



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, en muestras endocervicales de pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ADOLFO EVARISTO TORRES MATA

ASESORAS: M. en C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA
DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE:

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
para el diagnóstico de Chlamydia trachomatis, en muestras endocervicales
de pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer.

que presenta el pasante: Adolfo Evaristo Torres Mata
con número de cuenta: 09401202-6 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Enero de 2010.

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL ME. Fernando Flores Benitez

SECRETARIO MC. Andrea Angela Pecerril Osnaya

PRIMER SUPLENTE Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

SEGUNDO SUPLENTE MC. Ana Laura Vázquez Martínez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Por haberme apoyado en todo momento, por haberme dado amor, comprensión, respeto y cariño. Por haberme dado valores y educación. Por todos los días que trabajaron y se esforzaron para que sus hijos se prepararan y fueran mejores personas en la vida. Porque de haberlos escogido no hubiese podido escoger a otros padres mejores. Los admiro mucho gracias, los amo muchísimo.

A mis hermanos (as):

Por haberme brindado su apoyo y esfuerzo siempre que lo he necesitado. Por ser mis amigos y estar juntos en las buenas y en las malas, por haberse desvelado conmigo muchas ocasiones. Por ser las grandes personas que son siempre los voy a amar, gracias sin ustedes no lo hubiese logrado.

A mis sobrinos:

Que me han enseñado y han pasado a ser otra parte fundamental de mi vida y que sin saberlo me han motivado para que este trabajo lo haya llevado acabo. Los amo mucho nenitos.

A mi primo-hermano Eder:

Por compartir tantos momentos en la vida, por su amistad, apoyo y cariño. Te quiero mucho “mi chancla”. Gracias.

A mi amigo Kinke:

Te quiero mucho por la amistad que tenemos de toda la vida, por ser un apoyo más y por compartir tantas cosas. Gracias.

A Laura:

Por creer en mi, motivarme y apoyarme como lo has hecho, y además por ser un gran ser humano. Gracias, te amo.

A todos mis amigos y compañeros de carrera: José Luis, Lenin, Itzshel, Alma, Miriam, Fer, Dona, Yola, Betsa, Cesar, Iván, Turtle, Álvaro, Argel, Diana, Olga, Eric, Tuza, Omar, (y los que me faltaron), por compartir tantas maravillosas experiencias y que cada una de ellas la llevaré siempre en mi mente y en mi corazón. ¡¡¡Nunca los olvidaré!!!

A la Dra. Virginia Sánchez Monroy: por haberme dado la oportunidad, apoyo, confianza y paciencia para realizar este proyecto en el cual aprendí muchísimas cosas. Gracias.

A la M. C. Andrea Ángela Becerril Osnaya por su apoyo en la conclusión de este trabajo. Gracias.

A la Universidad: Por haberme formado y haberme brindado un espacio para realizar parte de mi sueño de ser alguien en la vida. ¡¡¡Muchas gracias!!!

La presente investigación se realizó en el Departamento de Biología Molecular de los Laboratorios Multidisciplinarios de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Bajo la dirección de:

Investigadora y Asesora:

Cap. 2/o Dra. Virginia Sánchez Monroy

ÍNDICE

INDICE	i
RELACION DE FIGURAS Y TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
1 INTRODUCCION	1
1.1 Estructura y Fisiología de <i>Chlamydiaceae</i>	5
1.1.1 Características Generales	5
1.1.2 Composición y estructura de <i>Chlamydiaceae</i>	8
1.1.3 Ciclo de Desarrollo	14
1.1.3.1 Adherencia y penetración	15
1.1.3.2 Multiplicación de cuerpos reticulares	17
1.1.3.3 Salida de cuerpos elementales	17
1.1.4 Metabolismo	19
1.1.5 Clasificación y Taxonomía de <i>Chlamydiaceae</i>	20
1.1.6 Infecciones y enfermedades causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	22
1.1.6.1 Biotipo Tracoma	22
1.1.6.1.1 Infecciones genitales	24
1.1.6.2 Biotipo Linfogranuloma Venéreo (LGV)	26
1.1.6.3 Otras enfermedades causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	27
1.1.6.4 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	27
1.1.6.5 <i>Chlamydia psittaci</i>	28
1.1.6.6 Epidemiología	29
1.1.6.7 Prevalencia	30
1.1.7 Diagnóstico de infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	
1.1.7.1 Diagnóstico Clínico	31
1.1.7.2 Diagnóstico por el Laboratorio	31
1.1.7.2.1 Demostración de <i>Chlamydiaceae</i> por técnicas de tinción	31
1.1.7.2.2 Aislamiento en cultivos celulares	32
1.1.7.2.3 Pruebas serológicas	32
1.1.7.2.4 Detección directa del antígeno en la muestra.	33
1.1.7.3 Métodos moleculares	34
1.1.8 Tratamiento y Prevención.	37
2. JUSTIFICACIÓN.	40

3. HIPÓTESIS.	42
4. OBJETIVOS.	43
4.1 Objetivo General	43
4.2 Objetivos Particulares	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1 Obtención de Muestras	45
5.1.1 Análisis de las muestras	46
5.2 Extracción y Purificación de ADN	46
5.3 Comprobación de integridad de ADN	47
5.3.1 Cuantificación de ADN por espectrofotometría	48
5.4 Estandarización de PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>	48
5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	49
5.4.2 Parámetros de amplificación de ADN	49
5.4.3 Comprobación de amplificación	50
5.5 Análisis estadístico.	50
6. Resultados	51
6.1 Integridad de ADN	51
6.2 Estandarización de PCR	51
6.2.1 Cuantificación de ADN por espectrofotometría.	54
6.2.2 Curva de sensibilidad.	55
6.3 Análisis de datos.	55
7. DISCUSION	61
8. CONCLUSIONES	68
9. RECOMENDACIONES	69
10. BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	78

FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURA 1. Plásmido clamidial.	8
FIGURA 2. Representación esquemática de un cuerpo elemental	10
FIGURA 3. Representación de envoltura de CE clamidial	13
FIGURA 4. Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydiae</i>	18
FIGURA 5. Pureza e integridad del ADN genómico de las muestras endocervicales en estudio.	51
FIGURA 6. Estandarización de PCR amplificando fragmentos de 241 pb en geles de agarosa al 2%.	53
FIGURA 7. Curva de sensibilidad de amplificación del fragmento de ADN del plásmido críptico de <i>C. trachomatis</i> con un tamaño de 241 pb mediante el uso de los iniciadores KL-1 y KL-2.	55
TABLA 1. Diferencias biológicas entre cuerpos elementales y cuerpos reticulares.	6
TABLA 2. Clasificación revisada de la familia <i>Chlamydiaceae</i>	21
TABLA 3. Secuencia de iniciadores utilizados para la detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras endocervicales	49
TABLA 4. Estandarización de concentraciones y volumen utilizado en cada reactivo para cada mezcla de reacción de PCR.	52
TABLA 5. Número de casos positivos y negativos de infección genital por <i>C. trachomatis</i> en pacientes de la CEM por medio de PCR y Vidas CHL.	56
TABLA 6. Prevalencia de infección genital de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras positivas por PCR y su relación con la edad.	57
TABLA 7. Presencia y ausencia de aborto en casos PCR positivos y negativos para <i>C. trachomatis</i> .	58
TABLA 8. Métodos anticonceptivos empleados por pacientes.	59
GRAFICO 1. Porcentaje de casos PCR positivos y negativos para <i>Chlamydia trachomatis</i>	57
GRAFICO 2. Presencia y/o ausencia de abortos en pacientes con infección por <i>C. trachomatis</i>	58
GRAFICO 3. Frecuencia del método anticonceptivo empleado por pacientes	59
GRAFICO 4. Comparativo de resultados por PCR en pacientes que utilizaron un método anticonceptivo diferente al de barrera y quienes no utilizaron	60

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CE	Cuerpo Elemental
CEM	Clínica de Especialidades de la Mujer
CI	Cuerpo Intermediario
CR	Cuerpo Reticular
DFA	Anticuerpos Fluorescentes Directos
dNTP's	Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
dd H ₂ O	Agua bidestilada estéril
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
IEA	Inmunoensayo
IF	Inmunofluorescencia
IFN- γ	Interferon gamma
ITS	Infecciones de Transmisión Sexual
KDO	3-deoxy-D-mano-octulosanato
LGV	Linfogranuloma Venéreo
LPS	Lipopolisacárido
m.o.	microorganismo
MOMP	Proteína Mayor de Membrana Externa
OmcA	Proteína del complejo de membrana externa A
OmcB	Proteína del complejo de membrana externa B
PC	Plásmido Críptico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POMP	Polimorfismos de proteínas de membrana externa
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SEDENA	Secretaría de la Defensa Nacional
VIDAS-CHL	Inmunoensayo empleado en la Clínica de Especialidades de la Mujer para la detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>

RESUMEN

Chlamydia trachomatis es una de los patógenos de transmisión sexual que se encuentra más ampliamente distribuido en el mundo y presenta un ciclo de desarrollo intracelular peculiar, lo cual, hace difícil su diagnóstico. Existen varias pruebas comerciales para su detección pero muchas de ellas presentan limitaciones técnicas y una disminuida sensibilidad. La técnica de PCR por sus características particulares ofrece una elevada sensibilidad y especificidad para la detección del microorganismo. El objetivo principal de este trabajo fue estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando un par de iniciadores (KL-1, KL-2) específicos para la secuencia genética del plásmido criptico que posee clamidia, así como también, compararlo con el método inmunológico (Vidas-Chl.) utilizado para su detección en la Clínica de Especialidades de la Mujer de la SEDENA en la Ciudad de México.

Se recolectaron 98 muestras endocervicales de pacientes que acudieron a la CEM. Se realizó la extracción del material genómico a cada una de ellas y como control de calidad de la misma se amplificó por PCR una región del gen de la proteína β -globina humana para cada muestra obtenida. La amplificación por PCR generó un fragmento de 241 pares de bases al ser observado en geles de agarosa al 2%, cuyas condiciones óptimas de amplificación por PCR estandarizadas fueron: primero un ciclo de 94°C por 10 min.; posteriormente 35 ciclos con 94°C/ 30 seg. 60°C/ 30 seg. y 72°C/ 30 seg. y finalmente un ciclo de 72°C/ 10 min. La cantidad mínima detectable del fragmento amplificado fue de 1 pg/ μ L. Los resultados obtenidos arrojaron una prevalencia del 20.4% cuando se utilizó la PCR; mientras que, para Vidas-Chl se obtuvo únicamente una muestra positiva (1.02%), la cual se reportó como indeterminada. Se consideró estadísticamente significativa ($p < 0.05$) el hecho de haber tenido al menos un aborto. Aunque se pudo observar que factores como ser menor de 30 años de edad, no utilizar método anticonceptivo de barrera para las relaciones sexuales y mostrar algún problema de esterilidad sumado a un antecedente de aborto puede tener relación con la presencia de este microorganismo. La estandarización de la PCR para la detección de clamidia fue realizada obteniendo una sensibilidad y especificidad elevada, ésta puede ser empleada para un mejor diagnóstico de la infección genital por dicha bacteria.

1. INTRODUCCION

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) comprenden todas las enfermedades infecciosas en que la transmisión sexual tiene una importancia epidemiológica. En los últimos años se ha ido reconociendo su amplio espectro clínico, así como sus complicaciones, no sólo para el paciente y sus parejas sexuales sino también para su descendencia.

Con la aparición de los antibióticos y el desarrollo de la diversidad y especificidad de los mismos, las enfermedades venéreas pudieron ser tratadas de forma adecuada, lo que condujo a una disminución drástica de la frecuencia y número de ellas. Sin embargo desde hace unos 30 años se ha ido incrementando notablemente su frecuencia y actualmente las infecciones de origen viral, como lo son el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus, hepatitis (B y C principalmente) y papilomavirus, además de las bacterianas clásicas como *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum* que, (están en franco descenso en países desarrollados, mientras que en países en subdesarrollo tienen un carácter epidémico) afectan a una gran parte de la población dado que su distribución no es uniforme, de tal manera que, a pesar de los diversos antibióticos, retrovirales y otros medicamentos, la frecuencia de dichas enfermedades es alarmante, principalmente aquellas que cursan con procesos inflamatorios inespecíficos, pasando desapercibidas por el médico y el personal de laboratorio, quienes con frecuencia ignoran la existencia de los microorganismos patógenos.^(15, 58)

La mayoría de las ETS, cursan con procesos inflamatorios que se clasifican como específicos cuando se determina el agente causal e inespecífico cuando este se desconoce.⁽¹⁵⁾

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) figuran entre las principales causas de enfermedad en el mundo. Durante los últimos 30 años su importancia se ha acrecentado debido a su relación con graves problemas del aparato reproductor. Aunque la magnitud exacta del problema no es bien conocida, en los países industrializados al menos 1 de cada 100 personas es consultada por una ETS, anualmente. En los países en desarrollo éstas figuran entre los cinco motivos más frecuentes de consulta en los servicios de salud. Cada año más de 333 millones de personas en el mundo adquieren una de ellas, la mayoría de las cuales son previsible y curables. En muchos casos, éstas infecciones permanecen asintomáticas y sin tratamiento, con riesgo de contagio a otros individuos y con la posibilidad de ocasionar serios problemas de salud, incluyendo infertilidad. Previamente, las ETS de mayor relevancia eran sífilis y gonorrea, sin embargo en la actualidad la bacteria más frecuente en infecciones del tracto genital es *Chlamydia trachomatis* mostrando una incidencia mayor o igual a *Neisseria gonorrhoeae*.^(12, 14, 15, 20, 32)

Las clamidias son bacterias pequeñas que sólo pueden crecer dentro de las células del hospedador y causar muchos padecimientos. Al menos tres especies causan enfermedades en el ser humano, *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pneumoniae* principalmente.⁽⁴⁹⁾

Historia

Desde tiempos remotos se han observado y descrito algunas manifestaciones clínicas de la familia *Chlamydiaceae*, tales como el tracoma, la conjuntivitis de inclusión, linfogranuloma venéreo (LGV), uretritis no gonocócica, cervicitis, psitacosis, daño al aparato respiratorio, entre otras.

El tracoma es uno de los males antiguos conocido y descrito en Egipto 15 siglos antes de Cristo. El papiro de Ebers es uno de los documentos médicos más antiguos que se conocen en el mundo occidental, describe perfectamente las características clínicas del tracoma así como diversas formas de tratamiento. Por otra parte, los bubones inguinales del linfogranuloma en hombres fueron descritos desde hace 200 años y la psitacosis o fiebre de los loros fue observada en Suiza en 1880 ⁽¹⁵⁾.

El aislamiento del agente causal del LGV por Helleström y Wassen en 1930, da inicio a la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico para incrementar así la sensibilidad, especificidad, disminuir tiempo y costo. ⁽¹⁵⁾

El avance en el diagnóstico de *C. trachomatis* estuvo basado primero en el cultivo en embrión de pollo por Pekin, Tang y cols. en 1957; posteriormente, el cultivo celular hecho por Gordon y Quan en 1965 (conocido como estándar de oro, hasta hace poco), y los métodos serológicos como inmunofluorescencia (IF) e Inmunoensayo (EIA) y de amplificación de ácidos nucleicos en la actualidad.

ANTECEDENTES

Chlamydia trachomatis, es la más diversificada de las tres especies que afectan al humano; causa enfermedades, agudas y crónicas, de la mucosa ocular, los pulmones, el tracto genital y otros órganos. Puede subdividirse en varias cepas, denominadas biovares, cada una asociada con un espectro diferente de enfermedades. Aunque la cepa que causa el tracoma, también puede ocasionar infecciones genitales. ⁽⁴⁹⁾

- En 1990, Ostergaard L. y cols. probaron 2 pares de iniciadores para amplificar fragmentos de la secuencia del plásmido críptico por PCR, el cual esta presente en todas las serovariedades de *C. trachomatis*, encontrando que la PCR muestra una sensibilidad mayor a la mostrada por el cultivo celular. ⁽⁴²⁾

- En 1990, Bobo y cols. realizaron un estudio en el cual encontraron que el ADN amplificado por PCR (utilizando iniciadores dirigidos contra la MOMP), e hibridado con ARN el cual es cuantificado por un inmunoensayo, muestra una mejorada capacidad de detección de *C. trachomatis* en muestras cervicales, detectando desde 1 hasta 4 cuerpos de inclusión. ⁽⁷⁾

- En 1992, Mahony y cols. compararon un nuevo set de iniciadores dirigidos contra el P.C. (KL1-KL2) por medio de PCR, contra un inmunoensayo Chlamydiazyme (EIA) verificando resultados con el uso de un nuevo par de iniciadores, en muestras de 683 hombres (592 no presentaban síntoma alguno de infección por *C. trachomatis*), encontrando que, la PCR fue 100% sensible y específica ya que detecto 31/31 muestras positivas de hombres sintomáticos y 9/9 muestras positivas de hombres asintomáticos; mientras que, EIA fue 100% específica pero 92.5% sensible detectando sólo 37/40 muestras positivas. ⁽³³⁾

- En 1993, Mahony y cols. realizaron un estudio comparativo entre 5 diferentes ensayos de PCR los cuales incluyeron dos dirigidos al PC,

dos a la MOMP y uno dirigido a rRNA, obteniendo que la amplificación para el plásmido es la más sensible. ⁽³⁴⁾

Una serie de estudios recientes han empleado al plásmido, MOMP, rRNA para la detección de esta bacteria, indicando que la PCR tiene una excelente sensibilidad, incluso confirmando que es más sensible y específica que el cultivo celular y EIA ^(4, 24, 26, 36, 48, 51)

1.1 Estructura y Fisiología de *Chlamydiaceae*

1.1.1 Características Generales

Chlamydiaceae está constituido por cocos Gram negativos inmóviles, genoma pequeño y su tamaño oscila entre 0.2 y 1.5 μm . *Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada. Además, es incapaz de generar su propia energía y debe tomarla de otra célula, por lo que, sólo se puede reproducir en el interior de vesículas citoplasmáticas de células eucariotas a través de un ciclo de desarrollo único que, conlleva a la formación de cuerpos elementales infecciosos (CE) y cuerpos reticulados no infecciosos (CR). Ambas formas de la bacteria cuentan con ciertas características que las definen (Tabla 1). ^(15, 17, 43, 44)

TABLA 1. Diferencias biológicas entre cuerpos elementales y cuerpos reticulares.

PROPIEDADES	CUERPOS ELEMENTALES	CUERPOS RETICULARES
Infectividad	Si	No
Multiplicación	No	Si
Inhibición de fusión fagolisosoma	Si	No
Toxico para el ratón	Si	No
Tóxico para macrófagos	Si	No
Transporte de ATP	No	Si
Síntesis de proteínas	No	Si
Tamaño (nm)	200 - 400	800 – 1000

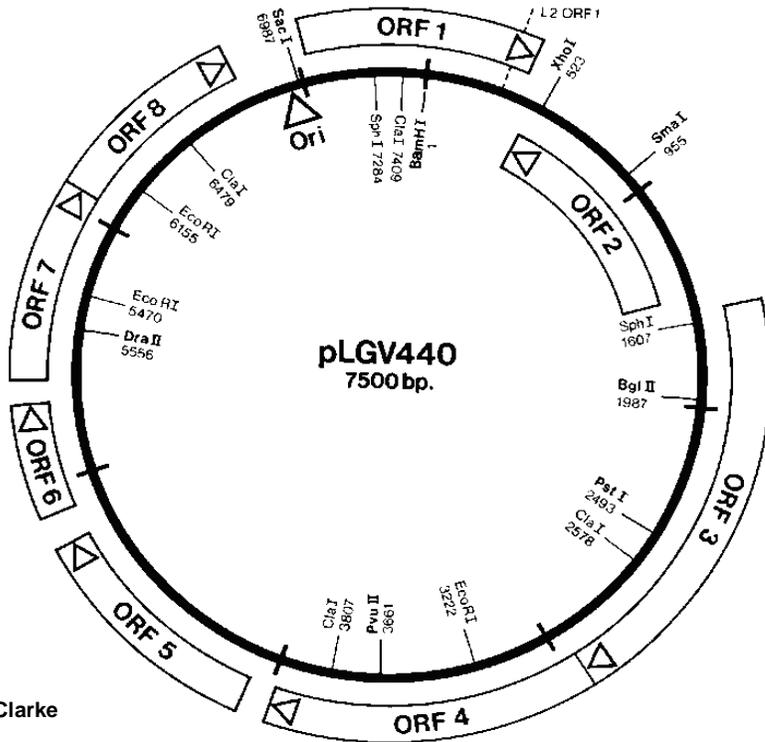
Modificada de Moulder, J. W. ⁽²⁹⁾

Éste organismo patógeno es casi exclusivamente humano, contiene plásmidos (moléculas de ADN circulares autorreplicativas).

Casi todos los plásmidos conocidos son de ADN bicatenario y circular, cuyo tamaño es menor que la veinteava parte del tamaño de un cromosoma. Éstos se encuentran presentes normalmente en algunos microorganismos, a los cuales favorecen en alguna función. Ciertos plásmidos son muy notorios porque confieren a las bacterias resistencia a un antibiótico, lo cual se torna ventajoso para la bacteria portadora, y asegura su subsistencia. Todo plásmido contiene una secuencia de nucleótidos particular, denominada “origen de replicación”, que es reconocida por una polimerasa y permite la replicación del plásmido. La mayoría de las enzimas implicadas en la

replicación de los plásmidos son enzimas celulares, de modo que los genes del plásmido que la controlan se limitan principalmente a conducir temporalmente el proceso de iniciación y el reparto de los plásmidos replicados entre las células hijas. El número de copias plasmídicas presentes por célula puede ser de 1-3 copias, mientras que otros pueden estar presentes en más de 100 copias. Todos los plásmidos deben llevar genes que aseguren su propia replicación. Sin embargo, en el caso de muchos de ellos se conoce muy poco de la naturaleza de los otros genes que llevan, denominándose como plásmidos crípticos ^(43, 54).

Chlamydia trachomatis posee un plásmido críptico circular de 7493 pares de bases con ocho marcos abiertos de lectura (ORF) Figura 1. Se encuentra a razón de 7-10 copias por partícula clamidial y presenta un alto grado de conservación entre diferentes aislamientos de *C. trachomatis*, y además, no es esencial para la supervivencia de la bacteria ^(43, 54).



I.N. Clarke

www.chlamydiae.com

Figura 1. Plásmido clamidial. Se indican los sitios de corte con enzimas de restricción, los marcos abiertos de restricción (ORF) y el origen de la réplica.

1.1.2 Composición y estructura de *Chlamydiaceae*

La composición de cada una de las formas de la bacteria posee características particulares que no se han encontrado en otras bacterias. El ciclo de desarrollo de *Chlamydiaceae* involucra tres diferentes formas:

1. Cuerpo Elemental (CE) tienen una elevada densidad y un tamaño pequeño de 0.3 a 0.35 μm . en diámetro.

2. Cuerpo Reticular (CR) se componen de material interno un poco homogéneo y un tamaño de 0.6 a 1.3 μm . en diámetro.
3. Cuerpo Intermediario (CI) tienen un núcleo denso característico céntrico.

Los cuerpos clamidiales se encuentran rodeados por una membrana trilaminar con un espesor de 75 a 80 Å. Los CR y CI poseen además otra membrana trilaminar, la membrana citoplasmática, es vista sólo por debajo de la pared celular de ambas formas clamidiales.

Los CE tienen un núcleo denso en una región excéntrica y el citoplasma esta compuesto de ribosomas y moderadamente denso. Por otra parte, el citoplasma esta compuesto de un material amorfo y un arreglo circular de finas fibras de ADN que pueden ser vistas en la región nuclear. Los CR poseen características diferentes en las estructuras internas dependiendo de la etapa en la fase de multiplicación que se encuentren.

Una característica particular única observada en *Chlamydiaceae* (en CE y CR) es la presencia de proyecciones de superficie las cuales están en formación hexagonal a manera de parche (Figura 2). Cada proyección sobresale desde la membrana interna hasta el exterior con un tamaño aproximado de 90 nm y un ancho de 6nm y una estructura base de 30 nm de diámetro rodeados por una estructura en forma de flor (roseta) con nueve pétalos o subunidades. Cada una de las proyecciones esta conectada con la membrana citoplasmática a través de la roseta en la pared celular. El número de proyecciones observadas en promedio por cuerpo clamidial es de 20, y a través de las cuales han sido vistas fibras de ADN que se extienden a partir del núcleo condensado. ⁽³⁰⁾ La asociación de tales estructuras con la membrana de inclusión sugiere que

Chlamydiaceae posee un sistema de secreción tipo III, encontrado en otras bacterias gram negativas patogénicas. Esta secreción es usualmente activada por contacto, inoculando deliberadamente proteínas efectoras directamente dentro del citoplasma de la célula huésped. Las proteínas inyectadas rompen los mecanismos de señales de transducción y los arreglos del citoesqueleto, principalmente para la endocitosis de la bacteria por células epiteliales, o muerte de fagocitos profesionales, u otros eventos que ayudan a las bacterias a establecer un parentesco parasitario. ^(11, 54)

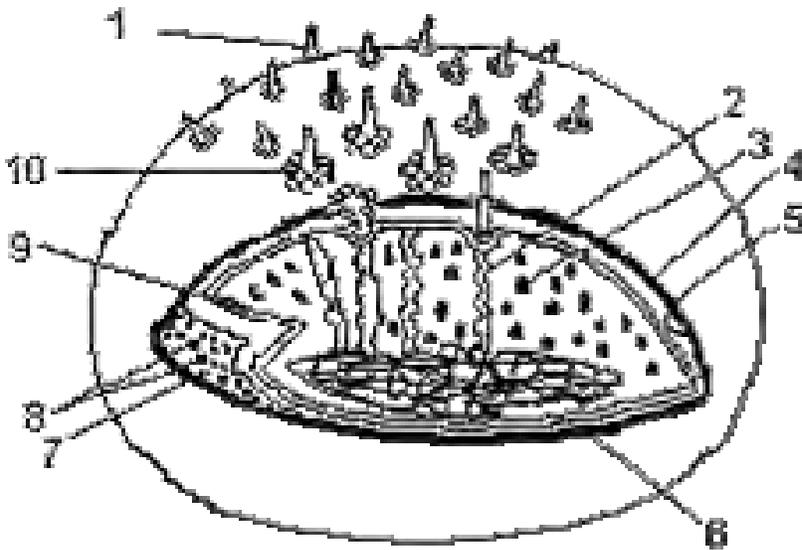


Figura 2. Representación esquemática de un CE. 1. Proyecciones de superficie; 2. Hebras de ADN; 3. Ribosomas; 4. Pared celular; 5. Capa hexagonal; 6. Núcleo; 7. Capa intermedia; 8. Partículas; 9. Membrana citoplásmica; 10. Rosetas

A diferencia de las bacterias Gram negativas en las que el peptidoglicano es responsable de la integridad osmótica de las mismas, en *C. trachomatis* el peptidoglicano al igual que el ácido murámico, se ha

encontrado sólo a nivel de trazas, aunque posee la mayoría, sino todos los genes para su producción. Son afectadas en su crecimiento por antibióticos (penicilina, eritromicina, tetraciclina, entre otros) y poseen proteínas fijadoras de penicilina. Se sabe que la penicilina y la D-cicloserina, son inhibidores de ensamblaje de peptidoglicano y afecta adversamente la división celular ^(11, 53). Por lo tanto se esperaría que clamidia posea una estructura similar al peptidoglicano de otras bacterias. En su membrana externa contiene una malla sólida compuesta de puentes disulfuro entrecruzado con cisteína y éstos a su vez enlazados a la membrana externa y proteínas periplásmicas que le brindan rigidez y estabilidad osmótica; ya que los CR's contienen mucho menos cisteína que los CE's Además de que se ha encontrado que poseen en la cara interna de la pared celular una estructura hexagonal macromolecular, la cual también, brinda rigidez. Dicha estructura es vista en CE y en CR sólo en pequeñas áreas dependiendo de la fase en desarrollo en la que se encuentra. ⁽²⁹⁾

A nivel molecular la membrana externa de los CE está compuesta principalmente de dos proteínas ricas en cisteína OmcA y OmcB, MOMP, LPS y otras proteínas accesorias (Figura 3). Las proteínas OmcA y OmcB están asociadas funcionalmente al complejo de membrana externa, y se encuentran sólo en ciertas fases de desarrollo. Por otra parte, la proteína OmcB ha sido implicada como porina y en el proceso de adherencia como receptor en las fases tempranas de la interacción del CE con la célula huésped y sólo ha sido encontrada sobre CE, además de que en la biovar LGV tiene mayor alcalinidad y carga negativa que en la biovariedad tracoma. Debido a esto es posible que la adherencia de las biovariedades LGV sea más eficiente que las tracoma. En un estudio ⁽⁴⁹⁾ se encontró que existe una clara diferencia en la utilización del citoesqueleto de la célula huésped por la biovariedad LGV en

mayor grado que por la biovariedad *C. trachomatis* genital; ya que al romper los microfilamentos y microtúbulos con citocalasina D y vinblastina respectivamente, se disminuyó la eficiencia para infectar las células blanco por la biovariedad LGV. Mientras que la biovariedad genital entra y sale de la célula por la superficie apical después del desarrollo de su ciclo, LGV puede entrar a la célula hospedadora por diversas rutas y ambas superficies apical o basolateral y salir por cualquiera de las dos superficies, por ser más invasiva con respecto al biotipo genital.

La proteína MOMP, se encuentra expuesta en la membrana externa de CE y CR constituye un 60% del peso de la membrana, siendo ésta una proteína rica en cisteína de aproximadamente 40 KDa. Entre las propiedades que se le han encontrado son como auxiliar en la adhesión a la célula hospedadora, como porina y contiene epitopos antigénicos de superficie. En *Chlamydiaceae* se ha observado que presentan 4 secuencias serovar-variables flanqueadas por secuencias conservadas. Las regiones variables contribuyen a ser expuestas en la superficie y la MOMP es inmunodominante en todas las especies excepto en *C. pneumoniae* lo que le da una disminución aparente de antigenicidad, al parecer, debido a que las regiones variables expuestas de la MOMP no son reconocidas por los sistemas inmunes de humanos y animales o por ser enmascaradas por algunos de los polimorfismos de proteínas de membrana externa (POMP o Pmp). La función de las POMP en el desarrollo clamidial es desconocida, pero se sabe que son inmunoreactivas y que le pueden brindar variabilidad a la membrana externa. Han sido identificados nueve genes POMP en el genoma de *C. trachomatis* de 21 identificados en diferentes especies. La presencia de un número tan grande de genes Pmp a lo largo del genoma sugiere que la recombinación es un importante mecanismo

para su amplificación y variación. El lipopolisacárido (LPS) es un epítipo trisacárido específico para la familia *Chlamydiaceae*. El cual es considerado por ser de una variedad rugosa similar a la encontrada en bacterias entéricas, excepto por tener una estructura básica de KDO trisacárido. Este enmascara la hoja externa de la membrana externa ya que es varias veces menos inmunoestimulante y endotóxico que el LPS de bacterias entéricas. El LPS se considera como un antígeno de grupo y es de gran utilidad en el diagnóstico de laboratorio de algunas enfermedades clamidiales. (29, 43, 54)

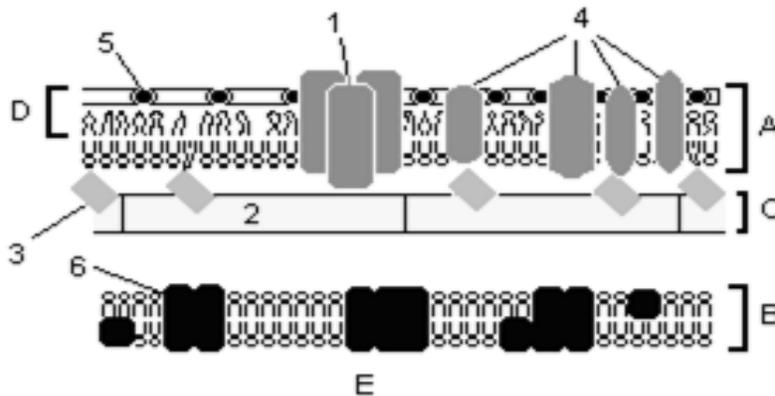


Figura 3. Representación de envoltura de CE clamidial. (Everett y Hatch, 1995). A) Membrana externa; B) Membrana interna; C) Capa periplasmica; D) LPS; E) Citoplasma. 1) MOMP; 2) Proteína rica en cisteína B, de bajo peso molecular; 3) Proteína rica en cisteína A, de bajo peso molecular; 4) POMP's; 5) Cation divalente; 6) Proteínas de membrana interna.

El material genético de *Chlamydiaceae* consiste en ADN de doble cadena en arreglo circular. Su tamaño varía entre las especies; de tal manera que el ADN cromosomal de *C. trachomatis* contiene aproximadamente 1043

Kb y un plásmido de 7.5 Kb el cual se ha encontrado en todos los serotipos de *C. trachomatis*; mientras que el de *C. pneumoniae* es de 1230 Kb y carece de plásmido. (5, 11, 29, 43, 54)

Al secuenciar el genoma de 2 serotipos de *C. trachomatis* y 3 de *C. pneumoniae* en un estudio, se observó que, sus diferencias son significantes, ya que *C. pneumoniae* posee 21 genes para proteínas Pmp y perdió los genes para la biosíntesis de triptófano; a diferencia de *C. trachomatis* que sólo posee 9 genes Pmp, genes para la biosíntesis de triptófano y además tiene genes de la familia HKD los cuales se cree también intervienen con los procesos normales de la célula hospedadora. Sugiriendo esto que forma parte de un mecanismo de persistencia de infección clamidial debido a la limitación de triptófano inducida por IFN- γ . Por otra parte, *C. trachomatis* tiene aproximadamente 70 genes sin homología a *C. pneumoniae*, y ésta posee aproximadamente 200 genes sin homología a *C. trachomatis*.⁽¹¹⁾ Estas diferencias sugieren que son especies que representan sistemas específicos de especie. El análisis del genoma clamidial a mostrado que codifica para 875 proteínas aproximadamente, que no son necesariamente expresadas, 70 de las cuales son exclusivas de *Chlamydia trachomatis*⁽⁴³⁾

Las clamidias difieren de todas las demás bacterias por tener un ciclo de desarrollo intracelular único en dos etapas, pero no obstante, poseen todas las características comunes a ellas, con excepción de que carecen de algunas de las actividades metabólicas necesarias para la reproducción extracelular.

1.1.3 Ciclo de Desarrollo

Como otros parásitos energéticos intracelulares *Chlamydiaceae* ha evolucionado morfológicamente en distintas formas reproductivas e

infecciosas. Los CE clamidiales nunca se dividen, su papel es el de acarrear la enfermedad de una célula a otra, reorganizándose dentro de ella en CR, los cuales son metabólicamente activos y se multiplican por fisión binaria dentro de vacuolas o inclusiones intracitoplasmáticas. Una diferencia estructural entre CR y CE radica en la capacidad de presentar en las proteínas de membrana externa un complejo de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Debido a que en los CR están ausentes los puentes proteicos, esta forma es osmóticamente frágil; sin embargo los CR están protegidos por su localización intracelular. ^(29, 40)

La replicación de *Chlamydiaceae* mediante su ciclo de desarrollo (Figura 4) ocurre en las células del hospedador susceptibles. El ciclo se inicia cuando los cuerpos elementales se pegan a las microvellosidades de las células blanco, seguidos de la penetración activa en ellas. Después de ser internalizadas por un proceso denominado “endocitosis mediada por el parásito”, las bacterias permanecen en los fagosomas citoplasmáticos, donde tiene lugar el ciclo de replicación. ⁽²⁹⁾

El ciclo consta de 3 fases principales de desarrollo:

- a) Adherencia y Penetración del CE.
- b) Multiplicación de CR.
- c) Salida de CE.

1.1.3.1 Adherencia y penetración

El inicio del ciclo se manifiesta con el ataque de los CE infecciosos a la célula hospedadora, este puede ser realizado por diferentes mecanismos en conjunto para garantizar la adherencia al hospedador y su posterior internalización de manera muy eficiente. De entre los mecanismos principales

empleados por el microorganismo son por el uso de fuerzas electrostáticas, por proyecciones de membrana externa y por receptores de superficie. La penetración consiste en dos pasos, el primero comienza con la adherencia de los CE sobre la membrana de la célula hospedadora. El segundo paso consiste en la entrada por endocitosis de los CE a la célula blanco, quedando dentro de una vacuola fagocítica o fagosoma. La adherencia y la formación del fagosoma dura de 2 a 4 horas. La sobrevivencia intracelular de la bacteria se debe a la presencia en la pared celular de los CE de una molécula termolábil que da lugar a la inhibición de la unión fagolisosoma. ^(15, 29, 54) La fusión fagolisosomal no se produce si la membrana externa está intacta. Si la membrana externa está dañada o las bacterias son inactivadas por calor o cubiertas por anticuerpos, ocurre la fusión fagolisosomal con la posterior muerte bacteriana. Lo cual sugiere que algún componente superficial de las clamidias (que puede ser enmascarado o inactivado por los anticuerpos del hospedero) impide la fusión. Una vez dentro del hospedador las clamidias forman colonias microscópicas (denominadas inclusiones intracitoplasmáticas) que pueden ocupar más de la mitad del volumen celular. ^(39, 49)

Uno de los principales pasos para la infección clamidial es la adhesión a la superficie de la célula hospedadora blanco. La información arrojada por la investigación de este m.o. es que la invasión celular es interpretada como un proceso de endocitosis mediada por receptor. Se han encontrado un número potencial de ligandos clamidiales para su desarrollo, los cuales enlazan un receptor celular del hospedero que media la entrada de *Chlamydiaceae*. De entre ellos se destaca heparan sulfato, el cual hipotéticamente *Chlamydiaceae* tiene la habilidad de enlazar usándolo posteriormente como mediador de invasión comprometiendo un receptor celular del huésped. ^(15, 54)

1.1.3.2 Multiplicación de CR

La multiplicación de los CR se realiza por fisión binaria para dar lugar a la formación de 100 a 1000 nuevas partículas infectantes (CE) las cuales tienen parecido morfológico a un coco Gram negativo excepto por su carencia de la capa de peptidoglicanos en la pared externa. En esta etapa del ciclo *C. trachomatis* comienza a acumular glucogéno en las inclusiones a diferencia de *C. psittaci* cuyos CR no acumulan glucogéno, siendo observables en tinciones con yodo. Se observa una distribución dispareja de los componentes internos de CR y se nota una agregación de material fibroso, y un aumento de tamaño de la inclusión ocupando gran parte del citoplasma de la célula. Todos los procesos son realizados a partir de los mecanismos biosintéticos de la célula hospedera compitiendo por los nutrientes, por lo que si decae la proporción de éstos a valores críticos, el desarrollo clamidial será suspendido temporalmente. Este proceso dura de 20 a 36 horas y se efectúa todo el proceso clamidial. ^(29, 50)

1.1.3.3 Salida de CE

Al final del ciclo después de 48 a 72 hpi., la inminente destrucción de la célula es observable, desarrollando degeneración y necrosis progresiva de organelos celulares. La liberación de los CE, se realiza mediante la lisis de la célula hospedera, infectando nuevas células para iniciar nuevamente el ciclo de desarrollo que permite su sobrevivencia. ^(15, 29, 50)

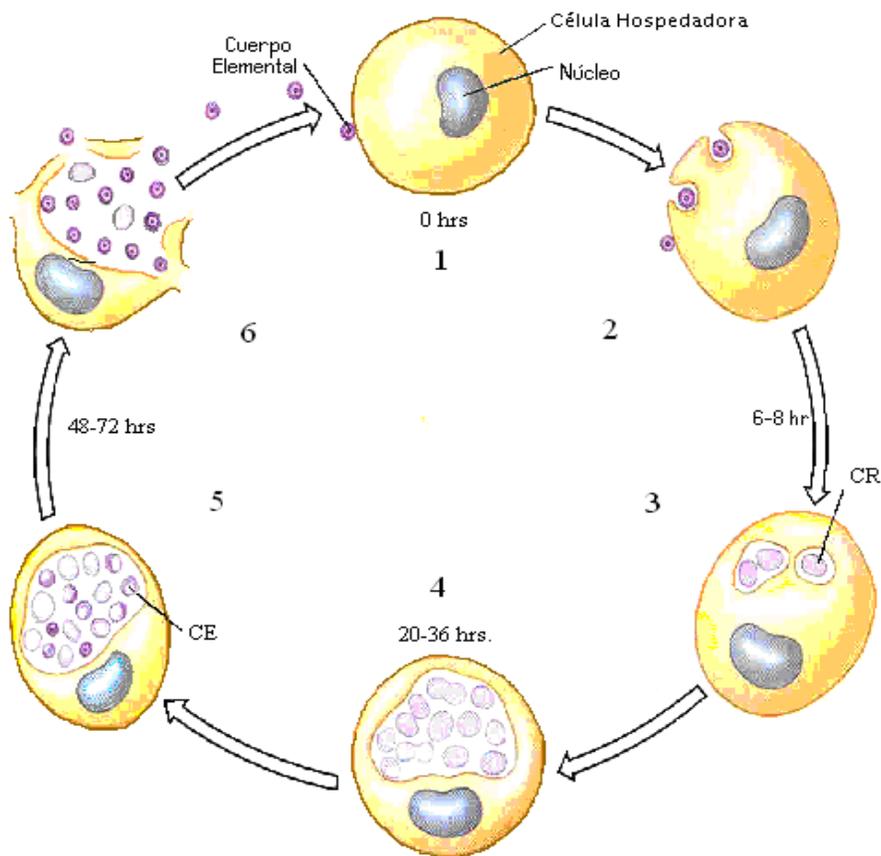


Figura 4. Ciclo de desarrollo de *Chlamydiae* (Black G., 2005) **(1)** Los pequeños cuerpos elementales infecciosos (al comienzo del ciclo de desarrollo) atacan a la célula huésped y, **(2)** penetran en ella por fagocitosis o endocitosis. **(3)** Los CE dentro de la vacuola pierden su gruesa pared y se transforman en CR alargados. **(4)** Los CR se dividen rápidamente llenando a la célula de progenie. **(5)** Los CR son reorganizados en CE los cuales, **(6)** son liberados por lisis celular y pueden iniciar nuevamente el ciclo.

1.1.4 Metabolismo

En adaptación a la vida intracelular, clamidia al parecer desarrolló mecanismos para la explotación de compuestos ricos en energía de sus hospedadores y que al tenerlos subsecuentemente perdió cualquiera de los sistemas de producción de energía que pudiera haber tenido antes. Los hospedadores libres de clamidias no tienen otras enzimas respiratorias que las piridinoproteínas, estas catabolizan glutamato, glucosa y piruvato para una cantidad limitada pero sin la producción de energía útil y las células hospedadoras infectadas no desarrollan mecanismos generadores de energía nueva. Sin embargo hospederos libres de cuerpos reticulares de ambos, *C. psittaci* y *C. trachomatis* mueven ATP dentro y ADP fuera de sus espacios intracelulares a modo de un sistema de intercambio ATP-ADP y utilizan el ATP derivado del huésped para la síntesis de proteínas clamidiales. Tal mecanismo para el transporte de ATP intacto dentro de una célula solo ha sido descrito en *Rickettsiae*.⁽²⁹⁾

LOS estudios del genoma muestran que *Chlamydiae* tiene la información genética necesaria para sintetizar al menos algo de ATP por sí misma, aunque también indican estos que, puede transportar ATP desde las células huésped.^(43, 44) En cuanto a los genes para los pasos en las rutas tales como síntesis de aminoácidos, nucleótidos, y síntesis de cofactor están a menudo ausentes, sugiriendo una confianza general sobre los intermediarios derivados del hospedador. Además las rutas metabólicas centrales tales como la glucólisis y la ruta de los ácidos tricarboxílicos (TCA) no están del todo completas pero, rutas alternativas podrían estar en otros genes que están presentes^(11, 53). Por otra parte, Nicholson y cols. (2004), no encontraron en *C. trachomatis* respuesta adaptativa al variar la fuente de carbono disponible

para su metabolismo; como lo hacen muchos microorganismos al recurrir a diversos mecanismos sofisticados para ajustarse a los nutrientes disponibles en el medio. Todos los plásmidos de *C. trachomatis* aislados de humanos son extremadamente similares con menos del 1% de variaciones en la secuencia de nucleótidos, todos tienen alrededor de 7500 nucleótidos ⁽⁴²⁾, lo cual, los hace idóneos para su detección.

1.1.5 Clasificación y Taxonomía de *Chlamydiaceae*

Chlamydiaceae consta de tres especies principales que infectan a los humanos: *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pneumoniae*. Cada una de ellas causa una entidad clínica diferente afectando la vista, los aparatos respiratorio y reproductor, además de causar daño cardíaco, hepático y renal.

Chlamydia trachomatis ha sido dividida en tres biovars: tracoma, LGV y murina (agente causal de neumonía en ratones). Las primeras dos se han encontrado en estudios de secuenciación de ADN que están muy estrechamente relacionadas; mientras que, la tercera tiene una menor relación. *C. trachomatis* comprende 18 serotipos (divididos por sus variantes antigénicas en las principales proteínas de la membrana externa (MOMP)). Los serotipos A, B, Ba y C han sido encontrados usualmente relacionados con tracoma; del D al K con el tracto urogenital, y L1, L2, L2a L3 y L3a con LGV ^(2, 31, 39, 43, 49, 50).

En 1999, la taxonomía de la familia *Chlamydiaceae* se revisó extensamente tomando como base los estudios genéticos de estos microorganismos. (Tabla 2). Previamente, la familia consistía en un género, *Chlamydia*, con cuatro especies. Ahora la familia se ha dividido en 2 géneros: *Chlamydia* y *Chlamidophila*. *C. trachomatis* ha permanecido en el género

Chlamydia, pero *C. psittaci* y *C. pneumoniae* se han pasado al nuevo género, *Chlamydophila*. Otras especies se han situado en los dos géneros, pero son patógenos humanos infrecuentes.

TABLA 2. Clasificación revisada de la familia *Chlamydiaceae*.

Género <i>Chlamydia</i>	Género <i>Chlamydophila</i>
<i>C. trachomatis</i> *	<i>C. pneumoniae</i> *
<i>C. muridarum</i>	<i>C. psittaci</i> *
<i>C. suis</i>	<i>C. pecorum</i>
	<i>C. abortus</i>
	<i>C. caviae</i>
	<i>C. felis</i>

Murray R. Patrick (2002)

* Especies de mayor importancia por infectar al humano con frecuencia

Primero *Chlamydiaceae* fue considerada como protozooario, después como virus, y por último, se aclaró que tenía todos los requisitos y propiedades de las bacterias:

a) Poseen una membrana interna y externa similar a las de las bacterias Gram-negativas.

b) Contienen ADN y ARN.

c) Poseen ribosomas procariotas.

d) Sintetizan sus propias proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.

e) Son sensibles a numerosos antibióticos antibacterianos.

f) Se reproducen por fisión binaria.

C. trachomatis se ha clasificado de acuerdo a sus secuencias genéticas (16S y 23S de su rARN) de la siguiente manera ⁽¹⁸⁾:

Orden: *Chlamydiales*

Familia: *Chlamydiaceae*

Género: *Chlamydia*

Especie: *Chlamydia trachomatis*

1.1.6 Infecciones y enfermedades causadas por *Chlamydia trachomatis*

Las enfermedades ocasionadas por esta bacteria son causa de un grave problema de salud pública en el mundo. *C. trachomatis* es patógeno exclusivamente humano. Las especies se han subdividido en dos biotipos (patógenos para el humano): tracoma y LGV; cada uno con sus respectivos serotipos o variantes serológicas asociado a un espectro diferente de enfermedades.

El biotipo tracoma ocasiona enfermedades como: tracoma ocular, infecciones genitales, neumonía del lactante y diversas complicaciones. Mientras que el biotipo LGV causa linfogranuloma venéreo siendo éste el causal de la enfermedad mayormente invasora.

1.1.6.1 Biotipo Tracoma

El tracoma es una enfermedad ocular crónica causada por *C. trachomatis* que, puede ocasionar trastornos visuales graves o ceguera. En las zonas endémicas la enfermedad es causada por los serotipos A, B, Ba y C. En zonas no endémicas, los serotipos D a K producen una conjuntivitis leve que sana en forma espontánea en lactantes que nacen de madres con infección

cervical o en adultos que adquieren la infección ocular a partir de sitios genitales ^(15, 39, 54)

En adultos sexualmente activos se ha observado una conjuntivitis aguda folicular producida por los serotipos asociados a infecciones genitales (A, B, Ba, D y K). Inicialmente, los pacientes tienen una conjuntivitis folicular con inflamación difusa que afecta toda la conjuntiva. La conjuntiva va presentando cicatrices conforme progresa la enfermedad, haciendo que el parpado del paciente se vuelva hacia dentro. Las pestañas que crecen hacia dentro producen excoriaciones en la córnea, y finalmente resultan en ulceración corneal, cicatrización, formación de *pannus* (invasión de los vasos de la córnea) y pérdida de la visión.

Las infecciones oculares también se producen en niños expuestos a *C. trachomatis* al nacer (conjuntivitis neonatal). Después de una incubación de 5 a 12 días, los párpados del niño se hinchan, con abundantes secreciones purulentas. Las infecciones no tratadas pueden durar hasta 12 meses, en los cuales se produce daño corneal por cicatrización. Los niños que no se tratan o lo hacen de manera tópica tienen riesgo de presentar una neumonía por *C. trachomatis* ⁽³⁹⁾. El periodo de la neumonía del lactante es variable, pero suele comenzar de 2 a 3 semanas después del nacimiento. Al inicio se observa hinchazón de párpados y conjuntiva, derrame ocular mucopurulento, rinitis y formación de membrana, apareciendo después una tos típica entrecortada. El niño permanece afebril durante la enfermedad clínica, que dura varias semanas. Los signos de la enfermedad pueden durar meses. ^(39, 64)

1.1.6.1.1 Infecciones genitales

Las infecciones por *C. trachomatis* son las más comunes de las enfermedades de transmisión sexual bacterianas en varios países. Éstas son asintomáticas en mujeres y hombres (hasta en 80% y 25% respectivamente). Las manifestaciones clínicas son uretritis, cervicitis, endometritis, salpingitis, bartolinitis y perihepatitis. Son causadas por los serotipos D a K. Si bien estos serotipos son los responsables de la infección genital en adultos, también pueden ocasionar infecciones oculares y respiratorias en lactantes. Infecta las células del epitelio columnar superficial y varios sitios como: endocervix, uretra, epidídimo, endometrio, oviductos, conjuntiva, nasofaringe y tracto respiratorio bajo. No invade tejido profundo, pero puede causar daños graves como: infertilidad, ceguera y embarazo ectópico. Los cuales son el resultado de la cicatrización causada por su estadía en el organismo o por periodos de reinfección ^(39, 54). Puede permanecer latente por largos periodos de tiempo y ser recuperable en cultivo celular ó ser demostrable su presencia por los métodos de amplificación de ácidos nucleicos. Por otra parte, *Chlamydia trachomatis* facilita la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ^(25, 25), y algunos estudios sugieren que también tiene un importante papel como cofactor en el cáncer cervical por VPH en mujeres infectadas. ^(19, 25).

i) Infecciones en el hombre

Uretritis. Es un síndrome caracterizado por la aparición de exudado uretral mucopurulento, disuria y/o prurito en el meato urinario; es la respuesta de la uretra a cualquier etiología. La mayoría de las uretritis son producidas por patógenos de transmisión sexual; éstas se clasifican como gonocócicas o no gonocócicas según se aísle, o no, como responsable etiológico a *Neisseria*

gonorrhoeae. Las uretritis no gonocócicas (UNG) tienen como agentes responsables más frecuentes a *C. trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*. En los Estados Unidos más de la mitad de los 2 millones de casos estimados de uretritis aguda son de etiología no gonocócica. *C. trachomatis* es causal de 30 a 50% de estos casos ^(20, 39).

ii) Infecciones en la mujer.

Cervicitis. La cervicitis es la manifestación clínica más frecuente en la infección genital por *C. trachomatis* en la mujer y puede conducir a cierto número de trastornos patológicos en las trompas de Falopio, los ovarios y la cavidad peritoneal, conocidos de forma colectiva como enfermedad inflamatoria pelviana (EPI). La infección clamidial del endocervix está a menudo asociada con un exudado mucopurulento endocervical, congestión e inflamación. Más del 70% de mujeres con cervicitis clamidial son asintomáticas pero pueden tener una apariencia cervical anormal. La dificultad en el diagnóstico de cervicitis clamidial radica en el hecho de que a menudo está presente como cervicitis por otra etiología, ya que es a menudo infectado con diversos organismos simultáneamente ⁽⁵⁴⁾.

Salpingitis. Los principales signos y síntomas incluyen fiebre, dolor en el abdomen bajo y dolor uterino al tacto al realizarse el examen pélvico. Estudios seroepidemiológicos han mostrado una fuerte asociación entre los altos niveles de anticuerpos anticlamidia con infertilidad tubárica y embarazo ectópico ⁽⁹⁾. La salpingitis puede presentarse con pocos síntomas y ser clínicamente más común que la Enfermedad Inflamatoria Pelviana. Se desconoce exactamente la contribución clamidial a la infertilidad y al embarazo ectópico, pero ambas se han incrementado a la par de los casos de salpingitis. Una complicación de la salpingitis es la perihepatitis.

Síndrome uretral femenino. Este síndrome de la mujer es el equivalente a la UNG en los hombres. Se presenta con frecuencia como disuria, en mujeres jóvenes sexualmente activas. En mujeres adultas la contribución de clamidia al síndrome uretral es menor, por haber múltiples causas ⁽⁵⁴⁾.

Enfermedad inflamatoria pelviana (EIP). Es la infección severa, más común entre los 16 y 25 años, que involucra al útero y/o trompas de Falopio, ovarios y estructuras adyacentes. Casi siempre se presenta como consecuencia de la diseminación en la zona pelviana de una infección no tratada (cervicitis y uretritis). Es una de las causas prevenibles, más comunes de infertilidad. Una mujer con EIP probablemente tenga problemas para quedar embarazada y esto puede deberse a que la infección no tratada por *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae* ha bloqueado parcial o totalmente las trompas de Falopio y por lo tanto el ovulo liberado por el ovario no puede pasar por las trompas hacia el útero. Como secuelas puede producir infertilidad, dolor crónico pelviano y embarazos ectópicos ^(49, 63).

1.1.6.2 Biotipo Linfogramuloma Venéreo (LGV)

El linfogramuloma venéreo es una enfermedad de aguda a crónica de transmisión sexual causada por los serotipos L1, L2, y L3 de *C. trachomatis*, siendo L2 el más común e invasivo. Esta enfermedad tiene una distribución cosmopolita, pero especialmente común en países tropicales y subtropicales. El inicio de la enfermedad se manifiesta de 1 a 4 semanas como una pequeña erosión indolora, una pápula, un nódulo o una lesión herpetiforme en el pene o en la vulva, lesión que con frecuencia pasa inadvertida. Los ganglios linfáticos muestran hinchazón y supuración (bubones), seguida por extensión del proceso inflamatorio a los tejidos contiguos. Se observan bubones

inguinales que pueden progresar a fístulas de drenaje. El paciente presenta fiebre, escalofríos, mialgia, cefalea y artralgia. El reservorio de la infección es el cervix de mujeres asintomáticas y en menor grado hombres homosexuales (15, 53, 63). El LGV que no se trata puede progresar a una fase crónica ulcerativa en la que se producen úlceras genitales, fístulas, estenosis o elefantiasis genital. El agente LGV es diferente de otras variantes de *C. trachomatis* en diversos aspectos, como son la toxicidad mortal para embriones de pollo y para ratones inyectados vía intracerebral, posesión de antígenos de serotipo, y la predisposición para atacar células linfoides lo cual permite su difusión en el tejido.

1.1.6.3 Otras enfermedades causadas por *C. trachomatis*

Entre otras complicaciones generadas por la infección clamidial destacan perihepatitis (diseminación peritoneal de la enfermedad) que puede indicar presencia de EIP. Síndrome de Reiter (también llamado artritis reactiva sexualmente adquirida) en la que más de un tercio de los casos se ha recuperado de la uretra a *C. trachomatis*; endocarditis, miocarditis, endometritis posparto en mujeres y proctitis por diseminación (LGV) en hombres. Por otra parte en infecciones que no son tratadas, éstas se extienden canalicularmente de manera ascendente alcanzando el epidídimo o el endometrio (15, 59).

1.1.6.4 *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae se ha encontrado en todo el mundo y es una importante causa de enfermedad respiratoria en adultos jóvenes, y en adultos mayores débiles puede causar una enfermedad respiratoria severa. Las

infecciones son comúnmente adquiridas desde la niñez hasta antes de la mayoría de edad resultando en prevalencias de hasta el 70% para los 50 años de edad. Infecciones secundarias pueden aparecer después de la infección inicial y existe la posibilidad que, de éstas, se desarrolle una enfermedad crónica, donde puede involucrar arterias coronarias. También produce otros procesos agudos del aparato respiratorio como: bronquitis, faringitis y sinusitis. En la mayoría de las infecciones asintomáticas, la enfermedad puede ser leve o moderada y repentinamente presentarse de manera severa. Su transmisión de persona a persona es por medio de aerosoles y fomites. Estudios seroepidemiológicos sugieren que las infecciones son adquiridas entre los 10 y 20 años de edad, resultando en seroprevalencias mayores al 70 % en personas de 50 años o más. Se ha estimado que el 10% de las neumonías en todo el mundo son producidas por *C. pneumoniae*, pero la mayoría no requiere internación hospitalaria ^(15, 38, 54).

1.1.6.5 *Chlamydia psittaci*

C. psittaci es una bacteria que afecta principalmente aves. En el humano causa la enfermedad llamada psitacosis o enfermedad de los loros, la cual afecta el aparato respiratorio causando una neumonía atípica. El ser humano, es un hospedero accidental de dicha bacteria. Las personas de mayor riesgo para adquirir la psitacosis son las que manipulan aves, granjeros, vendedores de mascotas. La enfermedad se presenta generalmente asintomática, y en menos ocasiones produce una neumonía grave. También puede manifestarse como bronquitis, faringitis o sinusitis. En animales causa: aborto, neumonía, poliartritis, conjuntivitis y encefalitis ⁽¹⁵⁾.

1.1.6.6 Epidemiología

La distribución del tracoma es principalmente en lugares como África, la India, sureste de Asia, Latinoamérica e Islas del Pacífico. Los cuales tienen como característica que son zonas calurosas, secas, con escasez de agua, malos hábitos higiénicos, hacinamiento y pobres condiciones sanitarias. En México, existen zonas de tracoma en el estado de Chiapas. Se estima que hay en el mundo 500 millones de personas con tracoma de los cuales sufren de ceguera 6 millones. La enfermedad se presenta por lo regular en la infancia y se manifiesta de forma brusca acompañada de una inflamación de la conjuntiva, a las pocas semanas se produce una acumulación de linfocitos, polimorfonucleares y de macrófagos formando folículos. Después se genera una vascularización y cicatrización de la cornea lo cual ocasiona una ceguera parcial o total ^(15, 39, 48, 53, 63). La repetida exposición a clamidias y la elevada prevalencia de otras infecciones bacterianas contribuyen a que sea más grave la enfermedad ocular. El modo de transmisión del tracoma es a través por aerosoles, contacto directo, fómites y moscas; ya que quienes padecen dicha enfermedad liberan clamidias en células conjuntivales descamadas y lágrimas.

El periodo de incubación de las enfermedades del tracto genital varía con el síndrome. La uretritis presenta un tiempo de incubación de 5 a 14 días, más largo que el presentado por las uretritis gonococicas, la cual es de 2 a 7 días. Por lo tanto, en pacientes con enfermedad simultánea por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, se manifiesta primero el gonococo, dado que presenta un periodo de incubación más corto que *Chlamydia*. Debido a esto, después de ser tratado el paciente para la gonococia con betalactámicos que no tienen actividad contra *Chlamydia*, unas semanas después presenta un cuadro de uretritis postgonocócica (UPG). El periodo de incubación de la

cervicitis es incierto, ya que no queda claro el inicio de ocurrencia de síntomas. El periodo de incubación de la salpingitis clamidial es extenso, usualmente seguido de la infección cervical por 2 o 3 semanas. Las uretritis en el hombre son debido a clamidias hasta en un 40%, y en la mayoría de éstos casos, sus parejas sexuales alojan al m.o. en el cuello uterino probablemente por periodos prolongados, debido a que son mujeres que cursan asintomáticas. *C. trachomatis*, como otros organismos patógenos genitales, ha sido encontrada frecuentemente en individuos jóvenes, solteros y de bajo estatus socioeconómico. Además de, mujeres y hombres, que tienden a tener más de una pareja sexual.

Los daños producidos mundialmente por el LGV son importantes. La incidencia es grande en los países africanos, América central y regiones tropicales de Asia, donde las condiciones socioeconómicas son precarias. El grupo que presenta mayor riesgo de infección es el de homosexuales sexualmente activos.

1.1.6.7 Prevalencia

Chlamydia es una bacteria muy común que se encuentra distribuida en el mundo. Según la OMS causa cerca de 92 millones de nuevos casos de infección genital por año ⁽⁶¹⁾, su frecuencia global varía entre 3-26% esto depende del tipo de población, estilo de vida sexual de la población estudiada, tipo de detección empleado, zona geográfica, nivel educativo, entre otros. En los Estados Unidos es la infección reportada más frecuentemente con una incidencia anual de 4 millones de casos y una prevalencia del 3.8% ⁽⁵⁸⁾. En países Europeos se ha reportado del 2 al 12% ^(22, 31, 61). En países asiáticos se encuentra entre 6 a 17% y en Latinoamérica la prevalencia es del 2 al 12% en población abierta ^(1, 23, 62).

1.1.7 Diagnóstico de infección por *C. trachomatis*

1.1.7.1 Diagnóstico Clínico

El diagnóstico clínico la mayoría de las veces es difícil, debido a que cuando existe una infección genital con síntomas, puede ser causada por varios microorganismos diferentes, y a su vez, un determinado agente puede ser el responsable de la misma. Los microorganismos que son detectados con mayor frecuencia (aparte de *C. trachomatis*) en infecciones genitales son: *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans* y *Gardnerella vaginalis*. En casos LGV clínicamente se observan linfadenopatías inguinales que se visualizan más comúnmente en el hombre, deficiencias gastrointestinales y lesiones anogenitales muy desarrolladas y que a menudo resultan en proctitis.

1.1.7.2 Diagnóstico por el Laboratorio

Existen una variedad de métodos para detectar la infección por *Chlamydiae* en el laboratorio: a) demostración de la presencia del microorganismo en las diferentes muestras en forma de CE o CR; b) realizar el aislamiento de clamidia (por cultivo celular principalmente); c) por ensayos serológicos (título de anticuerpos); d) por detección directa del antígeno en la muestra clínica y e) por métodos moleculares que implican el uso de sondas y amplificación de ácidos nucleicos.

1.1.7.2.1 Demostración de *Chlamydiaceae* por técnicas de tinción

En general, existen diferentes técnicas para poner de manifiesto los cuerpos de inclusión como son: Giemsa, Papanicolau, Machiavello, yodo y hematoxilina-eosina. Si hay presencia de gran cantidad de cuerpos de

inclusión de clamidias, el diagnóstico puede establecerse con facilidad por los métodos de coloración de Gimenez preferentemente, debido a que se colorean bien las inclusiones, pero por lo general es más disponible la coloración de Giemsa. Las inclusiones, que se ubican en el citoplasma de las células epiteliales tienen a menudo una localización perinuclear. La frecuencia con que se detectan inclusiones en los frotis es máxima en la conjuntivitis neonatal, más baja en la conjuntivitis de inclusión y en el tracoma, y mínima en la uretritis y cervicitis, donde las inclusiones son raras. También se ha utilizado yodo para teñir el glucógeno acumulado en los cuerpos de inclusión de *C. trachomatis*. Sin embargo estas técnicas son poco sensibles, en comparación con el cultivo celular y la inmunofluorescencia directa, ya que necesitan una gran cantidad de clamidias para ser de utilidad.

1.1.7.2.2 Aislamiento en cultivos celulares

Para tener un buen aislamiento de los cuerpos elementales clamidiales es necesario que sean centrifugados a 3000 rpm durante 60 min. sobre la monocapa celular en un frasco ampolla. Para el cultivo de *C. trachomatis* se utilizan células irradiadas o tratadas con un inhibidor metabólico. Las células McCoy tratadas con cicloheximida son más frecuentemente utilizadas y las células HeLa. Además de poder utilizar embrión de pollo o inoculación en ratón.

1.1.7.2.3 Pruebas serológicas

Estas pruebas son utilizadas rutinariamente para la determinación de título de anticuerpos en el diagnóstico de las especies del género *Chlamydia*. La fijación del complemento (FC) es útil en infecciones como psitacosis,

linfogramuloma venéreo y neumonía. Para el diagnóstico de las infecciones superficiales como tracoma, conjuntivitis e infecciones genitales es utilizada la microinmunofluorescencia (MIF), también puede ser útil en el diagnóstico de *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. Las pruebas serológicas tienen un valor limitado, ya que se necesita un elevado título de anticuerpos de hasta cuatro veces en la fase convaleciente, comparado con la fase aguda de la enfermedad para poder ser de valor. Además, los títulos de anticuerpos pueden persistir por mucho tiempo, por lo tanto, la prueba no puede diferenciar entre infecciones actuales y anteriores. Por otra parte, se ha encontrado que *C. trachomatis* puede persistir viables como formas alternativas deformadas difíciles de reconocer por el daño en la membrana externa que presentan; siendo indetectables por este tipo de técnicas ⁽⁵⁾. Las pruebas serológicas sólo son de utilidad en el diagnóstico de infecciones invasivas y sistémicas ^(15, 59).

1.1.7.2.4 Detección directa del antígeno en la muestra

Para realizar la detección antigénica se han empleado la inmunofluorescencia directa (IFD) y la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). En ambas pruebas, se usan anticuerpos que se han preparado frente a la MOMP o LPS (principales constituyentes de antigenicidad) de la pared celular de clamidia. Estas pruebas utilizan, ya sea anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar el LPS clamidial que es más soluble en comparación con la MOMP, y al menos contiene dos sitios antigénicos, siendo sólo uno específico para Chlamydia, y el otro lo puede compartir con otras bacterias (*Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, entre otras) causando resultados falsos-positivos ⁽³⁸⁾. Por lo tanto, las pruebas de anticuerpos que son dirigidas contra LPS son de menor especificidad ya que pueden causar

reacciones falsas-positivas. Este tipo de pruebas a pesar de tener una buena sensibilidad, son menos sensibles que el cultivo celular, especialmente cuando son empleadas en pacientes asintomáticos o en muestras uretrales de hombres.

1.1.7.3 Métodos moleculares

En los últimos diez años la aplicación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o métodos de biología molecular se han incrementado para realizar el diagnóstico y caracterización especial de una gran variedad de organismos patógenos, esto es gracias al avance tecnológico y científico. Esto, ha generado a su vez que, se produzcan una gama diferente de ensayos encaminados a la detección rápida y oportuna de patógenos que afectan la salud de la población en general. En países industrializados es más frecuente el uso de este tipo de técnicas debido a que es más bajo su costo en general en comparación con países de pocos recursos. Por lo tanto, es más extendido el uso de pruebas inmunológicas, en estos últimos, que tienen un menor costo, son fáciles de implementar y no se necesita mayor infraestructura para realizarlos, pero que, no tienen la sensibilidad y especificidad que las pruebas en las que se detecta la presencia de agentes infecciosos utilizando material genético del microorganismo como blanco y, no indirectamente la presencia de anticuerpos.

Algunos de los métodos moleculares que implican el uso de ADN y han sido aplicados en el diagnóstico de *Chlamydiaceae* son:

- a) PCR
- b) LCR
- c) Hibridación
- d) Otros

a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de amplificación de un blanco, esto significa que una secuencia blanco de ADN es identificada y amplificada hasta un punto en el que puede ser detectada. La eficiencia de amplificación o la secuencia del material amplificado puede ser examinada por cualquiera de los diferentes propósitos como son: genotipificación o la caracterización de nuevos genes, patrones de expresión genética, mutaciones o polimorfismos.

Ésta se realiza con un soporte a varias temperaturas automatizado y computarizado denominado ciclador térmico. En general, los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa Taq.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, los cuales son:

1. Desnaturalización (92-98 °C, 30 a 90 segundos), etapa en donde se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.
2. Alineamiento (50-60 °C, 30 a 60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
3. Extensión (70-74 °C, 30 a 90 segundos), en el que la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados del ADN blanco, al polimerizar los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^{17}) del segmento de ADN blanco (3, 28, 30).

Por su elevada sensibilidad y especificidad la reacción de PCR es una técnica que se ha convertido en un método estándar para el análisis de muestras de ADN o ARN en laboratorios de investigación, de diagnóstico clínico, molecular y forense.

b) Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR)

Es una técnica de amplificación muy específica que utiliza una enzima termoestable para unir dos oligonucleótidos inmediatamente adyacentes. Es una técnica cíclica al igual que la PCR consistiendo cada ciclo en pasos de desnaturalización, hibridación y unión covalente. Igual que en la PCR, los pares de oligonucleótidos ligados, junto con la secuencia original, constituyen los moldes de la siguiente ronda. Los 20 ó 30 ciclos de ligazón dan lugar a incrementos de alrededor de 10^6 veces en el producto de amplificación blanco (15), lo que indica menor sensibilidad que la PCR, por la generación de menor cantidad de producto de amplificación.

c) Hibridación

La hibridación con sondas genéticas son otra alternativa para la detección de agentes etiológicos de enfermedades. Para clamidia se utilizan sondas genéticas que incluyen ADN cromosomal y plasmídico de cuerpos elementales del biotipo LGV. Existe en el mercado un sistema para el diagnóstico de este tipo denominado PACE, que contiene un fragmento de ADN de hebra sencilla que hibrida con una secuencia de ARN ribosomal (rARN) específica de *C. trachomatis*. La sonda utilizada contiene una marca

quimioluminiscente de éster de acridinio. En este ensayo la muestra se coloca en el medio de transporte mismo que provoca la liberación del rARN. En seguida se adiciona la sonda y los tubos se incuban por una hora a 60 °C para propiciar la hibridación. Para eliminar la sonda no unida se adicionan micropartículas que se asocian a la sonda hibridada, se colocan los tubos en una gradilla de separación magnética y se desechan los sobrenadantes. Esta operación de lavado se repite varias veces y finalmente se agrega reactivo de elusión a cada tubo. Por último, los híbridos ARN-ADN son cuantificados en un luminómetro.

d) Otros

Hoy en día existen una variedad de pruebas que emplean la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de microorganismos responsables de enfermedades en humanos y animales. Tales como: amplificación por desplazamiento de la hebra (strand displacement amplification), ensayo de la Q β replicasa y replicación de secuencia de hebra simple, principalmente.

1.1.8 Tratamiento y Prevención

Se ha observado que el tratamiento con antibióticos por lo regular suprime el desarrollo clamidial, así como también las diversas entidades clínicas que causa. En general el tratamiento en todos los casos (tracoma, conjuntivitis neonatal, uretritis, cervicitis, entre otros) es oral y los antibióticos a los que son susceptibles dichas bacterias son: tetraciclina, eritromicina y sulfonamidas principalmente. El uso de éstos antibióticos es en dosis de 500 mg dos a cuatro veces por día, mínimo por 7 días.

Otras alternativas son: ofloxacin 300 mg. V.O. c/12 hr. por 7 días y levofloxacin 500 mg/día por 7 días. En zonas endémicas, el uso repetido de tratamiento es útil, ya que reducen la gravedad de la enfermedad y así se evita la progresión a ceguera. En casos de LGV, el tratamiento se inicia con la aspiración de los ganglios linfáticos junto con la aplicación de tetraciclina o eritromicina en dosis de 500 mg 4 veces al día por al menos 7 días. En mujeres la mayoría de las infecciones son asintomáticas, lo cual provoca que sean un reservorio importante para la transmisión de la enfermedad clamidial. Su tratamiento implica que deben de llevarlo a término; tratar también a la pareja sexual y no tener relaciones hasta estar completamente curada. Existen también antibióticos orales de dosis única como azitromicina (1 g). El tratamiento de EIP es más complicado y requiere varios fármacos. En infecciones debidas a *C. pneumoniae* y *C. psittaci* es útil la tetraciclina o eritromicina en dosis de 500 mg vía oral por 10 días mínimo; penicilina dosis mayor a 2 millones de unidades al día ^(15, 64).

La prevención de la enfermedad por *Chlamydiaceae* es difícil, porque la población con enfermedad endémica tiene generalmente un acceso limitado a la atención médica, y también pobres condiciones sanitarias. Las conjuntivitis y las infecciones genitales por clamidias se previenen con prácticas sexuales seguras y con el tratamiento precoz de los pacientes sintomáticos y de sus parejas sexuales. En el caso de la psitacosis, las personas que manipulan aves deben de usar guantes, cubre bocas, gafas y ropa adecuada para evitar la infección. Hasta el momento no existe vacuna alguna para la prevención de la infección por *Chlamydia trachomatis*, aunque se han estado realizando una serie de investigaciones ^(54, 61, 66) para identificar las principales moléculas que brindan mayor antigenicidad celular, y de esta manera ser reconocida por el

sistema inmune del hospedador para su posterior destrucción no importando en que fase de desarrollo se encuentre.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) han adquirido gran importancia a nivel mundial, ya que constituyen un problema de salud pública de gran impacto en cualquier tipo de población afectando en forma continua a grupos de personas que presentan factores de riesgo (principalmente las de actividad sexual más promiscua) y en la actualidad a grupos más jóvenes. Tanto la incidencia como las secuelas que éstas generan, causan gastos excesivos en la procuración de la salud en el mundo y más aún cuando los microorganismos responsables no son monitoreados y detectados a tiempo.

En la actualidad *C. trachomatis* es la bacteria más frecuente en infecciones del tracto genital a nivel mundial. En países como México, no se conoce la prevalencia real de *C. trachomatis*; algunos estudios sugieren una frecuencia del 4 al 11% en población abierta; del 3 al 7% en clínicas de planificación familiar y en mujeres embarazadas del 10 al 26%; en trabajadoras sexuales de 16 al 25% y en mujeres sintomáticas del 28% (8, 13, 14, 17, 21, 27). Por otra parte, del 50–70 % de las infecciones cervicales son asintomáticas o con clínica escasa y poco específica, lo cual implica que la infección por esta bacteria genere una serie de complicaciones graves, progrese al desarrollo de secuelas crónicas y que, además; los individuos infectados pueden permanecer asintomáticos durante meses o incluso años con lo cual pueden infectar a su(s) pareja(s) sexual(es).

Casi todos los reportes de estudios de prevalencia para *C. trachomatis*, realizados en México han utilizado metodologías inmunológicas, lo que directamente reduce la demostración de datos reales

de prevalencia. En el presente estudio se sabe que el método de detección utilizado es altamente sensible y específico, lo que nos permite obtener datos de mayor confiabilidad para la detección de este patógeno aún en casos carentes de sintomatología o con clínica escasa.

3. HIPÓTESIS

Si se logra estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar el plásmido críptico (PC) de *Chlamydia trachomatis*; entonces se podrá determinar la presencia o ausencia de este microorganismo, así como también se conocerá su prevalencia y factores de riesgo asociados a la infección en muestras endocervicales de pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer (CEM) de la Secretaria de la Defensa Nacional (SEDENA)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ❖ Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, en muestras endocervicales de pacientes de la Clínica de Especialidades de la Mujer (CEM) de la Secretaria de la Defensa Nacional (SEDENA).

4.2 Objetivos Particulares

- ❖ Obtener el material genético (ADN) de los raspados endocervicales proporcionados por las pacientes en la CEM a través del método fenol-cloroformo (Sambrook, 1994)
- ❖ Determinar las condiciones óptimas para la amplificación por PCR del fragmento de ADN bacteriano para el PC.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos por PCR y Vidas Chlamydia.
- ❖ Establecer la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y la relación con factores de riesgo en pacientes mujeres que acuden a la CEM.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

- Muestra purificada de ADN de *Chlamydia trachomatis* (serotipo L2) donada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (ENCB).
- Cebadores (Invitrogen) específicos para la secuencia genética del plásmido críptico.
- Agarosa (Gibco BRL)
- Muestras endocervicales obtenidas con hisopado de pacientes que acuden a la CEM.

Reactivos y soluciones:

- Buffer de extracción (EDTA 0.02 M, Tris 0.01 M, SDS 0.5%)
- Proteínasa K (Gibco BRL)
- Fenol ultrapuro, (Gibco BRL)
- Cloroformo (JTBaker)- Alcohol isoamílico (JT Baker) (24:1).
- NaCl (Sigma) 5M.
- Isopropanol (JTBaker)
- Etanol (JTBaker) al 70%
- TBE al 0.5%
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Buffer de carga (Applied Biosystems)
- Buffer de PCR 10x (Invitrogen)
- Cloruro de magnesio 50 mM (Invitrogen)
- Dioxinucleótidos trifosfatados 10 μ M (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen)

- Enzima Taq polimerasa termoestable (Invitrogen)
- *ddH₂O*

Equipos:

- Cámara electroforética horizontal (modelo Horizon 58, Gibco BRL)
- Fuente de poder (modelo 250, Gibco BRL)
- Transiluminador de luz UV (LKB 20011 Macrovue)
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech).
- Termociclador Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación de la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. Las pacientes estudiadas firmaron una carta de consentimiento voluntario para participar en el estudio.

5.1 Obtención de Muestras

Para la presente investigación se utilizó un total de 98 muestras endocervicales de pacientes mujeres que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer, en la ciudad de México, en un periodo comprendido entre julio del 2005 y marzo del 2006. A dichas pacientes se les explicó en que consiste el estudio, se realizó un cuestionario (anexo 1) y se les pidió su consentimiento para participar.

La toma de muestra de canal cervical para cada paciente se realizó por duplicado empleando hisopos y espejos vaginales estériles.

5.1.1 Análisis de las muestras

De las dos muestras tomadas una se analizó por la metodología utilizada en el laboratorio clínico de la CEM para la detección de la bacteria por medio de un inmunoanálisis enzimático cualitativo, VIDAS CHL Blocking Assay (*bioMérieux*), que consiste en un sistema de micropozos que utiliza anticuerpos policlonales contra el LPS clamidial, de una sensibilidad y especificidad de 88 y 98 % respectivamente (con respecto al cultivo celular) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Además de hacer el análisis de exudado microbiológico y en fresco; la otra muestra, se utilizó para realizar el diagnóstico molecular en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad (EMGS), mediante extracción de ADN y posterior amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cada uno de los raspados endocervicales fue cultivado en el laboratorio clínico de la CEM en medios para el aislamiento microbiológico de *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*.

5.2 Extracción y Purificación de ADN

La extracción de ADN a partir de muestras endocervicales se realizó utilizando la técnica descrita por Sambrook y cols. ⁽⁴⁷⁾ como a continuación se describe.

Después de haber tomado la muestra endocervical con el hisopo, éste se sumergió dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 µL que contenía 700 µL de buffer de extracción (EDTA 0.02 M, Tris 0.01 M, SDS 0.5%) donde se homogenizó y escurrió; desechándolo. Posteriormente se agregó proteínasa K (Gibco BRL) a una concentración final de 50 µg/µL y luego se mezcló en vortex 2 minutos e incubó a 65°C por 20 minutos.

Se adicionó un volumen de fenol ultrapuro, (Gibco BRL) y se mezcló en vortex 2 minutos, posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm por 5 minutos.

Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo Eppendorf y adicionó un volumen de Cloroformo (JTBaker)- Alcohol isoamílico (JT Baker) (24:1). Posteriormente se agitó en vortex por 2 minutos y centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos.

Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y precipito el ADN con NaCl (Sigma) a una concentración final de 0.2 M más un volumen de isopropanol (JTBaker). Se mezcló por inversión hasta la aparición de la hebra de ADN y se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos. Una vez hecho lo anterior, se decantó cuidadosamente para no desechar el pellet de ADN. Finalmente se lavo 3 veces con 500 μ l de etanol al 70%, centrifugó a 10,000 rpm, y se dejo secar por 30 minutos. Al final el ADN se resuspendió en 50 μ l de *dd*H₂O estéril y se almacenó a 4 °C.

Como control de calidad de la extracción de ADN a todas las muestras se les hizo PCR para un fragmento de beta globina humana, previamente estandarizado el cual dio un amplificado de 268 pb

5.3 Comprobación de integridad de ADN

Para evaluar la pureza del ADN y su integridad se observó en geles de agarosa (Gibco BRL) al 1% p/p. Para la preparación de los geles, se pesaron en un matraz Erlenmeyer 0.2 g de agarosa (Gibco BRL) llevándose a 20 g de peso con TBE 0.5%, se calentó en horno de microondas por 30 segundos, se peso nuevamente y agregó TBE 0.5% necesario para 20 g; la tinción del gel se realizó con 1 μ L de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). Una vez solidificado el gel se colocó en cámara electroforética horizontal (modelo Horizon 58, Gibco

BRL) para su corrimiento, colocándose en el primer pocito 2.5 μL de marcador de peso molecular de 50 pb, y en los siguientes pocitos, la muestra de ADN previamente mezclada con 1.5 μL de buffer de carga. Después se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder (modelo 250, Gibco BRL) corriéndose a voltaje constante de 90 volts por 40 minutos; al terminar, se visualizó en un transiluminador de luz UV (LKB 20011 Macrovue).

5.3.1 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Para cuantificar el ADN control para la realización de la curva de sensibilidad, se tomaron 10 μL de producto de reacción de PCR control positivo y se diluyeron en 490 μL de *dd H₂O* estéril para tener una dilución 1:50, después se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech). Posteriormente, se realizó el cálculo de la concentración de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de ADN en } \mu\text{g/ml} = 50 \times \text{Absorbancia a } 260\text{nm} \times \text{Fact. de Dilución}$$

5.4 Estandarización de PCR para *Chlamydia trachomatis*

Para estandarizar el ensayo de PCR se empleó una muestra purificada de ADN de *Chlamydia trachomatis* (serotipo L2) donada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (ENCB)

En el presente estudio se utilizaron un par de iniciadores (Invitrogen) específicos para la secuencia genética del plásmido críptico (Tabla 3), para realizar la detección de *C. trachomatis*. Los iniciadores KL1-KL2 dirigidos

contra el PC, descritos con anterioridad por Mahony y cols. ⁽³³⁾, amplificaron un fragmento de 241 pb observados en geles de agarosa al 2 %

Cada iniciador empleado fue disuelto en 400 µL de agua bidestilada estéril. Llevándolos a una concentración final de 89 µM y 82 µM para KL-1 y KL-2, respectivamente. De aquí, se preparó una solución de trabajo a una concentración de 10 µM para cada uno de los iniciadores (anexo 2).

TABLA 3. Secuencia de iniciadores utilizados para la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras endocervicales

Iniciador	Secuencia	Tm
KL1	5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3'	62
KL2	5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3'	60

5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar la PCR se preparó una mezcla de reacción que incluyo los siguientes componentes: buffer de PCR 10x, cloruro de magnesio 50 mM, dioxinucleótidos trifosfatados 10 µM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), un par de iniciadores 10 µM (KL-1 y KL-2), enzima Taq polimerasa termoestable 5 U/µL y una alícuota de 2 µL de DNA blanco. Todos ellos a una concentración dada para un volumen total de 25µL por cada tubo eppendorf de 250 µL, se mezclaron en vortex y se insertaron en el termociclador (tabla 4).

5.4.2 Parámetros de amplificación de ADN

La estandarización del programa de ciclos para la amplificación de ADN empleando iniciadores dirigidos contra el PC, se realizó primero tratando las muestras a una temperatura de 94 °C por 10 min. para asegurar una completa

desnaturalización del material genético. Después la temperatura fue reducida por 1 min. a 56, 58, 60 y 62 °C para optimizar la temperatura de alineamiento del par de iniciadores. Para la extensión del ADN, la temperatura fue elevada a 72 °C por 10 min. y así asegurar que se lleve a cabo por completo la actividad de la enzima Taq DNA polimerasa. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600.

5.4.3 Comprobación de amplificación

Para comprobar si se llevó a cabo la amplificación del fragmento esperado, se corrieron 5 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%. Preparado de manera similar al de comprobación de integridad de ADN. Se corrió en la cámara electroforética a 90 volts/30 min. Posteriormente se visualizó en el transiluminador (LKB 20011 Macrovue). El tamaño del fragmento esperado fue de 241 pb.

5.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los diferentes factores que podrían contribuir y relacionarse a la adquisición de *C. trachomatis* (edad, método anticonceptivo, edad de inicio de vida sexual, número de parejas sexuales) se utilizó la prueba de Ji-cuadrada (X^2), usando el paquete Sigma Stat versión 3.5 (2005)

6. RESULTADOS

6.1 Integridad de ADN

Al verificar la pureza e integridad del ADN extraído, se observó que en todas las muestras había una buena cantidad de ADN íntegro, sin ó con poca degradación, pues se apreciaron bandas bien definidas de elevado tamaño molecular al ser comparadas con el marcador de tamaño molecular (1 Kb plus Ladder) (Figura 5).

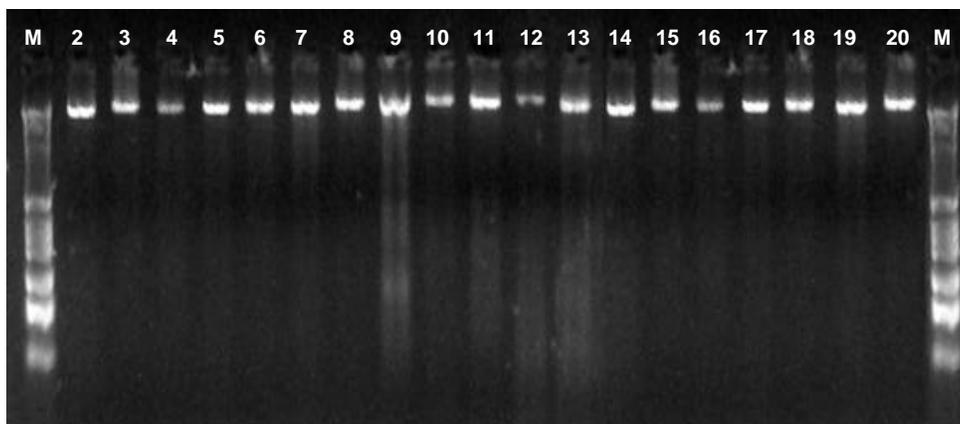


Figura 5. Pureza e integridad del ADN genómico de las muestras endocervicales en estudio. El ADN fue obtenido utilizando la técnica fenol-cloroformo descrita por Sambrook 1994 y, su integridad evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el carril 1 y 20 se muestra el marcador de tamaño molecular (1 Kb plus ADN Ladder), y en los carriles 2 al 19, ADN genómico obtenido de 18 muestras cervicales diferentes de la población en estudio.

6.2 Estandarización de PCR

Primero se realizaron diferentes reacciones de amplificación utilizando el ADN purificado de *Chlamydia trachomatis* L2 donado por la

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), los iniciadores KL-1 y KL-2 dirigidos contra una región del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y empleando distintos parámetros de temperaturas y concentraciones de reactivos hasta obtener el adecuado (Tabla 4).

TABLA 4. Estandarización de concentraciones y volumen utilizado en cada reactivo para cada mezcla de reacción de PCR

Reactivo	Conc. Soln. Stock	Conc. Final	Volumen μl
Buffer	10x	1x	2.5
*dNTP's	2 mM	200 μM	2.5
Iniciador F (KL-1)	10 μM	1 μM	2.5
Iniciador R (KL-2)	10 μM	1 μM	2.5
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	1.25
Taq Polimerasa	5 U/ μL	0.02U/ μL	0.05
ADN		50 ng/ μL	2
dd H ₂ O estéril			11.7

* Son una mezcla de dTTP, dATP, dGTP y dCTP a una misma concentración de 2 mM.

El fragmento de ADN blanco fue una secuencia de 241 pb genéticamente conservada del plásmido críptico (el espacio que ocupa el material extracromosomal va desde los 727 a 967 pb), con lo cual se amplificó el fragmento de tamaño esperado (241 pb) y, el control negativo sin muestra de ADN no mostró amplificación alguna (Figura 6-A). Posteriormente se procedió a probar tales condiciones de amplificación a las muestras de pacientes tomadas en el Laboratorio Clínico de la CEM (Figura 6-B)

obteniendo resultados similares a los obtenidos con la muestra control positivo cuando la bacteria estuvo presente en la muestra.

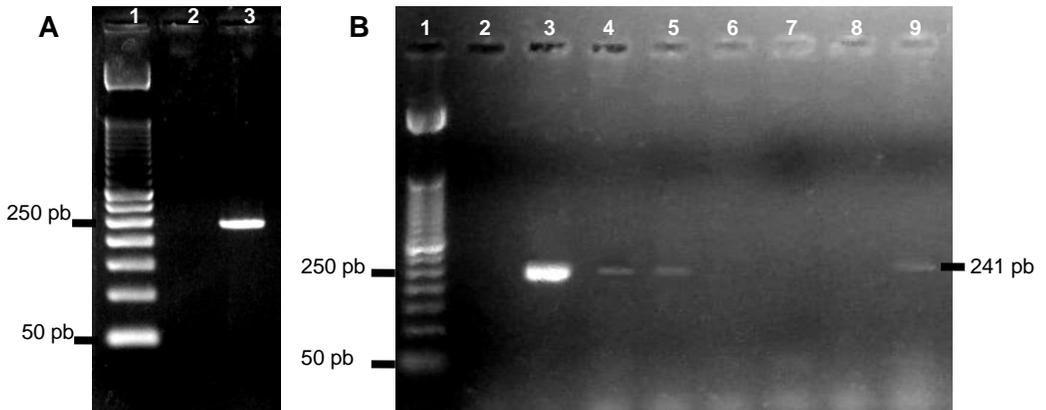


Figura 6. Estandarización de PCR amplificando fragmentos de 241 pb en geles de agarosa al 2%.

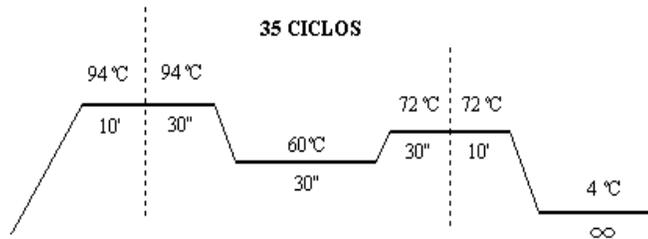
A) Amplificación de control positivo. Carril 1. Marcador de tamaño molecular (50 pb DNA Ladder). Carril 2. Control negativo de PCR. Carril 3. Control positivo de PCR en el cual se agregó ADN de *C. trachomatis* donado por ENCB.

B) Amplificación de muestras de pacientes. Carril 1. Marcador de tamaño molecular (50 pb DNA Ladder). Carril 2. Control negativo de PCR. Carril 3. Control positivo de PCR. Carril 4, 5 y 9, productos de amplificación en muestras problema. Carril 6, 7 y 8, muestras negativas, sin producto de amplificación.

En todos los casos se realizó PCR por duplicado para contrastar resultados. Para las muestras con resultado negativo después de realizar la segunda reacción de PCR ésta fue tomada como DNA blanco para la posterior amplificación y finalmente, emitir el resultado.

Los parámetros encontrados para realizar la amplificación del fragmento de ADN plásmidico fueron con una temperatura óptima de

alineamiento de 60 °C por 30 seg para cada uno de los 35 ciclos (desnaturalización (94 °C), alineamiento (60 °C) y extensión (72 °C)). Utilizando termociclador Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600.



Dado que la amplificación resultó satisfactoria se procedió a cuantificar la cantidad de ADN bacteriano presente en el control positivo para poder estimar cual es la cantidad mínima detectable por cada reacción de PCR por medio del uso de una curva de sensibilidad, la cual fue realizada a partir de concentraciones conocidas de ADN por cada tubo de PCR.

6.2.1 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Después de haber realizado una reacción de PCR utilizando el ADN purificado control positivo *Chlamydia trachomatis* L2, se procedió a realizar la cuantificación de ADN, en la cual se utilizó una alícuota del producto de reacción de PCR control positivo, ésta fue diluida 1:50, posteriormente se tomo la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. La absorbancia leída fue de 0.039, la cual corresponde a 97.5 ng/ μ L (anexo 3); se ajusto la concentración a 50 ng/ μ L y de está se partió para realizar la curva de sensibilidad.

6.2.2 Curva de sensibilidad.

Una vez que se estandarizó la concentración de ADN control a 50 ng/ μ L, a partir de ella se procedió a realizar la curva de sensibilidad para determinar la mínima cantidad de ADN detectable en geles de agarosa al 2.0% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en cámara UV. Así mismo se encontró que, la menor concentración correspondía a 1 pg/ μ l (Figura 7) cuyo valor es equivalente a 10 copias del plásmido, lo cual corresponde a 1 cuerpo elemental clamidial.

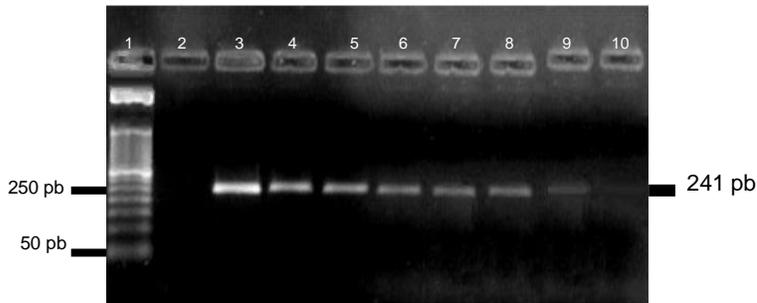


Figura 7. Curva de sensibilidad de amplificación del fragmento de ADN del plásmido críptico de *C. trachomatis* con un tamaño de 241 pb mediante el uso de los iniciadores KL-1 y KL-2. El ADN fue previamente cuantificado por espectrofotometría. En la figura se muestra un gel de agarosa al 2% donde se observa en el carril 1 marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder), en el carril 2 se encuentra el control negativo de PCR y en los carriles 3-10, diluciones de las cantidades de ADN agregadas a cada reacción de amplificación de PCR que van desde los 50 ng/ μ l hasta 0.1 pg/ μ l. La cantidad mínima detectada por la PCR fue de 1 pg/ μ l que se encuentra en el carril 9.

6.3 Análisis de datos

En el estudio fueron incluidas 98 muestras cervicales de mujeres que asistieron al Laboratorio Clínico de la CEM. Todas las muestras incluidas

fueron adecuadas para la amplificación por PCR para la detección de *C. trachomatis* al ser amplificado un fragmento del gen de β -globina humana de 268 pb. Las muestras que dieron resultado negativo se reamplificaron (se uso como DNA blanco el producto de PCR negativo para hacer otra PCR) para considerarse como verdaderas negativas.

Se encontraron 20 (20.4%) casos positivos por PCR para infección genital por la bacteria (tabla 6) y sólo 1 (1.02%) positivo reportado para Vidas-Chlamydia (Tabla 5, Grafico 1), el cual a su vez fue negativo por PCR al realizarse el reamplificado.

La edad de las pacientes oscila entre 19 y 59 años con una edad promedio de 33.8 años; y una edad media de inicio de vida sexual de 19 años.

La prevalencia más elevada de *C. trachomatis* (25%) fue encontrada entre mujeres menores de 30 años de edad (Tabla 6). Del total de pacientes infectadas, el 45% (9) no usa método anticonceptivo alguno; y de la población total estudiada sólo el 6.1% (6) utiliza anticonceptivos de barrera.

En general, la mayoría de pacientes en estudio aparentemente no realizaban prácticas sexuales de riesgo, debido a que sólo 2 (2%) tenían más de una pareja sexual y 5 (5.1%) tenían parejas ocasionales y no usaban métodos anticonceptivos de barrera.

TABLA 5. Número de casos positivos y negativos de infección genital por *C. trachomatis* en pacientes de la CEM por medio de PCR y VIDAS CHL.

PRUEBA	POSITIVO %		NEGATIVO %		TOTAL %	
PCR	20	20.4	78	79.6	98	100
VIDAS-CHL	1*	1.02	97	98.97	98	100

* Se considero indeterminado.

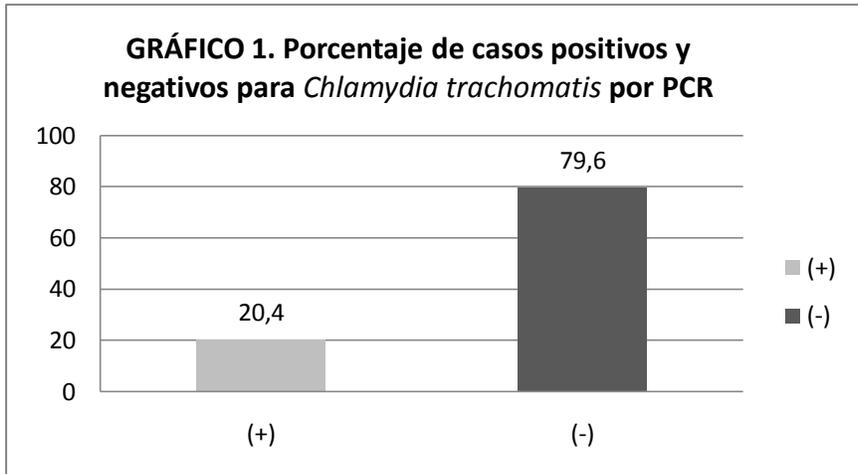


TABLA 6. Prevalencia de infección genital de *Chlamydia trachomatis* en muestras positivas por PCR y su relación con la edad.

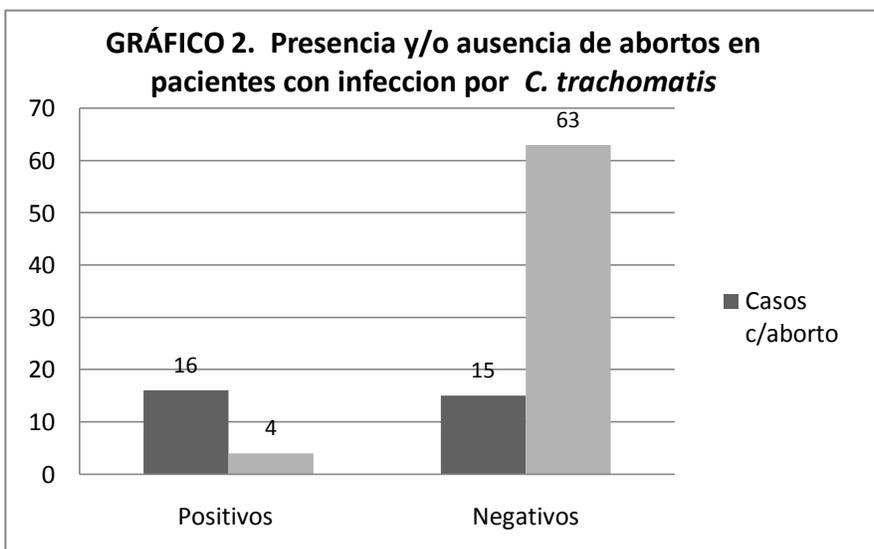
EDAD (años)	RESULTADO PCR				TOTAL	%
	POSITIVO	%	NEGATIVO	%		
≤ 30	10	(25)	30	(75)	40	(100)
≥ 31	10	(17.2)	48	(82.8)	58	(100)
TOTAL	20		78		98	

Se determinaron cada uno de los factores que pueden contribuir a la presencia o ausencia de la bacteria en la población de estudio tomando en consideración sólo los resultados de PCR ya que como se ha mencionado con anterioridad hubo un solo resultado positivo para el estudio inmunológico el

cual fue considerado como indeterminado tras haber repetido la prueba y considerar los datos clínicos de la paciente. De esta manera se observó que del total de muestras positivas, 16 (16.32%) habían presentado al menos un aborto (Tabla 7).

TABLA 7. Presencia y ausencia de aborto en casos positivos y negativos para *C. trachomatis* por la técnica de PCR.

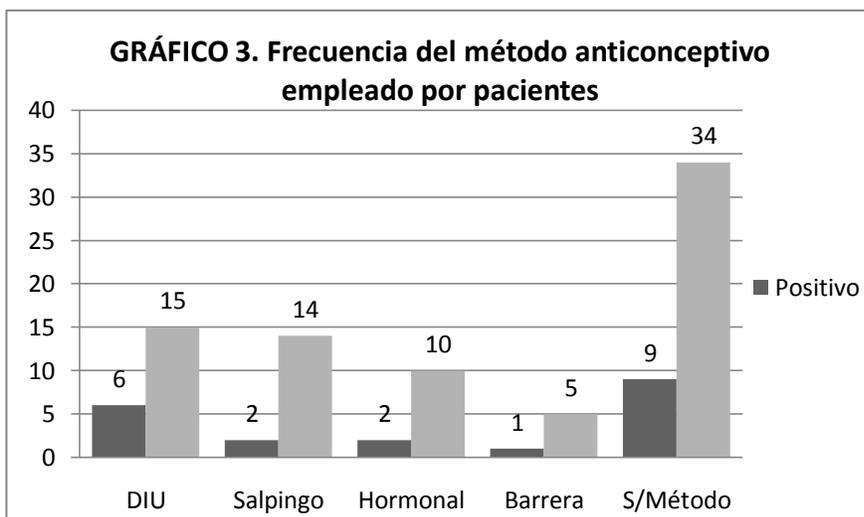
RESULTADO PCR	CASOS C/ ABORTO		CASOS S/ ABORTO		TOTAL	
	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%
POSITIVO	16	16.32	4	4.08	20	20.4
NEGATIVO	15	15.31	63	64.29	78	79.6
TOTAL	31	31.63	67	68.37	98	100.0



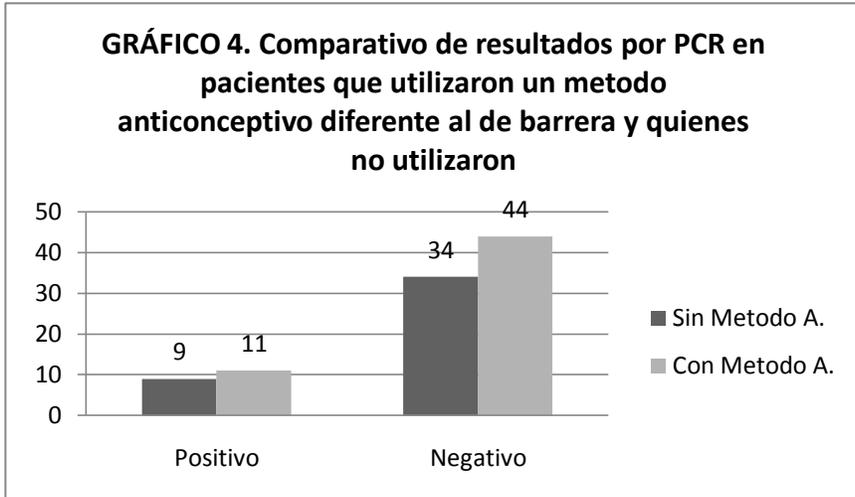
Por otra parte, en el examen microbiológico realizado se observó a *C. trachomatis* asociada a 11 vaginosis bacteriana y 2 candidiasis. En cuanto a la frecuencia del uso de métodos anticonceptivos en pacientes con infección genital se encontró lo siguiente: 9 sin método anticonceptivo, 6 DIU, 2 hormonal, 2 salpingoclasia y 1 de barrera (Tabla 8 y Gráfico 3).

TABLA 8. Métodos anticonceptivos empleados por pacientes.

METODO ANTICONCEPTIVO	CASOS POSITIVOS	CASOS NEGATIVOS	TOTAL
	FRECUENCIA	FRECUENCIA	
DIU	6	15	21 (21.43 %)
SALPINGOCLASIA	2	14	16 (16.33 %)
HORMONAL	2	10	12 (12.24 %)
BARRERA	1	5	6 (6.12 %)
SIN METODO	9	34	43 (43.88 %)
TOTAL	20	78	98 (100.0 %)



La comparación de los resultados obtenidos por PCR en pacientes que utilizaron algún método anticonceptivo y quienes no utilizaron ningún método no arroja diferencia alguna. (Gráfico 4).



Los datos revelan que en el 45% la detección de *Chlamydia trachomatis* por PCR fue de pacientes quienes refirieron no utilizar algún método anticonceptivo y, en 30% de quienes utilizaban DIU. De acuerdo a los datos obtenidos 6 pacientes acudían a la CEM presentando problemas de esterilidad, de éstas, dos tenían infección genital por *C. trachomatis* y ambas manifestaron haber tenido antecedentes de aborto. Una de ellas manifestó haber tenido cinco abortos.

Al utilizar el paquete Sigma Stat versión 3.5 (2005) para determinar la posible relación de la presencia de *C. trachomatis* con diferentes variables de acuerdo a datos de la población en estudio, no hubo relación significativa con la edad, edad de inicio de vida sexual y, el uso de métodos anticonceptivos diferentes al de barrera. En cambio, si hubo relación significativa con antecedentes de aborto ($p < 0.05$) (anexo 4).

7. DISCUSION

Chlamydia trachomatis es uno de los principales agentes patógenos de transmisión sexual que se manifiesta típicamente como cervicitis y uretritis, y que de no ser atendidas adecuadamente pueden conducir a Enfermedad Inflamatoria Pelviana, y esta a su vez puede progresar hacia consecuencias severas como infertilidad, embarazos ectópicos y dolor pelviano crónico y, además, puede producir transmisión perinatal causando conjuntivitis y neumonía en el neonato. En México, el diagnóstico de *C. trachomatis* se realiza por lo general utilizando los diferentes estuches que se encuentran disponibles en el mercado los cuales utilizan principalmente anticuerpos policlonales, monoclonales y sondas genéticas; sin la aplicación de PCR.

La PCR es una técnica que presenta una elevada sensibilidad, especificidad, y eficiencia, la cual esta influida por distintos parámetros, como: la composición de los cebadores en relación al DNA blanco, la temperatura de alineamiento (T_m) de los cebadores diseñados, calidad y cantidad de ADN y concentración adecuada de iones magnesio, principalmente.

En el presente estudio se realizó la estandarización de la técnica de PCR para la detección de *C. trachomatis* en muestras endocervicales utilizando un par de cebadores dirigidos contra el plásmido críptico de la bacteria. El fragmento de ADN blanco fue una secuencia de 241 pb genéticamente conservada del plásmido bacteriano, amplificándolo desde 727 a 967 pb dada la secuencia del mismo. Para realizar la reacción de PCR primero se obtuvo el ADN de cada una de las muestras, por el método de fenol-cloroformo descrito por Sambrook y cols. De este modo cada una de las

extracciones nos brindó una cantidad considerable de material genético y de buena calidad, ya que la mayoría de ellas no mostraban degradación alguna (Figura 5). Se demostró que la técnica de PCR basada en la realizada por Mahony y cols. ⁽³³⁾ tiene buena reproducibilidad y sensibilidad. La primera se comprobó al generar fragmentos del tamaño esperado (241 pb) y sin fragmentos inespecíficos tanto en muestras de pacientes como en nuestro control positivo (Figura 6-A, B). La segunda fue comprobada al realizar la curva de sensibilidad y observar que la mínima cantidad detectable en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, fue de 1 pg/ μ L (Figura 7); ésta corresponde a la detección de un cuerpo elemental, es decir, 10 copias de plásmido ⁽⁴²⁾. A diferencia del estudio hecho por Mahony y cols. (1992) en el estudio se utilizó una temperatura de alineamiento mayor ($T_m = 60$) lo cual nos brinda una mayor sensibilidad y especificidad ya que se encuentra muy cerca del T_m calculado para los cebadores KL1- KL2 (tabla 3), reduciendo la probabilidad de formación de estructuras inespecíficas, debido a que, los cebadores están diseñados para aparearse a una región genéticamente conservada del plásmido críptico ⁽³³⁾, por lo tanto se favorece la especificidad de la reacción. La elevada sensibilidad de la PCR encontrada en este proyecto coincide con otros reportes en los cuales se ha empleado (aunque con otros cebadores y diferentes poblaciones) y a generado resultados similares, pero siempre con mayor especificidad y sensibilidad que otros métodos con los cuales se ha comparado ^(26, 34, 36, 52, 55). Se detectaron 20/98 muestras positivas para *C. trachomatis*, utilizando 2 μ L de ADN por reacción en 25 μ L volumen total, por 35 ciclos detectando como mínimo un cuerpo elemental clamidial.

La comparación de los resultados generados por la PCR y el método inmunológico Vidas-CHL, mostró una diferencia notablemente favorable para

la primera, dado que el método inmunológico no detectó ninguna de las muestras positivas para PCR. En cambio, éste último, detectó una muestra positiva que al ser probada varias veces, no fue detectada en ninguna de ellas. Esto puede tener tres principales explicaciones: 1) que el método inmunológico empleado utiliza anticuerpos policlonales, lo que deriva en una menor especificidad de la prueba, además, los ensayos EIA de este tipo utilizan un anticuerpo policlonal anti-LPS, por ser la molécula más abundante en su pared celular, pero estos pueden tener reactividad cruzada con LPS de otras bacterias como *Klebsiella sp.*, *Streptococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Gardnerella sp.* ^(37, 64); 2) que al revisar los datos clínicos de la paciente se observó que presentaba bartolinitis al momento de la toma de muestra, siendo esta patología de etiología diversa y, puede ser ocasionada no solo por *C. trachomatis* sino también por organismos como: *Candida sp.*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.*, y principalmente *E. coli*, entre otros; lo cual puede resultar en una reacción falsa-positiva; 3) si al realizar el raspado cervical se encuentra una infección genital latente, puede ocasionar que haya en el DNA extraído mayor cantidad de material genético de otras bacterias que de *C. trachomatis* (si en dado caso llegase a existir en la muestra tomada) por lo tanto, puede inhibir la amplificación del fragmento de ADN blanco ^(10, 61). Además, se ha reportado por otros autores que existen varias sustancias que pueden actuar como inhibidores de la PCR ^(36, 61), las cuales pueden encontrarse en las muestras clínicas (sangre, productos de inflamación, entre otras) o ser ajenas a ellas (talco de guantes, o material plástico), debido a esto, últimamente se ha incluido en estuches comerciales de PCR un control interno para la detección de inhibidores de amplificación ^(4, 10, 12, 27, 47, 56) pese a ello, las PCR's que no utilizan control interno presentan mayor sensibilidad y especificidad que

otras pruebas para la detección de la bacteria ya que puede detectarla aun en casos donde no existen síntomas de infección.

Se ha observado que cuando *C. trachomatis* se encuentra bajo condiciones adversas en su medio ambiente, tales como: altas concentraciones de glucosa, baja en nutrientes, elevadas temperaturas, la presencia de subóptimas concentraciones de antibiótico o la presencia de interferon gama (producto normal de respuesta inmune), ésta se revierte a cuerpos persistentes no replicativos de forma anormal alargada, los cuales son escasos en MOMP, LPS y otras proteínas de membrana externa ^(5, 38). Por ello, al realizarse la detección del microorganismo por métodos inmunológicos no es reconocida, dado que las moléculas blanco no se encuentran intactas (si están presentes) en la membrana externa de la célula bacteriana. De ahí que, la PCR muestre una elevada sensibilidad, en primer lugar porque no distingue entre células viables y células atrofiadas, si el fragmento de DNA blanco se encuentra en buen estado éste será amplificado y, en segundo lugar, detecta una secuencia específica del material extracromosomal, el cual se encuentra presente de 7 a 10 copias por cuerpo elemental clamidial ^(26, 33, 42, 51), por lo tanto, existe mayor probabilidad de ser detectada mediante esta técnica.

La prevalencia encontrada para la detección de *C. trachomatis* por PCR fue de 20.4% (20/98), ésta es elevada dado que se trato de un estudio en población abierta. En comparación con otros reportes de estudios en México donde emplearon población similar ^(8, 14, 17) se nota una diferencia significativamente mayor. De este modo, al contrastar nuestros resultados con los obtenidos en estudios en trabajadoras sexuales ^(13, 14), clínicas de infertilidad y ginecológicas en México ^(21, 27) se observa que son ligeramente menores a éstos, lo cual nos lleva a suponer que dichos resultados en población de riesgo

podrían ser más elevados, dado que se ha utilizado para su detección métodos de menor sensibilidad y, además, ese tipo de población presenta mayor probabilidad para implicar a *C. trachomatis* en infecciones genitales, lo cual, manifiesta que la población mexicana en general esta en riesgo de contraerla. Observamos también que entre las pacientes estudiadas hubo seis que presentaban antecedentes clínicos de posible esterilidad, de ellas, a dos se les detectó infección genital debida a *Chlamydia trachomatis* y además solo ellas dos tenían antecedentes de abortos y no tenían hijos, mientras que las 4 pacientes restantes al menos tenían un hijo y no presentaban aborto alguno; lo cual coincide con lo reportado en otros estudios ^(21, 22, 24) donde se ha relacionado a este microorganismo con casos de infertilidad en mujeres y abortos.

El 51.6 % de las pacientes que presentaron infección por *C. trachomatis* tuvo al menos un aborto, lo cual sugiere que existe una amplia probabilidad de encontrar a éste patógeno relacionado a mujeres con este tipo de antecedentes contrastando con lo reportado por otros autores ^(8, 21) y también con la prueba de *chi-cuadrada* cuyo resultado determino que existe una relación significativa con la existencia de dicha bacteria ($P= <0.001$). A diferencia de otros estudios donde han encontrado relación entre la edad, edad de inicio de vida sexual, método anticonceptivo ^(17, 21), y la presencia de *C. trachomatis* no se encontró una relación estadística entre estos factores y la infección genital. Aunque, dado que la edad de la población estudiada en promedio es de 33 años, se observó que existe cierta tendencia de haber mayor prevalencia de la infección en pacientes menores de 30 años (25 %) que en mayores de 30 años (17.2 %) (Tabla 6). Lo anterior concuerda con otras publicaciones en donde se ha encontrado mayor prevalencia en mujeres

adolescentes y jóvenes menores de 20 años que en mujeres de mayor edad ^(1, 23, 31, 36). Lo cual ha sido atribuido a diferencias anatómicas dadas por una menor exposición del epitelio escamo-columnar de la región endocervical en mujeres mayores ⁽¹⁾ y/o también debido a que la bacteria infecta con mayor facilidad el cuello uterino inmaduro, por lo tanto, las mujeres jóvenes son más susceptibles ⁽²³⁾. La comparación de los resultados entre pacientes que utilizan un método anticonceptivo cualquiera y quienes no lo hacen, determino que no existe diferencia, ya que en ambos grupos se observo una proporción semejante de casos positivos para Chlamydia (gráfico 4), lo que manifiesta el riesgo de contraer ETS en general y de ahí, la importancia de utilizar anticonceptivos de barrera en las relaciones sexuales.

Se observó que el 30 % de las pacientes en quienes se detectó *C. trachomatis* utilizaban como método anticonceptivo DIU, (Tabla 8 y Gráfico 3), lo cual es equiparable con otros estudios en población mexicana ^(17, 21); y aunque no se sabe bien si el hecho de utilizar como medida de anticoncepción el dispositivo intrauterino pueda ser un factor que predisponga a la infección genital por dicha bacteria o de que manera beneficie al microorganismo la presencia del mismo, es recomendable su uso en personas quienes no presenten infección por clamidias u otro microorganismo patógeno.

De acuerdo a lo encontrado en este estudio (aunque fue realizado en una muestra poblacional pequeña), la presencia de abortos, tener menos de 30 años de edad y realizar prácticas sexuales sin método anticonceptivo de barrera, son factores que pudieran contribuir en gran medida a padecer infecciones por *C. trachomatis*; sin embargo, se requiere de un mayor número de muestras para validar lo observado y de este modo poder relacionar a la

bacteria con ciertos signos y síntomas clínicos reconocibles para su posterior tratamiento.

La estandarización de PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras endocervicales es una útil herramienta que nos brinda una elevada sensibilidad, disminución del tiempo de procesamiento y una mayor confiabilidad para la detección de una bacteria con características especiales y de difícil diagnóstico como las de éste organismo patógeno de transmisión sexual tan común y que representa un alto costo económico y en la salud reproductiva, principalmente, de la mujer.

8. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras endocervicales.
2. Se extrajeron cantidades aceptables de material genético en todos los raspados endocervicales utilizados en este estudio, mediante el método de extracción por fenol-cloroformo.
3. La comparación de los resultados obtenidos para la detección de *Chlamydia trachomatis* por la técnica de PCR y Vidas Chl. confirmo que la primera es la más adecuada para su detección.
4. La prevalencia general encontrada en este estudio fue del 20% y esta es mayor en personas quienes sean menores de 30 años de edad, con antecedentes de aborto e infertilidad y no utilizan métodos anticonceptivos de barrera.

9. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Con base en los resultados obtenidos podemos sugerir como recomendación para la detección de *Chlamydia trachomatis* a la Reacción en Cadena de la Polimerasa como una técnica que ofrece una elevada especificidad, sensibilidad y reproducibilidad; lo cual nos proporciona resultados de mayor confiabilidad para la detección de microorganismos como *Chlamydiae* en los cuales existen problemas técnicos en su detección por sus características, a veces, en gran medida complicadas y de peculiar biología que los convierte en un problema potencial para la salud pública.

Como sugerencias para proyectos futuros recomendamos lo siguiente:

- Realizar una comparación con métodos más sensibles que el ocupado en el presente estudio (VIDAS-CHL), como una PCR dirigida a la proteína mayor de membrana externa (MOMP) presente en la bacteria.
- Mayor número de muestras de pacientes y un mejor cuestionamiento al paciente para determinar que factores se encuentran relacionados a la presencia de la bacteria.
- Dividir el estudio entre pacientes menores de 25 años y mayores de dicha edad, para determinar el riesgo en la población mexicana de contraer dicho microorganismo y determinar así su prevalencia de una manera más real y poder adoptar medidas para prevenir su transmisión entre la población.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Arráiz R. N., M. Ginestre P., A. Perozo, M. Castellano, B. Urdaneta, M.M. García. 2007. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela. Rev. Chil. Infect. **24**: 48-52
2. Bandea, C. I., Kubota, K., Brown, T. M. & cols.; 2001, Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (omp1); Sex Transm. Inf., **77**:419-422
3. Barrera Saldaña Hugo A., Ortiz L. Rocío, Rojas M. A., Reséndez P.D.; Reacción en Cadena de la Polimerasa; 1993, Rev. Ciencia y Desarrollo; (01-02); 50-60.
4. Bass C.A, Jungkind D.L., Silverman N. S., Bond J.M.; 1993, Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens; J. Clin. Microbiol., **31**: 2648-2653.
5. Beatty, W. L., R. P. Morrison, G. I. Byrne. 1995, Reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* infection in cell culture. Infect. Immun. **63**: 199-205
6. Black G. Jacquelyn; 2005, Microbiology, Principles and Explorations; Ed. John Wiley & Sons. Inc.; E.U.A.
7. Bobo Linda, Coutlee Francois, Robert H. Yolken, Thomas Quinn y Raphael P. Viscidi; 1990, Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an Enzyme Immunoassay; J. Clin. Microbiol.; Vol. **28**/09; 1968 – 1973.
8. Canto, de C. Thelma, Polanco R. L., Fernandez, G. V., 1999, Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar; : <http://www.insp.mx/salud/index.html>

9. Cates, W., and J. N. Wasserheit; 1991, Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae; Am. J. Obstet. Gynecol.; **164**: 1771-1781.
10. Cone, R. W., A. C. Hobson, M. W. Huang. 1992. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. J. Clin. Microbiol. **30**:3185-89.
11. Cosart, Pascale; Boquet, Patrice; Normark Staffan; Rappuoli, R.; 2005; Celular Microbiology; Ed. ASM Press; E.U.A.; pp. 54-56, 141-143.
12. Cosentino, Lisa A., Landers, Daniel V., Hillier, Sharon L.; 2003, Detection of *Chlamydia trachomatis* and Neisseria gonorrhoeae by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swabs specimens; J. Clin. Microbiol., **41**(8): 3592-3596
13. Cosme A. Esquivel, García V. A., Castruita L. Dora, Cardosa N. F. J., Ruiz A. R.; Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en prostitutas registradas de la ciudad de Durango, México.
14. Cravioto María del Carmen, Matamoros Oscar, Villalobos Z. Y., Peña O., García Lara E., Martínez M., Castelo J., Sifuentes O. J.; 1993, Prevalencia de anticuerpos Anti-*Chlamydia trachomatis* y Anti-*Neisseria gonorrhoeae* en grupos de individuos de la población mexicana; <http://www.insp.mx/salud/index.html>.
15. Deleón Rodríguez I., Hernández M. J. Tomás y cols.; 2000, *Chlamydia trachomatis* ¿Un problema de salud pública en México? Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN; México.
16. Deluca, Gerardo D.; Alonso, José M.; Marín, Héctor M.; Schelover, Eduardo; Vicente, Lilian; 2005, Resultados preliminares de un estudio de Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en muestras de raspados endo y/o ectocervicales en mujeres de Argentina por PCR anidada. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/3-Medicina/M-016.pdf>.

17. Echániz – Avilés G., Calderon Jaimes E., Carnilla Barajas Noemi, Soto Noguerón Araceli, Cruz Valdéz Aurelio, Gatica Marquina Rodolfo; 1991, Prevalencia de Infección Cervicovaginal por *Chlamydia trachomatis* en población femenina de la ciudad de Cuernavaca, Morelos.
18. Everett, K. D., R. M. Bush & A. A. Andersen; 1999, Emended description of the order Chlamydiales proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:415-440
19. Farinatl, A.; T. Zitto; M. Bottiglieri & cols. 2008. Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent population: a manageable problem. Rev Panam Infectol; **10**(1):8-12
20. García Rodríguez J.A., Picazo J.J.; 1998, Microbiología Médica, tomo II; ed. Harcourt Brace; España; 267-273.
21. Guerra Infante F., Flores Medina S.; 1988, Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociadas a la infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres infértiles; <http://www.insp.mx/salud/index.html>
22. Hamdad-Daoudi Farida, J. Petit, F. Eb; 2004, Assessment of Chlamydia trachomatis infection in asymptomatic male partners of infertile couples. J. Med. Microbiol. **53**, 985-990
23. Herrera M. M. T., R. M. Sanchez, A. I. Ruiz P., O. L. Ostos. 2005. Tamizaje serológico y con PCR para determinar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con vaginosis y vaginitis inespecíficas que asisten a hospitales de la Secretaría de Salud de Bogotá. NOVA **3**:1-120
24. Hubacher D, Lara-Ricalde R, Taylor D. 2001. Use of copper intrauterine devices and the risk of tubal infertility among nulligravid women. N Engl J Med; **345**:561-567.

25. Jalal, H., H Stehen, D. F. Bibby, C. Sonnex, C. A. Carne; 2007. Molecular epidemiology of genital human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* among of patients attending of genitourinary medicine clinic with vaccine. J-STD. AIDS. **18**: 617-21.
26. Jalal, H., H. Stephen, M. D. Curran, J. Burton, M. Bradley, C. Carne; 2006, Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. J. Clin. Microbiol. **44**(1): 206-213.
27. José I. Gorozpe Calvillo, E. Gómez A., J.J. Castañeda V., S. Santoyo H., I. Herrera A.; 2005, Búsqueda de *Chlamydia trachomatis* en 159 mujeres en la consulta privada. Ginecol. Obstet. Mex. 2005; **73**:124-7
28. Koneman W. Elmer, Allen D. Stephen; 1997, Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color; 5ª. Edición; México; Ed. Panamericana; 47-49, 1230 -1234.
29. L. Barron Almen; 1988, Microbiology of Chlamydia; Ed. CRC Press; E.U.A.
30. L. Metzker Michael, C. Caskey Thomas; 2001, Polimerase Chain Reaction (PCR); Encyclopedia of Life Sciences
31. Lan Jar, Melgers Ingeborg, Chris J. L. M. Meijer & cols.; 1995, Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR; J. Clin. Microbiol., **33**(12):3194- 3197
32. Littvik, A. M., López T.N. & cols.; 2003, Tras las huellas de un mundo invisible; Ed. SIMA; Argentina; 160–173.
33. Mahony B. James, Luinstra E. Katheen, Sellors W. J., Chernesky A. M.; 1992, Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men; J. Clin. Microbiol.; **30**(9); 2241–2245.

34. Mahony B. James, Luinstra E. Katheen, Sellors W. J., Chernesky A. M.; 1993, Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids; J. Clin. Microbiol.; **31**(7); 1753–1758.
35. Mahony, J., S. Chong, D. Jang, K Luinstra, M. Faught, D. Dalby, J. Sellors, M. Chernesky. 1998. 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. **36**:3122-26
36. Marrazzo, J. M., R. E. Jonson, T. A. Green, W. E. Stamm, J. Schachter, G. Bolan, E. W. Hook III, R. B. Jones, D. H. Martin, M. E. St. Louis, C. M. Black; 2005. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification test and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections.
37. Moncada Jeanne, Schachter Julios, Gail Bolan, Joseph Engelman, Lowrence Howard, Isa Mushahwar, Geoff Ridgway, Gilanfar Mumtaz, Walter Stamm, Agnes Clark; 1990, Confirmatory assay increases specificity of the Chlamydiazyme Test for *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix; J. Clin. Microbiol., **28**:1770-1773
38. Murray R. Patrick, Baron E., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H.; 2003, Manual of clinical microbiology; Vol. 1; Ed. ASM Press; 8a. ed; USA; 991-1000.
39. Murray, R. Patrick & cols.; 2002, Microbiología Médica; 4ª. Ed.; Ed. Elsevier; España.
40. Myrvik N. Quentin, Weiser S. Russell; 1991, Bacteriología y Micologías Médicas; Ed. Interamericana McGraw-Hill.

41. Nicholson, T. L., K. Chiu, R. S. Stephens; 2004. *Chlamydia trachomatis* lacks an adaptive response to changes in carbon source availability. *Infect. Immun.* **72**: 4286-89
42. Ostergaard Lars, Birkelund S. & Christiansen G.; 1990, Use of polimerase Chain Reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*; *J. Clin. Microbiol.*, **28** (6):1254-1260
43. Ostos O. Olga. L., R. Mélida Sánchez. 2003. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *NOVA*, **1**:81-93
44. Prescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A.; 2002, *Microbiología*; Ed. McGraw-Hill; 5a. ed.; España; 379-382, 515-517.
45. Quint, Koen; C. Porras; M. Safaeian & cols.: 2007, Evaluation of a novel PCR-based assay for detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**(12): 3986-91.
46. Ruiz A. I., R. Sánchez, O. Ostos, E. Angel, H. Bonilla, C. Cifuentes, C. Correa. 2005. Estudio piloto de prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* detectada por PCR en mujeres con parto prematuro en el Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Rev. colombiana de Obstet. y Ginecol.* **56**:225-230
47. Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis , T. *Molecular cloning. A laboratory manual* Third ed. Cold spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Press, 1994.
48. Schachter Julios, McCormack M. W., Chernesky A. M., Martin H. D., Van Der Pol B., Rice A. P., Hook III W. E., Stamm E. W., Quinn C. T. and Chow M.; 2003, "Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*"; *J. Clin. Microbiol.* , **41**:3784-3789

49. Schaechter Moselio, Medoff Gerald; 1994, Microbiología: mecanismos de las enfermedades infecciosas; 2ª Ed.; Ed. Médica Panamericana; Argentina, 371-378
50. Schramm Nara y Wyrick Priscilla B.; 1995, Cytoskeletal Requirements in Chlamydia trachomatis infection of host cells; Infect Immun., **63**:324-332
51. Shattock M. Richard, Craig Patrizio, Simmonds P., Sutherland S.; 1998; Detection of Chlamydia trachomatis in genital swabs: comparison of commercial and in house amplification methods whit culture.
52. Smith I. W., C L Morrison, C Patrizio, A McMillan.1993. Use of a commercial PCR kit for detecting Chlamydia trachomatis; JClin Pathol 1993;**46**:822-825
53. Starnbach M.N., Loomis W.P., Ovendale P., et al. 2003, An inclusion membrane protein from Chlamydia trachomatis enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8+ T cell response. J. Immunol, **171**: 4742-9.
54. Stephens Richard S.; 1999, Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity; Ed. ASM Press; E.U.A.
55. Van del Pol B., Quinn T. C., Gaydos, C.A., Crotchfelt K., Schachter J. Moncada; 2000; Multicenter evaluation of the amplicor and automated COBAS amplicor CT/NG test for detection of Chlamydia trachomatis J. Clin. Microbiol.; **38** (3); 1105 – 1112.
56. Van Dyck E., Meheus A. Z.; 2000; Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de transmisión sexual ; Ed. OMS; Singapur

57. Verkooyen, Roel P., G. T. Noordhoek, P. E. Klapper, J. Reid, J. Schirm, G. M. Cleator, M. Ieven, G. Hoddevik. 2003. Reliability of nucleic acid amplification methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine: results of the first international collaborative quality control study among 96 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3013-16.
58. Vilata J. J.; 1993, Enfermedades de transmisión sexual; Ed. J.R. Prous; España.
59. Wallach, Jacques; 2002, Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio; Ed. Masson; 4ª ed.; España; pp. 1040-1044
60. Wang Chengbin, J. Tang, W. M. Geisler, P.A. Crowley-Nowick, C. M. Wilson, R. A. Kaslow. 2005. Human leukocyte antigen and cytokine gene variants as predictors of recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk adolescents. *J. Infect. Dis.* **191**: 1084-92.
61. Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3741-3751.
62. World Health Organization. Prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. Geneva, 2001. <http://www.who.int/docstore/htv/GRSTI/003.htm>
63. www.gineconet.com/articulos/398.htm
64. Wyngaarden, J. B.; Smith, L. H.; 1986, Tratado de Medicina Interna de Cecil; Vol. II; Ed. Interamericana; 17ª ed.; México; pp. 1840-41,1863-67.
65. Zarine R. B., N. R. Roan, L. N. Steele, M. N. Starnbach; 2006, Developmental regulation of *Chlamydia trachomatis* class I accessible protein-1, a CD8+ T cell antigen, *J. Infect. Dis.* **193**: 1459-1463.

ANEXO I

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis*

Fecha: _____
Nombre del paciente: _____
Registro o Matricula: _____
Domicilio: _____
Edad: _____
Diagnostico: _____
Edad de Inicio de vida sexual _____
¿Pareja fija u ocasional? _____
Infecciones urogenitales previas _____
Utilización de algún método anticonceptivo _____
Número de hijos: _____
Número de abortos: _____
Examen de exudado en fresco: _____
Resultado de diagnostico inmunológico _____

Autorizo participar en el estudio _____

ANEXO 2

Iniciadores.

Primer KL-1

Secuencia: 5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3'

T_m = 62 °C

Abs. = 0.409

Conc. Oligonucleótidos: 89 μM

Primer KL-2

Secuencia: 5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3'

T_m = 60 °C

Abs. = 0.358

Conc. Oligonucleótidos: 82 μM

Cálculo para preparar los primers KL-1, KL-2 a concentración 10 μM cada uno.

De acuerdo con la siguiente relación:

Para KL-1:

$$C_{in}V_{in} = C_f V_f$$
$$V_{in} = \frac{(10 \mu M)(100 \mu L)}{(89 \mu M)}$$
$$V_{in} = 11.2 \mu L$$

Por lo tanto se tomó una alícuota de 11.2 μL del primer KL-1 y diluyó en 88.8 μL de agua bidestilada estéril, para obtener una concentración 10 μM en 100 μL.

Para KL-2:

$$V_{in} = \frac{(10 \mu M)(100 \mu L)}{(82 \mu M)}$$
$$V_{in} = 12.19 \mu L$$

La alícuota a tomar de KL-2 fue de 12.2 μL y se resuspendió en 87.8 μL de agua bidestilada estéril para una concentración 10 μM en 100 μL. Por lo cual, estas soluciones del par de cebadores se utilizaron para realizar cada una de las reacciones de PCR.

ANEXO 3

Cálculo para determinar la concentración de ADN clamidial plasmidico a partir de la lectura espectrofotométrica.

De acuerdo con la siguiente formula:

$$\text{Conc. ADN} = (\text{Abs. } 260) (\text{dilución}) (50) = [\] \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Sustitución:

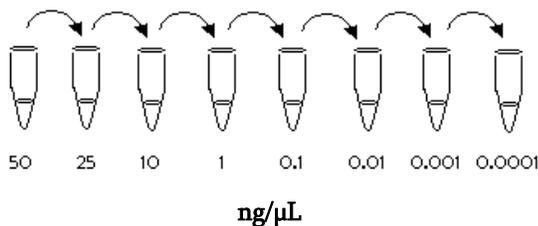
$$\text{Conc. ADN} = (0.039) (50) (50)$$

$$\text{Conc. ADN} = \mathbf{97.5 \text{ ng}/\mu\text{L}}$$

La concentración hallada (97.5 ng/ μ L) en la muestra del fragmento de ADN plasmidico amplificado, se utilizo para realizar la curva de sensibilidad y, determinar la mínima cantidad detectable por amplificación de PCR. Para ello se hizo un ajuste a 50 ng/ μ L partiendo de la concentración de ADN encontrada.

Curva de sensibilidad.

La curva de sensibilidad se realizó partiendo de una solución de reacción de amplificación *C. trachomatis* control positivo con mayor concentración (50 ng/ μ L), hasta la dilución de menor concentración (0.1 pg/ μ L), para posteriormente llevar a cabo una nueva reacción de amplificación de la cual se observo la menor cantidad detectable del material genético de la bacteria.



ANEXO 4

⊙ Edad de inicio vida sexual

Relación entre la presencia y/o ausencia de *Chlamydia trachomatis* vs edad de inicio de vida sexual.

Edad (años)	Resultado PCR	
	Positivo	Negativo
≤ 20	15	58
≥ 21	5	20

Chi-square

Data source: Data 5 in Notebook 1

Subjects	Col 1	Col 2	
Row 1	15.000	58.000	Counts
	14.898	58.102	Expected Counts
	20.548	79.452	Row %
	75.000	74.359	Column %
	15.306	59.184	Total %

Row 25.000	20.000	Counts
5.102	19.898	Expected Counts
20.000	80.000	Row %
25.000	25.641	Column %
5.102	20.408	Total %

Yates correction for continuity was used in calculating this test.

Chi-square= 0.0524 with 1 degrees of freedom. (P = 0.819)

The proportions of observations in different columns of the contingency table do not vary from row to row. The two characteristics that define the contingency table are not significantly related. (P = 0.819)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.053

The power of the performed test (0.053) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Ⓜ **Método anticonceptivo**

Relación de pacientes quienes emplean cualquier método anticonceptivo y quienes no lo utilizan vs la presencia y/o ausencia de *Chlamydia trachomatis* detectada por PCR.

Método Anticonceptivo	Resultado PCR	
	Positivo	Negativo
De cualquier tipo	11	44
Ninguno	9	34

Chi-square

Data source: Data 2 in Notebook 1

Subjects	Col 1	Col 2	
Row 1	11.000	44.000	Counts
	11.224	43.776	Expected Counts
	20.000	80.000	Row %
	55.000	56.410	Column %
	11.224	44.898	Total %

Row 29.000	34.000		Counts
	8.776	34.224	Expected Counts
	20.930	79.070	Row %
	45.000	43.590	Column %
	9.184	34.694	Total %

Yates correction for continuity was used in calculating this test.

Chi-square= 0.0194 with 1 degrees of freedom. (P = 0.889)

The proportions of observations in different columns of the contingency table do not vary from row to row. The two characteristics that define the contingency table are not significantly related. (P = 0.889)

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Ⓢ Aborto

Relación entre antecedentes de abortos vs la presencia y ausencia de *Chlamydia trachomatis*.

	Resultado PCR	
Aborto	Positivo	Negativo
Si	16	15
No	4	63

Chi-square

Data source: Data 4 in Notebook 1

Subjects	Col 1	Col 2	
Row 1	16.000	15.000	Counts
	6.327	24.673	Expected Counts
	51.613	48.387	Row %
	80.000	19.231	Column %
	16.327	15.306	Total %

Row 24.000	63.000		Counts
13.673	53.327		Expected Counts
5.970	94.030		Row %
20.000	80.769		Column %
4.082	64.286		Total %

Yates correction for continuity was used in calculating this test.

Chi-square= 24.445 with 1 degrees of freedom. (P = <0.001)

The proportions of observations in different columns of the contingency table vary from row to row. The two characteristics that define the contingency table are significantly related. ($P = <0.001$)

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 1.000

📍 **Infecciones ligadas a la edad**

Relación entre la edad vs la presencia y/o ausencia de *Chlamydia trachomatis*

EDAD (años)	RESULTADO PCR	
	POSITIVO	NEGATIVO
≤ 30	10	30
≥ 31	10	48

Chi-square

Data source: Data 5 in Notebook 1

Subjects	Col 1	Col 2	
Row 1	10.000	30.000	Counts
	8.163	31.837	Expected Counts
	25.000	75.000	Row %
	50.000	38.462	Column %
	10.204	30.612	Total %

Row 2	10.000	48.000	Counts
	11.837	46.163	Expected Counts
	17.241	82.759	Row %
	50.000	61.538	Column %
	10.204	48.980	Total %

Yates correction for continuity was used in calculating this test.

Chi-square= 0.465 with 1 degrees of freedom. ($P = 0.495$)

The proportions of observations in different columns of the contingency table do not vary from row to row. The two characteristics that define the contingency table are not significantly related. ($P = 0.495$)

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 0.098

The power of the performed test (0.098) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

ANEXO 5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

