundamentados en cinco conceptos principales:

- La educación tendiente a reducir los riesgos de contraer alguna ETS: la participación en el autocuidado de la salud sexual, la abstinencia sexual en tanto se sufra de lesiones activas y durante los lapsos de tratamiento -tanto en el paciente como en su pareja sexual- y el uso correcto del condón.
- La detección de individuos asintomáticos, e inclusive, de enfermos sintomáticos que no han acudido a consulta.
- La realización de diagnósticos certeros y el establecimiento de regímenes terapéuticos apropiados; en este último caso, el uso de microbicidas tópicos por parte de la mujer se ha venido implementando

como una nueva estrategia de salud para prevenir la diseminación de esta clase de padecimientos. Cabe mencionar que, en los últimos años, se ha estudiado intensamente a las protegrinas, consistentes en moléculas peptídicas con actividad microbicida, producidos por leucocitos porcinos y cuya actividad contra *N. gonorrhoeae*, los cuerpos elementales de *C. trachomatis* y viriones del VIH tipo 1 se ha comprobado debidamente (84, 85).

- La notificación, evaluación y el tratamiento de las parejas sexuales de los individuos que padecen alguna ETS.
- La inmunización, vía la aplicación de vacunas, ya que éstas representarían una solución eficiente y de largo plazo para el control de este tipo de afecciones (15, 20).

OBJETIVOS

- ✓ Describir los aspectos más sobresalientes acerca de las diversas afecciones ocasionadas al ser humano por *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, subrayando los mecanismos de patogenicidad del agente causal y los regímenes terapéuticos correspondientes.

- ✓ Señalar las principales metodologías implicadas en la identificación de laboratorio de estas bacterias, incluyendo aquéllas que se encuentran en fase de desarrollo.

- ✓ Describir las medidas de prevención y/o control de cada uno de los padecimientos ocasionados por estos microorganismos, así como los avances logrados en el desarrollo de vacunas eficaces.

I. *Treponema pallidum* y LA SÍFILIS

Treponema pallidum es el agente etiológico de la sífilis, enfermedad de transmisión sexual que aqueja a la raza humana desde hace varios siglos y que continua representando un importante problema de salud pública en el ámbito mundial, a pesar de que desde hace más de cinco décadas se cuenta con un tratamiento efectivo.

Adicionalmente, las úlceras genitales en general, incluido el chancro de la sífilis primaria, han sido identificadas como cofactores para la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana.

Así mismo, el diagnóstico de este padecimiento ofrece retos para el laboratorio clínico no asociados con la mayoría de las infecciones bacterianas, pues la falta de un medio de cultivo que permita el crecimiento del microorganismo a partir de muestras clínicas ha traído la necesidad de usar métodos alternativos (los cuales carecen de sensibilidad en algunas etapas de la enfermedad y de especificidad en algunas poblaciones) para su detección o la de anticuerpos específicos.

Todo lo mencionado hace que las investigaciones entorno a este padecimiento se enfoquen en la búsqueda de proteínas de membrana externa que sean potenciales determinantes de la virulencia y vacinógenos, y en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas.

i. Características microbiológicas del género *Treponema*

Especies principales

En general, las espiroquetas se ubican en el orden *Spirochaetales*, constituido por las familias *Leptospiraceae* y *Spirochaetaceae*. Esta última consta de cuatro géneros, uno de los cuales es *Treponema*, que incluye a cuatro especies patógenas para el ser humano y, por lo menos, diez especies no patógenas que integran la flora habitual de la cavidad oral y el tracto genital (48, 58, 74).

A diferencia de las especies no virulentas, las especies patógenas nunca se han logrado cultivar *in vitro*; tal es el caso de *T. pallidum*, causante de la sífilis venérea, *T. endemicum* productora de la sífilis endémica (también denominada bejel); *T. pertenue*, que ocasiona la frambesia y *T. carateum* agente causal de la pinta (45, 48).

Cabe mencionar que la diferenciación de estas especies es difícil y comúnmente se basa en la forma en la que se manifiesta el padecimiento, en

su severidad y en la infectividad hacia los animales de laboratorio; por ello, en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) la nomenclatura se reestructuró para reflejar la homología entre ellas. Así, la especie *Treponema pallidum* incluye a tres patógenos (consultar la tabla 2): *T. pallidum* subespecie *pallidum*, *T. pallidum* subespecie *endemicum* y *T. pallidum* subespecie *pertenue*; es decir, *T. carateum* permanece como una especie separada, debido a la falta de información genética (48, 58, 74). Tal como se acostumbra en la literatura especializada, en el presente texto se empleará el término *T. pallidum* para aludir específicamente al agente causal de la sífilis venérea.

Tabla 2. Características de las especies patógenas de *Treponema* (74)

Bacteria	Enfermedad	Distribución	Edad más susceptible	Transmisión	Infección congénita
<i>T. pallidum</i> subsp <i>pallidum</i>	Sífilis venérea	Mundial	Adolescentes y adultos	Contacto sexual	Si
<i>T. pallidum</i> subsp <i>pertenue</i>	Frambesia (pian)	Áreas tropicales, África, América del Sur, Caribe, Indonesia	Niños	A través de la piel	No
<i>T. pallidum</i> subsp <i>endemicum</i>	Sífilis endémica	Áreas áridas, África, Medio Oeste	De niños a adultos	Membranas mucosas	Rara vez
<i>T. carateum</i>	Pinta	Áreas cálidas, semiáridas, América Central y del Sur	Niños y adolescentes	A través de la piel	No

Morfología y estructura

T. pallidum es una espiroqueta que mide 0.09 a 0.2 μm de diámetro por 5 a 20 μm de longitud, lo que impide su observación al microscopio de luz: debido a su diámetro celular tan pequeño, deben emplearse microscopios de campo oscuro o de contraste de fases (48, 74, 83).

Morfológicamente, las espiroquetas de *T. pallidum* presentan hélices regulares (entre 6 y 14 por célula), con una longitud de onda de 1.1 μm . Sus extremos no son tan puntiagudos y carecen de la forma de gancho característica de algunas espiroquetas comensales (74).

La estructura de *T. pallidum* es similar a la de otras *Spirochaetaceae* (48); desde dentro hacia afuera presenta (ver figura 1):

1. Un cilindro protoplasmático, el cual encierra el contenido celular y está limitado por una membrana citoplasmática asociada estrechamente a la capa de peptidoglucano (48, 83).
2. Espacio periplásmico, en el que se sitúan las fibrillas axiales o endoflagelos. Estos inician en cada extremo de la espiroqueta, se enrollan a lo largo del cilindro protoplasmático y pueden superponerse en el centro del microorganismo (45, 48, 83). Es importante mencionar que el número de endoflagelos por extremo celular representa una característica

morfológica de cada especie; así, en las especies virulentas de *Treponema* es de tres (48).

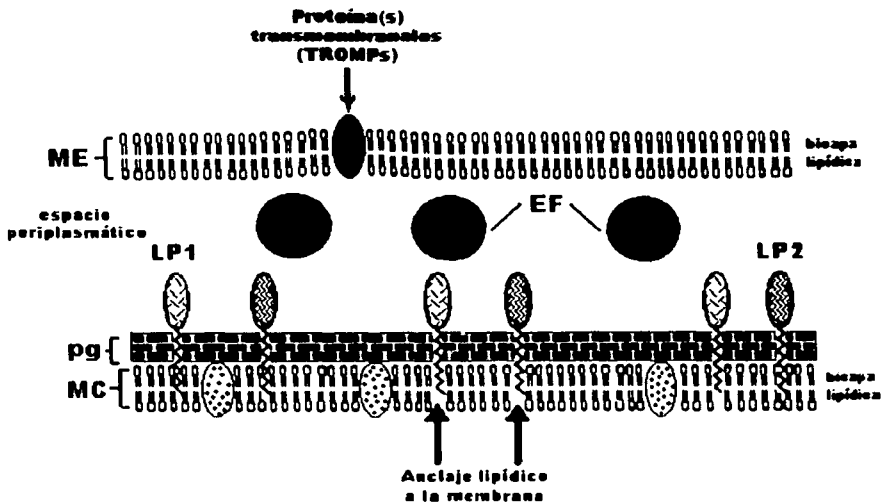
Debido a la acción del endoflagelo, el microorganismo exhibe movimientos rápidos de rotación sobre su propio eje (similar a un sacacorchos) en las preparaciones en fresco, y los movimientos de flexión también pueden ocurrir, a diferencia de los de translación, que sólo se observan en medios viscosos (74).

Otras proteínas son relativamente poco abundantes y/o poco inmunogénicas durante la infección sífilítica (98).

3. La membrana externa; ésta es difícil de visualizar debido a su labilidad y a su bajo índice proteínas/lípidos (86). (consultar la parte de factores de virulencia).

Como resultado de su arquitectura de doble membrana, se ha considerado a *T. pallidum* como una bacteria Gram negativa. No obstante, ello aparenta ser inapropiado, ya que su membrana externa es más frágil que la de aquellas y, además, no contiene lipopolisacáridos (LPS o endotoxina), lo que explica por qué la sífilis carece de la patofisiología séptica típica de las infecciones ocasionadas por la mayor parte de los microorganismos Gram negativos (86).

Figura 1. Estructura de *T. pallidum*



Adaptado de 26

CLAVES: ME = membrana externa; EF = endoflagelos; LP1, LP2 = lipoproteínas; pg = peptidoglucano; MC = membrana citoplasmática.

Cultivo

Hasta la fecha, no se ha logrado cultivar a *T. pallidum* en medios artificiales, huevos embrionados o cultivos de tejido (45). Su propagación (cepa Nichols) se realiza mediante la inoculación intratesticular en conejos, los cuales desarrollan infecciones primaria y secundaria similares a las humanas (48).

La bacteria tiene un tiempo de generación muy prolongado (de alrededor de 30 h), se divide por fisión transversal, es microaerófila (ya que carece de los genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, o peroxidasa [101]), resiste muy poco fuera del organismo humano y muere rápidamente por desecación y a temperaturas de 40-42°C (45, 48). Sin embargo, se mantiene móvil y viable, durante 3 a 6 días a 25°C, en un medio complejo definido por Nelson, con albúmina, vitaminas, aminoácidos, cofactores y sales, en atmósfera de 95% de nitrógeno y 5% de CO₂ (45, 83).

Metabolismo

Los estudios fisiológicos han mostrado que las capacidades biosintéticas de *T. pallidum* son limitadas, por lo que su desarrollo requiere de múltiples nutrientes del hospedero; de hecho, la reciente secuenciación de su genoma confirma su incapacidad para sintetizar enzimas, cofactores, ácidos grasos y nucleótidos de *novo*; no produce las enzimas para convertir fosfoenolpiruvato o piruvato en aspartato ni para realizar la β -oxidación de los ácidos grasos (27, 101).

Debido a lo anterior, la bacteria accede a los diferentes nutrientes por medio de 18 transportadores distintos para aminoácidos, carbohidratos y cationes; además, su falta de LPS en la membrana externa, origina que ésta sea más permeable a los compuestos de naturaleza lipofílica: de hecho, los ácidos

grasos de cadena corta (oleico, palmítico y linoleico) los adquiere mediante difusión pasiva (27, 101).

Por otro lado, se sabe que este microorganismo posee genes que codifican para todas las enzimas de la vía glucolítica, lo que sugiere que utiliza varios carbohidratos como fuente de energía (101).

Finalmente, la neelaredoxina, proteína que emplea hierro como cofactor inorgánico, cataliza la permanencia de un equilibrio redox entre el superóxido y el peróxido de hidrógeno (acción de superóxido reductasa), mecanismo utilizado por la espiroqueta para hacer frente al estrés oxidativo (51).

Diferenciación

Tal como se mencionó con anterioridad, *T. pallidum* subsp *pallidum* es indistinguible morfológica y antigénicamente de las demás subespecies y especies patógenas del género (83); inclusive, varias regiones de su genoma, las cuales han sido "blanco" de diversos estudios, no son de utilidad para efectuar la diferenciación correspondiente (23).

Las razones que explican la poca diversidad genética de estos microorganismos son inciertas, si bien aparentan incluir la falta de sistemas de recombinación y transferencia de DNA, plásmidos y transposones, o bien, sus

mecanismos de restricción son muy eficaces e impiden cualquier recambio de ácidos nucleicos con otros microorganismos (23).

A pesar de ello, recientemente se definió una región génica que codifica para la lipoproteína de 15-kDa (TpN15, de *T. pallidum* Nichols), la cual distingue a *T. pallidum* subsp *pallidum* de las subespecies *pertenue* y *endemicum* (77, 101).

Esto es de particular importancia para las comunidades infectadas que viven en áreas donde la frambesia y el bejel son endémicos y para llevar a cabo las evaluaciones a los inmigrantes provenientes de esos lugares, ya que los métodos de diagnóstico serológico estándar no discriminan entre estas afecciones y la sífilis venérea (23).

ii. Sífilis

Patología y patogenia

La sífilis, enfermedad de los vasos sanguíneos y las áreas perivasculares, tiene fundamentalmente tres etapas activas y un período de latencia, las cuales se relacionan con la duración de la infección (48, 100).

T. pallidum penetra al organismo humano a través de heridas, excoriaciones, fisuras no evidentes o diminutas abrasiones ocurridas durante las relaciones

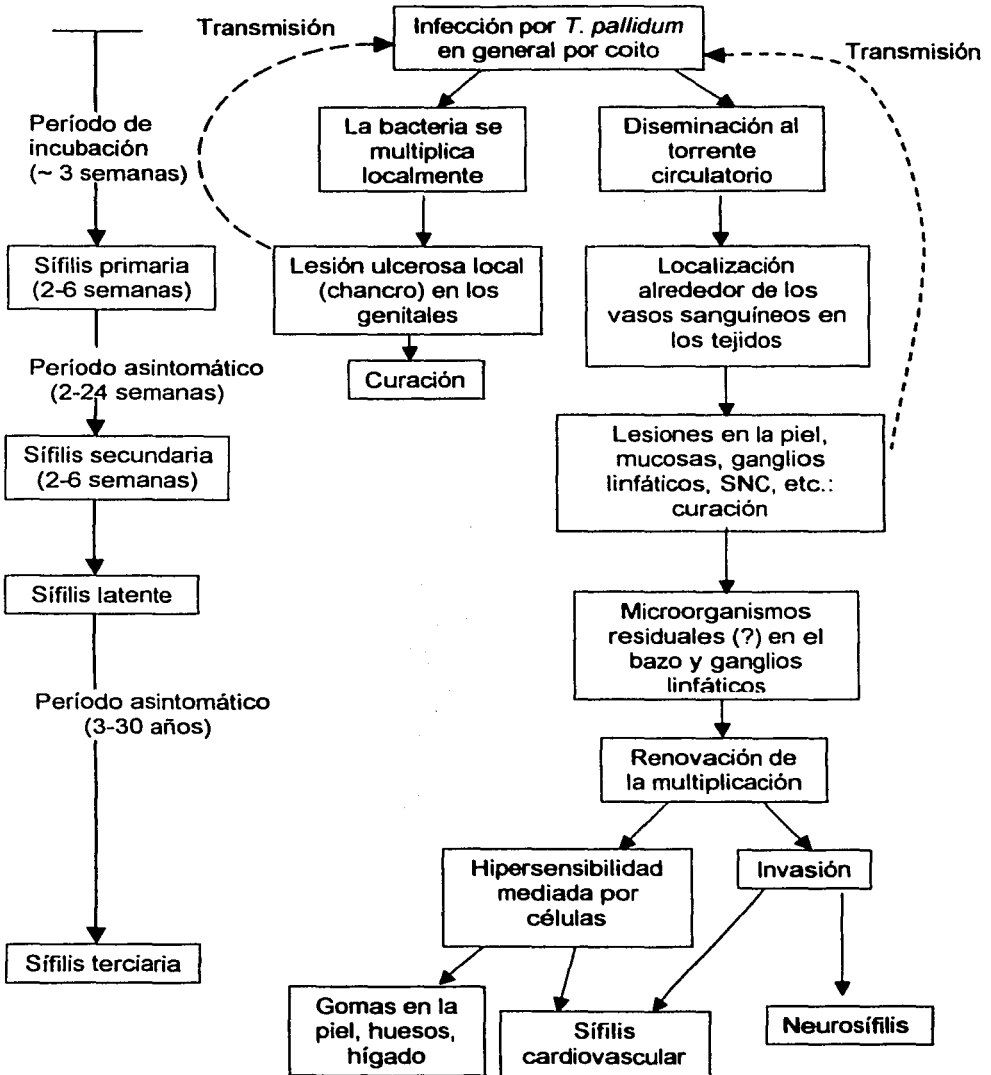
sexuales (59, 93). Una vez ubicados en los tejidos subepiteliales, los microorganismos se reproducen extracelularmente en forma local y se diseminan mediante los vasos linfáticos perivasculares hacia la sangre. Adicionalmente, la bacteria se puede transmitir de la mujer embarazada infectada hacia el feto, quien adquiere la sífilis congénita (consultar la figura 2) (48, 93).

El periodo de incubación fluctúa entre 10 y 90 días con una media de 3 semanas y parece estar relacionado con el tamaño del inóculo (59, 101).

Sífilis primaria. Esta etapa es altamente contagiosa y se caracteriza por la aparición de una úlcera cutánea, denominada chancro, resultado de la respuesta inflamatoria a la infección en el sitio de inoculación. La lesión es firme, de 0.3 a 3 cm de tamaño, por lo general indolora, con margen bien definido y bordes indurados, y de ella drena una secreción serosa poco abundante (59, 100, 101).

En el varón, el sitio más afectado es el pene, en tanto que, en la mujer, en orden decreciente, se ven implicados el labio mayor, menor y el perineo; sin embargo, la lesión también se puede localizar en el cuello uterino o en la pared vaginal, por lo que puede ser pasada por alto, situación que también ocurre cuando se trata de hombres homosexuales, en quienes es común el chancro ano-rectal (48, 101).

Figura 2. Patogenia de la sífilis (93).



Es importante mencionar que los chancros extragenitales son frecuentes, en los dedos, el borde de la lengua y el ano, en donde el dolor es un síntoma prominente. Otro signo común es la linfadenopatía regional (unilateral o bilateral) no dolorosa (100, 101). El chancro suele desaparecer en forma espontánea, sin dejar cicatriz, en 3 a 4 semanas, con variaciones de 1 a 5 (59, 100).

Sífilis secundaria. La etapa secundaria inicia 2 a 12 semanas después de la desaparición del chancro y es el resultado de la diseminación sistémica del microorganismo, mismo que se reproduce en los ganglios linfáticos, el hígado, las articulaciones, músculos, piel y mucosas (59, 93).

La manifestación más común de esta fase es una erupción cutánea que aparece en el 75 a 100% de los pacientes y que puede ser eritematosa, macular, maculopapular o folicular, hasta pustular, involucrando a todo el cuerpo, incluyendo las palmas de las manos y las plantas de los pies (100, 101).

En las mucosas, las lesiones aparentan parches mucosos blancos, sobre todo en la lengua, la cavidad bucal y los labios; además, se producen condilomas planos (pápulas pálidas) alrededor de las áreas más húmedas, tales como vagina y ano. Igual que en la etapa primaria, todas las lesiones mencionadas son contagiosas (45, 48, 101).

Otras manifestaciones propias de este estadio son la irritación faríngea, fiebre, hepatitis, linfadenopatías generalizadas, malestar general, alopecia por zonas, adelgazamiento del tercio lateral de las cejas, anorexia, náuseas y vómito (48, 100, 101).

Las complicaciones oculares de la sífilis secundaria pueden abarcar procesos inflamatorios que incluyen afectación del nervio óptico y anomalías pupilares (101).

Los signos secundarios a la respuesta inmunológica generalizada abarcan el síndrome nefrótico por inmunocomplejos (originado por el depósito de éstos en la membrana basal glomerular), la artritis y las artralgias (48).

Sífilis latente. Al período secundario le sigue una prolongada fase de latencia, que se extiende por 2 a 20 años (59) y se le define como el lapso que se presenta en pacientes con prueba serológica positiva para la enfermedad; transcurre sin signos o síntomas, ya sea que el individuo termine por alcanzar la cura terapéutica o, en su defecto, llegue a desarrollar las manifestaciones terciarias (100, 101).

Esta etapa se divide, arbitrariamente, en latente temprana, cuando su duración es menor a 1 año, y en latente tardía si rebasa dicho lapso. La primera se considera potencialmente infecciosa; además, las mujeres embarazadas que dan a luz durante este período llegan a tener bebés con

sífilis congénita. Por su parte, la segunda se caracteriza por el desarrollo de inmunidad contra las recaídas y por resistencia adquirida (no duradera) contra la infección (100).

Sífilis terciaria. Por lo general, la sífilis terciaria sólo se hace evidente hasta varios años después de la fase secundaria (entre 1 y 46 años, con una media de 15). En esta etapa, el paciente puede desarrollar lesiones localizadas no progresivas, denominadas gomas o sífilomas, en los tejidos blandos o en los huesos de cualquier parte del cuerpo (48, 93, 100, 101).

Los gomas corresponden a lesiones granulomatosas que contienen pocos treponemas y células inflamatorias; aparecen como resultado de una marcada reacción inmunológica y, si bien se pueden considerar benignas (sífilis terciaria benigna), en ausencia de tratamiento llegan a destruir permanentemente los tejidos afectados, abarcando a los sistemas cardiovascular, nervioso central y músculo-esquelético (48, 93,100).

Sífilis cardiovascular. Aproximadamente 10 a 40 años después de la sífilis primaria, aparecen signos de compromiso cardiovascular en 80% de los pacientes no tratados (48, 100). Las principales alteraciones de esta índole incluyen al aneurisma aórtico y a la disfunción de la válvula aórtica (100), e inclusive, la reacción inflamatoria implicada puede causar insuficiencia miocárdica y la muerte (48).

Neurosífilis. La sífilis del sistema nervioso central se presenta en el 3 a 7% de los pacientes, aunque existen claras evidencias de que numerosos individuos sufren invasión del líquido cefalorraquídeo (LCR) por espiroquetas desde las primeras etapas de la enfermedad (100, 101).

Después de la invasión inicial del LCR, las infecciones no tratadas o tratadas inadecuadamente pueden seguir diversos cursos: resolución espontánea, meningitis asintomática o meningitis sífilítica aguda. Posteriormente, la enfermedad puede permanecer asintomática o progresar hasta sífilis meningovascular, paresis o tabes dorsal (101):

- La neurosífilis asintomática se caracteriza por la ausencia de síntomas neurológicos, aunque aparecen anomalías en el LCR, tales como linfocitosis moderada, proteínas ligeramente elevadas y prueba no treponémica positiva (100).
- La sífilis meníngea es muy rara y se puede parecer a la meningitis aséptica. Los hallazgos clínicos incluyen dolor de cabeza, confusión, náuseas, vómito, rigidez del cuello; los nervios craneales comúnmente involucrados son los ópticos y los auditivos (100, 101). Por lo regular los pacientes son jóvenes y las pruebas no treponémicas en LCR suelen ser positivas (100).

- Las manifestaciones más comunes de la sífilis meningovascular incluyen dolores de cabeza durante varios días o semanas, hemiparesis o hemiplejía, cambios psicológicos o conductuales, convulsiones, vértigo e insomnio (100, 101).
- La paresis corresponde a una meningoencefalitis asociada a invasión directa del cerebro por *T. pallidum* (100). Su tiempo de incubación fluctúa entre 5 y 25 años, los síntomas son más comunes en hombres que en las mujeres y son similares a otras formas de demencia con irritabilidad, cambios en la personalidad, pérdida gradual de la memoria y de las funciones cognoscitivas. Cuando la enfermedad continúa, la demencia progresa hasta imitar a los padecimientos psiquiátricos (101).
- El tabes dorsal es el compromiso de las columnas dorsales de la médula espinal, lo que ocasiona la pérdida de la sensación de la posición (93, 101). Las manifestaciones tempranas abarcan dolores relámpago de las extremidades inferiores, parestesias, cambios en la pupila y ataxia. Las anomalías del LCR son frecuentes, pero las pruebas inmunológicas no treponémicas en el líquido espinal y en el suero pueden revertirse a la normalidad en casos tratados con síntomas persistentes (100, 101).

Respuesta Inmune

Un aspecto importante de la inmunología relacionada a la sífilis se basa en la identificación de los factores treponémicos que inician la respuesta inflamatoria. Como ya se mencionó, *T. pallidum* carece de LPS, un potente agonista inflamatorio, sin embargo, el microorganismo posee abundantes lipoproteínas que funcionan como los principales mediadores proinflamatorios y activan eficazmente *in vitro* a varias células del sistema inmune, incluidos los monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. Obviamente, esto no excluye la posibilidad de que otros componentes bacterianos, tales como el peptidoglucano y los glucolípidos, puedan contribuir a la respuesta inflamatoria global (14, 34).

Algunas otras moléculas implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune protectora son las proteínas transmembranales TROMPs (por *T. pallidum rare outer membrane proteins*), las que además se relacionan con las propiedades patogénicas del microorganismo y con la posibilidad de que tenga lugar la infección crónica (62).

Estudios recientes han demostrado que la activación de la respuesta inmune celular es consecuencia de la fagocitosis y degradación del microorganismo, acciones que liberan a las lipoproteínas de sus respectivos compartimentos y que promueven la interacción de estas últimas con receptores celulares tales

como el CD14; de esta manera, se estimula la secreción de citocinas proinflamatorias y de β -quimiocinas (14, 97).

Cabe señalar que las células dendríticas (CD) son los primeros componentes del sistema inmune que contactan a los diversos antígenos en la piel y en las membranas mucosas –los sitios principales de infección sifilítica–, para dar inicio a una respuesta de células T antígeno-específica. En ésta destacan las células Th1 (aunque no se puede excluir totalmente a las Th2) las cuales, junto con su patrón de citocinas (IL-2, INF- γ e IL-12), promueven la activación de macrófagos y la destrucción bacteriana en la sífilis temprana. En la sífilis tardía se piensa que estas células participan en el desarrollo de inmunidad a la reinfección (3, 14).

Así mismo, varias evidencias apoyan la importancia de la inmunidad humoral en la sífilis, incluyendo a la protección pasiva, a la inhibición de la adherencia e invasión de *T. pallidum* en cultivos celulares, a la fagocitosis por macrófagos obtenidos de conejo y a la acción bactericida del complemento dependiente de anticuerpos (62).

Sífilis y VIH

Desafortunadamente, las úlceras genitales también fungen como cofactores para la transmisión bidireccional del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); en tal sentido, los sifilíticos están predispuestos a transmitir o a

adquirir este virus, en virtud del desarrollo de úlceras durante las etapas primaria y secundaria de la enfermedad (97).

Diversos trabajos han mostrado que los principales componentes inflamatorios de *T. pallidum* (lipoproteínas, etc.) pueden estimular al CCR5, el principal correceptor para la entrada del VIH-1 cepa *M-tropic* (la cepa que se transmite con mayor frecuencia por vía sexual) a los monocitos humanos (101).

Adicionalmente, las citocinas secretadas pueden atraer numerosos macrófagos y linfocitos T que expresan el CD4 al sitio de replicación del microorganismo, lo que provee de más células "blanco" al VIH-1, cepa *T cell-tropic*, cuyo correceptor CXCR4 no resulta tan buen promotor de la transmisión pero sí del progreso de la enfermedad (97).

Todo este escenario explica, en parte, porqué los sifilíticos están predispuestos a adquirir el VIH (97); en tal caso, se ha comprobado ampliamente que el espectro clínico de la sífilis y la rapidez con que ésta avanza se pueden modificar cuando ocurre una infección concomitante por dicho virus (100).

Sífilis congénita

La sífilis congénita a menudo constituye una forma severa y mutilante del padecimiento y es resultado de la transmisión transplacentaria al feto,

situación que puede ocurrir durante cualquier estadio clínico de la enfermedad materna (48).

Durante el embarazo, la espiroqueta puede atravesar la placenta desde la décimo sexta semana de gestación, liberándose directamente hacia la circulación fetal; ello ocasiona espiroquetemia con una alta diseminación (48).

La competencia inmunitaria del producto empieza a desconocer al microorganismo hasta después del quinto mes, cuando se producen las lesiones tisulares o la muerte fetal (48, 59).

Al nacer, los neonatos pueden parecer normales, salvo por el menor peso para la edad gestacional, anemia moderada y abdomen prominente (puede haber hepatoesplenomegalia). La situación clínica del recién nacido corresponde a la etapa secundaria de la enfermedad (la fase primaria ocurre *in utero*) y suelen transcurrir 2 a 4 semanas antes de las primeras manifestaciones clínicas, las cuales incluyen fisuras periorales y anorrectales, lesiones bulbosas en palmas de las manos y plantas de los pies, rinitis hemorrágica y lesiones anulares en cuello y cara; sin embargo, en ocasiones éstas aparecen después del año de vida (59).

Posteriormente, la enfermedad terciaria ocurre cerca de los 2 años de edad, aunque rara vez ha tenido lugar después de cumplirse los 30. Algunas lesiones dejan cicatrices que persisten como "estigmas" de la enfermedad, destacando, en orden decreciente, los nódulos frontales de Parrot, maxilar

superior corto, arco palatino elevado, triada de Hutchinson (dientes de Hutchinson, queratitis intersticial, sordera del VIII par craneal), nariz en silla de montar, molares en forma de cúpula, protuberancia relativa del maxilar inferior y tibia en sable (48, 59).

Epidemiología

La susceptibilidad del ser humano a la infección sífilítica es universal, e inclusive, no ocurre resistencia natural ni adquirida a ninguna edad (59). La forma primaria de transmisión es la vía sexual, a través del contacto directo entre las mucosas (genital, anal, oral); adicionalmente, le sigue en frecuencia el contagio a través de la placenta (83, 101). A este respecto, se sabe que la mayoría de los infantes con sífilis congénita son infectados *in utero*, pero ello también puede tener lugar al suceder el contacto con una lesión genital activa al momento del parto (101).

Actualmente, la transmisión por transfusión sanguínea es de menor importancia, aunque teóricamente es posible, ya que el microorganismo puede sobrevivir durante más de 5 días en la sangre refrigerada (101).

En el ámbito mundial se estima que ocurren anualmente 12 millones de casos nuevos de sífilis, siendo los países subdesarrollados los más afectados; en tal sentido, destacan el sur y el sureste asiáticos y la región africana del sub-

Sara, en donde se reportaron, respectivamente, 5.8 y 3.5 millones casos en 1995 (14, 101).

En Europa, la incidencia de este padecimiento se ha venido incrementado a partir de 1992, especialmente en los países de la Federación Rusa, en donde se alcanzan cifras de 263 casos por cada 100,000 habitantes (95).

En cuanto a México, la tasa observada en 1996 fue de menos de 1,500 casos de sífilis adquirida y menos de 100 de sífilis congénita por cada 100,000 personas (59).

Independientemente de las cifras observadas en cada país, la probabilidad de contraer la enfermedad aparenta ir en aumento; algunos de los principales factores predisponentes, son (59):

1. La progresiva apertura de la población joven hacia las relaciones sexuales prematrimoniales, lo que se ha traducido en una mayor duración de la etapa sexual activa (59).
2. La disminución de los niveles socioeconómicos y educativos entre los grupos de mayor riesgo (93).
3. El uso de anticonceptivos hormonales, el cual ha conducido al menor temor hacia el embarazo y, por lo tanto, a mayor número de contactos sexuales y al menor uso de anticonceptivos físicos (los cuales ofrecen cierta protección hacia la infección) (59).

4. Los movimientos de la población: los internos, como resultado de la industrialización y de la urbanización crecientes; y los externos, en los casos de los trabajadores migratorios, los turistas y los conflictos bélicos (59).
5. El limitado acceso a los cuidados de salud y la disminución en los servicios de las clínicas departamentales (114).
6. El intercambio de sexo por drogas o por dinero para comprarlas (especialmente la cocaína tipo "crack") (114).
7. La dificultad para encontrar a los contactos sexuales cuando, como suele ocurrir, están implicadas múltiples parejas (114).

De cualquier forma, los grupos con mayor riesgo de contraer sífilis siguen siendo los jóvenes, emigrantes, viajeros, marinos, homosexuales, sexoservidores y la gente con situación económica precaria (59, 101).

Tratamiento

Todos los estadios y las formas clínicas de la sífilis pueden ser tratados exitosamente con penicilina G de acción prolongada ya que, por fortuna, *T. pallidum* representa una de las pocas especies bacterianas que no han desarrollado resistencia a dicho antibiótico (59, 91). No obstante, las dosis y vías de administración varían de acuerdo con la etapa de la enfermedad y el historial alérgico del paciente; por obvio, siempre se obtendrán mejores

resultados cuando la enfermedad es diagnosticada en forma temprana, (91, 100).

Las recomendaciones actuales para el tratamiento de la sífilis se resumen en la tabla 3, de la cual es preciso tomar en cuenta lo siguiente:

- ❖ Las pacientes embarazadas alérgicas a la penicilina y los individuos con neurosífilis sólo pueden ser tratados con penicilina después de la desensibilización. En caso de que ésta no resulte posible, en las mujeres embarazadas se puede emplear eritromicina pero, al nacer, el producto debe recibir tratamiento de inmediato, ya que este antibiótico no atraviesa placenta. La tetraciclina está contraindicada, debido a sus efectos nocivos sobre el feto y la madre (59, 101).
- ❖ La experiencia clínica con doxiciclina es menor que la asociada a la tetraciclina pero, entre ambos agentes terapéuticos, se recomienda el uso de la primera (101).
- ❖ La eritromicina es menos efectiva que otros antimicrobianos (101).
- ❖ La enfermedad terciaria se debe de excluir antes de empezar el tratamiento de la sífilis latente (101).
- ❖ En la neurosífilis, se han observado fracasos terapéuticos con penicilina benzatínica, debido probablemente a que el medicamento, con base de aceite, es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar la concentración treponemicida mínima en el LCR (0.018 µg/mL durante el

tratamiento) (93, 101). Para resolver este inconveniente suele utilizarse probenecid (derivado altamente liposoluble del ácido benzoico), el cual incrementa los niveles del antibiótico, tanto en el suero como en el LCR (101).

- ❖ La ceftriaxona, una cefalosporina de amplio espectro con una vida media de 7 h en el suero (característica que permite administrarla en una sola dosis diaria), posee la ventaja de penetrar mejor en el LCR; de esta manera, se reducen los fracasos terapéuticos y/o la subsecuente neurosífilis (101).
- ❖ El tratamiento de los pacientes VIH positivos con sífilis primaria o secundaria, es exactamente el mismo que el destinado a los VIH negativos. En cambio, los individuos con sífilis latente tardía –de duración desconocida– o con neurosífilis deben tratarse como VIH negativos y dárseles seguimiento a los 6, 12, 18 y 24 meses (114).

Tabla 3. Tratamiento de la sífilis en personas no infectadas por el VIH (101).

Etapa	Tratamiento	
	Pacientes no alérgicos a la penicilina	Pacientes alérgicos a la penicilina
Sífilis primaria, secundaria y latente temprana (<1 año)	Penicilina G benzatínica, 2.4 mU i.m. en una sola dosis Niños: penicilina benzatínica, 50,000 U/Kg i.m., a un máximo de 2.4 mU	Doxiciclina, 100 mg v.o. 2/d por 2 semanas. O Tetraciclina, 500mg v.o. 4/d por 2 semanas. O Eritromicina, 40mg/kg/día (max 500mg/dosis) v.o. en dosis divididas por 14 días. O Ceftriaxona, 1g diario por 8-10 días

Latente tardía (>1 año) o sífilis latente de duración desconocida	Penicilina G benzatínica, 7.2 mU i.m., administrada como 3 dosis de 2.4 mU i.m cada una en intervalos de 1 semana Niños: penicilina benzatínica, 150,000 U/Kg i.m., a un máximo de 7.2 mU, divididas y dadas en 3 dosis iguales en intervalos de 1 semana	Doxiciclina, 100 mg v.o. 2/d por 4 semanas. O Tetraciclina, 500mg v.o. 4/d por 4 semanas.
Sífilis terciaria (gomos o sífilis cardiovascular, no neurosífilis)	Penicilina G benzatínica, 7.2 mU i.m., administrada como 3 dosis de 2.4 mU i.m cada una en intervalos de 1 semana	Doxiciclina, 100 mg v.o. 2/d por 4 semanas. O Tetraciclina, 500mg v.o. 4/d por 4 semanas.
Neurosífilis, incluyendo infección ocular	Penicilina G cristalina acuosa, 18-24 mU diario, administradas como 3-4 mU i.v. cada 4 h por 10-14 días, o penicilina procaínica, 2.4 mU i.m. diario, mas probenecid, 500 mg v.o. 4/d, ambas por 10-14 días	
Sífilis congénita		
<1 mes de edad	Penicilina G cristalina acuosa, 100,000-150,000 U/Kg/día, administradas como 50,000 U/Kg/dosis i.v. cada 12 h por los primeros 7 días de vida y a partir de entonces cada 8 h por un total de 10 días, o penicilina procaínica, 50,000 U/Kg/dosis i.m. diario en una sola dosis por 10 días	
>1 mes de edad	Penicilina G cristalina acuosa, 200,000-300,000 U/Kg/día i.v., administradas como 50,000 U/Kg cada 4-6 h por 10 días	

CLAVES: i.m = intramuscular; mU = millones de unidades; v.o = vía oral; 2/d = 2 veces al día; 3/d = 3 veces al día; 4/d = 4 veces al día; i.v = intravenosa.

Reacción de Jarisch-Herxheimer. La reacción de Jarisch-Herxheimer se atribuye a la destrucción masiva y súbita de espiroquetas por los fármacos –lo que conduce a la liberación de moléculas tóxicas- y corresponde a signos y

síntomas tales como los siguientes: fiebre, cefalea, malestar general y agravamiento del cuadro clínico existente. Aparece 2 a 12 h después de iniciado el tratamiento y suele ceder a las 24 h; la terapéutica no debe suspenderse, a menos de que las alteraciones amenacen con ser mortales, o cuando el enfermo padece de meningitis sifilítica, ya que es posible que ocurra daño irreversible (48, 114). Las anomalías se pueden modificar administrando antipiréticos o corticoesteroides simultáneamente, aunque ello se emplea de manera empírica (114).

Prevención

La sífilis es una de las ETS de mayor trascendencia sanitaria y social debido, entre otras razones, a que diversas circunstancias dificultan su eficaz profilaxis: la escasa educación sobre sexualidad y ETS, lo poco severo pero muy contagioso de los periodos precoces, la consideración social peyorativa de estos padecimientos, la movilidad de los contactos sexuales, etc. (83).

A pesar de ello, Thomas Parran definió en 1937 un plan de control de esta enfermedad, basado en 5 puntos: educación pública, exploración o monitoreo, diagnóstico y tratamiento clínico, notificación a las parejas sexuales de los enfermos y tratamiento profiláctico. Es conveniente mencionar que este trabajo sigue conformando las bases del control actual de la sífilis, si bien los cambios epidemiológicos ocurridos han obligado a agregar otras estrategias (83, 101):

- ❖ Educación pública. Representa la medida primaria de prevención y se refiere a la educación de la población general acerca de las consecuencias y la prevención de la sífilis y de otras ETS. Su cumplimiento se traduce en el reconocimiento temprano de los signos y síntomas del padecimiento, así como en la modificación de las prácticas sexuales y en la solicitud oportuna de atención médica (83, 101).

- ❖ Exploración. La exploración poblacional tiene diversos intereses: prevención de las complicaciones, incluidas las de la sífilis congénita, y disminución de la transmisión (lo cual también conduce a reducir el VIH) (101).

- ❖ Diagnóstico y tratamiento. Ambos componentes son esenciales para el control de la sífilis, ya que la detección temprana y la terapéutica inmediata reducen las complicaciones y minimizan la transmisión futura de la enfermedad (101).

- ❖ Notificación a las parejas sexuales. Sumada a la evaluación, tratamiento y seguimiento, ésta es esencial para limitar la diseminación de la afección; no obstante, esta actividad, mediante la cual se visita, informa y entrevista a los(as) compañeros(as) sexuales es particularmente costoso y debe ser más selectivo. Los tiempos estimados para la notificación de sífilis primaria, secundaria y latente temprana son 3, 6 y 12 meses respectivamente (101).

❖ Tratamiento profiláctico. Esta medida, también conocida como tratamiento epidemiológico, se recomienda desde que se desconocía cuántos contactos de los individuos con sífilis infecciosa pueden desarrollar la enfermedad. Adopta 2 modalidades: el preventivo, encargado de evitar la inoculación de treponemas durante el contacto sexual y, el abortivo, dirigido a la destrucción de los mismos durante el periodo de incubación (59, 101).

Sin lugar a dudas, la investigación resulta esencial para encontrar y evaluar nuevos métodos de control y prevención; por ejemplo, medicamentos efectivos y baratos que se puedan administrar por vía oral y en una sola dosis, pruebas diagnósticas rápidas basadas en la obtención de muestras no invasivas y, sobretodo, vacunas eficaces, seguras, baratas y fáciles de transportar, almacenar y aplicar (59, 101).

iii. Factores de virulencia

La membrana externa bacteriana desempeña un papel central en la patogénesis e inmunidad, ya que participa en la adherencia a las células hospederas y funge como "blanco" de los anticuerpos opsonizantes (24).

Sin embargo, las moléculas de *Treponema pallidum* implicadas en tales acciones biológicas aún no se han logrado identificar debido, en parte, a la imposibilidad de cultivar *in vitro* a este microorganismo y a la falta de sistemas

de intercambio genético que permitan efectuar los estudios correspondientes, como sería la caracterización de los determinantes de virulencia treponémicos (24, 125).

Además, esta bacteria posee una membrana externa poco inmunogénica, hecho que es necesario analizar y comprender, puesto que contribuye a la larga permanencia del treponema en el hospedero (26).

Quimiotaxis

Debido a que esta espiroqueta obtiene la mayoría de sus nutrientes a partir del hospedero, la movilidad y quimiotaxis constituyen factores de particular importancia para su crecimiento y diseminación durante la infección temprana (32).

Los sistemas quimiotácticos de bacterias tales como *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis*, están compuestos por proteínas transmembranales "aceptadoras" de grupos metilo (MCPs, de *methyl-accepting chemotaxis proteins*) y por proteínas citoplasmáticas.

En *T. pallidum*, se han detectado un gen (*mcp1*) que codifica para las primeras y 4 para las segundas. De hecho, se han caracterizado dos proteínas de 66 y 45-kDa, la *Mcp1* y la *Mcp2*, respectivamente, la segunda de

las cuales es sintetizada durante la infección y provoca una respuesta humoral de anticuerpos IgG (32).

Adherencia e invasión

Los sistemas experimentales demuestran que *T. pallidum* se adhiere con avidez a un amplio espectro de líneas celulares y de muestras de tejido, lo que se basa en la interacción de ligandos específicos, presentes tanto en la bacteria como en la célula hospedera (48, 101). En este sentido, parece ser que la fibronectina es el receptor de cierta estructura presente en los extremos ahusados del microorganismo, posiblemente la proteína TpN83, aunque ello aún requiere de más estudios que lo comprueben (77, 91).

Otra molécula proteica involucrada en la adhesión es la TpN92, la cual presenta una secuencia muy similar a las proteínas de membrana externa de un amplio rango de especies bacterianas, incluidas *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* (17).

La TpN92 posee residuos de serina al final de la región C-terminal, distribuidos dentro de una asa situada sobre la membrana externa, los cuales podrían representar sitios potenciales en donde ocurra la unión entre el hidrógeno de este aminoácido y los carbohidratos superficiales de las células hospederas (17).

Por otra parte, la invasión parece representar un factor crítico de virulencia para el treponema, ya que éste muestra una gran capacidad para penetrar monocapas de células endoteliales y membranas intactas, merced a que produce una hialuronidasa que desdobra a la sustancia basal de diversos tejidos (45, 48, 101).

Evasión de la respuesta inmune

Si bien se trata de una bacteria extracelular de lento crecimiento, todo indica que ésta evade extraordinariamente las respuestas celular y humoral que provoca en el hospedero (86, 98). Por tradición, su pobre antigenicidad se ha explicado con base en una cápsula de mucopolisacáridos que cubre los antígenos superficiales y que, por ende, impide la detección inmunológica correspondiente (26). De hecho, la acumulación de esta sustancia obedece aparentemente a una respuesta del hospedero y no a la actividad treponémica (77).

Por otro lado, evidencias recientes indican que la inmuno-evasión se debe principalmente a la arquitectura molecular treponémica, la cual es bastante inusual, aunque también a la capacidad del microorganismo para recubrirse con proteínas del hospedero, entre las cuales destacan la α_2 -macroglobulina, la albúmina, la cadena pesada de las IgG, la transferrina y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I (86, 91).

La membrana externa de *T. pallidum* corresponde a una lábil bicapa de fosfolípidos (consultar la figura 4) que contiene muy pocas proteínas transmembranales de baja inmunogenicidad (TROMPs); es decir, las proteínas altamente inmunogénicas son lipoproteínas ancladas predominantemente a la cara periplásmica de la membrana citoplásmica (26, 86).

Lipoproteínas. Las lipoproteínas treponémicas constan de diversos polipéptidos unidos a lípidos covalentemente, lo cual incrementa notablemente sus propiedades inmunológicas específicas y les confiere su carácter hidrofóbico (34, 86, 99).

El genoma de *T. pallidum* contiene familias de genes que codifican para 22 lipoproteínas potenciales, si bien a la fecha sólo se conocen 8, cuyas funciones y localización estructural (superficie externa o interna de la membrana citoplasmática) aún no han sido bien establecidas. Al parecer, muchas de ellas se expresan de manera diferenciada, a fin de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales que enfrenta dentro del hospedero (34, 77). A continuación se describen brevemente las lipoproteínas detectadas a la fecha:

Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa (GlpQ). Esta lipoproteína de 38.5-kDa presenta una secuencia relacionada con la GlpQ, enzima involucrada en el

catabolismo del glicerol y del glicerol-3-fosfato (G3P), y que hidroliza a los fosfolípidos diacilados reeditando alcohol y G3P (98, 99).

Esta molécula parece estar asociada al complejo membrana citoplasmática-peptidoglucano y tiene la capacidad de unirse a las inmunoglobulinas (Ig), por lo que posiblemente posea alguna función adicional a la antes mencionada (16, 99).

TpN38. Ésta presenta una similitud de al menos 60% con el receptor periplásmico de glucosa/galactosa (MglB) presentes en *E. coli* y *S. typhimurium*; tal receptor funciona como sistema de transporte de alta afinidad para la galactosa y como receptor en la quimiotaxis para el mismo azúcar (6, 86).

Puesto que el microorganismo utiliza la glucosa del hospedero como su fuente de carbono y energía, la presencia de receptores para carbohidratos es consistente con la biología de la bacteria (6).

TpN47. Representa el principal inmunógeno treponémico, equivale a las PBPs (por *penicillin-binding proteins*) de otras bacterias y actúa como una carboxipeptidasa dependiente de zinc (86, 125). Las PBPs se encuentran unidas a la membrana citoplasmática y corresponden a enzimas involucradas en la biosíntesis del peptidoglucano, aunque también constituyen el "blanco" de las penicilinas (125).

TROMPs. *T. pallidum* contiene mucho menos proteínas transmembranales que las bacterias Gram negativas típicas; dichas proteínas son de una densidad extraordinariamente baja y presentan un dominio superficial, lo cual sugiere que son mediadores potenciales de la virulencia y “blanco” de la respuesta inmune del hospedero (86, 11).

Las TROMPs son relativamente uniformes en cuanto a tamaño, lo que sugiere la posibilidad de que representen una sola proteína u oligómero. Evidentemente, el hecho de que una bacteria contenga una o muy pocas proteínas de membrana externa, en escasas copias, resulta contrario a lo que se conoce acerca del transporte de nutrientes a través de membranas. De esta forma, las pocas sustancias que atraviesan la membrana externa de la espiroqueta, ya sea por difusión y/o a través de un pequeño número de canales acuosos, podría relacionarse, tanto con la imposibilidad de cultivarla en medios artificiales como con su prolongado tiempo de generación (de 30 a 33 h) (86).

Además, estas proteínas se encuentran formando una espiral alrededor del microorganismo, distribución no fortuita que sugiere la restricción de su movimiento lateral de translación, como resultado de interacciones con ciertos componentes del complejo membrana citoplásmica-peptidoglucano.

Dicha movilidad limitada podría ser benéfica para el treponema, ya que provocaría la lentitud en los procesos de fagocitosis y activación del

complemento. No obstante, es importante consignar que tal característica no concuerda con las observaciones de que el endoflagelo rota libremente por debajo de la membrana externa y a lo largo de ésta (86).

Hasta el momento, sólo dos TROMPs han sido identificadas:

Tromp1. Esta proteína de 31-kDa posee actividad de porina y comparte una homología significativa (27% de identidad) con una familia de adhesinas estreptocóccicas, lo que sugiere una posible función similar en *T. pallidum*. Por otra parte, se ha especulado acerca de que la parte externa de esta molécula sea "blanco" de anticuerpos treponemicidas (10, 11).

Tromp2. Es una proteína de 28-kDa que se encuentra en proporciones 3 a 4 veces menores que las de la Tromp1 en la membrana externa. Es reconocida por el sistema inmune del conejo durante la infección sífilítica pero, debido a su baja concentración, no se ha podido evidenciar si desempeña alguna actividad como porina (25).

Cabe señalar que la supuesta localización de estas proteínas, así como su papel en la respuesta inmune, no han sido aceptados universalmente. En tanto la Tromp3 está sujeta a investigación, las búsquedas en las restantes proteínas de membrana externa aún se pueden considerar incipientes (24, 98).

Ensayos asociados al eventual desarrollo de vacunas

Los esfuerzos por identificar a las moléculas específicas de *T. pallidum* que inducen la generación de anticuerpos treponemicidas y, en general, promotoras de la inmunidad protectora, desafortunadamente hasta ahora han sido improductivos. En suma, las inmunizaciones de animales de experimentación, ya sean con microorganismos completos muertos, fraccionados o con proteínas recombinantes, sólo han logrado conferir protección parcial (12, 17).

Entre las moléculas que se han estudiado como posibles antígenos vacunales se encuentran las Tromp1 y 2, las cuales son antigénicas cuando se exponen a suero inmune proveniente de conejos infectados; sin embargo, ambas son débilmente inmunogénicas, comparadas con las lipoproteínas periplásmicas del microorganismo (12).

Con relación a la Tromp1, se han efectuado experimentos inmunizando ratones con vesículas de membrana externa; si bien los resultados sugieren que esta molécula provoca la aparición de títulos elevados de anticuerpos bactericidas, las inmunizaciones con la proteína recombinante purificada no proporciona la actividad sérica protectora que se esperaría. Ello se atribuye a que el antígeno usado no posee las propiedades de la molécula nativa, tales como hidrofobicidad, actividad de porina y, sobre todo, una conformación oligomérica (12).

Otro candidato de interés es la enzima GlpQ (glicerofosfodiéster fosfodiesterasa); en un estudio interesante, conejos inmunizados con la molécula recombinante activa presentaron lesiones de formación acelerada, atípica y no ulcerativa, con resultados negativos de microscopía de campo oscuro, después de efectuado el reto intradérmico con la bacteria virulenta. Sin embargo, la discrepancia en los hallazgos obtenidos en este y otros experimentos, sumada al hecho de la localización periplasmática de la enzima, hacen cuestionable la eficacia de la molécula en cuestión para inducir una respuesta inmune protectora, acompañada por la formación de anticuerpos opsónicos (16, 34, 99).

Una molécula que parecía proveer de protección significativa contra la sífilis experimental es la Tpr K, miembro de la familia de las proteínas Tpr (de *T. pallidum* *repeaf*), de las que se sugería se encontraban localizadas en la membrana externa de *T. pallidum* con dominios variables expuestos en la superficie (17, 24).

Contrario a esto, recientemente se demostró que la Tpr K es pobremente inmunogénica, reside enteramente en el espacio periplasmático, no induce la generación de anticuerpos opsónicos ni de inmunidad protectora durante la infección experimental de conejos y, por lo tanto, no es un componente propicio para una vacuna eficaz (39).

Finalmente, los anticuerpos dirigidos contra la proteína TpN92 tienen una actividad opsónica significativa y su invariabilidad en numerosas cepas hace de esta molécula un candidato atractivo para el diseño de una vacuna universal (17).

Por el momento, es conveniente recalcar que los antígenos que confieren protección completa contra la infección sifilítica aún están por ser descubiertos, y los regímenes de vacunación exitosos pueden involucrar la inmunización simultánea con los que prometen ser inmunoprotectores como parte de una vacuna cocktail (17).

iv. Diagnóstico de laboratorio de la sífilis

A través de los años, dado que *T. pallidum* no puede cultivarse ni teñirse con facilidad, se han debido desarrollar otros recursos tendientes a caracterizar la infección en sus diferentes etapas. De esta manera, las actuales pruebas diagnósticas asociadas a la sífilis se ubican en 3 categorías: a) examen microscópico directo, adecuado para cuando las lesiones están presentes; b) pruebas no treponémicas, utilizadas para dar seguimiento a los pacientes; y c) pruebas treponémicas, las cuales son confirmatorias. El diagnóstico eficaz de la sífilis requiere de que se seleccionen las pruebas apropiadas, dependiendo de la etapa de la enfermedad (consultar la tabla 4) (61, 74).

Tabla 4. Criterios para efectuar el diagnóstico de la sífilis (74).

♦ **Primaria**

Definitivo: identificación directa de *T. pallidum* en material de la lesión, aspirado de nódulo linfático o biopsia

Presuntivo (requiere de 1 y cualquiera de 2 o 3):

1. Lesión típica
2. Prueba no treponémica reactiva y no tener historia de sífilis
3. Para personas con historia de sífilis, un incremento de 4 veces en el título en la prueba no treponémica más reciente comparado con los resultados de las pruebas pasadas

Sugerente (requiere 1 y 2):

1. Lesión parecida a chancro
2. Contacto sexual dentro de los 90 días precedentes con una persona que tenga sífilis primaria, secundaria o latente temprana

♦ **Secundaria**

Definitivo: identificación directa de *T. pallidum* en material de la lesión, aspirado de nódulo linfático o biopsia

Presuntivo (requiere de 1 y cualquiera de 2 o 3):

1. Lesiones típicas de la sífilis secundaria en la piel o membranas mucosas
 - a. Macular, papular, folicular, papuloescamosas o pustular
 - b. Condilomas (región anogenital o boca)
 - c. Parches mucosos (orofaríngea o cervix)
2. Prueba no treponémica reactiva con un título $\geq 1:8$ y sin historia previa de sífilis
3. Para personas con historia de sífilis, un incremento de 4 veces en el título en la prueba no treponémica más reciente comparado con los resultados de las pruebas pasadas

Sugerente (requiere de 1 y 2 se realiza solamente cuando los resultados de las pruebas serológicas no están disponibles)

1. Presencia de las manifestaciones clínicas como las descritas anteriormente
2. Exposición sexual en los 6 meses pasados a una persona con sífilis temprana

- ◆ **Latente temprana**
Definitivo: este diagnóstico no existe ya que las lesiones no están presentes en esta etapa
Presuntivo (requiere 1, 2 y 3 o 4)
 1. Ausencia de signos y síntomas
 2. Pruebas no treponémicas y treponémicas reactivas
 3. Pruebas no treponémicas no reactivas en el año anterior
 4. Incremento de 4 veces en el título de las pruebas no treponémicas comparado con resultados previos de personas con historia de sífilis o de síntomas compatibles con la enfermedad tempranaSugerente (requiere de 1 y 2)
 1. Pruebas no treponémicas reactivas
 2. Historia de exposición sexual en el año precedente
- ◆ **Sífilis terciaria benigna y cardiovascular**
Definitivo: observación de treponemas en secciones de tejido por examen microscópico directo con DFAT-TP
Presuntivo:
 1. Pruebas treponémicas reactivas
 2. No tener conocimiento de historia de tratamiento para sífilis
 3. Síntomas característicos del padecimiento benigno o cardiovascular
- ◆ **Neurosífilis**
Definitivo (requiere de 1 y cualquiera de 2 o 3)
 1. Pruebas treponémicas serológicas reactivas
 2. Prueba VDRL LCR reactiva en el líquido espinal
 3. Identificación de *T. pallidum* en el LCR o tejidos por examen microscópico o inoculación en animalesPresuntivo (requiere de 1 y cualquiera de 2 o 3)
 1. Pruebas treponémicas serológicas reactivas
 2. Signos clínicos de neurosífilis
 3. Proteínas en el LCR elevadas (>40mg/dL) o cuenta de leucocitos (>5 células mononucleares/mL) en ausencia de otras causas conocidas
- ◆ **Sífilis congénita**
Definitivo: demostración de *T. pallidum* por examen microscópico directo del cordón umbilical, placenta, descarga nasal o material de lesiones en la piel
Presuntivo (requiere de 1, 2 y 3)

1. Determinación de que el infante nació de una madre que no se haya tratado o que haya recibido un tratamiento inadecuado de sífilis a pesar de los hallazgos en el niño
 2. Infantes con pruebas treponémicas reactivas
 3. Uno de los siguientes criterios adicionales:
 - a. Signos clínicos o síntomas de sífilis congénita en el examen físico
 - b. Hallazgos anormales en le LCR sin otras causas
 - c. Prueba VDRL LCR reactiva
 - d. Prueba de anticuerpos IgM específica para sífilis reactiva
-

Detección de *T. pallidum*

Inoculación en animales. El método más antiguo para detectar una infección por *T. pallidum* consiste en la prueba de infectividad en animales, la cual es probablemente la más sensible y, por lo tanto, es la reconocida como estándar de oro para comparar la confiabilidad de nuevos métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (61).

El modelo animal más utilizado es el conejo, ya que en éste se produce una lesión local en el sitio de la inoculación, los tejidos permanecen infectados de por vida, la infección puede transferirse a otro animal –utilizando material proveniente de los testículos o de los nódulos linfáticos–, las pruebas para sífilis son reactivas y la sensibilidad alcanza el 100% cuando la muestra contiene al menos 23 espiroquetas y el paciente no ha recibido tratamiento. Evidentemente, el período de incubación, desde la inoculación hasta la

formación de la lesión, es inversamente proporcional al tamaño del inóculo (61).

Microscopía de campo oscuro. La microscopía de campo oscuro es más productiva en la etapa primaria, pero también resulta de utilidad en la sífilis secundaria, en las recaídas y en la sífilis congénita temprana, cuando están presentes la mayoría de las lesiones que contienen numerosos treponemas: chancros, condilomas, parches mucosos (exceptuando a los de la cavidad oral, ya que *T. pallidum* es indistinguible de las espiroquetas saprófitas presentes en este sitio) (61, 74).

Dado que esta técnica depende de la visualización directa de las espiroquetas móviles (microorganismos activos y viables), el procedimiento se debe realizar inmediatamente después de obtenida la muestra, preferentemente durante los siguientes 20 minutos. El microorganismo se distingue de otras espiroquetas con base en la separación de las espirales y en su movimiento de sacacorchos; sin embargo, la técnica no permite diferenciar al agente causal de otros treponemas patógenos (48, 61, 74)

Los hallazgos positivos conducen a un diagnóstico inmediato y específico, antes de que las pruebas serológicas empiecen a ser positivas. No obstante, un resultado negativo no excluye el diagnóstico del padecimiento, ya que los microorganismos son muy pocos cuando la lesión está por cicatrizar o cuando el paciente ha recibido tratamiento sistémico o tópico (48, 61, 74)

La sensibilidad del examen de campo oscuro es de 80%, pero es indispensable la experiencia y el cuidado para realizar un diagnóstico exacto, ya que el observador inexperto puede confundir al treponema con fibras de algodón y el movimiento browniano (61, 74).

DFA-TP (anticuerpo fluorescente directo para *T. pallidum*). Esta prueba detecta y diferencia a los treponemas patógenos de los que no lo son, por medio de una reacción antígeno-anticuerpo; no es imperativo que los microorganismos sean móviles y se puede aplicar a las muestras provenientes de lesiones orales, rectales o intestinales. Los anticuerpos marcados que se emplean corresponden a globulinas anti-*T. pallidum*, humanas o de conejos infectados, y los sueros correspondientes se han adsorbido previamente con treponemas de Reiter (*Treponema phagedenis*), a fin de evitar reacciones cruzadas; en este contexto, también se pueden utilizar anticuerpos monoclonales (61, 74, 95).

Al igual que en la microscopía de campo oscuro, un resultado negativo no excluye el diagnóstico de sífilis, ya que la detección del agente causal puede ser afectada por las condiciones de la muestra o de la lesión y por diversos factores técnicos (61, 74).

Este método alcanza una sensibilidad del 100% cuando se lleva a cabo en muestras de lesiones frescas, es fácil de realizar y también se puede utilizar para detectar al microorganismo en secreciones y fluidos corporales (61, 74).

DFAT-TP (DFA-TP para la tinción de secciones de tejido). El DFAT-TP, combinado con tinciones histológicas, se aplica para examinar secciones de tejido (biopsias o autopsias), procedente del cerebro, tracto gastrointestinal, placenta, cordón umbilical o piel (61).

Esta prueba también emplea anticuerpos monoclonales marcados (preparados en ratón), tal como en la técnica DFA-TP, o bien, se puede modificar utilizando anticuerpos anti-*T. pallidum* provenientes de suero humano o de conejos inmunizados y, posteriormente, agregando una globulina marcada, ya sea anti-humano o anti-conejo, según el caso. Es conveniente considerar un control, por ejemplo, una sección tisular de testículos infectados de conejo (61, 74).

El uso más común de esta prueba consiste en el diagnóstico durante la etapa tardía de la sífilis congénita y en la diferenciación entre las lesiones cutáneas de la etapa secundaria o de latencia, respecto a las que aparecen en la enfermedad de Lyme (61, 74).

Recolección de la muestra. El espécimen para microscopía de campo oscuro consiste de un fluido seroso claro, libre de eritrocitos, de otros microorganismos y de residuos de tejido; la lesión sólo se debe limpiar si está contaminada, utilizando agua corriente o solución salina libre de aditivos

antibacterianos. Las muestras para DFA-TP son similares a las antes descritas, excepto que se secan al aire (74).

Pruebas serológicas

Debido a que en el periodo de latencia y en la sífilis tardía suele no haber lesiones detectables, las pruebas serológicas de diagnóstico resultan indispensables (74). Éstas se clasifican en dos categorías generales: a) pruebas no treponémicas, que al parecer detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos lipídicos presentes tanto en el hospedero como en *T. pallidum*; y b) pruebas treponémicas, las cuales emplean como antígeno a *T. pallidum* subsp *pallidum*, vivo o muerto, a fin de detectar anticuerpos específicos anti-*T. pallidum* (114). En la actualidad, 4 de las primeras y 2 de las segundas son consideradas como estándares para el diagnóstico (consultar la tabla 5) (74).

Tabla 5. Pruebas estándar para diagnóstico serológico de la sífilis (74).

Tipo de prueba	Nombre
No treponémicas	<ul style="list-style-type: none"> - VDRL (por <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>) - USR (por <i>unheated-serum reagin</i>) - RPR (por <i>rapid plasma reagin</i>) en tarjeta con círculos de 18 mm - TRUST (por <i>toluidine red unheated-serum test</i>)
Treponémicas	<ul style="list-style-type: none"> - FTA-ABS (por <i>fluorescent-treponema-antibody absorption</i>) - MHA-TP (microhemaglutinación para anticuerpos anti- <i>T. pallidum</i>)

Evidentemente, la sencillez de las pruebas no treponémicas ha originado que aquéllas se utilicen universalmente en las exploraciones iniciales, se trate de exámenes individuales o de encuestas poblacionales (59); además, tienen la ventaja de ser accesibles, baratas, adecuadas para aplicarlas a un gran número de muestras y útiles para determinar la eficacia del tratamiento. Por otro lado, sus limitaciones incluyen la falta de sensibilidad en los casos de sífilis primaria y la posibilidad de que se presenten efectos de prozona o de que se obtengan resultados falsos positivos (74).

Por lo que se refiere a las pruebas treponémicas, su uso primario consiste en verificar la reactividad de las anteriores, incluidos los casos que presentan evidencias de sífilis, pero las pruebas no treponémicas han resultado negativas, tal como puede ocurrir en la sífilis tardía. Desafortunadamente, este tipo de pruebas es técnicamente más complicado, difícil de llevar a cabo, costosas y la mayoría no es útil para monitorear el tratamiento (74).

Pruebas no treponémicas. Éstas se basan en el empleo de un antígeno constituido por una solución alcohólica que contiene cantidades definidas de cardiolipina (1,3-difosfatidilglicerol), colesterol y suficiente lecitina purificada para producir una reacción estándar (61, 74, 83).

Las pruebas VDRL (única que se puede utilizar para analizar LCR) yUSR son de floculación y requieren revelarse al microscópico óptico, mientras que las de RPR y TRUST corresponden a reacciones de aglutinación visibles a simple

vista, ya que incluyen partículas de carbón y partículas pigmentadas, respectivamente, las cuales quedan atrapadas en la red formada por la reacción antígeno-anticuerpo (61, 74).

Cabe señalar que en la VDRL y RPR es necesario inactivar el complemento, calentando el suero a 58°C, durante 30 minutos (100). Todas las anteriores detectan a anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra del material lipídico proveniente de las células hospederas dañadas, así como de las lipoproteínas y de la cardiolipina del treponema; además, pueden ser cualitativas o cuantitativas, dependiendo de si se utiliza el suero concentrado y/o diluciones seriadas del mismo. Por obvio, las cualitativas sólo detectan la presencia o ausencia de anticuerpos, en tanto que, con las cuantitativas, es posible determinar si una infección es reciente por un incremento de 4 veces en el título, o si se trata de una reinfección o una recaída –en cuyo caso se observa reactividad persistente– (61, 74, 87).

La sensibilidad (71-100%) y especificidad (93-100%) de estos métodos son muy similares, aunque su reactividad puede variar, como consecuencia de la diferente preparación del antígeno (61, 74).

Los resultados de estas pruebas deben ser interpretados de acuerdo con la etapa de la enfermedad. Por lo general, dan positivas 4 semanas o más, después de que aparece el chancro y, en la etapa secundaria, se detectan

títulos de $\geq 1:8$ (aunque algunos autores reportan valores mayores de 1:32); en cuanto a los estadios tardíos, las cifras disminuyen a menos de 1:4, e inclusive, llega a no haber reactividad (74, 114).

Cuando las pruebas no treponémicas se emplean para dar seguimiento al tratamiento de las etapas primaria y secundaria, los resultados que sugieren terapia adecuada se asocian a un decremento de 4 veces el título obtenido 3 ó 4 meses antes, y de 8 veces para el sexto y octavo mes. En la sífilis temprana, el título declina hasta valores mínimos o a reacciones negativas. Asimismo, en los pacientes de las etapas latente o tardía, la reducción de los títulos es gradual (74).

Las eventuales reacciones de prozona se deben a muy elevadas concentraciones de anticuerpos o a que éstos actúan como incompletos; inicialmente, esas muestras serológicas "concentradas" pueden mostrar reactividad débil, atípica o hasta reacciones negativas inconstantes o de apariencia granulosa. Evidentemente las muestras se diluyen (generalmente hasta 1:32) para definir el título correspondiente (61).

En cuanto a las reacciones falsas-positivas, éstas dependen de la prueba utilizada y de la población estudiada, calificándose como agudas a las que duran menos de 6 meses y, como crónicas, a las que persisten por más tiempo.

Las agudas suelen relacionarse con hepatitis, mononucleosis infecciosa, neumonía viral, varicela, sarampión, otras infecciones virales, malaria, inmunizaciones previas, embarazo y errores de laboratorio, en tanto que, las crónicas, son frecuentes en las enfermedades del tejido conectivo (como el lupus eritematoso sistémico), en las que existen anomalías de las inmunoglobulinas (las cuales son más comunes en mujeres), en la lepra y en la adicción a narcóticos. El título de las reacciones suele ser bajo y sólo ocasionalmente llega a manifestarse muy alto; por lo tanto, ni las pruebas cuantitativas pueden diferenciar entre dichas afecciones y la sífilis (61).

Pruebas treponémicas. Los métodos considerados actualmente como estándar (consultar la tabla 5), emplean como antígeno a *T. pallidum*, por lo que detectan y cuantifican anticuerpos específicos dirigidos contra componentes celulares del microorganismo (61, 74).

Las pruebas varían en cuanto a reactividad durante la etapa primaria, en tanto que las diferencias acerca de la sensibilidad (70-100%) se relacionan principalmente con el momento de recolección del suero respecto al desarrollo de la lesión.

La FTA-ABS corresponde a una técnica de inmunofluorescencia indirecta, cuyo antígeno es *T. pallidum* (cepa Nichols) (61, 74). Se lleva a cabo diluyendo 1:5 el suero del paciente, con un extracto de treponema de Reiter. Posteriormente, la muestra se coloca sobre una preparación fija del antígeno

y, durante la incubación, los anticuerpos, si es que están presentes en el suero del enfermo, se unirán al microorganismo; previo lavado con solución salina amortiguada, se agrega a la preparación un suero anti-globulina humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FIT-C), los cuales sólo se incorporarán a la extensión cuando antes lo hayan hecho los anticuerpos humanos. Bajo tales condiciones, las espiroquetas podrán observarse fluorescentes con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (61, 74).

El resultado se reporta como reactiva, reactiva mínima, no reactiva o fluorescencia atípica. La reactividad mínima implica la repetición de la reacción (61, 74).

Para el diagnóstico de la sífilis congénita se recomienda realizar la prueba para IgM (FTA-ABS 19S IgM), ya que las inmunoglobulinas del neonato son una mezcla de IgG procedentes de la madre (transferencia placentaria) y de IgM producidas por el feto (59).

En esta técnica, las fuentes de error son considerables, ya que se trata de pruebas multicomponentes; por tal motivo, es preciso incluir los controles para las muestras reactivas, reactivas mínimas, no reactivas, tinciones inespecíficas y adsorbente, asegurarse de que el antígeno está bien adherido y que el microscopio se encuentre en condiciones óptimas de operación, con los filtros apropiados. Adicionalmente, el estado inmunitario del paciente también puede afectar los títulos de anticuerpos (61, 74, 114).

Por su parte la hemaglutinación pasiva de eritrocitos sensibilizados con antígeno corresponde a un método muy simple para detectar anticuerpos. En la MHA-TP los eritrocitos se recubren con productos de lisis de *T. pallidum* cepa Nichols, tratada con formalina y sonicación (61, 74).

El suero del paciente se mezcla con un diluyente constituido por treponemas de Reiter y por otros adsorbentes y estabilizantes; posteriormente, es colocado en placas de microtitulación y se agregan los eritrocitos sensibilizados. Si el suero contiene anticuerpos, éstos provocarán la aglutinación de los glóbulos rojos, formándose un sedimento suave en los pozos de reacción.

Los resultados se reportan como reactiva, no reactiva o inconclusa. El control de reacciones inespecíficas consta de eritrocitos sin sensibilizar y, en el caso de que manifieste aglutinación, toda la prueba deberá repetirse, en forma cuantitativa, preparando diluciones seriadas del suero adsorbido y de dicho control (61, 74).

Debido a que esta técnica se basa en la aglutinación de glóbulos rojos, es posible cuantificar los anticuerpos anti-treponémicos; empero, esto no es de utilidad, ya que los estudios muestran que no existe relación práctica entre los títulos obtenidos y el progreso de la enfermedad o el estado clínico del paciente (61).

Falta

Página

63

pueden llevar a cabo con muestras plasmáticas. La sangre se debe de recolectar con el anticoagulante adecuado, sin excederse en cuanto al tiempo establecido de almacenamiento. Para el diagnóstico de sífilis congénita, el CDC recomienda utilizar suero materno, más que sangre proveniente del cordón umbilical, ya que aquél constituye un mejor indicador de la infección, seguido por el suero neonatal; lógicamente, las pruebas específicas para IgM requieren muestras del infante (74).

Nuevas pruebas para el diagnóstico de la sífilis

Análisis inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISAs). A partir de 1975 se han venido desarrollando ELISAs que emplean como antígeno a los filamentos axiales de *Treponema phagedenis* biotipo Reiter, a la mezcla cardiolípidina-colesterol-lectina, a *T. pallidum* purificado y sonificado, e inclusive, a antígenos recombinantes tales como el TmpA, Tpn15, Tpn17, Tpn47 y a combinaciones de proteínas. Estos últimos cuentan con potencial para mejorar la especificidad de las pruebas serológicas, ya que no se encuentran contaminados con componentes de los testículos de conejo (95).

La sensibilidad de esta técnica se puede atribuir a su diseño:

ELISA tipo sándwich. En ésta, el antígeno está adherido a una fase sólida y, transcurrido el tiempo de incubación con el suero analizado, el inmunocomplejo se detecta con un conjugado IgG o IgM anti-humano (95).

ELISA competitivo. El antígeno también está unido a alguna superficie, pero los anticuerpos presentes en el suero compiten por aquél con anticuerpos anti-*T. pallidum* marcados que se adicionan al ensayo. Para la lectura se requiere de evaluar la densidad óptica (DO), la cual es baja cuando el suero del paciente contiene anticuerpos específicos.

ELISA de captura. En ésta se cuenta con moléculas anti-IgG o anti-IgM humanas adheridas al pozo de microtitulación, después de la incubación con el suero, las respectivas inmunoglobulinas humanas se une a la fase sólida. En la segunda incubación se agrega un complejo formado por antígeno y anticuerpos anti-*T. pallidum* marcados, el cual pone de manifiesto la presencia de anticuerpos anti- *T. pallidum* (ya sean IgG o IgM) en el suero del paciente (95).

Cabe señalar que las dos últimas variantes son más sensibles que la primera, si bien las tres fluctúan entre 99.5 y 100%. Evidentemente, todas superan a la VDRL y MHA-TP y son recomendables para manejar gran cantidad de muestras, porque se pueden automatizar, sus resultados se leen objetivamente y los reportes se generan electrónicamente, reduciendo los errores de transcripción (95).

En este sentido, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó un ELISA tipo sándwich, el cual evalúa anticuerpos IgG específicos (CAPTIA Syphilis-G, Trinity Biotech, Jamestown, N.Y.) (36) y el ensayo de competencia BioElisa

Syphilis (Biokit, Barcelona, Spain/Instrumentation Laboratory, Paris, France (30).

Para detectar sífilis congénita se cuenta con el Captia Syphilis M, un ELISA de captura que utiliza anticuerpos anti-IgM humana para poner de manifiesto a las IgM séricas del infante. Aquéllos están marcados con peroxidasa de rábano, la cual actúa sobre el sustrato correspondiente (61). Debido a que esta prueba puede dar resultados positivos durante los 2 años posteriores al tratamiento, es recomendable llevar a cabo el monitoreo con pruebas no treponémicas (RPR, etc.) para determinar la eficacia de la terapéutica (36).

Western Blot. Este método diagnóstico puede detectar tanto IgG como IgM. La preparación de las tiras para inmunocorrimiento, se realiza mediante la electroforesis del extracto acuoso del microorganismo en cuestión y, después, las proteínas separadas en el gel se transfieren a una hoja de nitrocelulosa. Posteriormente, esta última se corta en tiras y se incuba junto con el suero del paciente (en los kits comerciales el punto inicial son las tiras ya preparadas): los anticuerpos se detectan agregando un segundo anticuerpo, marcado con una enzima o con material radioactivo (61). Generalmente, los anticuerpos que se detectan para llevar a cabo el diagnóstico correspondiente son los dirigidos contra la TpN15, TpN17, TpN44.5 (TnpA) y TpN47 (95).

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también es altamente específica y sensible para efectuar la detección del DNA genómico de *T.*

pallidum; de hecho, representa una de las mejores alternativas. Sin embargo, no permite distinguir entre microorganismos vivos y muertos, por lo que su capacidad para determinar si una infección es activa ha sido cuestionada, no sólo tratándose de sífilis sino para muchas otras enfermedades infecciosas (126).

Hasta la fecha se han descrito varios segmentos "blanco" de la PCR para realizar el diagnóstico de esta afección; en 3 pruebas se amplifica el gen asociado a la TpN44.5, TpN19 o TpN39 y en otras 2 al de la TpN47. Las sensibilidades reportadas para esos ensayos son de 130, 130, 1, 1 a 10, y 1 a 10 bacterias, respectivamente, pero ninguna de las pruebas ha mostrado ser más sensible que la de infectividad en el conejo (22).

La RT-PCR (*reverse transcriptase* PCR) utiliza como "blanco" una región de 366-bp del RNA ribosomal 16S, y es más sensible que las PCR antes mencionadas, ya que teóricamente permite la identificación de 10^{-2} bacterias en el LCR; otra ventaja consiste en que, después de la lisis de los microorganismos, la muestra se puede diluir 100 veces más, lo que permite el diagnóstico aún en presencia de inhibidores de la reacción (como ocurre algunas veces con la sangre, tejidos o grandes volúmenes de LCR); además, es posible distinguir entre treponemas vivos y muertos, puesto que el RNA se degrada rápidamente en estos últimos (22).

Recientemente, se desarrolló una variante de PCR basada en las características únicas del gen que codifica para la DNA polimerasa I (*polA*) de *T. pallidum*, enzima fundamental en la replicación y reparación del DNA (63).

En la mayoría de los microorganismos, la DNA polimerasa I contiene 1 a 2 residuos de cisteína, característica muy diferente en *T. pallidum*, cuya *polA* posee 24, lo que representa el 2.4% del total de los aminoácidos. Por tal motivo, el segmento implicado es el amplificado por los *primers*.

Teóricamente, el límite de detección de esta técnica es de 2 microorganismos por PCR. Sin embargo, el método no ha resultado completamente satisfactorio, debido al tiempo que requiere: 1 h para la extracción del DNA, dependiendo del número de muestras a procesar; 2 a 3 h para la PCR y 1 h más para el revelado en gel (63).

Otras PCR son capaces de llevar a cabo la detección simultánea de los tres principales microorganismos causantes de úlceras genitales: *T. pallidum*, *Haemophilus ducreyi* y el virus del herpes simplex tipo 1 y 2. Las muestras pueden ser piel, úlceras genitales, sangre, líquido amniótico, tejidos diversos, suero y LCR (22, 63, 123, 126).

II. *Chlamydia trachomatis* y LAS CLAMIDIASIS GENITALES

Chlamydia trachomatis es el agente causal de la ETS bacteriana más importante en términos de incidencia, prevalencia de las complicaciones y costos asociados al cuidado de la salud tanto en países industrializados como aquellos en vías en desarrollo.

Este hecho trae la necesidad de que se sigan desarrollando nuevos métodos de diagnóstico, que sean más sensibles, rápidos y confiables y que, además, permitan el uso de muestras más accesibles.

Lo anterior evitaría la propagación de este padecimiento, ya que se facilitaría la realización de los programas de exploración de las poblaciones de alto riesgo y podría efectuarse el diagnóstico del gran porcentaje de personas asintomáticas.

Por otro lado, el objetivo de las investigaciones recientes concernientes a esta enfermedad consiste en el desarrollo de alguna vacuna exitosa, la cual representaría el mejor método de prevención.

Mientras ello ocurre, se han venido tomando una serie de medidas tendientes a impedir que el paciente abandone el tratamiento y, consecuentemente, que adquiera una reinfección o experimente las complicaciones de la enfermedad.

i. Características microbiológicas del género *Chlamydia*

Especies principales

En virtud de sus características especiales, entre las cuales destacan la de presentar un ciclo de crecimiento intracelular único y ser parásitos intracelulares obligados (ya que no pueden generar ATP), las clamidias se han agrupado dentro de su propio orden: *Chlamydiales*; en la familia *Chlamydiaceae*, con un solo género, *Chlamydia*, del cual se conocen cuatro especies: *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*, clasificadas según su potencial patógeno, variedad de hospederos y diferencias antigénicas (38,45, 68, 74). Las características de las últimas tres especies se resumen en la tabla 6.

Morfología

Las clamidias se observan como cocos inmóviles: presentan una morfología esférica u ovalada que, junto con el tamaño, varía en relación con la fase de desarrollo. De acuerdo con ello, se pueden distinguir dos estructuras fundamentales: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR) (83).

Tabla 6. Principales características de las clamidias patógenas para el humano.

Característica	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. trachomatis</i>
Morfología de la inclusión	Grande, forma variable, densa	Redonda, densa	Redonda, vacuolar
Glucógeno en la inclusión	No	No	Si
Morfología de los CEs	Redonda	Piriforme, redonda	Redonda
Susceptibilidad a las sulfonamidas	No	No	Si
Plásmidos	Si	No	Si
Variedades serológicas	>4	1	19
Hospedero natural	Aves	Humanos	Humanos
Modo de transmisión	Excreta de aves a humanos a través del aire	Persona a persona a través del aire	Persona a persona, madre a hijo
Principales enfermedades	Psitacosis, neumonía, fiebre	Neumonía, faringitis, bronquitis, aterosclerosis, asma, EPOC y Alzheimer	Tracoma, enfermedades de transmisión sexual, neumonía del lactante, LGV

CLAVES: CEs = cuerpos elementales; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; LGV = linfogranuloma venéreo.

El CE corresponde a una estructura esférica pequeña y densa con un diámetro de 0.2 a 0.4 μm , se tiñe de color púrpura con el colorante de Giemsa, contrastando con el color azul del citoplasma de la célula hospedera; además, es la forma infecciosa y responsable de la fijación e ingreso a la célula "blanco", aunque metabólicamente es inactiva e incapaz de replicarse (45, 48, 83).

Este elemento presenta una pared celular semejante a la de las bacterias Gram negativas, incluida una membrana trilaminar externa con lipopolisacáridos, pero carece de la molécula estabilizadora de peptidoglucano; en su lugar aparece una gran cantidad de puentes disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína de las principales proteínas de la membrana externa. Esto le confiere rigidez, escasa permeabilidad y estabilidad en el medio extracelular (75, 83).

El CR es la forma intracelular metabólicamente activa, se divide por fisión binaria, es osmóticamente frágil, no infectante, posee un diámetro de 0.6 a 1.2 μm y se tiñe de color azul con el colorante de Giemsa (48, 83).

Su pared celular es más fina, carece de la capa interna y no presenta los enlaces disulfuro que caracterizan a los CEs; por ende, es menos rígido y permeable para los nutrientes y los productos finales del metabolismo (83).

El CR adquiere su ATP por medio de una ATP-ADP translocasa y, una vez dentro de él, lo degrada a ADP por una ATPasa específica; la fuerza promotora resultante ayuda a conducir el transporte de los nutrientes (48).

Ciclo de crecimiento

El ciclo de crecimiento de las clamidias se considera único, es común para todas las especies del género y se divide en cinco fases principales: 1) fijación

y penetración del CE a las células epiteliales susceptibles; 2) transición del CE a CR; 3) división y desarrollo del CR; 4) maduración del CR a CE infeccioso; y 5) liberación del CE de la célula hospedera (48, 75).

El paso inicial en el ciclo de crecimiento y en el proceso infeccioso inicia con la fijación del CE a las microvellosidades de una célula epitelial (48). Debido a que éstas no son fagocitos profesionales, las clamidias inducen su propia internalización, proceso al que se denomina endocitosis dirigida por el parásito. Posteriormente, los microorganismos son captados por fagosomas, a la vez que aquéllos bloquean los mecanismos celulares de defensa tales como la fusión fagolisosomal (75, 83, 93).

Una vez dentro del fagosoma, el CE aumenta dos a tres veces su tamaño, la pared celular se torna más fina y permeable, el nucleóide desaparece y el citoplasma se evidencia más homogéneo, para dar lugar a la formación del CR y a la subsecuente replicación (48, 83).

La microcolonia de clamidias en desarrollo, conocida como inclusión, suele contener 500 a 1000 partículas de progenie, lo que requiere de la ocupación de más de la mitad del volumen celular (48,93, 120).

Para completar el ciclo de desarrollo, el CR madura a CE, antes de que el microorganismo sea liberado de la célula hospedera, por lisis o exocitosis, después de 48 a 72 h totales (48, 83). Al parecer, esta última transformación

se lleva a cabo cuando los nutrientes se han agotado, si bien no se descarta la posibilidad de que dicho evento ocurra debido a las condiciones oxidativas que se producen tardíamente en el curso de la infección (lo que llevaría a la restitución de los puentes disulfuro de la pared celular de los CE) (48, 93).

Estructura antigénica

La familia *Chlamydiaceae* presenta antígenos específicos de género (o de grupo), especie y serotipo y, aunque se trata de microorganismos antigénicamente complejos, sólo algunos epitopos desempeñan un papel importante en la patogénesis y en el diagnóstico (48, 74).

El antígeno de género es el lipopolisacárido (LPS), molécula análoga a la de ciertas bacterias Gram negativas, que se manifiesta durante todo el ciclo de crecimiento y cuyo componente inmunodominante es el ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (45, 48, 74).

Los antígenos específicos de especie son principalmente proteínas termolábiles de la membrana externa (45, 48) y, los específicos de serotipo, sólo son comunes para ciertos aislamientos (48, 83). En este sentido, se ha demostrado que la proteína principal de membrana externa o MOMP (por *major outer membrane protein*), contiene tanto antígenos específicos de especie como los de serotipo (74).

Así, *C. trachomatis* se divide en 3 variantes biológicas (biovariedades), con base en su tipo de hospedero y las enfermedades que causa y, en 19 serovariedades, tomando en cuenta los antígenos específicos de serotipo (consultar la tabla 7) (5, 73).

Tabla 7. Biovariedades y serovariedades de *C. trachomatis*

Biovariedades	Serovariedades	Enfermedades que ocasionan
Tracoma	A, B, Ba, y C	Tracoma
	D, Da, E, F, G, Ga, H, I, J y K	Infecciones del tracto genital, conjuntivitis de inclusión
LGV	L1, L2, L2a y L3	Linfogranuloma venéreo
MoPn ^a	-	Neumonía del ratón

CLAVE: a = esta biovariedad está muy poco relacionada genéticamente con las demás, por lo que numerosos investigadores sugieren no incluirla dentro de las biovariedades de *C. trachomatis* (53).

Cultivo e identificación

Puesto que las clamidias son microorganismos intracelulares, el cultivo celular todavía se considera como el método más sensible y específico para llevar a cabo su aislamiento e identificación (48).

En tal contexto, las líneas celulares más utilizadas son las McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa 229 (células cancerosas de cérvix humano), BHK-21 (células de riñón de hámster recién nacido), L 929 (fibroblastos de ratón) y BGMK (células de riñón de mono verde *Buffalo*) (9, 48). Cabe mencionar que no en todas ellas se obtiene el mismo desarrollo, pues las cepas oculares y

genitales de *C. trachomatis* tienden a variar ampliamente en cuanto a su infectividad (48).

Antes de efectuarse la inoculación, las monocapas celulares son tratadas con dietilaminoetilidextrana (DEAE-dextrana) y cicloheximida (la cual inhibe selectivamente la síntesis de proteínas del hospedero), lo que se traduce en un importante incremento de la susceptibilidad a la infección y de la replicación clamidiana (9, 48).

La incubación se realiza a 35°C durante 48 a 72 h, en medios de crecimiento para las células hospederas (mínimo esencial de Eagle –EMEM-, etc.), y posteriormente se lleva a cabo la visualización de las inclusiones, lo que contribuye a la especificidad cercana a 100 % del cultivo; esto último se logra mediante tinciones con anticuerpos monoclonales fluorescentes, los cuales pueden ser anti-LPS (para reconocer al género) o anti-MOMP (para realizar una identificación especie-específica) (9, 74).

ii. Enfermedades de transmisión sexual asociadas a *Chlamydia trachomatis*

Patología

C. trachomatis infecta preferentemente el epitelio columnar o transicional del aparato genital, aunque el proceso puede propagarse a otros tejidos; así mismo, el progreso y las complicaciones inducidas por el ascenso de esta

bacteria en el tracto genital dependen de lo intenso del proceso inflamatorio y de la fibrosis (122).

Por lo general, la infección se adquiere a través del sexo vaginal o anal realizado sin protección, así como del orogenital, aunque otra vía de contagio para la mujer consiste en la inseminación artificial, ya que el semen puede contener partículas clamidiales (82, 103, 127).

En los varones heterosexuales sintomáticos, los signos aparecen 1 a 3 semanas después de la exposición, siendo la uretritis el trastorno clínico más común, muy parecido –por cierto– a la gonorrea (9, 100).

La epididimitis suele ser resultado de una infección ascendente y clínicamente se caracteriza por un dolor escrotal unilateral, inflamación, sensibilidad del epidídimo y fiebre; evidentemente, si no es tratada a tiempo puede conducir a la esterilidad. La prostatitis y otras formas de infección local son muy poco frecuentes (9, 100).

Los varones homosexuales y bisexuales suelen desarrollar proctitis, en muchos casos asintomática; cuando los síntomas se presentan incluyen descarga rectal, dolor al defecar, tenesmo, diarrea y/o sangrado rectal (9).

Parecido a lo que ocurre en la gonorrea, el padecimiento clamidiano puede abarcar alteraciones sistémicas, si bien las manifestaciones se deben a la

formación de complejos antígeno-anticuerpo y no a la diseminación hematológica del microorganismo (100).

Evidentemente, en el varón, las infecciones no tratadas conducen a otras complicaciones, entre las cuales figura el síndrome de Reiter, caracterizado por una triada de síntomas recurrentes: uretritis, conjuntivitis y poliartritis. (48, 100).

En mujeres sintomáticas, las manifestaciones clínicas incluyen cervicitis mucopurulenta, uretritis, endometritis, abscesos en las glándulas de Bartholin, salpingitis o EIP (salpingitis con perihepatitis y/o peritonitis); no obstante, también puede verse afectada la mucosa rectal (9).

Las secuelas de la salpingitis no tratada pueden incluir abscesos tuboováricos y respuestas inflamatorias graves que causan cicatrización tubular con subsecuente infertilidad y generan riesgos de embarazo ectópico (9, 100).

En las mujeres embarazadas, la infección clamidiana se ha relacionado con EIP postparto, períodos de gestación más cortos, rompimiento prematuro de membranas y morbilidad perinatal (9, 48).

Los recién nacidos pueden adquirir conjuntivitis por inclusión y/o neumonía, tras su paso a través del canal de parto infectado. La primera se hace evidente 5 a 12 días después del nacimiento y se caracteriza por un exudado

pegajoso acompañado por vulvovaginitis, otitis o rinitis mucopurulenta. Por su parte, la neumonía se manifiesta a las 4 a 17 semanas posteriores al nacimiento (como complicación de la conjuntivitis), con silbidos, tos y ausencia de fiebre (9, 45, 48).

Es importante subrayar que, en los niños menores de 12 años, la identificación de esta bacteria debe hacer sospechar de abusos sexuales (59).

Respuesta Inmune

Las superficies mucosas representan el área más extensa de contacto entre los microorganismos y el sistema inmune del organismo humano; en tal sentido, el tracto reproductivo posee posiblemente el sistema inmune más especializado, ya que enfrenta el doble reto de proveer de protección continua contra los patógenos potenciales y contribuir con un ambiente receptivo para el espermatozoide y el embrión (52).

Estudios en ratones han mostrado que la respuesta inmune contra la infección genital por *C. trachomatis* es bastante compleja, ya que resuelve la infección y confiere protección específica de serotipo a corto plazo pero, al mismo tiempo, sensibiliza al hospedero para el desarrollo de alteraciones inmunopatológicas que conducen al daño tisular y a la fibrosis. Por esta razón, un componente crítico de la respuesta consiste en el reclutamiento de la subpoblación linfocitaria adecuada en la mucosa genital (52, 53, 80, 122).

Una vez que *C. trachomatis* se localiza en la vagina y el cérvix, se encuentra con células dendríticas (CD), monocitos (los cuales liberan interferón- γ [INF- γ] y factor de necrosis tumoral- α [TNF- α] en respuesta al LPS), neutrófilos y macrófagos (capaces de eliminar a las clamidias mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno) (75, 79).

Las CD, células presentadoras de antígeno (CPA) por excelencia, juegan un papel muy importante en el inicio de la respuesta inmune: internalizan a las clamidias, las inactivan y las presentan vía sus moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Esta interacción induce su maduración, a fin de que estimulen de una forma antígeno-específica a las células T CD4⁺ (75, 79).

Entre las citocinas participantes en la resolución de la infección, se cuenta la interleucina 12 (IL-12), la cual dirige la respuesta residente en los linfocitos T CD4⁺ Th1, cuyo papel preponderante consiste en la producción de IFN- γ , destinada a controlar la infección genital primaria y a prevenir que ésta se extienda hacia otros tejidos (102). Contrario a ello, la respuesta inmune mediada por los linfocitos T CD4⁺ Th2 es inefectiva para eliminar al parásito, e inclusive, puede contribuir a prolongar la infección y a propiciar cambios patológicos (53).

El mecanismo de protección sugerido para el INF- γ no es el de un efecto directo sobre las clamidias, sino la degradación del triptofano hasta N-formilcinnurenina y cirunenina, a través de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa, la cual es inducida por aquella molécula. Este proceso se ha correlacionado con la inhibición del crecimiento del microorganismo en diversas células humanas, incluidos los macrófagos, fibroblastos, las células epiteliales y las conjuntivales (75)

Otro mecanismo mediante el cual el INF- γ contribuye a resolver la infección es activando a los macrófagos, hecho que promueve la eliminación de los CE en el sitio de la infección (60).

Por su parte, los linfocitos T CD8⁺ también confieren protección por medio de dos mecanismos posibles. El primero involucra la lisis de las células hospederas durante la replicación intracelular de las clamidias, lo que promueve la liberación de los CR, formas no infectantes a los que, además, despoja de su nicho intracelular; el segundo se relaciona con la producción de INF- γ (60).

Finalmente, a los anticuerpos no se les ha logrado establecer alguna función protectora dominante en los modelos animales, lo que sugiere que aquéllos desempeñan algún papel limitado en la infección primaria, mismo que se incrementa notablemente en los estadios severos y en las reinfecciones (102).

Epidemiología

Las ETS ocasionadas por *C. trachomatis* suelen ser de dos tipos: 1) las ocasionadas por los serotipos D a K, que en la mujer se caracterizan por cervicitis mucopurulenta y, en el varón, por uretritis y epididimitis; y 2) el LGV originado por los serotipos L1, L2, L2a y L3 (48, 59).

Acerca de dichas enfermedades, en 1995, la cervicitis y la uretritis manifestaron una incidencia de 89 millones de casos, hecho que las ha convertido en las ETS bacterianas con mayor frecuencia en el ámbito mundial; por lo que respecta al LGV, actualmente se registran menos de 300 casos al año en EUA (48, 103). De acuerdo con los datos anteriores, el presente capítulo sólo hace referencia a los padecimientos provocados por los serotipos D a la K.

En EUA, el índice de infecciones clamidianas entre las mujeres aumentó de 78.5 a 404.5 casos por 100,000 habitantes en el lapso de 1987 a 1999. Actualmente, la incidencia anual de las clamidiasis genitales es de más de 4 millones, de los cuales 2.6 millones afectan a la mujer, 1.8 al varón y el resto involucra a infantes (21, 55, 81).

La prevalencia de *C. trachomatis* en mujeres adolescentes sexualmente activas generalmente excede el 10%; lógicamente, en las clínicas norteamericanas de ETS esta cifra asciende a 40% para adolescentes y

mujeres, es de 15 a 20 % para varones, de 8 a 12 % para mujeres embarazadas y aproximadamente el 65 % de los recién nacidos llega a padecer la infección tras la exposición perinatal (9, 59).

Así, el costo anual del tratamiento de las clamidiasis genitales en ese país se estima en 4 billones de dólares, monto superado solamente por el que se destina al SIDA. Cabe subrayar que el 80 % de tales costos se asigna a la terapéutica de las secuelas de la enfermedad en la mujer, rubro en el que destacan la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), la infertilidad y los embarazos ectópicos (103, 108).

En la ciudad de México, la incidencia de la infección en mujeres dedicadas a la prostitución fue de 13 % en 1995 y de 20 % en 1996 y 1997. En Guerrero, la cifra ascendió a 36.9 % en 1999 (2) y, entre las mujeres embarazadas, fue de 10 a 15% (59).

Es importante señalar que el porcentaje de personas asintomáticas es elevado: en el varón rebasa al 50 % (9, 103) y, en la mujer, se estima que el 70 a 90 % de las infecciones endocervicales pasan inadvertidas, pudiendo persistir sin tratamiento durante meses o años (103).

En la mujer, diversos estudios han establecido que el principal factor demográfico correlacionado con la infección es la juventud (18 a 21 años) y que los factores asociados a mayores edades incluyen la soltería, la

nuliparidad (el hecho de nunca haberse embarazado), la raza y las bajas condiciones socioeconómicas; así mismo, influyen otros factores de riesgo tales como tener numerosas parejas sexuales o alguna nueva, no utilizar condón, etc. (9, 55, 104).

Adicionalmente, es conveniente reiterar que las infecciones genitales ocasionadas por este microorganismo se cuentan entre las ETS que incrementan el riesgo de contraer el VIH (9).

Tratamiento

El ciclo de crecimiento de las clamidias impacta directamente sobre la terapéutica correspondiente, ya que son microorganismos intracelulares que sólo se encuentran fuera de la célula hospedera cada 48 a 72 h. Bajo tales condiciones, los antibióticos seleccionados deben ser capaces de alcanzar el ambiente intracelular y poder administrarse por tiempos prolongados (durante por lo menos 7 días) para lograr su efectividad clínica y microbiológica (93, 103).

Otro aspecto negativo del tratamiento reside en el hecho de que la mayor parte de las infecciones son asintomáticas (93).

Adicionalmente, el incumplimiento por parte del paciente representa otro factor de ineficacia, medida por cultivos positivos después de 7 a 14 días de

finalizado el régimen terapéutico. A la fecha, la resistencia a antibióticos no constituye una dificultad, ya que el CR permanece dentro de las inclusiones y el CE es relativamente inerte en lo referente a sostener interacciones genéticas con otros microorganismos que podrían transferirle los genes correspondientes (9, 93, 103).

El CDC estadounidense, en sus Guías para el Tratamiento de las Enfermedades Transmitidas Sexualmente de 1998 (1998 Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases) recomienda que los pacientes infectados sean tratados con doxiciclina (por 7 días) o azitromicina (en una sola dosis); los antibióticos alternativos son eritromicina base, etilsuccinato de eritromicina y ofloxacina (20).

La doxiciclina y la azitromicina, esta última de mayor costo, son igualmente eficaces; por su parte, la eritromicina es menos efectiva y genera efectos gastrointestinales, lo que provoca que los pacientes incumplan el régimen. La ofloxacina alcanza eficacias similares a las de las primeras, pero es más cara y no aporta ventajas respecto al régimen de dosificación, ya que se debe administrar por 7 días; otras quinolonas no son efectivas en contra de la infección clamidiana o no han sido evaluadas adecuadamente (20).

En el caso de mujeres embarazadas, la doxiciclina y la ofloxacina están contraindicadas; así mismo, la seguridad y eficacia de la azitromicina durante

el embarazo y la lactancia aún no se han establecido. De acuerdo con lo anterior, se indica un tratamiento con eritromicina base o con amoxicilina.

Para los infantes con oftalmía o neumonía también se recomienda la eritromicina base, igual que para quienes pesan menos de 45 Kg; para menores de 8 años de edad con 45 Kg o más, el antimicrobiano adecuado es la azitromicina y, para los mayores de 8 años, se puede elegir entre ésta y doxiciclina (20).

Prevención

Las medidas actuales encaminadas a la prevención de la infección por *C. trachomatis* se basan en las siguientes consideraciones: la mayoría de los padecimientos que ocasiona son asintomáticos en mujeres, y resultan usualmente en salpingitis silenciosa, cicatrización de las trompas de Falopio e infertilidad; la falta de tratamiento o su incumplimiento incrementa estos riesgos y, la uretritis en hombres jóvenes es también frecuentemente asintomática. Tomando esto en cuenta se sugiere que la exploración periódica de las personas en alto riesgo para contraer la infección, así como el tratamiento de los individuos asintomáticos y el manejo adecuado de los sintomáticos son las mejores medidas de prevención y control, mientras se cuenta con una vacuna efectiva (92, 103).

iii. Factores de virulencia

Chlamydia infecta a las células a través de su adherencia, endocitosis e inhibición de la fusión fagolisosomal. Las principales células hospederas "blanco" *in vivo* son las epiteliales columnares, a las que el microorganismo ingresa vía endocitosis mediada por receptor (128).

Tal como ocurre en otras enfermedades infecciosas, se espera que el conocimiento de las bases moleculares de la adherencia y la infectividad de las clamidias resulten trascendentales para entender la patogénesis y virulencia y, con base en ello, poder desarrollar estrategias eficaces de prevención, tanto inmunológicas como biológicas (128).

Adhesinas

La adherencia clamidiana puede involucrar a diferentes componentes de la envoltura de los CE (75). A continuación se describen los mecanismos asociados a cada uno de ellos en el proceso de adhesión.

MOMP. La MOMP es una proteína glicosilada de 40-kDa, equivalente al 60 % de las proteínas de membrana externa del CE. La forma activa, funciona como las porinas bacterianas pero, a diferencia de éstas, contiene un gran número de residuos de cisteína que le confieren la capacidad de formar enlaces

disulfuro intramoleculares o intermoleculares (o ambos), lo que contribuye a la rigidez del CE (42).

Esta molécula (codificada por el gen *omp1*), presenta cuatro dominios de secuencia variable, VS1 al VS4, que se encuentran expuestos en la superficie y están distribuidos entre cinco regiones o secuencias altamente conservadas, de la CS1 a la CS5, con ubicación transmembranal. Los dominios variables 1, 2 y 4 contienen varios epitopos antigénicos que generan respuesta por parte de las células Th y la consecuente aparición de anticuerpos neutralizantes con especificidad de serotipo, subgrupo y subespecie (42, 80, 81, 104).

Se ha propuesto que la MOMP participa en la adhesión de *Chlamydia* a las células hospederas a través de tres mecanismos independientes –y tal vez cooperativos– que involucran tanto factores específicos como no específicos: 1) interacciones electrostáticas de los residuos cargados negativamente en los VS2 y 4; 2) interacciones hidrofóbicas del inaccesible e invariable nonapéptido localizado en la región central del VS4 (105); y 3) interacción tipo ligando-receptor entre ella (o su porción glicosilada) y el sulfato de heparán presente en la superficie de las células epiteliales (106, 110).

Además, Su y cols encontraron que esta proteína no es internalizada después de la unión, por lo que su función primaria es sólo la de mediar un paso irreversible en la adhesión para promover otras interacciones que puedan propiciar el evento de internalización (106).

Por otro lado, las variaciones antigénicas de la MOMP, las cuales ocurren con relativa frecuencia (por mutaciones puntuales o a través de eventos recombinantes) representan un factor de evasión de la respuesta inmune, ya que el cambio de un sólo aminoácido altera la secuencia de los epitopos e interfiere su reconocimiento por parte de los anticuerpos neutralizantes (80, 103). De hecho, ello contribuye a la aparición de las infecciones recurrentes del tracto genital, aún a pesar de la frecuente respuesta de los linfocitos Th1 y T CD8⁺ (80).

Citoadhesina clamidiana (CCA). Esta es una molécula termolábil, componente menor de la membrana externa de los CE y cuyo peso molecular es de 38-kDa; se une a las células hospederas a través de interacciones proteína-proteína, lo que indica la presencia de un receptor específico, al cual aún no se ha logrado identificar (49, 50, 75, 105).

La CCA (por *chlamydial cytheadhesin*) es inmunogénica y la presencia de anticuerpos anti-CCA en el suero de los individuos infectados comprueba su expresión *in vivo* durante la infección (50).

Glucosaminoglucano. Aparentemente, un mecanismo trimolecular que involucra receptores para glucosaminoglucanos (GAG) también contribuye a la adherencia clamidiana. Si bien dichas moléculas se encuentran presentes tanto en la célula hospedera como en la bacteria (75, 128), todo indica que su origen es eucariótico, ya que *C. trachomatis* es incapaz de sintetizarlos (112).

Aunque la identidad del receptor no se conoce con certeza, al parecer podría tratarse de las lectinas o las proteínas que se unen a la heparina o al sulfato de heparán. Dichos receptores presentes en las células hospederas, los cuales captan heparina o sulfato de heparán para su uso intracelular, mediarían la adhesión clamidiana y promoverían la endocitosis, proceso que no incluye la fusión fagosoma-lisosoma (128).

Evidentemente, otra ventaja de clamidia, al habilitar al GAG eucariótico como su adhesina, reside en aplicar el mimetismo molecular, a fin de dificultar el inicio de la respuesta inmune; además, ello bloquearía la acción de los anticuerpos dirigidos contra otros componentes de la superficie clamidiana, e inclusive, afectaría la activación de los componentes del complemento (128).

Omp2. La Omp2 (por *outer membrane protein 2*), se asocia a la pared celular de los CE, es rica en cisteína y posee la capacidad de generar una interacción selectiva, basada en su conformación nativa, con la superficie de las células HeLa (115).

Esta proteína de 60-kDa no se detecta en las etapas tempranas del ciclo de crecimiento, lo que sugiere que probablemente es degradada después de la internalización y el subsecuente desarrollo clamidiano; por otro lado, su expresión es regulada en forma tardía, aproximadamente cuando los CR se empiezan a diferenciar en CE, lo que coincide con la fase más peligrosa del proceso infeccioso (115, 124).

Invasión

Existen dos mecanismo endocíticos utilizados por *Chlamydia* para invadir las células hospederas: la fagocitosis y la pinocitosis dependiente de microfilamentos; ambos ocurren independientemente, por lo que, en alguna etapa de la adhesión, es seleccionado uno u otro (89).

Mecanismos para establecer persistencia

La capacidad de las clamidias para impedir la fusión de los lisosomas con la inclusión dentro de la cual se reproduce es crítica para su sobrevivencia intracelular y, por lo tanto, para su persistencia. De esta manera, las biovariedades que más prolongan su presencia en los fagocitos profesionales son las asociadas a las enfermedades más invasivas, crónicas y generalizadas; de hecho, es posible que monocitos y macrófagos representen vehículos bacterianos para la colonización de órganos y tejidos lejanos al sitio inicial de infección (75).

La persistencia clamidiana se ha descrito como una asociación entre *Chlamydia* y las células hospederas, dentro de las cuales el microorganismo permanece en estado viable pero el cultivo celular es negativo. Este último término se refiere a la ausencia de un crecimiento bacteriano patente (correlacionado con la reducción de la actividad metabólica clamidiana), sugiriendo la presencia de las clamidias en una forma diferente al de sus estructuras morfológicas intracelulares típicas. Es decir, se asume que el ciclo

de crecimiento se interrumpe, pero continúa cuando las condiciones son más favorables, hasta originar la infección productiva.

Los diferentes factores que influyen en la persistencia clamidiana incluyen la inhibición de la fusión fagolisosomal, la reducción de nutrientes, el uso de antibióticos y la presencia de citocinas (75).

La fusión fagolisosomal se inhibe vía proteínas termolábiles aún no definidas, situadas en la pared celular del CE, o bien, debido a ciertas características atípicas que aparecen en la inclusión intracitoplásmica (75).

En cuanto a esto último, las inclusiones clamidianas se pueden describir como vesículas aberrantes derivadas del aparato de Golgi, a partir del cual recibe lípidos derivados del hospedero. Es decir, esta estructura representa una vesícula secretoria, cuyo transporte y fusión con la membrana plasmática celular se retrasan, por lo que no es percibida por la célula como un fagosoma destinado a fusionarse con los lisosomas (75, 35).

Otra hipótesis que explica la ausencia de fusión fagolisosomal se relaciona con la retención de bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasas dentro de la vesícula; dichas bombas y la H^+ -ATPasa vacuolar están involucradas en la regulación del pH de los compartimentos endocíticos. A tal respecto, se ha observado que, una vez ingeridos los CE, el pH de los endosomas que los contienen se estabiliza en 6.6, debido a la internalización de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, lo que limita la

acidificación por la H⁺-ATPasa hasta pH menores de 6.0 (como los lisosomales), hasta que dicha enzima es removida de las vesículas (75).

Por otro lado, la reducción de algún nutriente esencial puede bloquear la multiplicación, no sólo de las bacterias sino también de las propias células hospederas. En este contexto, hospedero y parásito sobreviven en estados no multiplicativos, reversibles cuando el nutriente vuelve a estar disponible.

Al parecer, los antibióticos también ocasionan interrupciones en el ciclo de crecimiento de las clamidias, lo que provoca la aparición de formas de desarrollo anormales. Un ejemplo de ello incluye a la penicilina, la cual bloquea la conversión de los CR en CE (al inhibir la síntesis de la Omp2), originando la acumulación de los primeros (75).

Puesto que el INF- γ bloquea reversiblemente el ciclo de desarrollo de estos microorganismos (al propiciar la degradación del triptofano), también afecta el crecimiento y la división del CR; lo anterior se demuestra por la reducción de los componentes estructurales incluidos la MOMP, la Omp2 y el LPS.

Así mismo, el TNF- α ha manifestado capacidad para inducir el desarrollo de formas irregulares *in vitro*, sugiriendo que diversas citocinas liberadas por el hospedero podrían inducir el desarrollo de formas persistentes (75).

En conclusión, cuando *Chlamydia* existe en una forma aberrante –inducida por alguno de los mecanismos antes descritos–, el microorganismo es capaz de evadir la respuesta inmune, ya que permanece más tiempo dentro de las células hospederas, protegido de la neutralización mediada por anticuerpos. Las clamidias también podrían evadir la inmunidad mediada por células, si bien aún no se ha logrado obtener alguna evidencia directa de ello (75).

Regulación de la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada representa uno de los principales mecanismos asociados a la eliminación de células, tanto durante la selección inmune como en el propio desarrollo y regeneración de los tejidos. Es un proceso regulado genéticamente que tiene lugar como resultado de estímulos específicos, tanto internos como externos, y en el cual las macromoléculas se escinden y se liberan en forma ordenada, a fin de evitar que se desencadene una respuesta inflamatoria (28).

La apoptosis es controlada por varios factores, incluidas las proteínas de la familia Bcl-2, que pueden ser pro-apoptóticas (Bax, Bad y Bid) o anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) y el Fas, también llamado CD95. Por otro lado, la fase efectora de este proceso se lleva a cabo por una serie de enzimas llamadas caspasas que actúan en cascada (1).

La figura 3 muestra los modelos de apoptosis mediada por Bcl-2 y por el Fas, y la figura 4 se refiere a la activación de las caspasas.

La capacidad de algunos patógenos para inducir apoptosis es relevante en cuanto a la iniciación de la infección, a su sobrevivencia y al escape de la respuesta inmune del hospedero. La infección de las células no solo cambia su susceptibilidad a los mecanismos inductores de este evento, sino que también puede mediar la apoptosis de las células no infectadas (46).

Chlamydia es capaz de modular este proceso (induciéndolo o inhibiéndolo) a través de los siguientes mecanismos:

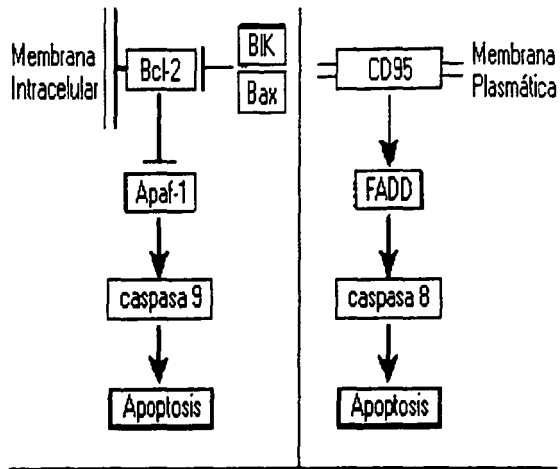
- 1) Inducción de la apoptosis de las células T, por parte de macrófagos infectados, a través de la interacción del Fas con su ligando (FasL), de la producción de TNF- α o de la secreción de especies reactivas de oxígeno. En este sentido, algunos experimentos han mostrado que los linfocitos T CD4⁺ son eliminados previa interacción Fas-FasL, mientras que los CD8⁺ suelen ser más susceptibles a la señalización mediada por el TNF- α . Evidentemente, estos eventos afectan la evolución de la respuesta inmune, lo suficiente como para no erradicar la infección (46).
- 2) Inhibición de la apoptosis durante la infección activa, manteniendo secuestrado al citocromo c en la mitocondria. La translocación del

citocromo desde el espacio intermembranal de dicho organelo representa un evento crítico en la activación de las caspasas. Específicamente, la liberación de esta molécula al citoplasma facilita su unión a la Apaf-1 y, en la presencia de ATP, escinde y activa a la procaspasa-9, la cual a su vez estimula a la caspasa-3 hasta que se concreta el proceso de desmantelamiento de la célula (28) (ver figura 4).

- 3) Resistencia al estímulo apoptótico. Este mecanismo involucra a la hsp (por *heat shock protein*) 60, la cual podría ser transportada hasta el citoplasma de la célula hospedera, en donde interacciona con moléculas celulares tales como la procaspasa-9, impidiendo su posterior activación, lo que interrumpiría el proceso (28).

- 4) Regulación de la apoptosis a nivel de proteínas. Ésta se lleva a cabo vía la formación de heterodímeros y homodímeros entre los miembros de la familia Bcl-2 (ver figura 3), los cuales provocan o bloquean la salida del citocromo c de la mitocondria. Dichas moléculas proteicas presentan regiones compartidas con humanos, nemátodos y ciertos patógenos virales y, a pesar de que en *C. trachomatis* aún no se han encontrado proteínas homólogas, se piensa que algunas interactúan con la membrana mitocondrial externa y bloquean la translocación del citocromo después de la inducción apoptótica (28).

Figura 3. Regulación Apoptosis

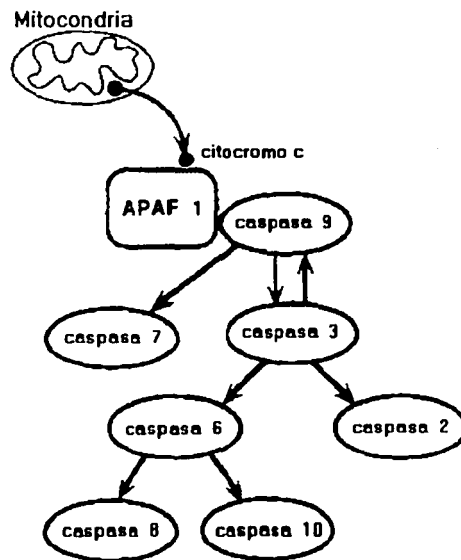


CD95: Fas
 FADD: dominio de la muerte asociado a Fas

Adaptado de Adams, J. Cory, S. (1998).

Science 281: 1322-1326.

Figura 4. Activación de las caspasas



Adaptado de Slee *et al.* (1999).

Journal of Cell Biology 144: 281-29

tb

Los mecanismos antes descritos proponen nuevas formas para evadir la respuesta inmune por parte de *Chlamydia*, mismas que contribuirían a la persistencia del microorganismo hasta 5 años en el tracto genital, con una continua expresión antigénica responsable de la inflamación y la fibrosis (28, 46).

Desarrollo de eventuales vacunas

El desarrollo de vacunas –cuya finalidad es inducir inmunidad en la mucosa genital a largo plazo- se ha visto obstaculizado debido, en parte, al poco entendimiento de la respuesta inmune del organismo humano en contra *C. trachomatis* (43, 80)

En general, la eficacia de una vacuna es influenciada por la inmunogenicidad del antígeno y el estado inmune del hospedero. En particular, la respuesta inmune de las mucosas puede ser afectada por factores adicionales que incluyen el adyuvante, el vehículo o la ruta de administración (43).

En este sentido, el desarrollo de vacunas seguras contra *Chlamydia*, usando estrategias convencionales de inmunización, no ha tenido el éxito esperado debido a que la efectividad es relativamente limitada por la poca inmunogenicidad del antígeno que las conforma; por otro lado, el uso de microorganismos completos inactivados no es recomendable debido a los componentes inmunopatogénicos que poseen (43).

De esta forma, los objetivos en el diseño de una vacuna protectora anti-clamidia incluyen: 1) la identificación de el (los) antígeno(s) apropiado(s); 2) el desarrollo de vehículos de administración efectivos; 3) el uso de adyuvantes (que optimizan la inducción y reclutamiento de linfocitos Th1 clamidia-específicos en la mucosa genital); y 4) el establecimiento de la ruta de inmunización adecuada (43, 44).

En *C. trachomatis* existen ocho antígenos (cuyo peso molecular oscila entre 10 a 75-kDa) como principales candidatos para ser componentes de una vacuna; de ellos la MOMP es el más promisorio, ya que es altamente inmunogénica e inmunoaccesible, provoca respuestas de células T y de anticuerpos neutralizantes, es la proteína de superficie dominante y se expresa en todas las fases del ciclo de crecimiento; sin embargo, futuras investigaciones determinarán la eficacia y seguridad para utilizarla en humanos (43).

Cabe mencionar que en años recientes se ha estudiado usar como adyuvantes a CD autólogas "alimentadas" ex vivo con microorganismos. La razón para emplearlas con este fin es que son potentes inductoras de la respuesta Th1 específica, la cual proporciona inmunidad protectora en contra del reto con bacterias vivas en el tracto genital de ratones. No obstante, hay que tener presente lo impráctico de usar este método como inmunoterapia para la prevención en humanos (79, 107).

Una vacuna que no se ha estudiado es aquella que tiene por antígeno a microorganismos vivos atenuados debido, en parte, a que no se han desarrollado sistemas genéticos para las clamidias que permitan la generación de cepas atenuadas por mutación de factores de virulencia o de componentes inmunopatogénicos (108).

Ciertamente, este tipo de vacuna puede tener ventajas importantes sobre los inmunógenos basados en el DNA o en subunidades recombinantes, ya que esta bacteria presenta un estilo de vida intracelular estricto, complejidad biológica y antigénica y afinidad por la mucosa genital, sitio que requiere la inducción de una respuesta inmune local (108).

iv. Diagnóstico de laboratorio de las clamidiasis genitales

En virtud de que las infecciones clamidiales pueden causar enfermedades clínicas severas, especialmente en mujeres, el diagnóstico y tratamiento apropiados representan todo un desafío para los equipos de salud (13). El método tradicional de diagnóstico de las infecciones ocasionadas por *C. trachomatis* consiste en el cultivo de las muestras urogenitales; sin embargo, en la década pasada, el desarrollo de nuevas técnicas se incrementó notablemente, ante la necesidad de detectar las numerosas infecciones asintomáticas y de establecer programas de exploración y vigilancia epidemiológica (9, 109).

Las guías para la práctica clínica del CDC (*CDC Clinical Practice Guidelines*) definen el diagnóstico de *C. trachomatis* en tres categorías:

1. Diagnóstico sugerente. Éste se basa en la presencia de los síntomas clínicos de la infección y en la exclusión de otras causas de la leucorrea, de la exposición sexual a alguna persona infectada con *C. trachomatis* o de diagnósticos recientes de uretritis no gonocócica, cervicitis mucopurulenta o EIP (9)

2. Diagnóstico presuntivo. Requiere de determinar la presencia o ausencia de los síntomas clínicos y de efectuar la detección de *C. trachomatis* mediante pruebas no culturales (9).

3. Diagnóstico definitivo. Se fundamenta en el aislamiento de *C. trachomatis* mediante el cultivo del espécimen cervical, rectal o uretral, así como en la plena identificación de las características inclusiones intracelulares o del microorganismo, en este último caso, mediante uno de los siguientes métodos y la confirmación por medio de un método cultural o no cultural (9, 45):
 - a) DFA (anticuerpo fluorescente directo).
 - b) EIA (análisis inmunoenzimático).
 - c) Hibridación con sondas marcadas o PCR.

Recolección y transporte de las muestras

En las mujeres, los sitios adecuados para obtener los especímenes, ya sea con hisopo o con cepillo citológico, son el endocérvix o la uretra. Los hisopos de elección para este fin son los de dacrón, algodón, rayón o alginato de calcio, pero es indispensable que el soporte no sea de madera, ya que ésta resulta tóxica para las clamidias (9).

Por lo que se refiere a los varones, la uretra anterior es la región más recomendable para recolectar la muestra; en tal caso, el espécimen se obtiene al menos 1 h después de que el individuo ha orinado, debido a que la orina puede eliminar las células columnares infectadas, reduciendo la sensibilidad de la mayoría de los métodos de diagnóstico.

Cabe mencionar que el aislamiento de las clamidias se optimiza cuando las muestras se refrigeran inmediatamente después de ser recolectadas, siempre y cuando sean procesadas dentro de las próximas 48 h; de lo contrario, aquéllas se pueden congelar a -70°C , pero la viabilidad de los microorganismos disminuye en un 20 % (9).

Si las muestras se van a procesar en un lugar diferente de donde se recolectaron se deben transportar en los medios 2-sacarosa fosfato (2SP), sacarosa-glutamato fosfato, M4 o FlexTrans, de preferencia adicionados con

antibióticos tales como la gentamicina, vancomicina, anfotericina B o nistatina, a fin de prevenir el crecimiento de bacterias y hongos.

En la realización de métodos que no implican el cultivo del agente causal, la recolección y el transporte de las muestras deben efectuarse como lo indique el instructivo de manufactura; empero, aquellos generalmente no difieren de lo descrito para el cultivo (9).

Es importante mencionar que, a diferencia de los EIAs y las sondas de DNA, los métodos de amplificación del ácido nucleico (PCR y LCR) son muy sensibles y específicos para detectar a la bacteria en muestras urinarias provenientes de mujeres o varones; ello se debe a que las copias del DNA clamidiano permanecen sin cambios en la orina que lava las superficies mucosas (9, 66).

Ciertamente, la facilidad con la que se obtiene una muestra de orina ayuda a que las personas asintomáticas acepten someterse al análisis correspondiente, e inclusive, apoya a la economía de los programas de exploración poblacional; sin embargo, algunas llegan a contener sustancias que originan la obtención de resultados falsos negativos: la LCR es inhibida por los nitritos y la PCR es afectada por la hormona gonadotropina coriónica y diversos cristales (especialmente los que incluyen cationes divalentes tales como Mg^{++}) (66, 72).

En tal contexto, cabe subrayar que la mayoría de las sustancias inhibitorias puede eliminarse, llevando a cabo alguna de las siguientes acciones: 1) extrayéndolas con fenol-cloroformo; 2) almacenando las muestras toda la noche a 4°C o a -70°C; 3) realizando lo mencionado en el punto anterior y, posteriormente, diluyendo las muestras 1:10 (66).

Otros especímenes no invasivos que se pueden someter a los métodos de amplificación del ácido nucleico son los que las mismas pacientes recolectan a partir de vagina o vulva (9).

Métodos culturales

Actualmente, el CDC recomienda el cultivo celular para llevar a cabo la detección de *C. trachomatis* en los especímenes uretrales provenientes de mujeres y varones asintomáticos y, adicionalmente, en las muestras rectales de cualquier paciente, en las nasofaríngeas de infantes, en las vaginales de niñas prepúberes y en los casos en que se sospecha de abuso sexual. Ello se debe a que dicho método ofrece algunas ventajas sobre los demás: sólo detecta CE's viables, las posibilidades de contaminación son cada vez más escasas y su especificidad alcanza el 100% (9).

Evidentemente, algunas características limitan el uso del cultivo: las sensibilidades de 70 al 85% únicamente se logran con personal

experimentado, su costo es alto y el tiempo en el que se obtienen los resultados se extiende hasta los 3 a 7 días.

Antes de inocular las líneas celulares McCoy, HeLa 229 o BGMK, es necesario sonicar las muestras para lisis a las células hospederas y a las inclusiones y que, de esa manera, se liberen CEs. Después de transcurrido el tiempo de incubación (48 a 72 h), se procede a la búsqueda de las inclusiones intracitoplasmáticas, utilizando anticuerpos anti-MOMP o anti-LPS marcados con fluoresceína.

Es preciso que la identificación de las inclusiones no se realice mediante otros métodos que detectan antígenos (DFA y EIA), ya que éstos carecen de especificidad para tal fin; así mismo, las tinciones de Gram, Giemsa o yodo son poco sensibles (9).

Métodos no culturales

Las ventajas de estos métodos incluyen su accesibilidad para los analistas que carecen de experiencia o de posibilidades de practicar el cultivo; además, se reducen los requerimientos para el transporte de la muestra, se pueden estandarizar, son tan sensibles como los métodos de tinción directa y permiten efectuar un pronto diagnóstico (9, 48).

Por obvio e independientemente de la prueba seleccionada, la interpretación de los resultados requiere de todo el cuidado y atención del analista, particularmente cuando el diagnóstico se asocia a serias implicaciones médicas, legales y sociales (9).

Métodos de detección del antígeno. Los principales métodos diagnósticos que detectan antígenos clamidiales incluyen al DFA y al EIA (9).

El primero tiene como ventajas la de que las muestras se tiñen directamente con anticuerpos específicos anti-clamidia (9, 45), se lleva a cabo en aproximadamente 30 minutos, su sensibilidad es de 80 a 90% con el uso de anticuerpos monoclonales anti-MOMP, y la especificidad fluctúa entre 98 y 99% con respecto al cultivo. No obstante, la evaluación microscópica de cada espécimen es laboriosa y requiere de personal altamente especializado, lo que limita su uso a un número pequeño de muestras (9).

Esta técnica es especialmente útil para detectar a *C. trachomatis* en frotis endocervicales, en donde el resultado se considera positivo cuando se encuentran al menos 10 CEs; además, es aplicable para las muestras provenientes de la conjuntiva, uretra, recto y nasofaringe de infantes (9).

Por su parte, el EIA se basa en la detección inmunoquímica del LPS extraído de los CEs presentes en la muestra; dicha molécula es más abundante y

soluble que la MOMP y, en cuanto a la metodología, los resultados se obtienen en 3 a 4 h, aunque se trate de técnicas manuales (9, 45).

En los EIA directos, los anticuerpos marcados con enzimas se unen al LPS de la muestra; a diferencia de ello, en los indirectos, se emplea un anticuerpo primario anti-LPS (IgG murina) como reactivo detector y, posteriormente, se agrega un anticuerpo secundario anti-IgG murina marcado con enzima (anticuerpo revelador) (9).

Esta técnica se puede automatizar y, por lo tanto, es útil para grandes cantidades de muestras; sin embargo, también exige un entrenamiento y equipamiento mínimos, con los cuales proporciona resultados confiables (48).

Por otro lado, su principal desventaja consiste en que los anticuerpos anti-LPS pueden llegar a presentar reacción cruzada con el de algunas bacterias Gram negativas. Esta limitante obliga a realizar paralelamente ensayos de bloqueo, en los cuales la prueba se repite en presencia de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el LPS clamidiano. Dichos anticuerpos bloquean o inhiben competitivamente el epitopo "blanco" del anticuerpo detector, lo que se traduce en una reducción de la coloración correspondiente (9).

Los EIA son menos sensibles que el cultivo (alcanzan cifras de 80 a 95%), dependiendo de cada uno. Así mismo, su especificidad varía dependiendo de

si se emplean o no los anticuerpos bloqueadores: los valores suelen ser de 97 % cuando aquéllos no se emplean y hasta mayores de 99 % si se les incorpora a la técnica (9, 45).

Métodos de detección del ácido nucleico. Entre las técnicas moleculares más utilizadas para llevar a cabo el diagnóstico de las clamidiasis figuran los basados en el empleo de sondas de hibridación del DNA y los de amplificación del ácido nucleico. En las primeras se aplican sondas quimioluminiscentes, que hibridizan alguna secuencia específica en el RNA ribosomal (rRNA) 16S clamidiano. Una vez que se forma el híbrido DNA-rRNA, éste es absorbido sobre una cama magnética y la reacción se detecta y cuantifica en un luminómetro (9).

En teoría, esta clase de metodologías es más sensible que las de detección del antígeno, ya que las clamidias en división poseen más de 10^4 copias del rRNA 16S; además, aunque su especificidad es relativamente alta (98 a 99%), es conveniente realizar ensayos de confirmación con sondas de competencia dirigidas hacia el mismo "blanco" que la sonda diagnóstica (9, 45, 48).

Por lo que respecta a las técnicas de amplificación del ácido nucleico, éstas son muy sensibles, ya que basta que la muestra contenga una sola molécula del segmento "blanco" para detectar la participación del agente causal y se pueden realizar en frotis de garganta, muestras del endocérvix, uretra y urinarias, esputo, fluido broncoalveolar y secreciones oculares (9, 65, 92).

El método más ampliamente conocido de amplificación es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la cual emplea dos "primers" de oligonucleótidos sintéticos con secuencias que son complementarias a un segmento específico de DNA presente en el microorganismo "blanco" que puede ser género, especie, grupo o cepa específica, dependiendo del "primer" utilizado (9).

En este sentido, las PCR desarrolladas para detectar a *C. trachomatis* tienen como "blanco" algún segmento del plásmido presente en la bacteria, el cual se llega a encontrar a razón de 7 a 10 copias por molécula (9).

Otro método de amplificación del ácido nucleico utilizado es el de LCR (reacción en cadena de la ligasa), en el cual cuatro sondas de oligonucleótidos sintéticas (dos por hebra de DNA) se alinean en sitios específicos del plásmido. Cada par de sondas se hibridizan cerca la una de la otra sobre el templado con sólo una abertura de 1 ó 2 nucleótidos entre ellas. Una vez que esto ocurre la abertura es llenada por la DNA polimerasa y cerrada por la enzima ligasa. Dicho proceso de dos pasos (llenar y cerrar), en teoría, la hace más específica que la PCR.

Una limitación importante de ambas técnicas es que el diagnóstico depende de la posibilidad de detectar segmentos específicos de DNA y no microorganismos viables o intactos; por ello, los resultados pueden estar sujetos a discrepancias con los del cultivo cuando se utilizan para comprobar la eficacia del tratamiento. En este sentido, se ha descrito que la "ventana"

para el período cultivo negativo-PCR positivo parece durar tres semanas o más después de una terapia con doxiciclina; transcurrido ese lapso, el cultivo como la PCR reditúan resultados negativos (9).

Pruebas serológicas

Aunque las pruebas serológicas no pueden reemplazar a los métodos que detectan de forma directa a *C. trachomatis*, son útiles para el diagnóstico de los pacientes que padecen una enfermedad crónica -en quienes la bacteria no se detecta localmente y un resultado positivo podría ser la única indicación de la infección- y para predecir si una infección es activa (que se demuestra con un incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos) (4,9).

Las pruebas serológicas que se han desarrollado para la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* son las de fijación del complemento (FC), microinmunofluorescencia (MIF) y el ELISA (9, 48).

La prueba de FC detecta anticuerpos fijadores de complemento que reconocen al LPS, pero es de escaso valor en el diagnóstico de las infecciones genitales ya que carece de sensibilidad (4, 48).

Por su parte, el diagnóstico serológico a través del MIF incluye: 1) la demostración de seroconversión, 2) aumento de 4 veces en el título para un

serotipo específico o 3) la presencia de anticuerpos IgM (indicativos de infección aguda) (9, 48).

La MIF es la más sensible de las pruebas serológicas razón por la cual se sigue considerando como el estándar de oro en este rubro. Sin embargo, es laboriosa, los antígenos (CEs fijados con formalina) son costosos, su disponibilidad es limitada y se han reportado reacciones cruzadas entre las especies (4, 9).

En cuanto a las pruebas inmunoabsorbentes ligadas a enzima (ELISA), existen aquellas que utilizan antígenos recombinantes de *Chlamydia* (LPS de los CE o CR), pero también se dispone de antígenos específicos de *C. trachomatis* como son la hsp 70, hsp 60, hsp 10 y un polipéptido (pgp3) codificado por el plásmido (4, 9).

Se recomienda usar esta técnica solo en las serovigilancias de las poblaciones de alto riesgo (9), siempre y cuando se tome en cuenta que está sujeta a una interpretación subjetiva y no es recomendable para manejar un gran número de muestras (4).

Nuevos métodos de diagnóstico

La tecnología utilizada para el diagnóstico de las ETS clamidianas sigue refinándose con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad y ofrecer así

un diagnóstico rápido y definitivo. Entre las pruebas que se ha desarrollado y aún se encuentran en fase de experimentación están la amplificación mediada por transcripción o TMA (por *transcription-mediated amplification*), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico o NASBA (por *nucleic acid sequence-based amplification*) y la SDA (por *strand displacement amplification*) (9).

No obstante, se tiene que llevar acabo muchos estudios para que estas formas de diagnóstico puedan reemplazar al cultivo (9).

III. *Neisseria gonorrhoeae* y LA BLENORRAGIA

La gonorrea, ocasionada por *Neisseria gonorrhoeae*, constituye una de las principales y más antiguas enfermedades de transmisión sexual que afectan al humano. Sin embargo, su elevada incidencia, aún mayor en los países en vías de desarrollo, hace que este padecimiento continúe representando un grave problema de salud mundial.

La prevalencia de esta enfermedad en la población se debe en buena parte a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos que se utilizan comúnmente en el tratamiento, así como a las personas asintomáticas quienes, al no solicitar atención médica, fungen como reservorio del microorganismo y, por ende, provocan su diseminación.

Todo ello conduce a que las autoridades de salud lleven a cabo una permanente vigilancia epidemiológica y establezcan diversos programas de prevención y control.

Por otro lado, los investigadores siguen perfeccionando y desarrollado métodos de diagnóstico que ofrezcan resultados más exactos y confiables en poco tiempo, con el fin de que se administre el tratamiento de forma oportuna

y sin contratiempos, e inclusive, continúan buscando una vacuna eficaz que funcione como método de prevención ideal.

i. Características microbiológicas del género *Neisseria*

Especies principales

La familia *Neisseriaceae* consiste de los géneros *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Kingella* y *Moraxella*, el último de los cuales abarca a los subgéneros *Moraxella* (bacilos) y *Branhamella* (cocos). No obstante, con base en los resultados derivados de estudios de secuenciación del RNA ribosomal (RNAr) y de hibridación del DNA, se ha propuesto que las especies de *Neisseria*, *Kingella* y *Eikenella* sean agrupadas en la familia *Neisseriaceae*, en la subclase β de las *Proteobacterias*, y que los géneros *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Psychrobacter* se reubiquen en la familia *Moraxellaceae*, en la subclase γ de las *Proteobacterias* (37). Cabe subrayar que esta clasificación aún está en desarrollo y no es oficial, por lo que en este trabajo se hará alusión a la clasificación vigente.

El género de *Neisseria* incluye a las especies *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. flavescens* y *N. cinera*, cuyo único reservorio es aparentemente el humano. Las dos primeras son patógenas y ocasionan, respectivamente, gonorrea y meningitis séptica epidémica, encontrándoseles frecuentemente dentro de los leucocitos

polimorfonucleares o acompañados por ellas. Las especies restantes son miembros regulares de la flora habitual del aparato respiratorio y pocas veces llegan a ocasionar afecciones (45, 48).

Por lo que respecta a *N. gonorrhoeae*, especie a la cual también se le conoce como gonococo, se sabe que existen más de 70 cepas distintas, diferenciables mediante auxotipificación, serotipificación o pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (100).

Micro y macromorfología

Las neisserias típicas corresponden a diplococos Gram negativos, inmóviles y aerobios o facultativos, no capsulados y de 0.6 a 1.0 μm de diámetro (48, 59). Las células individuales presentan forma de riñón y cuando se encuentran en pares evidencian sus lados adyacentes aplanados (45).

La envoltura celular gonocócica está conformada por tres elementos principales: la membrana citoplasmática, una capa rígida de peptidoglicanos y la membrana externa, la cual contiene lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas importantes desde el punto de vista inmunológico (48).

Las neisserias crecen óptimamente en condiciones aerobias, si bien algunas cepas logran desarrollar en ambientes anaerobios; en cuanto a *N. gonorrhoeae*, se multiplica mejor en medios que contienen sustancias

orgánicas complejas tales como sangre calentada, hemina, proteínas animales y atmósfera de 5 a 10 % de CO₂ (45).

Por otro lado, su crecimiento puede ser inhibido por algunos constituyentes del medio; por ejemplo, los ácidos grasos¹, ciertas sales o pHs menores de 5.8; además, son muy susceptibles a la desecación, luz solar, calor húmedo y varios desinfectantes, y frecuentemente producen enzimas autolíticas que originan tumefacción rápida y lisis de las colonias, sobre todo a 25 °C y/o a pH alcalino (45, 48, 75)

Los principales medios selectivos empleados para el aislamiento de neisserias patógenas son el Thayer-Martin modificado (MTM) y el Martin-Lewis (ML), los cuales permiten una mejor diferenciación y su reconocimiento en las placas en las que llegan a desarrollar algunos miembros de la flora habitual (48).

El medio Thayer-Martin se compone de un agar chocolate suplementado con factores de enriquecimiento necesarios para el aislamiento de microorganismos exigentes; en tal sentido, destaca el polienriquecimiento IsoVitalex o Supplement B. Además, contiene el complejo antimicrobiano VCN, constituido por vancomicina (3 µg/mL), colistina (7.5 µg/mL) y nistatina (12.5 µg/mL), destinado a inhibir bacterias Gram positivas, a la flora entérica Gram negativa y a diversas levaduras, respectivamente (48, 56).

¹ Para neutralizar el efecto tóxico de los ácidos grasos es preciso agregar almidón, colesterol o albúmina.

El medio Thayer-Martin modificado incluye 5 µg/mL de trimetoprim (ajuste realizado por el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas en el CDC), compuesto similar a las sulfonamidas que inhibe a ciertas cepas de *Proteus* resistentes a los antibióticos antes mencionados (100).

En cuanto a otro medio selectivo, conocido como Martin-Lewis, éste es semejante al MTM excepto que su concentración de vancomicina es de 4 µg/mL y la nistatina es reemplazada por anisomicina (20 µg/mL) como agente antimicótico. En la década de los 70 se introdujo el agar New York City (NYC), también selectivo, constituido por agar base peptona-almidón, plasma citratado de caballo y, para incrementar la recuperación de las cepas exigentes de *N. gonorrhoeae*, un dializado de levadura y dextrosa; sus antibióticos son: vancomicina (2 µg/mL), colistina (7.5 µg/mL), lactato de trimetropina (5 µg/mL) y anfotericina B (1.2 µg/mL), como agente antimicótico (56).

Cabe señalar que, recientemente, se ha introducido un nuevo medio: InTray GC (BioMed Diagnostics, San José, California), el cual consiste de una bandeja rectangular con agar chocolate, antibióticos y un sistema generador de CO₂. Dicho medio ha mostrado ser equivalente al MTM aún después de su almacenamiento por un año a temperatura ambiente; por tal motivo, su empleo es recomendable para cultivar a *N. gonorrhoeae*, a partir de muestras

endocervicales, sobre todo en lugares donde el almacenamiento y la disponibilidad del MTM resultan problemáticos (7).

Es importante hacer notar que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* son susceptibles a vancomicina, especialmente las AHU (auxótrofas a arginina, hipoxantina y uracilo), razón por la cual resulta conveniente inocular los especímenes urogenitales, tanto en medios selectivos como en algunos no selectivos (agar chocolate, por ejemplo), a fin de asegurar el desarrollo del agente causal. Sin embargo, las muestras orofaríngeas y rectales sólo deben inocularse en medios selectivos, porque la flora de estos sitios, muy numerosa y de rápido crecimiento, enmascararía la presencia de los gonococos (56, 74).

En cuanto a la morfología colonial de *N. gonorrhoeae*, suelen predominar las siguientes características, previa incubación durante 72 h: colonias convexas, brillantes, prominentes, mucoides, transparentes u opacas, no pigmentadas, no hemolíticas, de color blanco grisáceo y de 1 a 5 mm de diámetro. *N. flavescens*, *N. subflava* y *N. lactamica* muestran pigmentación amarilla o rojiza. Por su parte, *N. sicca* produce colonias opacas y rugosas (56).

Identificación

Debido a que la morfología y la afinidad tintoreal de *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* y algunas especies de *Acinetobacter* son similares en las preparaciones teñidas al Gram, en diversas ocasiones la microscopía no

representa un criterio muy confiable para llevar a cabo la diferenciación del género *Neisseria* (56).

De hecho, los parámetros conjuntos utilizados para llevar a cabo la identificación de este género se resumen en la tabla 8: todas las especies de *Neisseria* y *Moraxella* dan positivas las pruebas de catalasa y citocromo oxidasa, característica que ayuda a diferenciarlas de bacterias similares en morfología; *Acinetobacter* es oxidasa negativa, *Kingella* se diferencia de *Neisseria* microscópicamente y por ser catalasa negativa y, finalmente, la utilización de glucosa es útil para distinguir entre *Moraxella* y *Neisseria* (48, 56).

Tabla 8. Diferenciación entre géneros de la familia *Neisseriaceae*.

Género	Morfología	Ox	Cat	Glu
<i>Neisseria</i>	Cocos G(-)	+	+	+
<i>Moraxella</i>				
Subgénero <i>Moraxella</i>	Bacilos G(-)	+	+	-
Subgénero <i>Branhamella</i>	Cocos G(-)	+	+	-
<i>Acinetobacter</i>	Bacilos G(-)	-	+	±
<i>Kingella</i>	Bacilos G(-)	+	-	+

CLAVES: G(-) = Gram negativo; Ox = oxidasa; Cat = catalasa; Glu = glucosa.

Una vez identificado el género, es necesario llevar a cabo la identificación de la especie, ya que otras neisserias también se pueden encontrar en la región urogenital, sugiriendo de forma errónea la presencia de *N. gonorrhoeae*. Para tal fin se cuenta con la prueba de utilización de carbohidratos, el método de

electroforesis de isoenzimas, diversos procedimientos inmunológicos – incluidas algunas pruebas con anticuerpos fluorescentes (FA) y coagulación- y ciertas técnicas de sustrato enzimático cromogénico (48, 56).

El medio basal empleado para llevar a cabo la prueba de utilización de carbohidratos es el cistina-tripticase-agar (CTA); éste contiene cistina, peptonas, rojo de fenol y 0.25 % de agar, está suplementado con alguno de los hidratos de carbono implicados en la diferenciación. Los patrones de oxidación, observables por el cambio de color del indicador de rojo a amarillo derivado de la producción de ácidos orgánicos, se muestran en la tabla 9 (45, 48, 56).

Evidentemente, cuando las pruebas de oxidación de carbohidratos llegan a complicarse por alguna de las características del crecimiento microbiano², suele utilizarse alguna de las otras pruebas antes mencionadas, de las cuales a continuación se incluyen algunos comentarios:

² Por ejemplo, cuando la producción de ácido se enmascara con los productos alcalinos provenientes de la degradación de las peptonas.

Tabla 9. Patrones de oxidación de carbohidratos de las principales especies de *Neisseria*.

Especie	Crecimiento en MTM; ML o NYC	Acido a partir de:				Ox	PIGM
		Gluc	Mal	Lac	Sac/Fruc		
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	-	-	-	+	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	-	-	+	-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>N. sicca</i>	-	+	+	-	+	+	±
<i>N. subflava</i>	-	+	+	-	±	+	+
<i>N. mucosa</i>	-	+	+	-	+	+	±
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>N. cinera</i>	±	-	-	-	-	+	-

CLAVES: MTM = Thayer-Martin modificado; ML = Martin-Lewis; NYC = New York City; Gluc = glucosa; Mal = maltosa; Lac = lactosa; Sac = sacarosa; Fruc = fructosa; Ox= oxidasas; PIGM = pigmento

- **Electroforesis de isoenzimas.** En esta prueba se analiza la hexoquinasa de las *Neisserias*, ya que gonococos y meningococos poseen una isoenzima específica de especie que, por lo tanto, permite efectuar la diferenciación correspondiente (48).
- **Procedimientos inmunológicos.** Éstos se utilizan para realizar la confirmación de los cultivos de *N. gonorrhoeae*. La prueba de FA es rápida y confiable; de hecho, ya se distribuyen comercialmente los anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína. Por su parte, las reacciones de coaglutinación emplean como soporte sólido células de *Staphylococcus aureus* ricas en proteína A recubiertas con anticuerpos antigonocócicos; de esta manera, se producen agregados fácilmente visibles como resultado de mezclar dicho reactivo con su antígeno homólogo (56).
- **Técnicas de sustrato enzimático cromogénico.** Éstas usan reactivos bioquímicos específicos para detectar actividades enzimáticas de las bacterias y la hidrólisis de estos sustratos se traduce en productos finales con colores específicos, los cuales se pueden detectar directamente o después de agregar algún revelador. Las actividades enzimáticas incluyen a la β -galactosidasa, γ -glutamylaminopeptidasa y prolilaminopeptidasa. La presencia de las dos últimas identifica a *N. gonorrhoeae* (56).

ii. Características de la gonorrea

Patología

Los gonococos son patógenos exclusivos del ser humano, por lo que no infectan de forma espontánea a los animales, e inclusive, no viven libremente en el medio ambiente (93).

El potencial patogénico de las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae* evidencia diferencias sustanciales, ya que una clona determinada puede causar cervicitis o uretritis no complicadas, enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) o la infección gonocócica diseminada (IGD)³ (75, 93).

El gonococo se une a las células epiteliales columnares del cervix, o bien, de la uretra, vía múltiples adhesinas, incluyendo a sus *pili*, a las proteínas Opa, a los lipooligosacáridos (LOS) y a sus porinas (Por); el proceso de adhesión resulta decisivo en la patogenia, ya que impide el arrastre mecánico de los microorganismos por efecto de la micción. Posteriormente, la bacteria ingresa en las células epiteliales a través de un mecanismo aún indefinido y, después de transitar intracelularmente dentro del fagosoma correspondiente, es exocitado hacia el estroma subepitelial, donde usualmente se le localiza y da origen a una severa respuesta inflamatoria, la cual conduce a la destrucción

³ Las cepas AHU se asocian a IGD y, además, a uretritis asintomática en varones.

de la mucosa uretral, a la balanitis erosiva (inflamación del prepucio y del glande) y a la cervicitis (33, 59).

La diseminación a partir del tejido "blanco" primario se realiza por dos vías: la linfática, que canaliza a las bacterias hacia la próstata, el epidídimo, las glándulas de Skene, de Bartholin y de Cowper, la piel del área genital, las trompas de falopio, el peritoneo y el espacio perihepático; y la hemática, que suele desencadenar artritis o dermatitis séptica, e inclusive, endocarditis o meningitis (59).

En el varón, la enfermedad clínica aguda se asocia a la uretritis anterior, que aparece 1 a 8 días después de la exposición (con un promedio de 3 a 4 días); la patología inicia con molestias uretrales y poliuria (eliminación excesiva de orina) pero, al ocurrir la reacción inflamatoria, aparece la disuria (dificultad para orinar) y una secreción mucoide de color blanco amarillento que en pocas horas se torna purulenta; ésta se conforma por leucocitos polimorfonucleares (PMN) que han fagocitado a los gonococos, aunque también contiene células epiteliales descamadas y líquido intersticial (59, 100).

Por obvio, cuando no se modifica el curso de la enfermedad se corre el riesgo de que el proceso inflamatorio se extienda a la uretra posterior, a la próstata, a las vesículas seminales y, finalmente, al epidídimo, lo que provoca la

infertilidad. Una minoría de casos (2 al 10 %) son asintomáticos desde su origen y el 95 % lo es 6 meses después, en ausencia de tratamiento.

Por lo que respecta a las mujeres, la infección involucra al canal endocervical, aunque la colonización de la uretra es frecuente. Los síntomas incluyen el aumento de descarga vaginal, disuria, fiebre, sangrado uterino anormal y menorragia; el cuello uterino puede tener descarga purulenta o presenta áreas de sangrado fácilmente inducible. Las infecciones asintomáticas llegan a alcanzar cifras cercanas al 90 % y entre el 20 y 50 % presenta procesos patológicos en el recto, debido al escurrimiento de las secreciones.

Evidentemente, cuando el tratamiento no inicia oportunamente, aparecen diversas complicaciones de la gonorrea, entre las cuales destacan la salpingitis (infección de las trompas de Falopio) y la EIP; ésta abarca casos de perihepatitis y/o peritonitis. La salpingitis puede cursar en forma aguda, subaguda o crónica, dependiendo de lo oportuno del diagnóstico, de la calidad del tratamiento y de la virulencia de la cepa implicada, y puede tener como consecuencia la obstrucción de las trompas, vía la cicatrización del tejido, lo que provoca la esterilidad de la paciente o los embarazos ectópicos (59, 100).

Las mujeres embarazadas con gonorrea pueden transmitir el microorganismo hacia el producto, cuando éste se expone al exudado cervical durante el nacimiento; 2 a 5 días después, ello ocasiona conjuntivitis o enfermedades

sistémicas que incluyen septicemia y artritis; otras manifestaciones menos serias incluyen rinitis, vaginitis y uretritis (20, 78).

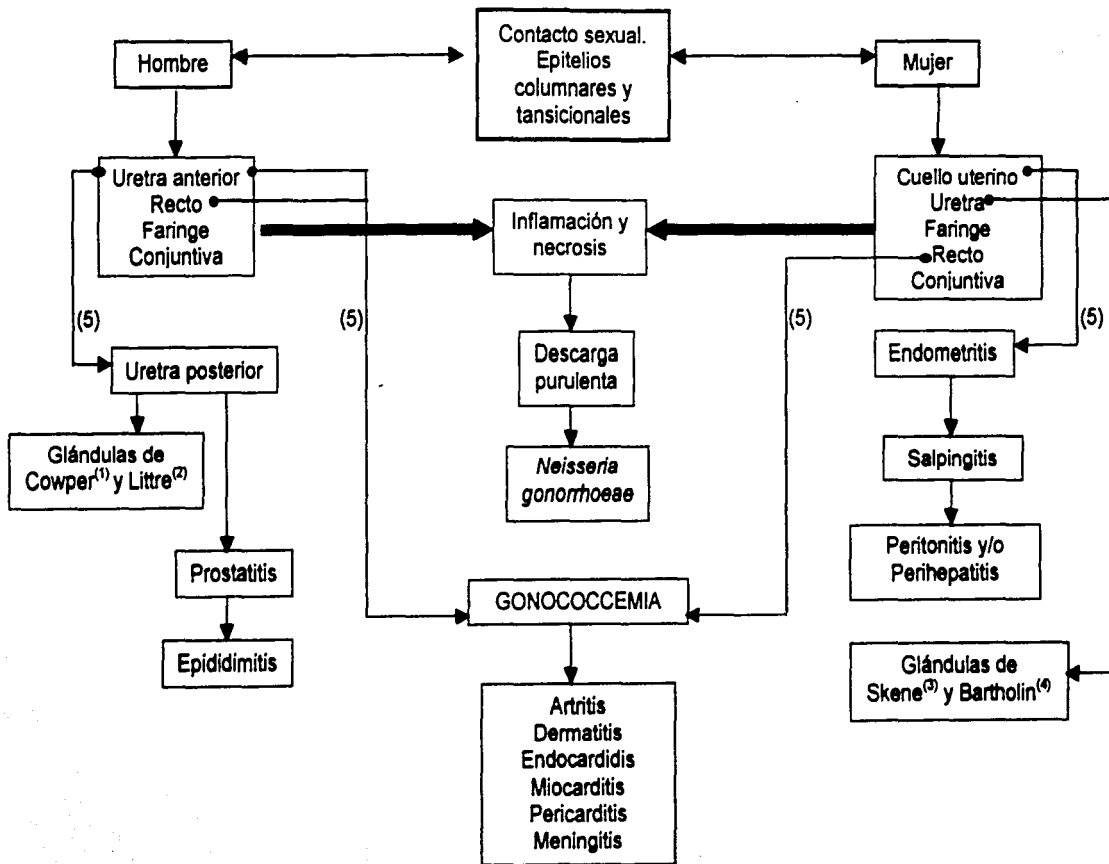
En ambos sexos, el cuadro ocasionado por gonococemia y alguna otra patología asociada se conoce como infección gonocócica diseminada o IGD; los principales cuadros adyacentes son la artritis (el más común), meningitis, endocarditis, dermatitis, miocarditis o pericarditis; la IGD afecta a entre 1 y 3 % de los pacientes, siendo las mujeres con VIH y las embarazadas las más propensas a adquirir dicha entidad clínica (59, 78).

La figura 5 muestra importantes aspectos asociados a la patogenia de la infección gonocócica en el varón y la mujer. En tal sentido, es importante destacar que:

- La vagina no es muy colonizada por el gonococo, merced a su pH ácido, que interfiere la proliferación microbiana; otro factor contrario al desarrollo gonocócico corresponde a la actividad de un relevante sistema bactericida, mediado por peroxidasa y dependiente del pH.
- En la mujer, la proctitis gonocócica tiene su origen en la contaminación a partir de la mucosa genital, o bien, en el coito rectal (este último resulta fundamental en el contagio del varón homosexual); otra posibilidad radica en la ruptura de algún absceso pélvico; el equivalente en el varón alude a los abscesos prostáticos (59).

- La inflamación de las glándulas de Cowper y Littre -en el hombre-, así como las localizadas en las de Bartholin y Skene -en la mujer-, llega a originar la obstrucción de la luz y, cuando ello se prolonga, tiene lugar la formación de abscesos.
- La inflamación de la conjuntiva produce abundante secreción purulenta; cuando además se ulceran el epitelio y la córnea, es posible que se originen las panoftalmías y la celulitis orbitaria.
- La transmisión orogenital únicamente puede afectar a las amígdalas, con o sin linfadenopatía regional (59).

Figura 5. Patogenia de la infección gonocócica.



CLAVES:

- (1) = Glándulas de Cowper: también conocidas como glándulas bulbouretrales, situadas por debajo de la próstata, secretan un moco lubricante y protector del líquido seminal (71).
- (2) = Glándulas de Littre: conocidas como glándulas uretrales, se encuentran a lo largo de toda la uretra.
- (3) = Glándulas de Skene: o glándulas parauretrales, están cerca del orificio uretral y son consideradas la contraparte femenina de la próstata
- (4) = Glándulas de Bartholin: se abren a cada lado del orificio vaginal, tienen una función humectante (71).
- (5) = Si no se administra el tratamiento adecuado.

Otro punto de interés consiste en el hecho de que las reinfecciones por *N. gonorrhoeae* son muy comunes, debido a que el microorganismo produce IgA hidrolasas y a que generalmente ocurre una pobre respuesta inmune, con escasas células de memoria, mínimos niveles de inmunidad protectora y bajos títulos de anticuerpos séricos (40, 93).

Por otra parte, la infección gonocócica también aparenta facilitar la adquisición y transmisión del VIH: la inflamación de la mucosa proporciona una mejor puerta de entrada al virus y la liberación de partículas virales en el semen es significativamente mayor en los individuos VIH positivos con gonorrea que en quienes no padecen esta última afección (8).

Epidemiología

La gonorrea afecta a 78 millones de personas anualmente (67), dato que convierte a esta afección como la segunda ETS de origen bacteriano más importante en términos de incidencia (sólo es superada por la clamidiasis genital).

En EUA, las clínicas especializadas reportan índices anuales de 327 casos de gonorrea/100,000 hombres y de 229 casos/100,000 mujeres, asegurando que el 40 % de los varones y entre el 30 a 50 % de las enfermas se encuentran coinfectados con *Chlamydia trachomatis* (19).

En Canadá, la incidencia de esta enfermedad en 1995 fue de 5,500 casos, los cuales las autoridades correspondientes estiman que su costo para el sistema canadiense de salud fluctúa alrededor de 43 millones de dólares al año (113).

Cabe mencionar que, en la década pasada, se presentaron casos de transmisión endémica en Londres, Inglaterra; Cleveland, Ohio; Seattle, Washington; Sydney, Australia y Ontario, Canadá, así como una epidemia en Grecia en 1999; además, se ha estimado que en los países del sureste de Asia ocurrirán el mayor número de casos (8, 69).

En México, la tasa de morbilidad por cada 100,000 habitantes disminuyó de 21.27 en 1987 a 13.57 en 1996; sin embargo, es preciso subrayar que, en las

ETS, las estadísticas suelen evidenciar una subestimación importante, debido en gran parte a que el médico no comunica los casos a las autoridades sanitarias (59).

La gonorrea afecta principalmente a las personas con mayor actividad sexual; actualmente, el grupo etario con mayor morbilidad es el de 15 a 20 años, aunque el padecimiento afecta a personas de cualquier edad. En general, no hay inmunidad natural, ni susceptibilidad racial y los principales factores de riesgo incluyen los bajos niveles socioeconómicos, la residencia urbana, la soltería y un historial pasado de gonorrea (59, 100).

Es importante resaltar que, en las niñas prepúberes, el pH alcalino del moco y el menor espesor de la pared vaginal se conjuntan para que el cuadro clínico característico de esta edad sea la vulvovaginitis, misma que, en la actualidad, no se presenta como resultado del empleo de toallas, termómetros y artículos de aseo contaminados; por ello, después del periodo neonatal, el abuso sexual es la causa más frecuente de gonorrea (20, 59).

Por último, es oportuno señalar que, en una pareja en la que la mujer está infectada, el riesgo de que la enfermedad se contagie es de 18 a 25 %; dicha cifra asciende hasta 73 % cuando el varón es la persona infectante. Adicionalmente, se ha observado que la práctica del sexo anal representa una vía más efectiva de transmisión que las prácticas orogenitales (59, 100).

Tratamiento

La terapéutica de la gonórrea, hasta hace algunos años sencilla y barata, en los últimos lustros se ha tomado más complicada, debido a que *N. gonorrhoeae* ha venido desarrollando una amplia resistencia a diversos agentes antimicrobianos. Entre los factores asociados a este fenómeno se cuenta la muy extendida autoprescripción de medicamentos como medida profiláctica (54, 111).

La resistencia de este microorganismo puede residir en el cromosoma o en plásmidos. La tolerancia a penicilina codificada por genes cromosómicos es resultado del efecto aditivo de mutaciones en múltiples *loci*, en tanto que, la resistencia debida a un plásmido tipo Africano de 3.2-MDa, se relaciona con la producción de β -lactamasas. Es importante mencionar que la transferencia plasmídica entre distintas cepas de *N. gonorrhoeae* se lleva a cabo por conjugación, lo que requiere la presencia de un plásmido conjugativo de 24.5-MDa en la célula donadora (8).

En cuanto a la resistencia a las tetraciclinas, ésta se encuentra mediada por plásmidos que contienen al determinante *tetM*; el plásmido conjugativo gonocócico tiene originalmente un peso de 24.5-MDa, mismo que se incrementa a 25.2-MDa al adquirir el gen *tetM*; dicho plásmido se puede movilizar por sí mismo entre las cepas gonocócicas y de éstas a otros géneros (y viceversa). De hecho, las clonas resistentes a tetraciclina son

propensas ha diseminarse más rápidamente que las productoras de penicilinas, ya que el plásmido involucrado también suele encontrarse en algunos miembros de la flora vaginal que pueden fungir como donadores de *N. gonorrhoeae* (8).

Debido a esta situación, el CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) estadounidense, ubicado en Atlanta, actualmente recomienda a las cefalosporinas o a algunas fluoroquinolonas tales como la ciprofloxacina y ofloxacina, para sustituir a la penicilina y tetraciclina como los fármacos de primera elección para el tratamiento de las gonococcias; cuando la persona es alérgica o manifiesta intolerancia o reacciones adversas a estos medicamentos, el antibiótico recomendado es la espectinomicina (8, 20).

Es importante señalar que, en los últimos años, se han reportado casos de resistencia a las fluoroquinolonas, en Estados Unidos, Inglaterra, Bangladesh, Grecia y Japón. En este caso, la resistencia es originada por mutaciones puntuales localizadas en los genes de la DNA girasa (*gyrA*) o de la topoisomerasa IV (*parC*) (8, 69, 111); por ello, se propone cada vez más insistentemente la realización de pruebas de susceptibilidad, las cuales resultan útiles, tanto con fines epidemiológicos, como para establecer el régimen terapéutico adecuado, sobre todo cuando los tratamientos empíricos no han sido exitosos (20).

Prevención

Si bien en cualquier enfermedad es más adecuado prevenir que tratar, desde el punto de vista epidemiológico la prevención de la gonorrea resulta realmente complicada, debido principalmente a las siguientes razones (59):

- La existencia de un muy amplio reservorio de portadores asintomáticos potencialmente infectantes.
- La carencia de pruebas serológicas útiles para llevar a cabo encuestas epidemiológicas confiables.
- La falta de inmunidad posterior al padecimiento.
- Se trata de una enfermedad con un muy corto período de incubación.

Antiguamente, el tratamiento epidemiológico de la gonorrea (profiláctico o abortivo) implicaba la administración de penicilina a sujetos de riesgo tales como los(as) sexoservidores(as) y el personal militar con licencias cortas; no obstante, debido a la aparición de cepas resistentes a dicho antibiótico y a que diversos estudios han demostrado que la resistencia es, en parte, consecuencia de esta clase de prácticas preventivas, dicha medida se ha ido abandonando gradualmente (59).

Consecuentemente, los únicos tratamientos preventivos que se manejan en la actualidad son los destinados a evitar la oftalmía del recién nacido y consisten en la instilación de solución acuosa de nitrato de plata al 1% (solución de

Créde), eritromicina al 0.5 % o tetraciclina al 1 %; lógicamente, esta medida se aplica a los infantes cuyas madres padecen de gonorrea (20).

iii. Factores de virulencia

El proceso de colonización de la mucosa genital por *N. gonorrhoeae* inicia en la superficie apical, en la que tienen lugar varios eventos de toda una cascada de reacciones que desembocan en la adherencia bacteriana; ésta es sucedida por el ingreso de los gonococos a la célula hospedera, los cuales sobreviven intracelularmente hasta ser depositados en la submucosa.

Dichos sucesos son modulados por la participación de una serie de factores de virulencia gonocócicos y de su respectivo receptor en la célula epitelial; la interacción entre las adhesinas y receptores induce diversas señales que fluyen desde el patógeno hasta el hospedero -y viceversa- durante las diferentes etapas antes señaladas (70).

Buena parte de las estructuras superficiales gonocócicas que interaccionan con las células hospederas experimentan dos tipos de cambios: la variación de fase, consiste en el encendido o apagado de la síntesis de algún componente antigénico, en tanto que, la variación antigénica, se refiere a la periódica modificación de los epitopos externos. Lógicamente, ambos tipos de cambios promueven que el microorganismo evada la respuesta inmune del hospedero y el resultado polimórfico también afecta otros aspectos biológicos

tales como la inmunogenicidad, hidrofobicidad, densidad de carga, aglutinación, resistencia a microbicidas, requerimientos nutricionales y especificidad en la adhesión e invasión de las células hospederas (70, 93).

Por otro lado, se ha observado que los PMNs presentes en la descarga purulenta (leucorrea) del enfermo usualmente contienen numerosos gonococos intracelulares. El análisis microscópico indica que muchos de ellos son eliminados, mientras otros permanecen intactos en el interior de las vacuolas, si bien cada vez aparecen más reportes acerca de que estas bacterias pueden escapar y reproducirse en el citosol.

Aún cuando es claro que la adherencia gonocócica a las células epiteliales es trascendental en el proceso de infección, lo cierto es que persisten algunos puntos por ser dilucidados, principalmente aquéllos que se relacionan con la penetración del microorganismo en los fagocitos no profesionales (70, 91)

Adherencia e invasión

Sin lugar a dudas, la adherencia del gonococo a los epitelios representa un primer paso crucial el cual, sin embargo, no necesariamente es sinónimo de daño tisular (31, 75).

A la fecha se han propuesto cuatro mecanismos generales que conducen a la invasión bacteriana de las células hospederas: endocitosis mediada por

receptores, endocitosis dependiente de microtúbulos, englobamiento en forma de cierre (zipper) y penetración disparando el rearrreglo del citoesqueleto. En este sentido, diversos estudios han demostrado la capacidad de *N. gonorrhoeae* para invadir células hospederas mediante los tres mecanismos citados en primer término y, más recientemente, se ha encontrado que el microorganismo puede inducir rearrreglos citoesqueléticos macropinocitarios que lo transfieren hacia el medio intracelular (31).

A continuación se describen brevemente los aspectos asociados a las principales moléculas de membrana externa de *N. gonorrhoeae*, involucradas en la adhesión e invasión.

Pili. Estos organelos permiten que *N. gonorrhoeae* se adhiera fuertemente a la superficie de las células endoteliales y epiteliales. Los gonococos producen *pili* tipo IV conformados por lo menos de dos proteínas diferentes: la subunidad principal y altamente variable PilE (pilina) y la adhesina PilC. Mientras la primera constituye la mayor parte de la fibrilla y desempeña alguna función en el reconocimiento del receptor, e inclusive, posiblemente funciona como hemaglutinina, la PilC sólo se localiza en la punta del *pilus*, es crítica para que se concrete la unión de la bacteria a las células epiteliales y al parecer está implicada en la maduración de la pilina. Además, recientemente se ha reportado que los *pili* presentan sitios únicos de glicosilación, en los cuales podrían radicar las propiedades adhesivas o la modulación de la adherencia (70, 91, 94).

Es preciso señalar que este tipo de *pili* no es meramente un conjunto de fibras pasivas involucradas en la adhesión, sino que también juega un papel muy dinámico en otras actividades tales como la agregación bacteriana, la dispersión de dichos agregados y la inducción de respuestas por parte de la célula hospedera (el flujo del calcio citosólico, exocitosis, citotoxicidad y rearrreglos del citoesqueleto y de la membrana plasmática); adicionalmente, participa en la transformación genética (mecanismo bacteriano de transferencia de genes) (70).

Aunque las bases moleculares de la adhesión se han estudiado intensamente, fue hasta recientemente que se identificó al primer receptor de los *pili* de *Neisseria*: la glicoproteína de superficie CD46, de la cual se ha logrado establecer que existen seis variedades, que está presente en casi todas las células humanas y que participa en la regulación de la cascada del complemento (47, 70).

La proteína pilE experimenta una variación antigénica originada por la recombinación genética entre el *loci pilE* y algunas regiones homólogas situadas en varios *loci* parciales, clasificados como "silenciosos" o "de almacenamiento" (*pilS*). Dicha recombinación es unidireccional y puede ocurrir de forma intragénica o con ADN exógeno proveniente de algún gonococo destruido (75).

Por su parte, la variación de fase de los *pili* gonocócicos se refleja *in vitro* en el cambio del fenotipo *pili*⁺ al *pili*⁻; cuando este tipo de variación implica al gen *pilC* suele ocurrir una reducción en la piliación del microorganismo (75).

Otro hallazgo interesante referente a los *pili* tuvo lugar al realizarse un estudio con humanos, en el cual se observó que gonococos mutantes incapaces de producirlos podían colonizar la uretra masculina, aunque sin provocar una respuesta inflamatoria típica o significativa. Por obvio, la adhesina no fimbrial involucrada podría mediar la presentación de otros componentes de superficie y estar también directamente relacionada con ciertos procesos inhibidores de la inflamación (47).

Proteína Opa. La segunda etapa de la adhesión e invasión gonocócica parece estar mediada, en buena parte, por una familia de proteínas bacterianas de membrana externa denominadas Opa, debido a la opacidad que confieren a las colonias que las producen. Estas moléculas proteicas, también conocidas como P.II, fueron las primeras en identificarse como invasinas gonocócicas y también poseen la capacidad de unirse a los azúcares expuestos de los lipooligosacáridos (LOS) pertenecientes a otras células de *N. gonorrhoeae*, lo que resulta esencial en la formación de microcolonias (47, 91).

Las Opa promueven la invasión de las células hospederas interactuando con distintos receptores superficiales: la unión de las diferentes variantes de esta proteína a su respectivo receptor desencadena diversas cascadas de señalización, lo que permite el ingreso de los gonococos por rutas distintas y, posiblemente, la selección de diferentes destinos intracelulares y/o grados de infección. Los receptores de las Opa incluyen a aquellos proteoglicanos cuya porción del polisacárido está constituida por el sulfato de heparán (HSPGs), así como a varios miembros de la familia CD66 (70, 121).

El HSPG se une a las variantes de Opa que exponen residuos cargados positivamente (acil-aminos); no obstante, esta interacción es insuficiente para promover la internalización. Por su parte, la unión Opa-CD66 corresponde a una interacción proteína-proteína (70).

Adicionalmente, las Opa se unen a la piruvato quinasa (PK) subtipo M2 humana, enzima soluble elaborada por numerosas células, incluyendo las epiteliales, que cataliza la conversión irreversible de fosfoenol-piruvato en piruvato, con la producción de ATP. Es posible que, de esta manera, los gonococos intracelulares unidos a la PK promuevan su procuración de piruvato, molécula que representa una de sus tres únicas fuentes de carbono utilizables, lo cual aseguraría su supervivencia intracelular (47).

Es importante mencionar que, como resultado de la variación antigénica, *N. gonorrhoeae* puede expresar entre 9 y 11 Opa, de 25 a 30-kDa, las cuales

podrían ser determinantes en el tropismo celular, en la inducción de la respuesta oxidativa de los neutrófilos y en el grado de foto-opacidad de las colonias (que varían desde transparentes hasta muy opacas) (70, 75, 64).

Porinas. Las proteínas más abundantes en la membrana externa gonocócica son las porinas denominadas Por o P.I, cuya función común es la de permitir la difusión de nutrientes de bajo peso molecular a través de la membrana externa; sin embargo, dichas proteínas también desempeñan un papel muy significativo en la invasión de las células epiteliales (potenciada en presencia de las Opa): se translocan desde la superficie bacteriana hasta la de la célula hospedera -a través del sitio de contacto-, lo cual se traduce en el colapso del potencial de membrana en esta última, debido probablemente a la formación de poros; posteriormente, ello permite el flujo de Ca^{++} , lo que al parecer promueve la invasión gonocócica y la inducción de apoptosis (47, 64, 70, 91)

Adicionalmente, las Por o P.I afectan a los neutrófilos: previa inserción en la membrana de estos últimos, inhiben la fagocitosis, la polimerización de la actina, la secreción de enzimas microbicidas, la expresión de los receptores para las opsoninas, la maduración del fagosoma y la fusión fagolisosomal; además, provocan la modificación de las reacciones del metabolismo oxidativo dependientes de la mieloperoxidasa, las cuales son fundamentales en la conversión del peróxido a diversas especies reactivas de oxígeno ($ROS = O_2^-$, $O_2^=$ y OH^{\cdot}), encargadas de matar a los microorganismos (64).

Existen dos subtipos diferentes de Por: P.IA y P.IB. Las cepas productoras de la primera se asocian a la gonorrea diseminada, son usualmente más resistentes al suero y capaces de invadir a las células en ausencia de las Opa. Esta invasión es facilitada por la limitación de fosfato, lo que se traduce en disminución del crecimiento bacteriano, o posiblemente, por alguna modulación directa de la función de la porina. Por su parte, las variantes P.IB están más relacionadas con las infecciones que permanecen localizadas y requieren de las proteínas Opa para concretar su internalización (121).

Adhesina inducible. Hace varios años se observó que la incubación de algunas cepas de *N. gonorrhoeae* con células endometriales humanas de la línea Hec1B, inducía la expresión de alguna(s) molécula(s) gonocócica(s) de superficie que aumentaba(n) la adhesión o invasión bacteriana. Más recientemente, se ha reportado que la adhesina inducible se une al receptor de lutropina (hCG/LH), el cual parece ser requerido para originar el fenotipo invasivo; sin embargo, aún no se ha logrado establecer la identidad de esta(s) molécula(s) (47).

Rmp y el bloqueo de anticuerpos

La proteína de membrana externa Rmp (proteína modificable por reducción o P.III) se encuentra formando un complejo con las Por, a las que se encuentra unida no covalentemente. Al parecer aquélla está involucrada en la invasión

gonocócica de las células epiteliales humanas⁴ y en el bloqueo de los anticuerpos bactericidas dirigidos contra la porina y el LOS (no sialicado), evento que se atribuye a impedimentos estéricos (47, 91, 121).

Es importante mencionar que el suero humano normal suele contener anticuerpos dirigidos contra esta proteína, aunque ello también puede ser debido a que ésta presenta reacción cruzada con la proteína OmpA de *E. coli*, lo que descarta la posibilidad de que dichos anticuerpos séricos se puedan aplicar al diagnóstico indirecto (75).

IgA1 proteasa

Tal como se ha detectado en algunos otros patógenos que colonizan mucosas, *N. gonorrhoeae* secretan inmunoglobulina A1 (IgA1) proteasa, enzima que resulta relevante en los siguientes aspectos:

- ✓ Promueve la colonización bacteriana: escinde a nivel de la región de la bisagra a la IgA1s humana, correspondiente a una de las dos subclases de IgA localizadas en las mucosas (la subclase IgA2 representa del 10 al 20% del total [90]) (93).

⁴ De hecho, las cepas de *N. gonorrhoeae* que carecen de Rmp invaden con menor eficacia.

- ✓ Apoya el escape gonocócico de la fagocitosis, vía la remoción del extremo Fc de las moléculas de IgA unidas al microorganismo; el Fc es la porción reconocida por los fagocitos (93).

- ✓ Incrementa la sobrevivencia intracelular, ya que también corta a la LAMP1 (proteína 1 asociada a la membrana lisosomal); ésta es una glicoproteína que integra la membrana lisosomal, se encuentra involucrada en la maduración vacuolar o endosomal y presenta un segmento parecido a la región de la bisagra de la IgA1. La proteólisis provocada conduce a múltiples alteraciones en los lisosomas de las células infectadas (41, 47).

Procuración de hierro

Las bacterias requieren fierro como nutriente indispensable para su crecimiento, por lo que la capacidad de los microorganismos patógenos para obtener dicho metal a partir de su hospedero representa un factor determinante de virulencia. En tal contexto, las bacterias Gram negativas, incluida *N. gonorrhoeae*, han desarrollado sistemas para lograr la asimilación de este elemento, implicando receptores de membrana externa que reconocen y adsorben moléculas que transportan hierro (116).

Numerosos microorganismos sintetizan y secretan sideróforos quelantes del fierro encontrado en el ambiente, los cuales posteriormente se unen a algún

receptor específico que los transporta hacia el interior de la membrana. Sin embargo, *N. gonorrhoeae* no sintetiza sideróforos; de hecho, utiliza las fuentes de hierro derivadas del hospedero a través de receptores situadas en su membrana externa, mismos que interactúan específicamente con la transferrina, la lactoferrina, la hemoglobina y otros grupos heme (76, 96, 116).

Dichos receptores gonocócicos para transferrina y lactoferrina son el Tbp1 y Tbp2, así como el LbpA y LbpB; diversos estudios han logrado determinar que el hierro es removido de ambas proteínas hospederas con gasto de energía, aunque éstas no son internalizadas. Es decir, el hierro es tomado por la FbpA (por *ferric binding protein*) y transportado a través del espacio periplásmico hacia la membrana citoplásmica (96, 116).

Los receptores HmbR y el HpuB, facilitan la adquisición del hierro a partir del grupo heme de la hemoglobina y de los complejos hemoglobina-haptoglobina respectivamente; una posible ruta de transporte del hierro del grupo hemo reside en la FbpA, aunque no puede descartarse la posibilidad de que otras proteínas también participen en el proceso. Cabe mencionar que, si bien el gonococo es capaz de producir el grupo heme, se ha observado que también cuenta con las herramientas para adquirirlo del hospedero (96, 116).

Resistencia al suero

LOS. Los lipooligosacáridos (LOS) encontrados en la superficie de *N. gonorrhoeae* difieren de los lipopolisacáridos de las bacterias entéricas Gram negativas en que los primeros carecen de la cadena lateral larga de antígeno O (unidades repetidas de azúcares); lógicamente, sí poseen al lípido A unido a las cadenas de carbohidratos, mismas cuya longitud y composición de azúcares resultan muy variables, merced a la acción de diversas glicosiltransferasas (45, 75).

El LOS posee una estructura terminal conservada, la lacto-N-neotetraosa; ésta se une al receptor de la asialoglicoproteína (ASPG-R), hecho que se relaciona con la invasión a cultivos de células epiteliales de uretra humana, aunque no necesariamente con la adhesión (45, 47, 75).

Otros eventos importantes asociados a LOS que presentan dicha fracción, son:

- **Mimetismo molecular**, ya que dicha fracción es muy parecida a la que presentan algunos glucoesfingolípidos humanos. Ello y el hecho de que otros fragmentos del LOS gonocócico también comparten epitopos con los globósidos, gangliósidos y lactósidos humanos, explican la capacidad del microorganismo para evadir al sistema inmunológico (45).

- **Sialicación.** La sialicación de la galactosa terminal presente en esta porción es catalizada por la enzima gonocócica sialiltransferasa, la cual usa como donadora de ácido siálico a una molécula del hospedero conocida como ácido citidínmonofosfato-N-acetilneuramínico (CMP-NANA) (75).

De esta manera, se inhiben las interacciones bacterianas con las células hospederas –debido a la carga negativa que confiere el ácido siálico a la cadena de carbohidratos– (70), pero también se origina la resistencia del microorganismo al suero, ya que se impide la deposición del complemento sobre la superficie bacteriana (75, 91), pues dicho ácido favorece la captación de factor H (proteína responsable de la regulación del mismo sistema), el cual bloquea el ensamblaje de la convertasa de C3 de la vía alterna y adicionalmente, sirve como cofactor en la proteólisis mediada por el factor plasmático I del C3b –componente que además actúa como opsonina- (1).

La sialicación también interfiere con la producción del componente C5a del complemento, el cual representa un relevante factor quimiotáctico para fagocitos; de esta forma se interfiere la llegada de estos últimos (91).

Evidentemente, el LOS también es responsable de los eventos endotóxicos que ocurren durante las infecciones gonocócicas: estimula la producción de

mediadores inflamatorios por parte de macrófagos y neutrófilos, destacando el TNF- α (factor de necrosis tumoral α), IL-8 (interleucina 8), IL-6, IL-1 y GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófago-granulocito) (47).

El TNF- α está involucrado en el proceso inflamatorio, en el catabolismo y la fibrosis, además de participar en el daño tisular ocasionado a las trompas de Falopio; la IL-8 interviene en la inflamación y en la migración celular, ya que constituye un potente inductor de la quimiotaxis de neutrófilos y de células T; la IL-6 es importante para inducir la diferenciación de las células formadoras de anticuerpos; la IL-1 genera fiebre, estimula a las células B y T e induce respuestas pro-inflamatorias tales como la producción de prostaglandinas y de enzimas degradativas tales como la colagenasa; finalmente, el GM-CSF actúa como factor de activación sobre células maduras (90, 91).

Cuando la producción de dichas citocinas resulta muy intensiva, ocurre el denominado *shock* o choque endotóxico, caracterizado por fiebre, colapso circulatorio, coagulación intravascular diseminada y necrosis hemorrágica, conjunto de alteraciones que puede conducir al fallo orgánico múltiple (90).

AniA. La AniA es una proteína de membrana externa presente durante el crecimiento anaeróbico del microorganismo. Diversos estudios efectuados con el suero de mujeres que padecen infección gonocócica local, IGD y EPI, han

detectado anticuerpos anti-AniA, lo que indica que aquella proteína es elaborada *in vivo* por *N. gonorrhoeae* (18).

Cabe mencionar la propuesta de algunos autores en el sentido de que la AniA podría potenciar la resistencia del microorganismo al suero, ya que dicha proteína presenta una región repetitiva rica en prolinas y, por lo general, éstas participan en numerosas interacciones proteína-proteína. Así, tales regiones adsorberían al factor H, ya sea directamente, o bien, utilizando como puente a la heparina (18).

Reclutamiento directo de proteínas del hospedero

En años recientes, se ha logrado confirmar la existencia de una singular estrategia de diversas bacterias para amplificar su virulencia. En concreto, el mecanismo implicado, ya demostrado también en *N. gonorrhoeae*, consiste en que el microorganismo recluta, con base en sus propios factores estructurales y funcionales, diversas proteínas del hospedero, las cuales incluyen mediadores inflamatorios, glicoproteínas adhesivas, factores de crecimiento y otras citocinas, sin que ello requiera de la producción de receptores para cada uno (29).

El mecanismo propuesto consiste en la adsorción de heparina o de polisacáridos sulfatados funcionalmente relacionados (tales como los glicosaminoglicanos) a la superficie bacteriana, los cuales, a su vez, fungen

como sitios de unión "secundarios" para las proteínas del hospedero; generalmente, dicha unión implica a grupos de 6 a 8 aminoácidos básicos e hidrofílicos alternados y, lógicamente, la deposición indirecta de todo un universo de proteínas del hospedero sobre la célula bacteriana repercute notablemente en aspectos tales como virulencia del agresor y defensa del organismo invadido. En este último caso, se reduce la quimiotaxis y la eficacia de la respuesta inmune, al tiempo de que se incrementa la probabilidad de adaptación del microorganismo (29).

Adicionalmente, *N. gonorrhoeae* también puede adsorber a la vitronectina (proteína que promueve la adhesión plaquetaria y modula al sistema del complemento), a través del mismo mecanismo: la heparina o los polisacáridos sulfatados antes mencionados forman un puente molecular estable entre la Opa y aquella proteína. En tal sentido, se ha demostrado que dicho evento capacita al gonococo para invadir ciertos tipos de células epiteliales que, de otra manera, no podrían ser infectados por el microorganismo (29).

Desarrollo de eventuales vacunas

Sin lugar a dudas, la medida preventiva que ofrecería una solución más eficaz y de largo plazo consiste en el desarrollo de una vacuna efectiva, segura, barata, fácil de transportar y almacenar. El diseño de inmunógenos que estimulen la inmunidad humoral, fundamentalmente en las mucosas, debe tomar en cuenta los siguientes factores: a) La complejidad y grado de

diversidad antigénica del microorganismo; b) la naturaleza de la infección (aguda o crónica); c) la capacidad del organismo humano para desarrollar inmunidad después de la inmunización; f) la posibilidad de obtener modelos experimentales que reproduzcan los procesos infeccioso e inmunitario; y g) la posibilidad de evitar que las infecciones subclínicas evadan el sistema inmune (15).

En *N. gonorrhoeae*, por lo menos tres moléculas de la membrana externa experimentan variación de fase, antigénica o ambas: los *pili*, las proteínas Opa y el LOS (93). El *pilus* aparentaba ser un buen candidato para obtener una vacuna confiable, ya que presenta regiones conservadas; sin embargo, éstas no resultan accesibles a los anticuerpos (91, 93).

Las proteínas Por representan una buena alternativa, ya que están presentes en forma abundante sobre la superficie bacteriana, su naturaleza es relativamente conservada y no varían dentro de una misma cepa (aunque sí entre cepas); de hecho, hasta existen regiones conservadas entre los subtipos P.IA y P.IB, y los estudios de epidemiología molecular sugieren que los anticuerpos anti-Por que aparecen durante las infecciones naturales podrían aportar una protección parcial contra la reinfección por gonococos del mismo serotipo (91, 121).

Recientemente, se ha venido estudiando la variabilidad antigénica del TbpA (receptor de transferrina) entre las diferentes cepas gonocócicas, acción

necesaria para evaluar a dicha molécula como potencial componente de una vacuna antigonocócica (76).

iv. Diagnóstico de laboratorio de la gonorrea

Entre los 60s y 80s, las opciones de diagnóstico de la gonorrea eran limitadas, lo que no representaba preocupación alguna, ya que el cultivo en medios selectivos era barato, confiable y altamente sensible, sobre todo cuando se realizaba en laboratorios capacitados en los que, además, podía intentarse el monitoreo de cepas resistentes a antibióticos.

En la década de los 90s, las alternativas se ampliaron significativamente al desarrollarse los métodos de detección del ácido nucleico, los cuales incluyen pruebas para efectuar la identificación presuntiva del gonococo en los especímenes usuales o en muestras urinarias, pero también contemplan ensayos para llevar a cabo la detección simultánea de *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en el mismo espécimen. Evidentemente, estas nuevas técnicas ofrecen más ventajas pero resultan sustancialmente más costosas que el cultivo y la diferenciación microbiológicos (57).

El diagnóstico de la gonorrea se puede dividir en tres niveles: sugerente, presuntivo y definitivo.

- Diagnóstico sugerente. Éste se basa en la presencia de un exudado mucopurulento endocervical o uretral en la examinación física y, adicionalmente, en el conocimiento de un contacto sexual con alguna persona infectada con *N. gonorrhoeae*. (57).
- Diagnóstico presuntivo. Éste se desprende de alguna de las siguientes características: a) la observación de diplococos intracelulares Gram negativos, a partir de secreciones prostáticas, uretrales (en varones) o en endocervicales (en mujeres); b) el aislamiento de colonias que, provenientes de muestras de secreción uretral (en varones) o endocervical, sean oxidasa positiva y presenten una morfología macroscópica y microscópica sugerentes de *N. gonorrhoeae*; c) la detección de segmentos de DNA que pudieran provenir de *N. gonorrhoeae*.
- Diagnóstico definitivo. Éste requiere de: a) el aislamiento de *N. gonorrhoeae* a partir de los sitios de exposición (por ejemplo, uretra, endocérnix, garganta o recto), con morfología microscópica y colonial típicas, oxidasa positiva e identificación a nivel de especie, ya sea mediante pruebas bioquímicas, enzimáticas, serológicas o moleculares. Por ejemplo, utilización de carbohidratos, pruebas rápidas con sustratos para enzimas, reacciones de coaglutinación o con anticuerpos fluorescentes y PCR (57).

Diagnóstico con técnicas microbiológicas

Cultivo. En virtud de su elevada sensibilidad y especificidad (mayores del 85 %), la identificación de *N. gonorrhoeae* mediante cultivo y la secuencial realización de pruebas confirmatorias, continúa constituyendo el estándar de oro para pruebas de evaluación, propósitos medicolegales y exploraciones de rutina (57).

Las muestras recién recolectadas se estrian sobre medios selectivos (por ejemplo, MTM y NYC) y se incuban 48 h, a 37°C, en atmósfera de 5 a 10 % de CO₂; transcurrido dicho lapso, se localizan colonias blanco grisáceas, brillantes y convexas las cuales, previa propagación en gelosa chocolate, se someten a observación microscópica a inmersión, a la prueba de las oxidasas y a la de oxidación de carbohidratos en CTA (45, 56).

Cuando se sospecha de una IGD, se obtienen muestras sanguíneas que se inoculan en medios tales como el agar soya-tripticaseína (TSA); cabe mencionar que algunas cepas de gonococos pueden ser susceptibles al polianetol sulfonato de sodio (SPS), anticoagulante presente en algunos medios estándar para hemocultivo (45, 56).

Algunas desventajas de este tipo de métodos diagnósticos tienen su origen en lo exigente del microorganismo, lo cual provoca que sólo haya éxito cuando se

empleen medios óptimos (de transporte y para aislamiento) y pruebas confiables (57, 119).

De hecho, suelen obtenerse falsos negativos cuando el paciente se encuentra bajo tratamiento antimicrobiano al momento en el que se recolectan las muestras, o si el microorganismo pierde la viabilidad durante el transporte o se trata de una cepa susceptible a la vancomicina (57, 119).

Examen microscópico. Los frotis al Gram provenientes de exudados uretrales o endocervicales se consideran positivos para gonorrea cuando se observan los típicos diplococos Gram negativos, ya sea dentro de los PMN o en estrecha asociación a ellos. Es decir, el diagnóstico resulta dudoso si sólo se evidencian microorganismos extracelulares o cocos Gram negativos atípicos (45, 48).

Además, los frotis teñidos de exudados conjuntivales también suelen ser indicativos, pero los procedentes de muestras faríngeas, rectales, cutáneas o de líquido cefalorraquídeo generalmente carecen de utilidad (45, 48, 57).

La sensibilidad y especificidad de la tinción de Gram para hombres con uretritis son comparables a las del cultivo cuando se usa para diagnóstico presuntivo (para mujeres son mucho menores), además tiene la ventaja de ofrecer un diagnóstico rápido que facilita el tratamiento inmediato (57).

Diagnóstico con otras técnicas

Técnicas inmunoenzimáticas. La aplicación de técnicas inmunoenzimáticas se destina a la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos gonocócicos específicos en el suero del paciente. Algunas ventajas de estas pruebas incluyen su realización en sólo 3 a 4 h, ya que el resultado no depende del crecimiento microbiano *in vitro*, además de que la refrigeración de la muestra por tiempos prolongados (30 días) no resta confiabilidad al diagnóstico (100).

Si bien algunos autores afirman que estas técnicas tienen una mejor sensibilidad cuando se trata de muestras provenientes de varones asintomáticos que de mujeres asintomáticas, algunos autores cuestionan su uso diagnóstico, debido principalmente a la marcada heterogeneidad antigénica de los gonococos, al lento desarrollo de anticuerpos en las infecciones agudas y a la relativa gran concentración de anticuerpos anti-gonococo entre la población sexualmente activa (45, 57, 100).

Técnicas de amplificación del ácido nucleico. Éstas abarcan a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a la reacción en cadena de la ligasa (LCR). En numerosos casos, los "blancos" seleccionados para el diagnóstico molecular corresponden a secuencias de DNA que codifican para factores tóxicos o patogénicos o para antígenos específicos, e inclusive, para rRNA

(75), sin soslayar que también se puede intentar la amplificación de fragmentos de plásmidos específicos (37).

Sin embargo, para propósitos de identificación se recomiendan los genes del rRNA; en general, la identificación de *N. gonorrhoeae* por LCR implica la detección del gen *opa1* y la PCR apunta hacia los genes *HO1-HO3* (37, 57).

En la actualidad, las pruebas más recientes de amplificación del ácido nucleico pueden detectar a *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (ya sea que uno o ambos estén causando la infección) en una misma muestra y la mayoría se puede aplicar a especímenes urinarios⁵, las cuales son más recomendables para evaluar poblaciones asintomáticas. El tiempo que requieren es sólo de 3 a 4 h, dependiendo del tipo de muestra (117, 118).

En cuanto al lapso durante el cual los especímenes se pueden almacenar sin sufrir deterioros que disminuyan la confiabilidad de los resultados, para muestras de orina aquél es de 2 días entre los 2 y 27°C, o bien, de 6 días entre los 2 y 8°C; por su parte, para las secreciones o exudados cervicales y uretrales, es de 6 días entre los 2 y 27°C (117).

Evidentemente, las ventajas que ofrecen estos métodos de diagnóstico sobre el cultivo tradicional incluyen la flexibilidad en cuanto a la obtención de la muestra, así como su fácil manejo y la rápida obtención de los resultados. A

⁵ Evidentemente, también existen técnicas que utilizan muestras cervicales o uretrales.

pesar de ello, el cultivo continúa representando una excelente opción para llevar a cabo el diagnóstico de la gonorrea, ya que el aislamiento del microorganismo también permite realizar pruebas de susceptibilidad (57).

Recolección de la muestra

Es muy importante tomar en cuenta que los hisopos de alginato de calcio, dacrón o rayón resultan los más apropiados para efectuar la recolección de los especímenes, ya que el algodón suele contener ácidos grasos que son tóxicos para *N. gonorrhoeae* (56).

Por lo que respecta a la mujer, la preparación de la paciente de quien se obtendrá la muestra requiere del uso de agua tibia y de solución salina estéril, evitando la aplicación de desinfectantes y lubricantes que en pequeñas cantidades pueden resultar tóxicos para el gonococo. Además, el endocérnix constituye la región óptima para obtener los especímenes para el cultivo; los especímenes se recolectan bajo visualización directa, con apoyo de un espéculo vaginal: el exceso de moco cervical debe ser removido con algodón o gasa y el hisopo se inserta en el canal endocervical, desplazándolo con suavidad de un lado a otro y/o dejándolo en el mismo sitio durante 10 a 20 segundos, para permitir la adsorción de las bacterias.

Por lo que se refiere a los varones que padecen uretritis gonocócica, el material purulento correspondiente puede proceder de la uretra anterior y se

obtiene con el hisopo. Por obvio, cuando el paciente es asintomático, la muestra se recolecta insertando un hisopo nasofaríngeo en la uretra, a 2 ó 3 cm del extremo externo, por lo menos 1 h después de que el individuo ha orinado.

Los especímenes orofaríngeos pueden obtenerse con el apoyo de luz dirigida y de un abatelenguas; el hisopo se frota con firmeza sobre el área de las amígdalas y la faringe posterior. Por su parte, las muestras rectales se obtienen insertando un hisopo 4-5 cm en el canal anal; dicho hisopo se desplaza con suavidad de un lado a otro y se deja 10 a 20 segundos para permitir que los microorganismos presentes en las criptas anales se adsorban a él. Cuando el hisopo contiene demasiada materia fecal, es conveniente usar otro y tomar una segunda muestra (56).

Los especímenes que no sean procesados inmediatamente después de haberse recolectado, deben depositarse en medios de transporte, tales como el Amies, JEMBEC, Transgrow, BioBag y Gono-Pak (56).

Tal es el caso de las muestras urinarias que se destinarán a la realización de pruebas de amplificación de ácido nucleico; en concreto, deben obtenerse 15 a 20 mL de la primera orina de la mañana, en recipientes estériles, de plástico, libres de preservativos. La ventaja de este tipo de muestras es que pueden ser recolectadas por el propio paciente (19).

CONCLUSIONES

- a) Actualmente las ETS aún muestran una elevada frecuencia en el ámbito mundial, afectando predominantemente al grupo etario integrado por los jóvenes en edad reproductiva y con vida sexual activa quienes, por ende, son los que más evidencian las graves complicaciones de esta clase de padecimientos.

- b) El concepto sobre ETS ha evolucionado en cierto grado, ya que hoy en día se considera agente causal a cualquier patógeno capaz de ser transmitido entre seres humanos durante la actividad sexual.

- c) Se ha estimado que el diagnóstico de ETS a nivel mundial asciende a 330 millones de casos anuales, de los cuales 89 millones corresponden a *Chlamydia trachomatis*, 78 a *Neisseria gonorrhoeae* y 12 a *Treponema pallidum*; dichos microorganismos figuran como los agentes etiológicos de la clamidiasis genital, gonorrea y sífilis, respectivamente.

- d) La sífilis presenta tres etapas activas diferentes y un período de latencia, cada uno de los cuales muestra duraciones y manifestaciones clínicas diferentes; la etapa terciaria o neurosífilis es la de mayor gravedad. Además, dado que el agente causal puede atravesar la barrera placentaria, el feto llega a adquirir sífilis congénita, la cual frecuentemente se traduce en abortos o en malformaciones físicas.

- e) Las entidades clínicas más comunes asociadas a la clamidiasis y la gonorrea son la uretritis y la cervicitis; ambas suelen cursar en forma asintomática, alcanzando cifras de hasta 90 % en el caso de *C. trachomatis* y, cercanas al 50 %, cuando se trata de *N. gonorrhoeae*.
- f) Independientemente de que cursen o no en forma sintomática, la clamidiasis genital y la gonorrea pueden dar lugar a serias complicaciones clínicas cuando no son tratadas oportuna y adecuadamente, destacando patologías tales como EIP, embarazos ectópicos en la mujer, e inclusive, IGD e infertilidad en ambos sexos.
- g) La prevención y control de las ETS se basan en la educación de la población, complementada con un diagnóstico y tratamiento efectivos. Desafortunadamente, el desarrollo de vacunas que ofrecerían una solución concreta de largo plazo, se ha visto obstaculizado debido, en parte, al desconocimiento y/o al escaso entendimiento de los factores de virulencia de los agentes causales.
- h) Los principales factores de virulencia de *Treponema pallidum* son las posibles adhesinas TpN83 y TpN92 y la hialuronidasa, enzima implicada en el proceso de diseminación. Además, se ha comprobado que esta espiroqueta evade con cierta eficacia la respuesta inmune del hospedero, vía misma que esta directamente relacionada con la estructura de su membrana externa y con su capacidad para unirse a proteínas del aquíel.

- i) En cuanto a *Chlamydia trachomatis*, aún no se conocen con certeza las moléculas determinantes de virulencia, si bien se han logrado determinar como adhesinas potenciales a las proteínas MOMP, Omp2 y GAG. Además, destaca la capacidad de este microorganismo para modular el proceso apoptótico en las células del hospedero.

- j) Los principales factores de patogenicidad de *Neisseria gonorrhoeae* son los *pili*, las proteínas Opa y Por, el LOS y la IgA1 proteasa; estos participan fundamentalmente en la adhesión, invasión, resistencia a la acción bactericida del suero y en hidrólisis de los anticuerpos IgA1, respectivamente.

- k) Los métodos de laboratorio utilizados para la identificación de estos patógenos abarcan a los de índole microbiológico, inmunológico, serológico y molecular. Estos últimos ofrecen mayor rapidez en los resultados, si bien no han podido sustituir completamente a los primeros, ya que son considerablemente más costosos.

- l) Las actuales pruebas diagnósticas asociadas a la sífilis se ubican en 3 categorías: a) examen microscópico directo, adecuado para cuando las lesiones están presentes; b) pruebas no treponémicas, utilizadas para dar seguimiento a los pacientes; y c) pruebas treponémicas, las cuales son confirmatorias.

- m) Para las clamidias, microorganismos intracelulares, el cultivo celular todavía se considera como el método más sensible y específico para llevar a cabo el diagnóstico. En tal contexto, las líneas celulares más utilizadas para cultivar a *C. trachomatis* son las McCoy, HeLa 229, BHK-21, L 929 y BGMK.
- n) En virtud de su elevada sensibilidad y especificidad, el cultivo de *N. gonorrhoeae* en medios selectivo y la secuencial realización de pruebas confirmatorias, continúa constituyendo el estándar de oro.
- o) Los “blancos” seleccionados para llevar a cabo el diagnóstico molecular (mediante PCR o LCR) corresponden a secuencias de DNA que codifican para factores patogénicos o antígenos específicos, e inclusive, para rRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Agar soya-tripticaseína
ATP	Adenosin trifosfato
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Cuerpo elemental de <i>Chlamydia trachomatis</i>
CMP-NANA	Ácido citidinermonofosfato-N-acetilneuramínico
CR	Cuerpo reticular de <i>Chlamydia trachomatis</i>
CTA	Cistina-tripticase-agar
DEAE-dextrana	Dietilaminoetilidextrana
DFA	Anticuerpo fluorescente directo
DFA-TP	Anticuerpo fluorescente directo para <i>T. pallidum</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIA	Enzimoimmunoanálisis
EIP	Enfermedad Inflamatoria pélvica
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FA	Anticuerpos Fluorescentes
FbpA	Ferric binding protein
FC	Fijación del complemento
FTA-ABS	Absorción de anticuerpos fluorescentes treponémicos
GAG	Glucosaminoglucanos
GlpQ	Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias macrófago-granulocito
HmbR y HpuB	Receptores para hemoglobina de <i>N. gonorrhoeae</i>
Hsp	Proteínas de shock térmico
Ig	Inmunoglobulina
IGD	Infección gonocócica diseminada
IL	Interleucina
LbpA y LbpB	Receptores para lactoferrina de <i>N. gonorrhoeae</i>
LCR	Reacción en cadena de la ligasa
LGV	Linfogranuloma venéreo
LOS	Lipooligosacárido

LPS	Lipolisacárido
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MHA-TP	Microhemaglutinación para anticuerpos contra <i>T. pallidum</i>
MHC	Moléculas del complejo de histocompatibilidad
MIF	Microinmunofluorescencia
ML	Medio Martin-Lewis
MOMP	Proteína principal de membrana externa de <i>C. trachomatis</i>
MTM	Medio Thayer-Martin modificado
NADP	Nicotin adenin difosfato
NYC	Agar New York City
Omp2	Proteína de membrana externa 2 de <i>Chlamydia trachomatis</i>
PBP _s	Proteínas que se unen a penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK	Piruvato quinasa
PMNs	Polimorfonucleares
Por	Porinas de <i>N. gonorrhoeae</i>
rDNA	DNA ribosomal
rRNA	RNA ribosomal
Rmp	Proteína modificable por reducción de <i>N. gonorrhoeae</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPR	Prueba de reagina plasmática rápida
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
Tbp1 y Tbp2	Receptores para transferrina de <i>N. gonorrhoeae</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TROMPS	<i>T. pallidum</i> rare outer membrane proteins
TRUST	Prueba en suero no calentado con rojo de toluidina
USR	Prueba de reagina suero-no calentado
VCN	Vancomicina, colistina, nistatina
VHS	Virus del herpes simplex
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VPH	Virus del papiloma humano
VDRL	Laboratorio de investigación de enfermedades venéreas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A., Lichtman A., Pober J.
INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.
3ª edición. España: Interamericana McGraw-Hill, 1998: 242, 353, 363, 364.
2. Alvarado C., García A., Castruita D. E., Cardosa F. J. y Ruiz R.: Prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* en prostitutas registradas de la ciudad de Durango, México, S Pub Mex, 2000; 42(1): 43-47.
3. Arrol T.W., Centurión-Lara A., Lukehárt S.A. y Van Voorhis W. C.: T-cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection, Infect Immun, 1999; 67(9):4757-4763.
4. Bas S., Muzzin P., Ninet B., Bornand J.E., Scieux C. y Vischer T.L.: Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens, J Clin Microbiol, 2001; 39(4): 1368-1377.
5. Beaty R.P., Rasmussen S. y Stephens S.: Cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of *Chlamydia trachomatis*- and *Chlamydia psittaci*-infected cells, Infect Immun, 1997; 65(3): 951-956.
6. Becker P.S., Akins D.R., Radolf J.D. y Norgard M.V.: Similarity between the 38-kilodalton lipoprotein of *Treponema pallidum* and the glucose/galactose-binding (MgIB) protein of *Escherichia coli*, Infect Immun, 1994; 62(4): 1381-1391.
7. Beverly A., Bailey-Griffin J.R. y Schwebek J.R.: InTray GC medium versus modified Thayer-Martin agar plates for diagnosis of gonorrhea from endocervical specimens, J Clin Microbiol, 2000; 38(10): 3825-3826.
8. Bhuiyan B.U., Rahman M., Miah M.R.A., Nahar S., Islam N., Ahmed M., Rahman K.M. y Albert M.J.: Antimicrobial susceptibilities and plasmid contents of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from commercial sex workers in Dhaka, Bangladesh: emergence of high-level resistance to ciprofloxacin, J Clin Microbiol, 1999; 37(4):1130-1136.
9. Black C.M.: Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections, Clin Microbiol Rev, 1997; 10(1): 160-184.
10. Blanco D.R., Champion C.I., Exner M.M., Erdjument-Bromage H., Hancock R. E.W., Tempst P., Miller J.N. y Lovett M.A.: Porin activity and sequence

- analysis of a 31-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* rare outer membrane protein (Tromp1), J Bacteriol, 1995; 177(12): 3556-3562.
11. Blanco D.R., Champion C.I., Exner M.M., Shang E.S., Skare J.T., Hancock R. E.W., Miller J.N. y Lovett M.A.: Recombinant *Treponema pallidum* rare outer membrane protein 1 (Tromp1) expressed in *Escherichia coli* has porin activity and surface antigenic exposure, J Bacteriol, 1996; 177(23): 6685-6692.
 12. Blanco D.R., Champion C.I., Lewinski M.A., Shang E.S., Simkins S.G., Miller J.N. y Lovett M.A.: Immunization with *Treponema pallidum* outer membrane vesicles induces high-titer complement-dependent treponemocidal activity and aggregation of *T. pallidum* rare outer membrane proteins (TROMPs), J Immunol, 1999; 163: 2741-2746.
 13. Boman J., Gaydos C., Juto P., Wadell G. y Quinn T.: Failure to detect *Chlamydia trachomatis* in cell culture by using a monoclonal antibody directed against the mayor outer membrane protein, J Clin Microbiol, 1997; 35(10): 2679-2680.
 14. Bouis D.A., Popova T.G., Takashima A. y Norgard M.V.: Dendritic cells phagocytose are activated by *Treponema pallidum*, Infect Immun, 2001; 69(1): 518-528.
 15. Calderón E.: Tratamiento y prevención de las enfermedades de transmisión sexual, S Pub Mex, 1999; 41(4): 334-343.
 16. Cameron C.E., Castro C., Lukehart S.A. y Van Voorhis W.C.: Function and protective capacity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* glycerophosphodiester phosphodiesterase, Infect Immun, 1998; 66(12): 5763-5770.
 17. Cameron C.E., Lukehart S.A., Castro C., Monili B., Godornes C. y Van Voorhis W.C.: Opsonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92, J Infect Dis, 2000; 181(4): 1401-1413.
 18. Cardinale J.A. y Clark V.L.: Expression of AniA, the mayor anaerobically induced outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*, provides protection against killing by normal human sera, Infect Immun, 2000; 68(7): 4368-4369.
 19. Carrol K.C., Aldeen W.E., Morrison M., Anderson R., Lee D. y Mottice S.: Evaluation of the Abbott LCx Ligase Chain Reaction Assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine and genital swab specimens from sexually transmitted disease clinic population, J Clin Microbiol, 1998; 36(6): 1630-1633.

20. Centers for Disease Control and Prevention. 1998 Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1998; 47(1): 2, 53-70.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease surveillance 1999 supplement, Chlamydia prevalence monitoring project annual report 1999. Division of STD Prevention, 2000: 1-8.
22. Centurion-Lara A., Castro C., Shaffer J.M., Van Voorhis W.C., Marra C.M. y Lukehart S.A.: Detection of *Treponema pallidum* by sensitive reverse transcriptase PCR, J Clin Microbiol, 1997; 35(6): 1348-1352.
23. Centurion-Lara A., Castro C., Castillo R., Shaffer J.M., Van Voorhis W.C., y Lukehart S.A.: The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes, J Infect Dis, 1998; 177(4): 1036-1040.
24. Centurion-Lara A., Castro C., Barrett L., Cameron C., Mostowfi M., Van Voorhis W.C. y Lukehart S.A.: *Treponema pallidum* mayor sheath protein homologue Tpr K is target of opsonic antibody and the protective immune response, J Exp Med, 1999; 189(4): 647-656.
25. Champion C.I., Blanco D.R., Exner M.M., Erdjument-Bromage H., Hancock R. E.W., Tempst P., Miller J.N. y Lovett M.A: Sequence analysis and recombinant expression of a 28-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* rare outer membrane protein (Tromp2), J Bacteriol, 1997; 179(4): 1230-1238.
26. Cox D.L., Chang P., McDowall A.W. y Radolf J.D.: The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*, Infect Immun, 1992; 60(3): 1076-1083.
27. Cox D.L. y Radolf J.D.: Insertion of fluorescent fatty acid probes into the outer membranes of pathogenic spirochaetes *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*, Microbiol, 2001; 147(5): 1161-1169.
28. Dean D. y Powers V.C.: Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli, Infect Immun, 2001; 69(4): 2442-2447.
29. Duensing T.D., Wing J.S. y Van Putten J.P.M.: Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis, Infect Immun, 1999; 67(9): 4463-4468.
30. Ebel A., Bachelart L. y Alonso J.: Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Shyphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of Syphilis, J Clin Microbiol, 1998; 36(2): 358-361.

31. Edwards J.L., Shao J.Q., Ault K.A. y Apicella M.A.: *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells, *Infect Immun*, 2000; 68(9): 5354-5363.
32. Greene S.R. y Stamm L.V.: Molecular characterization of *Treponema pallidum* *mcp2*, a putative chemotaxis protein gene, *Infect Immun*, 1998; 66(6): 2999-3002.
33. Grove C., Kirkpatrick R., Witkamp M.T., Larson J.A., Schipper C.A., Waldberser L.S., O'gaora P., Cooper M. y So M.: *Neisseria gonorrhoeae* mutants altered in toxicity to human fallopian tubes and molecular characterization of genetic locus involved, *Infect Immun*, 1999; 67(2): 643-652.
34. Haake D.A.: Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis, *Microbiol*, 2000; 146(7): 1491-1504.
35. Hackstadt T., Fischer E.R., Scidmore M.A., Rockey D.D. y Heinzen R.A.: Origins and functions of the chlamydial inclusion, *Trends Microbiol*, 1997; 5(7): 288-293.
36. Halling V.W., Jones M.F., Bestrom J.E., Wold A.D., Rosenblatt J.E., Smith T.F. y Cockerill III F.R.: Clinical comparison of the *Treponema pallidum* CAPTIA Syphilis-G enzyme immunoassay with the fluorescent treponemal antibody absorption immunoglobulin G assay for syphilis testing, *J Clin Microbiol*, 1999; 37(10): 3223-3234.
37. Harsem D., Singer C., Rothgänger J., Tønjum T., Sybren de Hoog G., Shah H., Albert J. y Frosch M.: Diagnostics of *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae* by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(3): 936-942.
38. Hatch T.P.: Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae?, *J Bacteriol*, 1996; 178(1):1-5.
39. Hazlett K.R.O., Sellati T.J., Nguyen T.T., Cox D.L., Clawson M.L., Caimano M.J. y Radolf J.D.: The TprK protein of *Treponema pallidum* is periplasmic and is not target of opsonic antibody or protective immunity, *J Exp Med*, 2001; 193(9): 1015-1026.
40. Hedges S.R., Mayo M.S., Mestecky J., Hook III E.W. y Russell M.W.: Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections, *Infect Immun*, 1999; 67(8): 3937-3946.

41. Hopper S., Vasquez B., Merz A., Clary S., Wilbur J.S. y So M.: Effects of the immunoglobulin A1 protease on *Neisseria gonorrhoeae* trafficking across polarized T84 epithelial monolayers, *Infect Immun*, 2000; 68(2): 906-911.
42. Hughes E.S., Shaw K.M. y Ashley R.H.: Mutagenesis and functional reconstitution of Chlamydial mayor outer membrane proteins: VS4 domains are not required for pore formation but modify channel function, *Infect Immun*, 2001; 69(3): 1671-1678.
43. Igietseme J.U. y Murdin A.: Induction of protective immunity against *Chlamydia trachomatis* genital infection by a vaccine based on mayor outer membrane protein-lipophilic immune response-stimulating complexes, *Infect Immun*, 2000; 68(12): 6798-6806.
44. Igietseme J.U., Portis J.L. y Perry L.L.: Inflammation and clearance of *Chlamydia trachomatis* in enteric and noenteric mucosae, *Infect Immun*, 2001; 69(3): 1832-1840.
45. Jawetz E., Melnick J.L., Adelbert E.A., Brooks G.F., Butel J.S. y Omston L.N.
MICROBIOLOGÍA MÉDICA DE JAWETZ, MELNICK Y ADELBERT.
16ª edición. México: El manual moderno, 1999: 317-324, 357-361, 383-390.
46. Jendro C.M., Deutsch T., Körber B., Köhler L., Kuipers J.G., Krause-Opatz B., Westermann J., Raum E. y Zeidler H.: Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potential mechanism for persistent infection, *Infect Immun*, 2000; 68(12): 6704-6711.
47. Jerse A.E. y Rest R.F.: Adhesion and invasion by the pathogenic neisseria, *Trends Microbiol*, 1997; 5(6): 217-221.
48. Joklik W., Willet H., Amos B. y Wilfert C.
ZINSSER MICROBIOLOGÍA.
20ª edición. Argentina: Médica-Panamericana, 1996: 611-633, 890-902, 973-984.
49. Joseph T.D. y Bose S.k.: A heat-labile protein of *Chlamydia trachomatis* binds to Hela cells and inhibits the adherence of chlamydiae, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 4054-4058.
50. Joseph T.D. y Bose S.k.: Further characterization of an outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with cytoadherence properties, *FEMS Microbiol Lett*, 1991; 84: 167-171.

51. Jovanovic T., Ascenso C., Hazlett K.R.O., Sikkink R., Krebs C., Litwiller R., Benson L.M., Moura I., Moura J.J.G., Radolf J.D., Huynh B.H. Naylor S., Rusnak F.: Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase, *J Biol Chem*, 2000; 275(37): 28439-28448.
52. Kaushic C., Zhou F., Murrin A.D., Wira C.R.: effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract, *Infect Immun*, 2000; 68(7): 4207-4216.
53. Kelly K.A., Walker J.C., Jameel S.H., Gray H.L. y Rank R.G.: Differential regulation of CD4 lymphocyte recruitment between the upper and lower regions of genital tract during *Chlamydia trachomatis* infection, *Infect Immun*, 2000; 68(3): 1519-1528.
54. Klausner J.D., Aplasca M.R., Mesola V.P., Bolan G., Whittington W.L. y Holmes K.K.: Correlates of gonococcal infection and of antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* among females sex workers, Republic of Philippines, 1996-1997, *J Infect Dis*, 1999; 179(3): 729-733.
55. Klausner J.D., McFarland W., Bolan G., Hernández M.T., Molitor F., Lemp G.F., Cahoon-Young B., Morrow S. y Ruiz J.: Knock-knock, a population-based survey of risk behavior, health care access, and *Chlamydia trachomatis* infection among low-income women in the San Francisco Bay Area, *J Infect Dis*, 2001; 183(7): 1087-1092.
56. Koneman E.W., Allens S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers H. M. y Winn W.C.
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO (TEXTO Y ATLAS COLOR).
México: Médica-Panamericana, 1997: 394-404.
57. Koumas E.H., Johnson R.E., Knapp J.S. y St. Louis M.E.: Laboratory testing for *Neisseria gonorrhoeae* by recently introduced nonculture test: a performance review with clinical and public health considerations, *Clin Infect Dis*, 1998; 27: 1171-1180.
58. Krieg N.K. y Holf J.G.
BERGEY'S MANUAL OF SISTEMATIC BACTERIOLOGY.
EUA: Williams & Wilkins, Vol 1. 1984: 38-57, 729-738.
59. Kumate J., Gutiérrez G., Muñoz O. y Santos J.I.
MANUAL DE INFECTOLOGÍA CLÍNICA.
15ª edición. México: Méndez Editores, 1998:257-264, 268-276, 278-280.

60. Lampe M.F., Wilson C.B., Bevan M.J. y Starbach M.N.: Gama interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of *Chlamydia trachomatis* infection, *Infect Immun*, 1998; 66(11): 5457-5461.
61. Larsen S.A., Steiner B. M. y Rudolph A.H.: Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis, *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8(1):1-21.
62. Lewinski M.A., Miller J.N., Lovett M.A. y Blanco D.R.: Correlation of immunity in experimental syphilis with serum-mediated aggregation of *Treponema pallidum* rare outer membrane proteins, *Infect Immun*, 1999; 67(7): 3631-3636.
63. Liu H., Rodes B., Chen C-Y. y Steiner B.: New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(5):1941-1946.
64. Lorenzen D.R., Günther D., Pandit J., Rudel T., Brandt E., Meyer T.F.: *Neisseria gonorrhoeae* porin modifies the oxidative burst of human professional phagocytes, *Infect Immun*, 2000; 68(11): 6215-6222.
65. Madico G., Quinn T.C., Boman J. y Gaydos C.A.: Touchdown enzyme time release-PCR for detection of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(3): 1085-1093.
66. Mahony J., Chong S., Jang D., Faught M., Dalby D., Sellors J. y Chernesky M.: Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(11): 3122-3126.
67. Mahony J.B., Song X., Chong S., Faught M., Salonga T. y Kapala J.: Evaluation of the NucliSense Basic Kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA; *J Clin Microbiol*, 2001; 39(4):1429-1435.
68. Matsumoto A., Izutsu H., Miyashita N. y Ohuchi M.: Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(10): 3013-3019.
69. Mavroidi A., Tzouveleakis L.S., Tassios P.T., Fliemetakis A., Danilidou M. y Tzelepi E.: Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to fluoroquinolones isolates in Greece from 1996 to 1999, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(9): 3489-3491.

70. Merz A.J y So M.: Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000; 16:423-457.
71. Miller M.A. y Leavell L.C.
KIMBER-GRAY-STACKPOLE. MANUAL DE ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA.
16ª edición. México: La Prensa Médica Mexicana, 1992: 738.
72. Morré S.A., Van Valkengoed I.G.M., Jong A., Boeke J.P., Van eijk J.T.M., Meijer C.J.L.M. y Van de Brule A.J.C.: Mailed, home-obtained urine specimens: a reliable screening approach for detecting asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections, *J Clin Microbiol*, 1999; 37(4): 976-980.
73. Morré S.A., Rozendal L., Van Valkengoed I.G.M., Boeke J.P., Voorts Vander P.C., Schirm J., Blok S., Van Den Hoek A.A.R., Van Doornum G.J.J., Meijer C.J.L.M. y Van de Brule A.J.C.: Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations?, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(6): 2292-2296.
74. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. y Tenover R.H.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
6ª edición. Washington D.C.: ASM Press, 1995:636-651, 669-677.
75. Nataro J.P., Blaser M.J. y Cunningham-Rundles S.
PERSISTENT BACTERIAL INFECTIONS.
Washington D.C.: ASM Press, 2000:201-261.
76. Nau C., Anderson J.E., Boulton I.C. y Sparling P.F.: Antigenic and sequence diversity in gonococcal transferrin-binding protein A, *Infect Immun*; 2000; 68(8): 4725-4735.
77. Norris S.J., y The *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group.: Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles, *Microbiol Rev*, 1993; 57(3): 750-779.
78. Nowicki S., Selvaranga R. y Anderson G.: Experimental transmission of *Neisseria gonorrhoeae* from pregnant rat to fetus, *Infect Immun*, 1999; 67(9): 4974-4976.
79. Ojcius D.M., Bravo de Alba Y., Kanellopoulos J.M., Hawkins RA., Kelly KA., Rank RG. y Dautry-Varsat.: Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells, *J Immunol*, 1998; 160:1247-1303.
80. Ortiz L., Angenive M., Kim S-K., Watkins D. y Demars R.: T-cell epitopes in variable segments of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein

- elicit serovar-specific immune responses in infected humans, *Infect Immun*, 2000; 68(3): 1719-1723.
81. Pal S., Theodor I., Peterson E.M. y de la Maza L.M.: Immunization with an acellular vaccine consisting of outer membrane complex of *Chlamydia trachomatis* induces protection against a genital challenge, *Infect Immun*, 1997; 65(8): 3361-3369.
82. Pannekoenk Y., Westenberg S.M., de Vries J., Repping S., Spanjaard L., Eijk PP., Van Der Ende A. y Dankert J.: PCR assessment of *Chlamydia trachomatis* infection of semen processed for artificial insemination, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(10): 3763-37-67.
83. Pumarola A., Rodriguez A., Garcia J.A. y Piedrola G.
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA.
2ª edición. España: Mason-Salvat Medicina, 1992:534-541, 567-573.
84. Qu X-D., Harwing S.S.L., Oren A., Shafer W.M. y Lehrer R.I.: Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins, *Infect Immun*, 1996; 64(4): 1240-1245.
85. Qu X-D., Harwing S.S.L., Shafer W.M. y Lehrer R.I.: Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Infect Immun*, 1997;65(2):.636-639.
86. Radolf J.D.: *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins, *Mol Microbiol*, 1995; 16(6): 1067-1073.
87. Radolf J.D., Robinson E.J., Bourell K.W., Akins D.R., Porcella S.F., Weigel L.M., Jones J.D., y Norgard M.V.: Characterization of outer membranes isolates from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete, *Infect Immun*, 1995; 63(11): 4244-4252.
88. Raham M., Alam A., Nessa K., Hossain A., Nahar S., Datta D., Khan S.A., Mian R.A. y Albert M.J.: Etiology of sexually transmitted infections among street-based female sex workers in Dhaka, Bangladesh, *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3):.1244-1446.
89. Reynolds D.J. y Pearce J.H.: Endocytic mechanism utilized by *Chlamydiae* and their influence on induction of productive infection, *Infect Immun*, 1991; 59(9): 3033-3039.
90. Roitt I.
ROITT INMUNOLOGÍA.
9ª edición. Argentina: Médica-Panamericana, 1998:61, 187.

91. Salyers A.A. y Whitt D.D.
BACTERIAL PATHOGENESIS A MOLECULAR APPROACH.
Washington D.C.: ASM Press, 1994:244-259, 295-300.
92. Schachter J., Hook III E.W., McCormack W.M., Quinn T.C., Cherneshy M., Chong S., Girdner J.I., Dixon P.B., DeMeo L., Williams E., Cullen A. y Lorincz A.: Ability of Digene Hybrid Capture II Test to identify *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens, J Clin Microbiol, 1999; 37(11): 3668-3671.
93. Schaechter M., Medof G., Eisenstein B. y Guerra H.
MICROBIOLOGÍA, MECANISMOS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS. ENFOQUE MEDIANTE LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.
2ª edición. Argentina: Médica-Panamericana, 1994:244-251, 355-363, 371-378.
94. Scheuerpflug I., Rudel t., Ryll R., Pandit J. y Meyer T.: Roles of pilC and pilE in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells, Infect Immun, 1999; 67(2): 834-843.
95. Schmidt B.L., Edjlalipour M. y Luger A.: Comparative evaluation of nine different enzyme-linked assays for determination on antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis, J Clin Microbiol, 2000; 38(3): 1279-1282.
96. Sebastian S. y Attardo C.: FbpC is not essential for iron acquisition in *Neisseria gonorrhoeae*, Infect Immun, 1999; 67(6): 3141-3145.
97. Sellati T.J., Wilkinson D.A., Sheffield J.S., Koup R.A., Radolf J.D. y Norgard M.V.: Virulent *Treponema pallidum*, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1, J Infect Dis, 2000; 181:283-293.
98. Shevchenko D.V.; Akins D.R., Robinson E.J., Li M., Shevchenko O.V. y Radolf J.D.: Identification of homologs for thioredoxin, peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase, and glycerolphosphodiester phosphodiesterase in outer membrane fractions from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete, Infect Immun, 1997; 65(10): 4179-4189.
99. Shevchenko D.V.; Sellati T.J., Cox D.L., Shevchenko O.V., Robinson E.J. y Radolf J.D.: Membrane topology and cellular location of the *Treponema pallidum* glycerolphosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) ortholog, Infect Immun, 1999; 67(5): 2266-2276.

100. Shulman S.T., Phair J.P. y Sommers H.M.
INFECTOLOGÍA CLÍNICA.
4ª edición. México: Interamericana-Mc Graw-Hill, 1994:265-267, 280, 285-293.
101. Singh A.E. y Romanowski B.: Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features, Clin Microbiol Rev, 1999; 12(2): 187-209.
102. Stagg A.J., Tuffrey M., Woods C., Wunderink E. y Knight S.C.: Protection against ascending infection of the genital tract by *Chlamydia trachomatis* is associates with recruitment of major histocompatibility complex class II antigen-presenting cells into uterine tissue, Infect Immun, 1998; 66(8): 3535-3544.
103. Stam W.E.: *Chlamydia trachomatis* infections: Progress and problems, J Infect Dis, 1999; 179(suppl 2): S380-383.
104. Sturm-Ramirez K., Brumblay H., Diop K., Guèye-Ndiaye A., Sankalé J-L., Thior I., N'doye I., Hsieh C-C., Mboup S. y Kanki P.: Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk women in Senegal, West Africa, J Clin Microbiol, 2000; 38(1): 138-145.
105. Su H., Watkins N.G., Zhang Y-X. y Caldwell H.D.: *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the Chlamydial major outer membrane protein as adhesin, Infect Immun, 1990; 58(4): 1017-1025.
106. Su H., Raymond L., Rockey D.D., Fischer E., Hackstadt T. y Caldwell H.D.: A recombinat *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells, Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 11143-11148.
107. Su H., Messer R., Whitmire W., Fischer E., Portis J.C. y Caldwell H.D.: Vaccination against Chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable Chlamydiae, J Exp Med, 1998; 188(5): 809-818.
108. Su H., Messer R., Whitmire W., Hughes S. y Caldwell H.D.: Subclinical chlamydial infection of the female mouse genital trac generates a potent protective immune response: implications for development of live attenuated chlamydial vaccine strains, Infect Immun, 2000; 68(1): 192-196.
109. Suchland K., Counts J.M. y Stamm W.E.: Laboratory methods for detection of *Chlamydia trachomatis* survey of laboratories in Washington State, J Clin Microbiol, 1997; 35(12): 3210-3214.

Falta

Página

177

- immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(5): 1751-1756.
120. Van Ooij C., Homola E., Kincaid E. y Engel J.: Fusion of *Chlamydia trachomatis*-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis, *Infect Immun*, 1998; 66(11): 5364-5371.
121. Van Putten J.P.M., Duensing T.D. y Carlson J.: Gonococcal Invasion of epithelial cells driven by P.IA, a bacterial ion channel with GTP binding properties, *J Exp Med*, 1998; 188(5): 941-952.
122. Van Westreenen M., Pronk A., Diepersloot R.J.A., de Groot P.G. y Leguit P.: *Chlamydia trachomatis* infection of human mesothelial cells alters proinflammatory, procoagulant, and fibrinolytic responses, *Infect Immun*, 1998; 66(5): 2352-2355.
123. Villanueva A.V., Podzorski R.P. y Reyes M.: Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(7): 2117-2119.
124. Watson M.W., Lambden P.R., Everson J.S. y Clarke I.N.: Immunoreactivity of the 60 KDa cysteine-rich proteins of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* expressed in *Escherichia coli*, *Microbiol*, 1994; 140: 2003-2011.
125. Weigel L.M., Radolf J.D. y Norgard M.V.: The 47-Kda major lipoprotein immunogen of *Treponema pallidum* is a penicillin-binding protein with carboxipeptidase activity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 11611-11615.
126. Wicher K., Abbruscato F., Wicher V., Collins D.R., Auger I. y Horowitz H.W.: Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR, *Infect Immun*, 1998; 66(6): 2509-2513.
127. Winter A.L., Gilleran G., Eastick K. y Ross J.D.: Comparison of a ligase chain reaction-based assay and cell culture for detection of pharyngeal carriage of *Chlamydia trachomatis*, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(9): 3502-3504.
128. Zang J.P. y Stephens R.S.: Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells, *Cell*, 1994; 69:861-869.