



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Obtención, purificación y caracterización de la proteína principal de membrana externa recombinante (MOMPr) de *Chlamydia trachomatis*.

TESIS

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta:

SANDRA IVETTE GUADARRAMA MACEDO

DIRECTOR: Dr. Fernando M. Guerra Infante

ASESOR: Mtra. Yolanda Flores Cabrera



México, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología, Departamento de
Inmunología e Infectología del Instituto Nacional de Perinatología “ Isidro Espinosa de
los Reyes”**



AGRADECIMIENTOS

A Dios

Que ha llenado mi vida de bendiciones y me ha hecho afortunada al colocar en mi camino sólo a las mejores personas.

A mis padres

Por todo el esfuerzo que realizaron para que llegáramos juntos hasta aquí, por haberme guiado siempre con amor, por confiar en mí y por ser los primeros y mejores maestros. Jamás tendré manera de retribuir todo lo que me han dado.

A mis abuelitos

Por ser ejemplo de fortaleza, sabiduría, responsabilidad. Por amarnos y ayudarnos a todos, en todo momento, son los seres que más admiro.

A Claudia, Anel y Bety

Que han sido mis mejores amigas, me han cuidado, protegido y ayudado, juntas hemos crecido y aprendido y sé que juntas seguiremos, no imagino mi vida sin ustedes.

A Graciela, Marco y Carlos

Ustedes han compartido toda clase de experiencias conmigo, son personas excepcionales y sé que no me equivoqué al elegirlos para estar a mi lado siempre.



A Doctor Fernando Guerra

Por su paciencia, por compartir su conocimiento y por enseñarme que un verdadero profesional no aparta el lado humano, ha sido un honor trabajar con usted.

A la Maestra Yolanda Flores

Por el enorme apoyo que recibí en este proceso, por ser una buena maestra y una maravillosa persona.

A la Maestra Marcela, Verónica, Fernando y Miguel

Por hacer que el trabajo en el laboratorio se hiciera ligero acompañado de muy buenos momentos con tan agradables personas, y por el apoyo y amistad que me ofrecieron.

A Mis Sinodales

A quienes tuve el placer de tenerlos como mis profesores, y por los cuales siento profundo respeto.

A la UNAM

Por haberme formado en sus aulas, por ofrecerme el conocimiento de la mejor manera, aprendiéndolo y viviéndolo como universitaria; por las facilidades y la calidad con que nos instruyen, por la manera en que nos cobija.

A todos ustedes, Gracias.



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.- MARCO TEÓRICO	5
1.1 Características microbiológicas de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	5
1.2 Estructura de la membrana externa del cuerpo elemental de <i>Chlamydia sp.</i>	7
1.3 Estructura y genes de la MOMP.	9
1.4 Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	11
1.5 Espectro clínico de infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	12
1.6 Infecciones genitales causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	13
1.7 Infección y complicaciones por <i>Chlamydia trachomatis</i> en mujeres embarazadas.	16
1.8 Diagnóstico de infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	17
1.9 Detección de anticuerpos séricos anti- <i>Chlamydia trachomatis</i> .	18
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3.- OBJETIVOS	23
4.- HIPÓTESIS	23
5.- DISEÑO METODOLÓGICO	24
a) Población de estudio.	24
b) Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	24
c) Variables.	25
d) Diseño estadístico.	25
e) Material.	25
f) Métodos.	29
6.- RESULTADOS	36
6.1 Detección del gen <i>ompA</i> y purificación de la MOMP recombinante.	36
6.2 Detección de anticuerpos IgG anti MOMPr de <i>Chlamydia trachomatis</i> mediante la técnica de ELISA.	39
6.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA utilizando la MIF como técnica de referencia.	40
6.4 Detección de anticuerpos anti MOMPr por inmunodetección.	44



6.5 Utilidad de la prueba de ELISA en padecimientos asociados a la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i>.	47
7.- DISCUSIÓN	50
8.- CONCLUSIONES	59
9.- REFERENCIAS	60
10.- ANEXO	67
a) Preparación de reactivos.	67
b) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA.	72



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación del orden <i>Chlamydiales</i>.	6
Figura 2: Estructura de la membrana externa del género <i>Chlamydia</i>.	8
Figura 3: Estructura de la proteína principal de membrana externa de <i>Chlamydia trachomatis</i>.	10
Figura 4: Esquema del ciclo replicativo de <i>Chlamydia trachomatis</i>.	12
Figura 5: Análisis electroforético de la extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> BL21 transformada.	36
Figura 6: Amplificación del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> a partir del ADN plasmídico de <i>E. coli</i> BL21 transformada.	37
Figura 7: Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos por cromatografía de afinidad.	38
Figura 8: Resultados del índice de absorbancia (IA) obtenidos por la técnica de ELISA.	40
Figura 9: Número de sueros con anticuerpos contra especies de la familia <i>Chlamydiaceae</i>, analizados por el método de ELISA y MIF.	41
Figura 10: Número de sueros que detectan anticuerpos anti <i>Chlamydia trachomatis</i> por las técnicas de ELISA y MIF.	42
Figura 11: Número de sueros con anticuerpos anti <i>Chlamydophila pneumoniae</i> por los métodos de ELISA y MIF.	43
Figura 12: Número de sueros con anticuerpos anti <i>Chlamydophila psittaci</i> por los métodos de ELISA y MIF.	43
Figura 13 y 14: Inmunodetección de anticuerpos contra la MOMPr.	45



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Serotipos de *Chlamydia trachomatis* que producen enfermedad en el hombre. 13

TABLA 2: Sensibilidad y especificidad de ensayos de detección de *Chlamydia trachomatis*. 17

TABLA 3: Detección de anticuerpos IgG anti-*Chlamydia* en sueros de algunas mujeres embarazadas por las técnicas de ELISA, MIF e Inmunodetección. 46

TABLA 4: Características demográficas y obstétricas de las mujeres embarazadas cuyos sueros mostraron anticuerpos anti MOMPr de *Chlamydia trachomatis*. 48

TABLA 5: Semanas de gestación de las mujeres que resolvieron su embarazo y presencia de anticuerpos IgG anti-*Chlamydia*. 49



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato.
BSA	Albúmina bovina sérica.
CAT	Pruebas de anticuerpos anti-Chlamydia.
CE	Cuerpos elementales.
CR	Cuerpos reticulados.
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados.
EIA	Ensayos inmunoenzimáticos.
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica.
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
HSG	Histerosalpingografía.
HSP	Proteína de choque térmico.
IA	Índice de absorbencia.
IFD	Inmunofluorescencia directa.
ITS	Infecciones de transmisión sexual.
LPS	Lipopolisacárido.
MIF	Microinmunofluorescencia.
MOMP	Proteína principal de membrana externa.
MOMP_r	Proteína principal de membrana externa recombinante.
OTB	Obstrucción tubárica bilateral.
PAAN	Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Solución fosfato salina.
PBS-T	Solución fosfato salina adicionado de Tween 20 al 0.05%.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGR	Pérdida gestacional recurrente.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PVDF	Polivinilideno difluoruro.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
TAE	Tris-Acetato-EDTA.
TRIC	Conjuntivitis de inclusión del tracoma.
UNG	Uretritis no gonocócica.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.
VPN	Valor predictivo negativo.
VPP	Valor predictivo positivo.
VS1-VS4	Región variable 1-4.



RESUMEN

La infección por *Chlamydia trachomatis* provoca diversos padecimientos en la mujer, tales como: enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad por obstrucción tubaria (OTB), embarazos ectópicos y pérdida gestacional recurrente (PGR). La detección de la infección se realiza por serología o presencia del antígeno. La serología es útil en diagnosticar mujeres con OTB, sin embargo, se desconoce si esta técnica puede identificar a mujeres con PGR causada por *C. trachomatis*. Las pruebas serológicas actuales detectan anticuerpos contra la proteína principal de membrana externa (MOMP), que es una proteína de superficie e inmunogénica. Actualmente, se ha clonado el gen que codifica para la MOMP (*ompA*). El objetivo de esta investigación fue la de obtener la MOMP recombinante (MOMPr) de cepas de *E. coli* previamente transformadas con el gen *ompA*. La purificación de la proteína fue mediante cromatografía de afinidad y la detección por SDS-PAGE. La MOMPr mostró un peso molecular de 29.16 kDa, que se confirmó por inmunodetección. Su uso como antígeno en una ELISA indirecta mostró una sensibilidad del 67% y una especificidad del 52% en sueros de mujeres embarazadas. Se propone para futuras investigaciones, buscar un epítipo de la MOMPr que aumente la sensibilidad y especificidad de la prueba. ⁽¹⁻⁷⁾



INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es una bacteria Gram negativa intracelular obligada que se transmite de manera sexual entre individuos homosexuales y heterosexuales. Causa diversos padecimientos tanto en la mujer como en el varón, las más frecuentes en la mujer son: cervicitis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad por oclusión tubárica o por adherencias, embarazos ectópicos y pérdida gestacional recurrente. En el varón causa uretritis no gonococcica, epididimitis y orquitis. Además cabe señalar que en recién nacidos produce neumonía y conjuntivitis. ^(1, 2,8)

La infección por *C. trachomatis* es un problema de salud pública por lo que el diagnóstico temprano es de suma importancia, sin embargo del 70 al 90% de los individuos infectados no muestran ni signos ni síntomas de la infección por este patógeno. Debido a lo anterior diversos países industrializados realizan pruebas de detección temprana en mujeres y varones que inician su vida sexual activa para evidenciar posibles portadores de infección con este patógeno. ^(8,9)

Por lo anterior, la detección de anticuerpos séricos anti-*Chlamydia* ha sido de gran utilidad porque ha permitido reconocer a las mujeres con infertilidad por oclusión tubárica asociada a una infección por *C. trachomatis*. Los antígenos empleados para la detección de estos anticuerpos son el lipopolisacárido y la proteína principal de membrana externa (MOMP). ⁽³⁻⁷⁾



Con los nuevos avances en biología molecular se puede obtener el gen que codifica para la MOMP (*ompA*) e insertarlo a un vector (como un plásmido) que permita expresar la proteína cuando éste se implante en una bacteria o levadura. ⁽¹⁰⁾

Actualmente el laboratorio de virología cuenta con diversas cepas de *E. coli* que presentan plásmidos y expresan la MOMP de *C. trachomatis*, el propósito de la investigación fue obtener, purificar y caracterizar la MOMP recombinante (MOMP_r) de una *E. coli* que contiene el gen *ompA* del serovar L2.

Lo primero que se realizó fue verificar que la cepa de *E. coli* mostrara el gen *ompA* de *C. trachomatis*, una vez visualizado el gen la *E. coli* se cultivó en caldo Luria adicionado de lactosa, se recuperó la bacteria y se lisó por sonicación, el sobrenadante rico en MOMP_r se purificó mediante una columna de afinidad que está formada por esferas de sepharosa 4B conjugadas con glutatión. La proteína ya purificada se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se observó la presencia de una proteína con peso molecular de 29.16 kDa, que corresponde al peso molecular de la secuencia génica del *ompA*, calculada in silico. Mediante inmunodetección se confirmó que esta proteína corresponde a la MOMP de *C. trachomatis* ya que reaccionó con un anticuerpo IgG humano comercial contra *C. trachomatis*.



Esta proteína se utilizó como antígeno en una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-Chlamydia en sueros de mujeres embarazadas que se hospitalizaron para la resolución de su embarazo. La sensibilidad de la técnica de ELISA en la detección de *C. trachomatis* fue del 67% y la especificidad del 52%. Además, se demostró la presencia de anticuerpos de reactividad cruzada contra *C. pneumoniae* y *C. psittaci* por lo que se concluye que la proteína es capaz de detectar anticuerpos contra miembros de la familia *Chlamydiaceae sp.* con una sensibilidad y especificidad del 59 y 80% respectivamente. A pesar de lo anterior esta prueba mostró una diferencia estadística entre las pacientes que fueron atendidas en el Hospital General de Cuernavaca con las atendidas en el Hospital de la Mujer; así como entre el grupo de pacientes que presentaron alguna complicación obstétrica asociada a *C. trachomatis* con las pacientes que mostraron otro padecimiento obstétrico y con aquellas mujeres que tuvieron aborto entre las 2 y 20 semanas de gestación.



1.- MARCO TEÓRICO

Los *Chlamydiales* son patógenos importantes del hombre y animales, su capacidad de producir enfermedades respiratorias, entre otras formas de presentación, es una característica frecuente de estos microorganismos, estando presente en *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Chlamydia trachomatis* y en las familias *Simkaniaceae* y *Parachlamydiaceae*.⁽¹¹⁾

Las clamidias pueden producir, además, diversos cuadros clínicos; los primeros informes acerca de la presencia de clamidias en patologías infecciosas se deben a las descripciones sobre tracoma hechas en China y Egipto hace miles de años.⁽¹²⁾

Chlamydia trachomatis es patógena sólo para el hombre, hace más de 50 años se identificó como el agente causante del tracoma, y en la década de los 80's se comprobó también su papel en diversas infecciones de transmisión sexual y algunas infecciones perinatales, a pesar del espectro clínico de esta bacteria es el agente etiológico que subclínicamente menos se diagnostica, su detección es de suma importancia ya que puede evitar secuelas graves en el humano.^(8,11)

1.1 Características microbiológicas de *Chlamydia trachomatis*.

Los *Chlamydiales* comprenden actualmente cuatro familias: *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* y *Waddliaceae* con un total de trece especies (Fig. 1). Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* son patógenos que infectan una amplia



variedad de organismos, así como diversos protistas, esta familia contiene dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*, con nueve especies. ^(8,11)

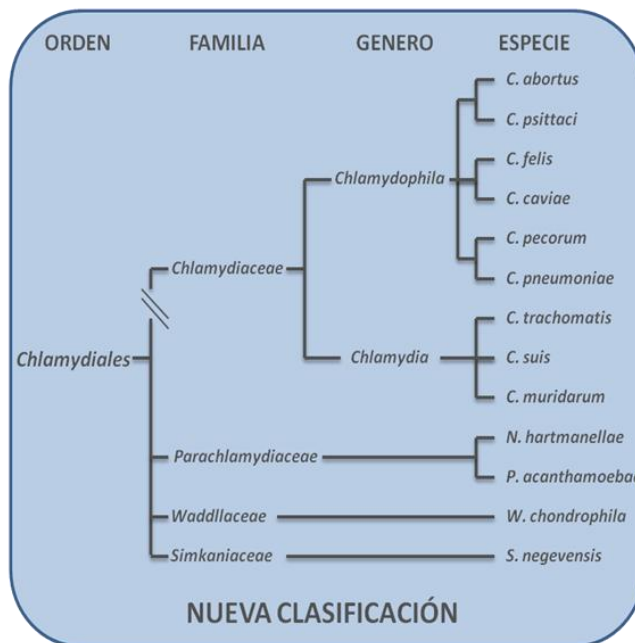


Fig. 1: Clasificación del orden *Chlamydiales* ⁽¹³⁾

Existen tres especies que pueden infectar humanos: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydophila pneumoniae*. *Chlamydophila abortus* también es capaz de causar aborto y sepsis en mujeres embarazadas que han estado en contacto con ovejas o corderos infectados con este germen. ^(1,11)

Los miembros de esta familia son bacterias que tienen morfología de Gram negativas, son esféricas u ovaladas, no móviles, no tienen vida libre y colonizan el citoplasma de las células susceptibles. En décadas pasadas se les consideraba como virus por su tamaño pequeño, pueden atravesar filtros de 0.45 μm , además de ser bacterias intracelulares obligadas por su incapacidad de sintetizar ATP. ⁽⁸⁾



Chlamydia trachomatis alterna entre dos formas de desarrollo, los cuerpos elementales (CE) y los cuerpos reticulados (CR). Los CE son estructuras redondeadas, diminutas (300 nm), con capacidad infecciosa, rígidas, resistentes a la ruptura, se liberan cuando se lisa la célula hospedera infectada. En los CE se encuentran ADN y ARN, presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos, que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica y no se pueden replicar. ^(1, 8, 11,12)

Los CE de las clamidias en su membrana externa secretan proteínas extracelulares ricas en cisteína, unidas de forma cruzada por puentes de disulfuro, proporcionándole al cuerpo elemental protección y forma. Los CE se liberan de la célula del huésped al final del ciclo de infección e invaden nuevas células blancas. Una vez dentro de estas células, las clamidias se transforman en CR que son el resultado de la diferenciación de los CE al ser fagocitados, tienen morfología bacilar, su tamaño va de 600 a 1000 nm y no son infecciosos, los CR son frágiles en comparación con los CE. ^(12,14)

1.2 Estructura de la membrana externa del cuerpo elemental de *Chlamydia sp.*

Al género *Chlamydia* se le considera como bacterias Gram negativas, ya que presentan una membrana externa y una pared celular que carece de peptidoglucano. La membrana externa está constituida por: el lipopolisacárido (LPS, específico de género); las proteínas de superficie (codificadas por familias de genes *Omp*), las adhesinas y el heparán sulfato (Fig. 2). ⁽¹⁵⁾

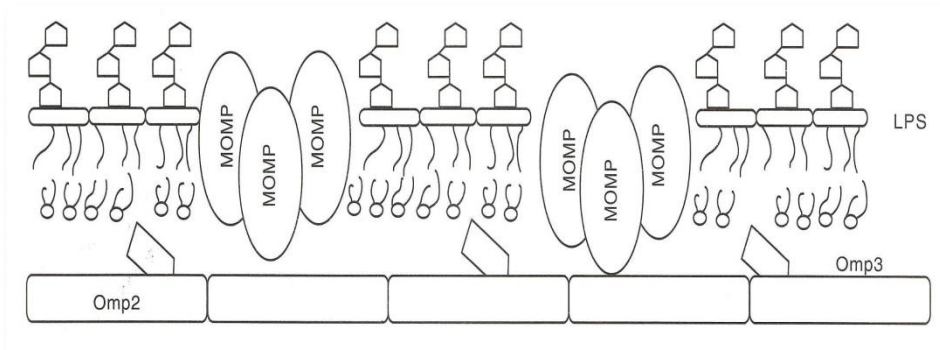


Fig. 2: Estructura de la membrana externa del género *Chlamydia*. Proteína principal de membrana externa (MOMP), Lipopolisacárido (LPS).⁽¹⁵⁾

Las proteínas de la envoltura de *Chlamydia* ricas en cisteína incluyen:

- 1.- Proteína principal de membrana externa (MOMP): es una proteína altamente antigénica que representa al 60% del total de las proteínas de la membrana externa.⁽¹²⁾
- 2.- Proteína de 60 kDa: esta proteína está codificada por el gen *omp2* y confiere a las clamidias una integridad semejante a la dada por el peptidoglucano. Los CR no contienen la proteína de 60 kDa.⁽¹⁴⁾
- 3.- Proteína de 12-15 kDa: codificada por el gen *omp3* es una lipoproteína hidrofílica que tampoco contienen los CR, ayuda en la adhesión a las células del huésped. Se han identificado otras proteínas que pesan: 18, 28 y 82 kDa, las cuales tienen propiedades de adhesión. Existen otras dos proteínas en la membrana externa que son ricas en cisteína y que se denominan *OmcA* y *omcB*.^(14,15)



También se ha confirmado la presencia de tres proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) en la membrana de *Chlamydia sp*, la HSP10, HSP60 y la HSP70 que son relevantes por que se han asociado con la presencia de niveles altos de anticuerpos contra estas proteínas en mujeres que muestran enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) e infertilidad.⁽¹⁴⁾

La membrana externa también se compone por el LPS que contiene el antígeno O, su estructura es similar al del LPS rugoso que se encuentra en algunas bacterias entéricas. El LPS es un antígeno presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*.^(8,12)

1.3 Estructura y genes de la MOMP.

El genoma de *C. trachomatis* y de otros miembros de la familia *Chlamydiaceae* ha sido secuenciado en su totalidad, posee un tamaño de 1, 042,519 pares de bases que codifican aproximadamente para 895 proteínas, entre ellas las proteínas de membrana externa (MOMP, OmcA y OmcB), el gen *ompA* que codifica para la MOMP consta de aproximadamente 1200 pb.⁽¹⁰⁾

La MOMP se expresa en la envoltura del cuerpo elemental, tiene una masa de aproximadamente 40 kDa (entre 41.6 kDa y 37.76 kDa); muestra una función de porina, adhesina y contiene epitopes antigénicos de superficie, esta proteína presenta una estructura β -plegada. Las porinas son una familia de canales que se localizan en las membranas externas de las bacterias Gram negativas y sirven como caminos de difusión para nutrientes, productos de desecho y antibióticos, así como receptores para bacteriófagos.^(16,17)



Esta proteína es común a los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta características estructurales y de inmunogenicidad para cada una de las especies, tiene cuatro dominios variables que tienden a situarse en la superficie de la membrana y cinco constantes (Fig. 3).⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

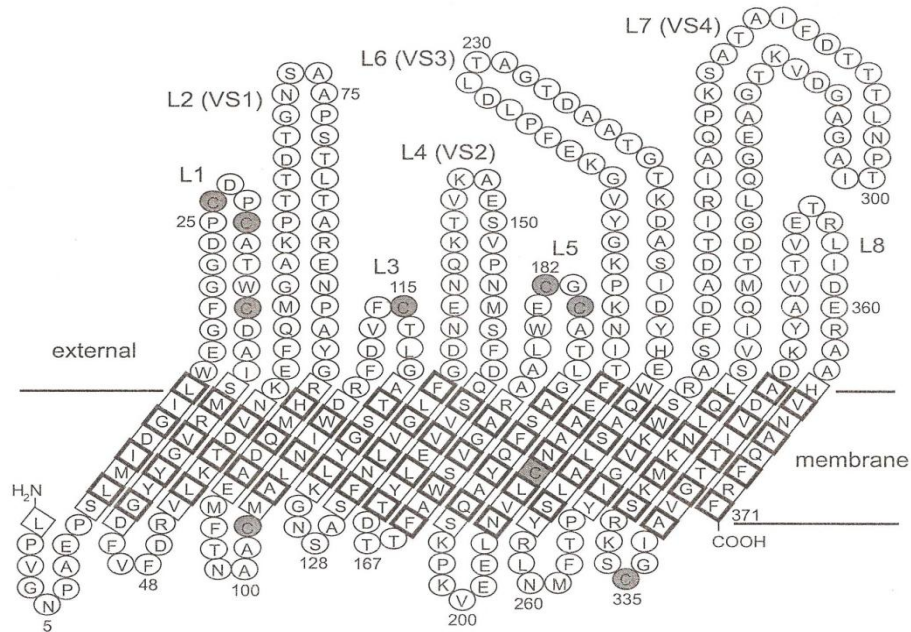


Fig 3: Estructura de la proteína de membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, se muestran los cuatro dominios variables (VS1-VS4) expuestos en la superficie y los dominios constantes dentro de la membrana.⁽¹⁰⁾

Las regiones variables (VS) corresponden a las asas expuestas en la superficie, que son ricas en cisteína y forman oligómeros lo que hace que los CE sean muy resistentes a la temperatura, pH y a las condiciones del ambiente; en cambio, los CR al ser metabólicamente activos, reducen sus residuos de cisteína y presentan a la proteína en forma monomérica por lo que no pueden sobrevivir por mucho tiempo fuera de la célula hospedera. Al encontrarse las regiones en la superficie de la membrana externa, se ha



demostrado que las regiones VS1, VS2 y VS4 estimulan la respuesta humoral, mientras que la región VS3 estimula la respuesta celular. ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

Esta proteína es inmunogénica, ya que presenta epitopos inmunodominantes (específicos de especie), por lo que se ha considerado como una proteína útil para la producción de vacunas. ⁽¹⁰⁾

1.4 Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*.

El ciclo celular (Fig. 4) se inicia cuando un cuerpo elemental se acopla a la célula hospedadora por un mecanismo de tipo adhesina-receptor. Se han propuesto varios proteoglicanos de la superficie de las células eucariotas como potenciales ligandos, los glucosaminoglicanos homólogos al heparán sulfato son los más prometedores. Penetran en la célula por endocitosis y se forma un fagosoma, que no fusiona con los lisosomas de la célula hospedadora. El cuerpo elemental se reorganiza en el cuerpo reticulado; dentro de la vacuola rodeada por una membrana, el cuerpo reticulado aumenta de tamaño y se divide varias veces por fisión binaria. ⁽¹²⁾

Con el tiempo, la vacuola se encuentra llena de CE derivados de la fisión binaria de los CR para formar una inclusión en el citoplasma de la célula huésped. Los CE recién formados pueden liberarse de la célula huésped para infectar nuevas células. La liberación de los CE de las células infectadas es mediante lisis celular o exocitosis, el ciclo de reproducción dura de 24-48 horas. ^(8,14)

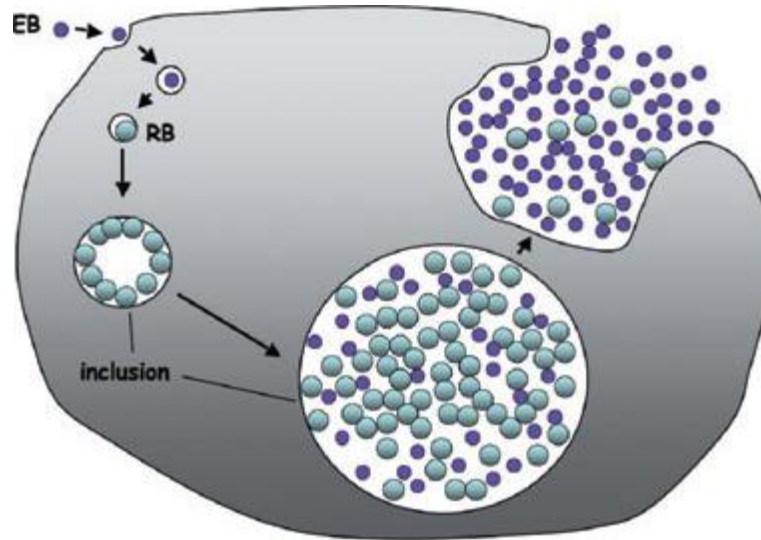


Fig. 4 Esquema del ciclo replicativo de *Chlamydia trachomatis*.⁽¹⁹⁾

1.5 Espectro clínico de infección por *Chlamydia trachomatis*

Las especies de *C. trachomatis* se clasifican en serovares basados en la reactividad del suero del paciente contra la MOMP. Se han identificado 19 serovares los cuales están divididos en dos biovares: el biovar TRIC, que consiste de cepas que infectan al epitelio columnar y que incluye las cepas A, B, Ba y C (asociadas al tracoma ocular), los serovares del D al K (causantes de infección en el tracto urogenital) y el biovar linfogranuloma venéreo, el cual afecta al tejido linfático y que se compone de los serovares L1, L2, L2a y L3 (Tabla 1).^(1, 10,20)



Tabla 1: Serotipos de *Chlamydia trachomatis* que producen enfermedad en el hombre. ⁽¹⁾

Grupo	Serotipo	Enfermedad
LGV	L1, L2, L2a, L3	Linfogranuloma venéreo
TRIC	A,B, Ba, C	Tracoma
TRIC	D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K	Conjuntivitis de inclusion (adultos y neonatos) Infecciones de genitales (uretritis no gonocócica, epididimitis,cervicitis, salpingitis) y neumonía neonatal

1.6 Infecciones genitales causadas por *Chlamydia trachomatis*.

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) figuran entre las principales causas de enfermedad en el mundo, durante los últimos 20 años su importancia se ha acrecentado debido a su relación con graves problemas del aparato reproductor. La infección por *C. trachomatis* es la enfermedad de transmisión sexual más común y curable, en la mayoría de los países industrializados. ^(9,21)

Chlamydia trachomatis se considera ahora como el patógeno más frecuente de transmisión sexual, particularmente en personas menores de 25 años de edad. La importancia de *C. trachomatis* a nivel mundial se fundamenta en las predicciones de la Organización Mundial de la Salud, la cual estimó 90 millones de infecciones por año, y la tendencia mundial es a aumentar cada año con excepción de países en donde se están llevando programas de escrutinio y el resultado es una reducción importante de la infección por *C. trachomatis*. ^(9, 22,23)



En México los datos de prevalencia de las infecciones por *C. trachomatis* son escasos y dependen de factores asociados a la población bajo estudio y al método de diagnóstico empleado, existen publicaciones que indican que es del 9% en población abierta, 16% en mujeres embarazadas y 18% en mujeres infértiles. ⁽²⁴⁾

Se han identificado diversos factores de riesgo asociados con la historia natural de la infección por *C. trachomatis*: el número de parejas sexuales, la edad, el nivel socioeconómico, los hábitos higiénicos, el uso de anticonceptivos orales y la presencia de otras ITS. ⁽²⁵⁾

Chlamydia trachomatis afecta a ambos sexos, pero tiene mayor impacto en las mujeres, principalmente mujeres jóvenes y adolescentes sexualmente activas. Las variedades serológicas de la D a la K son la causa de cervicitis, uretritis, endometritis, salpingitis y perihepatitis, también causa la EIP (algunos estudios seroepidemiológicos han descrito que una proporción del 40-80% de los casos de EIP son debidos a *C. trachomatis*) la cual puede conducir a infertilidad. ^(1, 8, 12,25)

En las mujeres puede dar lugar a embarazos ectópicos, bartolinitis, endometritis, sin olvidar la transmisión vertical al neonato. El mayor desafío para el control de la infección por *Chlamydia trachomatis* es que del 70-90% de las mujeres y más del 50 % de los varones que se infectan no experimentan ningún síntoma. Esto da como resultado un gran reservorio de individuos infectados no reconocidos que son capaces de transmitir la infección a sus parejas sexuales. ^(9,25)



Chlamydia trachomatis también es causa del 40 al 60% de la uretritis no gonocócicas (UNG) de los varones, en los últimos años se ha detectado una disminución en el porcentaje de individuos con esta patología (10-20%). Sin embargo, se ha observado un aumento en la infección por esta bacteria en varones jóvenes que no muestran sintomatología de UNG (3.7-10.3%) o que presentan manifestaciones clínicas mínimas de infección uretral, al no ser detectados no reciben tratamiento y actúan como reservorio de *C. trachomatis* transmitiendo el patógeno a sus parejas sexuales. Se ha informado que las muestras de semen de los compañeros sexuales de mujeres con diagnóstico de infertilidad son positivas a *C. trachomatis* entre 10 y 39.3%. Por otro lado, *C. trachomatis* puede provocar una infección urogenital crónica asintomática o una infección con sintomatología aguda que puede afectar los parámetros espermáticos. Los espermatozoides pueden funcionar como reservorios y vectores de *C. trachomatis*, esparciendo al patógeno en todas las superficies del útero y en las trompas de Falopio de su compañera sexual.⁽²⁴⁾

La infertilidad conyugal es un problema de distribución mundial y magnitud creciente. Se calcula que del 20-35% de las parejas que desean procrear no pueden tener hijos, y que, el factor masculino es responsable del 30 al 50% de esos casos, en muchos casos el origen de la infertilidad masculina no está bien identificado, pero se han referido una gran cantidad de factores, uno de estos factores determinantes es la patología infecciosa de tipo inespecífico de la vía seminífera. En el semen de varones infértiles se han aislado diversas clases de bacterias, entre ellas, *C. trachomatis*. En algunos reportes se menciona que *C. trachomatis* está presente en el 71% de los casos de infertilidad masculina y se ha



descrito su adherencia y penetración al citoplasma del espermatozoide, el tratamiento de la infección por *C. trachomatis* podría evitar la infertilidad futura de hombres y mujeres.

(9,26-28)

1.7 Infección y complicaciones por *Chlamydia trachomatis* en mujeres embarazadas.

Las infecciones del aparato reproductivo son enfermedades frecuentes que pueden tener consecuencias serias para la salud de las mujeres, los hombres y los niños. La repercusión más seria debida a las ITS excluyendo al VIH/SIDA, tiende a ocurrir en mujeres y recién nacidos. En los países en vías de desarrollo, las complicaciones maternas que se relacionan directamente con las ITS no tratadas representan la primera causa de morbi-mortalidad materno-infantil. ⁽²⁹⁾

Las infecciones causadas por *C. trachomatis* pueden producir secuelas obstétricas durante el embarazo, así como en el recién nacido al pasar a través del canal del parto. Se ha reportado una prevalencia de infección clamidial del 2-35% en el cuello uterino y se ha documentado que los niños nacidos de una mujer infectada son más susceptibles de adquirir la infección. Entre estos infantes el riesgo de desarrollar conjuntivitis de inclusión varía desde 18-50% y el riesgo de neumonía desde 3% hasta 20%. ⁽²⁾

Uno de los factores que aumentan el riesgo de embarazo ectópico son los procesos inflamatorios del útero y trompas de Falopio que se originan en su gran mayoría por agentes transmitidos sexualmente, especialmente con el antecedente de infección por *Chlamydia trachomatis*. La incidencia del embarazo ectópico ha aumentado en los últimos



20 años, es una de las principales causas de mortalidad materna durante el primer trimestre de embarazo. *Chlamydia trachomatis* provoca lesiones irreversibles que no se deben a virulencia directa, sino a una respuesta inmunológica local específica dirigida contra antígenos de la trompa de Falopio, considerándose como una autoinmunidad órgano-específica. ⁽³⁰⁾

1.8 Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis*

Después de la detección de inclusiones por tinción de Giemsa en 1907, los métodos de detección han mejorado con respecto a la sensibilidad, especificidad, y en la reducción de tiempo para realizar el ensayo. Las pruebas comúnmente utilizadas en la detección de este microorganismo se muestran en la tabla 2. ⁽²³⁾

Tabla 2: Sensibilidad y especificidad de los ensayos de detección de *Chlamydia trachomatis*. ⁽²³⁾

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Límite de detección (Nº de CE que detecta)
PAAN	90-95	>99	1-10
IFD	80-85	>99	10-500
EIA	60-85	99	500-1000
Pruebas de detección de ácidos nucleicos	75-85	>99	500-1000
Cultivo celular	50-85	100	5-100

PAAN: Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, IFD: Inmunofluorescencia directa, EIA: Ensayos inmunoenzimáticos.



Los dos antígenos usados para su detección en las pruebas de Inmunofluorescencia directa (IFD) y ensayos inmunoenzimáticos (EIA) son la MOMP y el LPS, sin embargo, los anticuerpos monoclonales utilizados presentan reactividad cruzada y ocurren enlaces inespecíficos por lo que actualmente estas pruebas de detección de antígenos se están reemplazando por pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN).⁽²³⁾

El cultivo celular se considera el estándar de oro para las infecciones por *Chlamydia* debido a que su especificidad es cercana al 100%, sin embargo, presenta algunas desventajas; la técnica es laboriosa, cara y relativamente insensible comparada con las recientemente desarrolladas PAAN.^(23,31)

En cuanto a los sistemas de detección de ADN o ARN de *Chlamydia* y que no conllevan amplificación la mejor prueba disponible es hibridación en fase líquida (PACE-2), que comparada con el cultivo celular posee una especificidad alrededor del 99%. En los últimos 30 años se han desarrollado las PAAN, en estas pruebas de amplificación la cantidad original de ácidos nucleicos presentes en la muestra clínica se multiplica. Las PAAN son más sensibles comparadas con el cultivo y la detección de antígenos y debido a la sensibilidad incrementada genera del 25-40% más de resultados positivos en la detección de *Chlamydia* comparado con el cultivo celular.⁽²³⁾

1.9 Detección de anticuerpos séricos anti- *Chlamydia trachomatis*.

El diagnóstico de infecciones por microorganismos intracelulares, frecuentemente se basa en la presencia de anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión, sin embargo, las pruebas serológicas generalmente no son útiles en el diagnóstico de



infección del aparato genital por *C. trachomatis*, debido a que los niveles de anticuerpos IgG producidos durante una infección por esta bacteria se encuentran elevados por mucho tiempo, por lo que una prueba de anticuerpos positiva no distinguiría de una infección anterior a una actual. A pesar de esto, las pruebas serológicas han tenido mayor utilidad en la detección de pacientes con EIP o infertilidad por factor tubárico. Debido a esta alta asociación, varios países industrializados han incluido en su clínica ginecológica las pruebas serológicas que identifican a los anticuerpos anti *Chlamydia* como métodos de diagnóstico para la detección de mujeres con infertilidad por factor tubárico o EIP. ^(15, 32,33)

Se ha encontrado que los títulos elevados de IgG son altamente predictivos de infección reciente o exposición pasada a *C. trachomatis*. En la literatura se ha confirmado considerablemente la correlación entre anticuerpos elevados contra *Chlamydia* e infertilidad tubárica, sin embargo, estas pruebas no se utilizan ampliamente como diagnóstico. En la detección de enfermedad tuboperitoneal, se considera la prueba de oro la laparoscopia y la prueba de detección inicial más común es la histerosalpingografía (HSG); la laparoscopia es un procedimiento invasivo, por lo que pueden presentarse complicaciones, debido a esto, se propone utilizar procedimientos menos invasivos para una investigación inicial en las pacientes. Cuando la HSG y la serología de *Chlamydia* se combinaron en estudios previos, su sensibilidad y especificidad para hallar patología tubárica se incrementa cerca del 80%. Estas pruebas de anticuerpos IgG contra *C. trachomatis* (CAT, por sus siglas en inglés) se usan ampliamente como pruebas de detección de infertilidad por factor tubárico. El valor predictivo de CAT puede mejorar usando otros marcadores serológicos asociados a daños tubaricos. ⁽³⁻⁷⁾



El primer método serológico empleado para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* fue la prueba de fijación del complemento, sin embargo, esta cayó en desuso y fue sustituida por la microinmunofluorescencia (MIF, por sus siglas en inglés) que utiliza pequeños volúmenes de suero; es muy sensible para detectar, inmutipificar y cuantificar anticuerpos y se considera como el “estándar de oro” en el diagnóstico serológico de *C. trachomatis*. Anteriormente se utilizaron antígenos por separado para cada inmutipo; actualmente, se ha encontrado que es más práctico utilizar una mezcla de antígenos. La prueba se puede utilizar con conjugados monoespecíficos de las clases IgM, IgG e IgA. ^(14, 15,33)

La técnica de MIF es demandante y laboriosa, como consecuencia, se está reemplazando en algunos centros de investigación por ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), para detección de anticuerpos. La técnica de ELISA detecta anticuerpos contra antígenos específicos de género o LPS de cuerpos elementales o cuerpos reticulares y se emplea en estudios seroepidemiológicos porque es menos costosa y más fácil de realizar a gran escala. ^(15,34)

En los últimos años esta técnica ha mostrado avances sobre el tipo de antígeno que se utiliza para evitar la detección de anticuerpos de reacción cruzada, recientemente se han desarrollado péptidos sintéticos especie-específicos para la detección de anticuerpos de *C. trachomatis* que utilizan la región inmunodominante de la MOMP. Estos antígenos son altamente específicos y hacen posible discriminar entre anticuerpos específicos de *C. trachomatis* y la respuesta inmune total anti-Chlamydia. Estos ensayos son específicos (97-98%) y sensibles (70-85%), y se ha demostrado que son tan buenos como la MIF. La



comparación correcta de estos ensayos serológicos es necesaria dado que estas pruebas son menos caras y laboriosas que la MIF. ^(35,36)

Otra forma de obtención de antígenos se da con el desarrollo de la biología molecular y el método de clonación de ácidos nucleicos, de esta forma se están obteniendo antígenos recombinantes de parásitos y bacterias que se pueden utilizar para la detección de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA y que una vez estandarizadas son pruebas altamente sensibles y específicas y que pueden incorporarse confiablemente en los protocolos de diagnóstico. ^(37,38)



2.- PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Chlamydia trachomatis es un microorganismo de transmisión sexual que causa diversos padecimientos tanto en el varón como en la mujer. Actualmente, la importancia de *C. trachomatis* a nivel mundial se fundamenta en las predicciones de la Organización Mundial de la Salud, la cual estima que cada año ocurren aproximadamente 90 millones de casos nuevos de infección por este patógeno, con un costo aproximado de 4.5 miles de millones de dólares por año en gastos de prevención, diagnóstico, tratamiento e investigación. Debido a lo anterior, la infección por este microorganismo se ha considerado como un problema de salud pública, por lo que diversos países industrializados realizan pruebas de detección temprana de infección en mujeres y varones que inician su vida sexual activa. La detección de anticuerpos IgG anti-Chlamydia (CAT) por microinmunofluorescencia, ELISA o inmunofluorescencia indirecta se ha utilizado para identificar mujeres con oclusión tubárica y EIP. En México existe poca información sobre la utilidad de la detección de CAT, y no se ha evaluado en mujeres con aborto habitual, endometritis, embarazos ectópicos o cervicovaginitis. ^(1,3-9,15)

Debido a lo anterior, esta investigación tiene como objetivo obtener, purificar y caracterizar a la MOMP recombinante de *C. trachomatis* obtenida de *E. coli* que previamente se ha transformado con el gen *ompA* de este patógeno, con el propósito de estandarizar una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti Chlamydia en sueros de mujeres embarazadas hospitalizadas para resolución de su embarazo.



3.- OBJETIVOS

a) Objetivo general.

Obtener, purificar y caracterizar la proteína principal de membrana externa recombinante (MOMPr) de *Chlamydia trachomatis*.

b) Objetivos Particulares.

1. Verificar que la *E. coli* BL-21 transformada muestre el gen *ompA* de *C. trachomatis*.
2. Inducir la expresión de la proteína principal de membrana externa de *C. trachomatis*.
3. Purificar la proteína principal de membrana externa recombinante de *C. trachomatis* por cromatografía de afinidad.
4. Detectar la proteína principal de membrana externa recombinante de *C. trachomatis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección.
5. Demostrar la utilidad de la proteína principal de membrana externa recombinante de *C. trachomatis* para el diagnóstico de infección por este patógeno mediante técnica de ELISA.

4.- HIPÓTESIS.

Ha. La proteína principal de membrana externa recombinante de *C. trachomatis* es útil para identificar mujeres con infección por este patógeno.

Ho. La proteína principal de membrana externa recombinante de *C. trachomatis* no es útil para identificar mujeres con infección por este patógeno.



5.- DISEÑO METODOLÓGICO.

A) POBLACIÓN DE ESTUDIO

La recolección de muestras de suero se realizó entre Enero del año 2000 y Diciembre del año 2002 en el Hospital de la Mujer del D.F. y en el Hospital General de Cuernavaca, a mujeres hospitalizadas para la resolución del embarazo (a término, pretérmino, óbitos, ectópicos y abortos). Todos los sueros se mantuvieron congelados a -70 °C.

B) CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres embarazadas que fueron hospitalizadas para la resolución del embarazo.
- Mujeres embarazadas que aceptaron participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres embarazadas que estén recibiendo terapia antimicrobiana dentro de las 72 hs previas al estudio.
- Mujeres embarazadas con enfermedades severas tales como neoplasias, autoinmunidad o de trastornos hematológicos.
- Mujeres embarazadas cuyo estado de consciencia y/o estado de gravedad limitaban su capacidad para aceptar participar en el proyecto.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes cuyos datos se encuentran incompletos.
- Muestras de suero en mal estado.



C) VARIABLES

Variable dependiente: Capacidad de la técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti MOMP de *C. trachomatis*.

Variables independientes:

Presencia del gen *ompA* en *E. coli*.

Deficiencia en la purificación de la proteína principal de membrana externa recombinante de *Chlamydia trachomatis*.

Deficiencia en la adsorción de la proteína principal de membrana externa recombinante de *Chlamydia trachomatis* a placas de ELISA.

Presencia de alto contenido de lípidos o precipitados en los sueros problemas

D) DISEÑO ESTADÍSTICO

Estudio experimental donde se determinará la sensibilidad y la especificidad (ver anexo) de la prueba de ELISA. Prueba exacta de Fisher para determinar asociaciones entre la patología (embarazo ectópico, aborto recurrente y óbito) y la positividad de la prueba.

E) MATERIAL (BIOLÓGICO, MATERIAL, EQUIPO, REACTIVOS)

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de *E. coli* BL-21 transformadas con el plásmido pGEX-6P-1
- Sueros de pacientes del Hospital de la Mujer del D.F. y de pacientes del Hospital General de Cuernavaca.
- Suero de chivo Anti-Inmunoglobulinas totales humanas conjugadas a peroxidasa. (Calbiochem)



- Estuche de prueba para detección de anticuerpos contra *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci* (AniLabsystems) mediante la técnica de microinmunofluorescencia.

MATERIAL

- Microplacas de poliestireno de 96 pozos (Costar 3591)
- Matraz Erlenmeyer de 50 y 200 mL. (Pyrex)
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL. (Pyrex)
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL. (Falcon)
- Matraz aforado 100 y 1000 mL. (Pyrex)
- Vasos de precipitados 50 mL. (Kimax)
- Puntas para pipetas automáticas 10-1000 μ L (Axigen)
- Pipetas automáticas. (Labsystem)

EQUIPO E INSTRUMENTOS

- Centrífuga. (Damon/IEC Division)
- Balanza analítica. (Ohaus)
- Sonicador (Branson sonifier).
- Placa de agitación. (Mistral, multi-mixer)
- Equipo para montaje de geles de poliacrilamida (Mini protean 3 Cell, Bio rad).
- Estufa 37 °C. (Lab-Line, Instruments Inc)
- Lavador de microplacas (Handiwash, Dynatech)
- Lector de ELISA (Ceres 900 HD BIO-TEX).



-
- Microscopio de fluorescencia. (Carl-Zeiss)
 - Potenciómetro. (Jenway)
 - Fuentes de poder para electroforesis (Amersham, Biosciences)
 - Vortex (Thermolyne type)
 - Baño María (GEMINI, Robbins Scientific®)
 - Microcentrífuga (Beckman, Coulter)
 - Termociclador (PTC-100 MJResearch© USA)

REACTIVOS

- Caldo LB con ampicilina. (USB)
- Lactosa (Merck) 64 mM
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
- Sefarosa (Gluthatione sepharose 4 fast flow, Amersham biosciences)
- Membrana de transferencia (Polyscreen).
- Solución fosfato salina (PBS) 1X
- Solución fosfato salina adicionada de Tween20 al 0.05% (PBS-T)
- Tris-HCl 50 mM, glutatión reducido 10 mM pH 8. (Sigma)
- Persulfato de amonio (Promega Corporation, USA)
- Geles de poliacrilamida (sellador, separador, concentrador).
- Regulador de corrimiento para electroforesis.
- Regulador 2X (mezcla con la muestra)
- Solución para tinción de proteínas



-
- Solución decolorante para geles de poliacrilamida.
 - Reactivo de Bradford. (BIO-RAD)
 - Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.1 M
 - Solución reguladora de citrato-ácido cítrico pH 5.0
 - Peróxido de hidrógeno (Merck)
 - Ortofenilendiamina (Sigma)
 - H₂SO₄ 1N (Baker)
 - Regulador de lisis
 - Fenol (Ambion)
 - Cloroformo (Merck)
 - Etanol (Merck)
 - NaCl 1M (Baker)
 - Solución reguladora Tris-Acetato- EDTA (TAE)
 - Regulador de PCR (PROMEGA)
 - Iniciadores P3 y P4 (PROMEGA)
 - Cloruro de Magnesio (PROMEGA)
 - Taq polimerasa (PROMEGA)
 - dNTPs (PROMEGA)
 - Regulador de transferencia
 - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Boehringer, Mannheim)



F) MÉTODOS

Extracción de ADN de la cepa de *E. coli* BL-21 transformada con el plásmido pGEX-6P-1: A un tubo Eppendorf se le adicionó 1 mL de la cepa *E.coli* crecida en caldo Luria con ampicilina, posteriormente se le agregaron 200 μ L de regulador de lisis (ver anexo) y se agitó en vortex por 1 minuto, la mezcla se incubó una hora a 56° C. Pasado el tiempo, se agregaron 200 μ L de fenol y 200 μ L de cloroformo, se agitó en vortex por 1 min y la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se le añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó en vortex por 15 minutos, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 30 μ L de NaCl 1 M y 1 mL de etanol absoluto frío (-20° C), mezclándose por inversión para posteriormente centrifugar a 13000 rpm, por 15 minutos a 4° C, el sobrenadante se decantó y la pastilla de ADN se dejó secar para después reconstituirse con 40 μ L de agua inyectable. La integridad del ADN se verificó por una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución reguladora TAE.

Amplificación del gen *ompA*: El volumen final para llevar a cabo la PCR fue de 20 μ L con el siguiente esquema: se adicionaron 4 μ L de regulador de PCR, 30 pM de cada uno de los iniciadores, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 2.5 U de Taq polimerasa, 0.2 mM de dNTPs y 1 μ L de ADN extraído de la cepa de *E. coli* BL-21 transformada, completando los 20 μ L con agua inyectable. Para la amplificación del gen *ompA* de 879 pares de bases se utilizaron los iniciadores:



NOMBRE	SECUENCIA
P3 SENTIDO	T GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT TT
P4 ANTISENTIDO	TTT TCT AGA TTT CAT CTT GTT CAA T/CTG

La muestra se procesó en un termociclador con los siguientes ciclos: calentamiento inicial a 95° C por 5 minutos y 35 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 1.5 minutos; alineación a 59 °C por 1.5 minutos y extensión a 70° C por 1.5 minutos, y una extensión final a 70° C por 10 minutos. Los productos de la amplificación del PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio al 0.1%, en el mismo gel se metió un marcador de peso molecular.

Obtención de la MOMPr: Se creció una colonia de la bacteria recombinante en un tubo con 10 mL de caldo LB con ampicilina a 37° C por 24 horas. Se inocularon 5 mL del cultivo a 50 mL de caldo LB con ampicilina y se incubaron por 6 horas, 15 mL de este cultivo se transferirieron a un matraz con 150 mL de caldo LB con ampicilina, se agitó por dos horas y se agregaron 5 mL de lactosa 64 mM. El cultivo se mantuvo en agitación por tres horas. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 5 mL de PBS y se trató con un sonicador con 5 pulsos de 5 minutos por 10 minutos de descanso. Se agregaron 100 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, que se almacenó a -70°C hasta su uso.



Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad: Se midieron 5 mL de sepharosa conjugada a glutation y se incubaron con 5 mL del lisado celular por 30 minutos a temperatura ambiente usando agitación suave. La sepharosa se sedimentó por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante (se guardó para su posterior análisis por SDS-PAGE). La sepharosa se lavó agregando 25 mL de PBS. El medio se sedimentó por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos y cuidadosamente se decantó (lavado 1), este paso se repitió hasta completar tres lavados (los lavados también se guardaron para su análisis electroforético). Las proteínas se eluyeron agregando 2.5 mL de una solución de glutatión reducido (10 mM) en Tris-HCl (50 mM), pH 8.0 (ver anexo), se incubó 10 minutos, con agitación suave. Posteriormente, la sepharosa se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, cuidadosamente se decantó el sobrenadante (elusión 1). Los pasos de elusión de proteínas se repitieron hasta obtener tres eluidos, para la recuperación total de la proteína.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS: Para montaje del gel se utilizó una cámara de electroforesis comercial (Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad), se preparó y colocó un gel sellador en la parte inferior, una vez que polimerizó se preparó el gel separador (ver anexo) y se agregaron 3.5 mL de la mezcla entre los vidrios; se dejó gelificar para después agregar el gel espaciador (ver anexo), en una cantidad necesaria para que cubra la totalidad del espacio entre los vidrios y se colocó el peine para crear los pozos. Después de la gelificación del gel espaciador la cámara se llenó con el amortiguador de corrida (ver anexo), se colocaron 15 μ L de la muestra de proteína recombinante



obtenida mezclada con solución para la muestra (ver anexo) volumen a volumen, también se colocó el marcador de peso molecular en uno de los carriles laterales. Las muestras se corrieron a 120 V, finalizado el tiempo de corrimiento, el gel se tiñó con colorante Coomassie (ver anexo), sumergiéndolo durante toda la noche, luego se eliminó el exceso del colorante con varios cambios de la solución decolorante (ver anexo); los resultados se registraron mediante un fotodocumentador.

Determinación de proteínas por el micrométodo de Bradford: La concentración de proteína purificada se calculó a partir de una curva patrón preparada con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de 0 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Se colocaron 150 μL de BSA de concentración conocida (8, 10, 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$) en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y 150 μL de glutatión reducido 10 mM en Tris-HCl 50 mM como solución blanco. En los pozos siguientes se colocaron 150 μL de la proteína recombinante MOMP obtenida. Finalmente, a todos los pozos se les adicionaron 150 μL de reactivo de Bradford. La microplaca se incubó 60 minutos y se leyó a 595 nm. Se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras problema en la curva patrón realizada con BSA y se determinó la concentración de proteína presente en cada muestra.

Técnica de ELISA: Para detectar la presencia de anticuerpos anti MOMP mediante la técnica de ELISA se emplearon microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, las cuales se sensibilizaron con la proteína recombinante obtenida, ajustada a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ en solución de carbonatos 0.1M, pH 9.6. Las microplacas se



incubaron durante 2 horas a 37° C, terminado este tiempo se realizaron cuatro lavados con PBS-T mediante un lavador automatizado de microplacas. Posteriormente se bloquearon las microplacas con 100 µL de una solución de BSA al 1% en PBS-T y se incubaron a 37° C durante 1 hora, terminado este tiempo se realizó nuevamente un ciclo de cuatro lavados, al finalizar se adicionaron 100 µL del suero problema diluido previamente 1:100. La microplaca se incubó nuevamente a 37° C durante 1 hora, la microplaca se lavó nuevamente y se agregaron 100 µL de anticuerpo de cabra anti-IgG de humano conjugado a peroxidasa diluido previamente 1:15,000. La microplaca se incubó nuevamente a 37° C durante 1 hora, se realizó un nuevo ciclo de lavados y después se le agregaron 100 µl de la solución de sustrato (10 ml de solución de citratos pH 5.0, con 8 µl de peróxido de hidrógeno y 4 mg de orto-fenilen-diamina), la reacción se llevó a cabo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min; la reacción se detuvo adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 1N. Finalmente las lecturas de absorbancia se midieron a 490 nm en un lector de ELISA.

Técnica de Microinmunofluorescencia: Se empleó un estuche comercial (AniLabsystems) el cual contiene laminillas divididas en 21 pozos con cuerpos elementales de *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pneumoniae* en cada pozo. A cada una de las muestras de suero se les realizaron diluciones hasta 1:32. A cada pozo se le adicionaron 20 µL de cada uno de los sueros diluidos, incluyendo control positivo y negativo; las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37° C por 30 min, posteriormente se lavaron con PBS y se secaron a temperatura ambiente; después a cada pozo se les agregaron 20 µL de conjugado anti-IgG humano fluoresceinado; nuevamente las laminillas se incubaron en



cámara húmeda a 37° C por 30 min, se lavaron con PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente a cada laminilla se les adicionó el líquido de montaje y se les colocó el cubreobjetos. Las laminillas se observaron en el microscopio de inmunofluorescencia y los resultados se consideraron como:

Positivas si se observan CE teñidos de color verde fluorescente a un titulo 1:32.

Negativo si no se observan CE teñidos de color verde fluorescente a un titulo 1:32.

Transferencia de la proteína MOMPr a membrana de PVDF: Se realizó un corrimiento electroforético (SDS-PAGE 12%) de la proteína MOMPr, como se mencionó anteriormente. Se cortaron trozos de papel filtro y membrana de transferencia de 8 x 8 cm los cuales se sumergieron en el regulador de transferencia (ver anexo). Se colocó un casete del equipo y sobre este una esponja, posteriormente se colocó papel filtro y la membrana humedecida, para finalmente acomodar el gel que contiene el corrimiento de proteína MOMPr de manera que no queden burbujas entre el gel y la membrana. Posteriormente se colocó nuevamente papel filtro en la otra parte del casete, aprisionando perfectamente el emparedado. Este casete se depositó en la cámara de corrimiento, se cubrió con regulador de transferencia y se conectó a la fuente de poder, la transferencia se dejó durante 2.5 h a 200 mA. Pasado el tiempo de la transferencia, la membrana se recuperó y se cubrió con 2 trozos de papel filtro y se guardó en refrigeración hasta su uso.



Detección de anticuerpos anti MOMP por inmunodetección: Para la inmunodetección se utilizaron tiras de la membrana de 3 mm de ancho, con la proteína transferida. Se adicionó 1 mL de leche al 1% a la membrana y se dejó incubar a 37° C por 15 minutos, pasado este tiempo se realizaron 10 lavados de 1 minuto con PBS-T. Se adicionó 1 mL de suero a probar en una dilución 1:8, se incubó 1 hora a 37°C y por 18 horas en refrigeración. Posteriormente se realizaron 10 lavados como se describió anteriormente. Al finalizar los lavados, se agregó el conjugado anti IgG humanas acoplado a peroxidasa (Calbiochem) diluido 1:500 y se incubó a 37° C por una hora. Finalmente se realizaron 7 lavados con PBS-T y 3 lavados con PBS y se reveló con 4-cloro-1-alfa-naftol, la reacción se detuvo con adición de agua destilada.



6.- RESULTADOS

6.1 Detección del gen *ompA* y purificación de la proteína MOMP recombinante.

En la figura 5 se muestra la integridad del ADN extraído a la cepa de *E. coli* BL21 transformada, se observan 3 bandas de tamaño molecular aproximado de: 925, 1300 y 19,329 pb que corresponde al ADN plasmídico que posee este microorganismo.

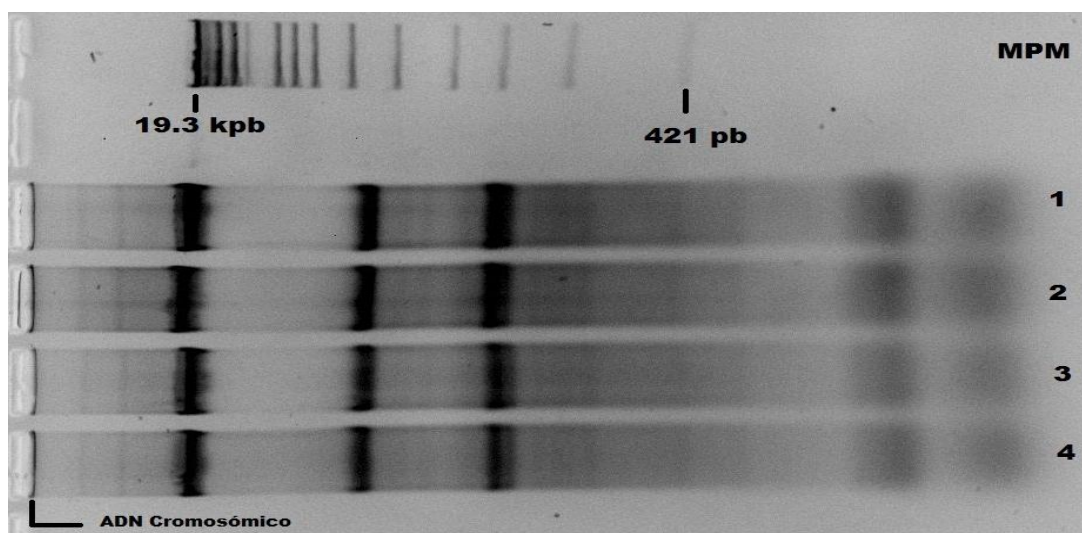


Fig. 5: Análisis electroforético de la extracción del ADN plasmídico de *E. coli* BL21 transformada.

El ADN obtenido de la cepa de *E. coli* BL21 se sometió a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para llevar a cabo la amplificación del gen *ompA* de *C. trachomatis* que codifica para la MOMP, en la figura 6 se aprecia un amplicon de 879 pb que corresponde a este gen.

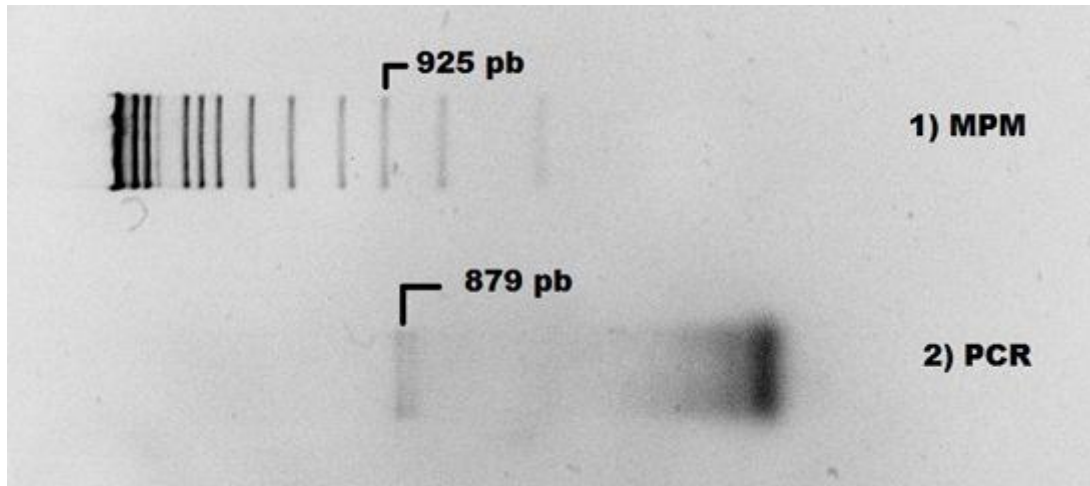


Fig. 6: Amplificación del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* a partir del ADN plasmídico de *E. coli* BL21 transformada. Un amplicon de 879 pb se obtuvo mediante PCR.

Una vez verificada la presencia del gen *ompA* de *C. trachomatis* se realizó el cultivo microbiológico de la *E. coli* BL21 transformada, al medio de cultivo que se empleó se le adicionó ampicilina y lactosa, esta última dispara la expresión de la proteína recombinante. Posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación y el sobrenadante rico en MOMPr se sometió a cromatografía de afinidad para la purificación de ésta. Los productos obtenidos en los diferentes pasos de la purificación se sometieron a análisis electroforético en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 12%, los resultados se muestran en la figura 7.

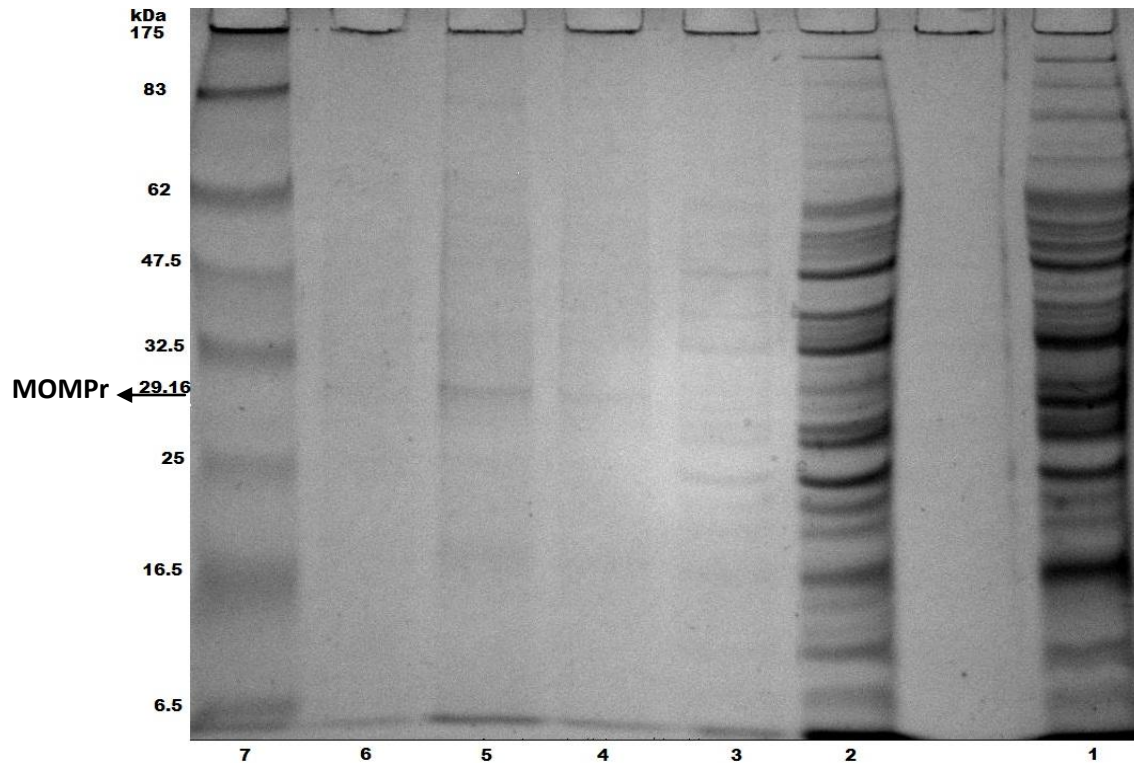


Fig. 7: Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos por cromatografía de afinidad. Carril 1: proteínas totales obtenidas de la lisis de *E. coli* BL21, carriles 2 y 3: proteínas no unidas a la sepharosa y eliminadas en los lavados, carriles del 4-6: productos de la elusión de la MOMPr obtenida con peso molecular de 29.16 kDa, carril 7: marcador de peso molecular.

En el carril 1 se observan las proteínas totales del sobrenadante obtenido de la lisis de *E. coli* BL21 en el que se aprecian más de 30 proteínas, este sobrenadante fue incubado con la sepharosa conjugada a glutation, con el objetivo de que las proteínas de fusión marcadas con Glutathione-S- transferasa se unieran selectivamente a la columna de afinidad. En el carril 2 y 3 se observan las proteínas que no se unieron a la sepharosa y que fueron eliminadas en los lavados. En los carriles del 4 al 6 se observan los productos obtenidos al tratar la columna de afinidad con la solución amortiguadora de elusión que



contiene glutatión reducido que es capaz de liberar la proteína recombinante de interés y que de acuerdo al análisis de la secuencia génica se calcula que tiene un peso molecular de 29.16 kDa.

6.2 Detección de anticuerpos IgG anti MOMPr de *C. trachomatis* mediante la técnica de ELISA.

Una vez purificada la proteína, esta fue cuantificada por el micrométodo de Bradford y fue utilizada como antígeno a una concentración de 0.1 µg por pozo en la técnica de ELISA. En la figura 8 se observa la distribución de los sueros positivos y negativos así como el valor de corte obtenido al aplicar la fórmula correspondiente (la diferencia del valor de absorbancia del control positivo y el negativo, multiplicado por 0.6). El índice de absorbancia se obtuvo dividiendo la media de absorbancia de la muestra entre el valor de corte. Una vez sometidos los sueros problema y los controles a la técnica de ELISA y realizando los cálculos correspondientes, los sueros se agruparon como positivos, negativos y dudosos de acuerdo al valor de índice de absorbancia.

Los 110 sueros analizados por la técnica de ELISA fueron de mujeres gestantes que resolvieron su embarazo tanto en el Hospital General de Cuernavaca (43.6%) como en el Hospital de la Mujer (56.4%). De ellas el 50% mostraron un índice de absorbancia mayor a 1.4, por lo que se consideraron positivos a la presencia de anticuerpos IgG anti-Chlamydia, el resto de los sueros presentaron valores de índice de absorbancia menor a uno, por lo que se tipificaron como negativos.

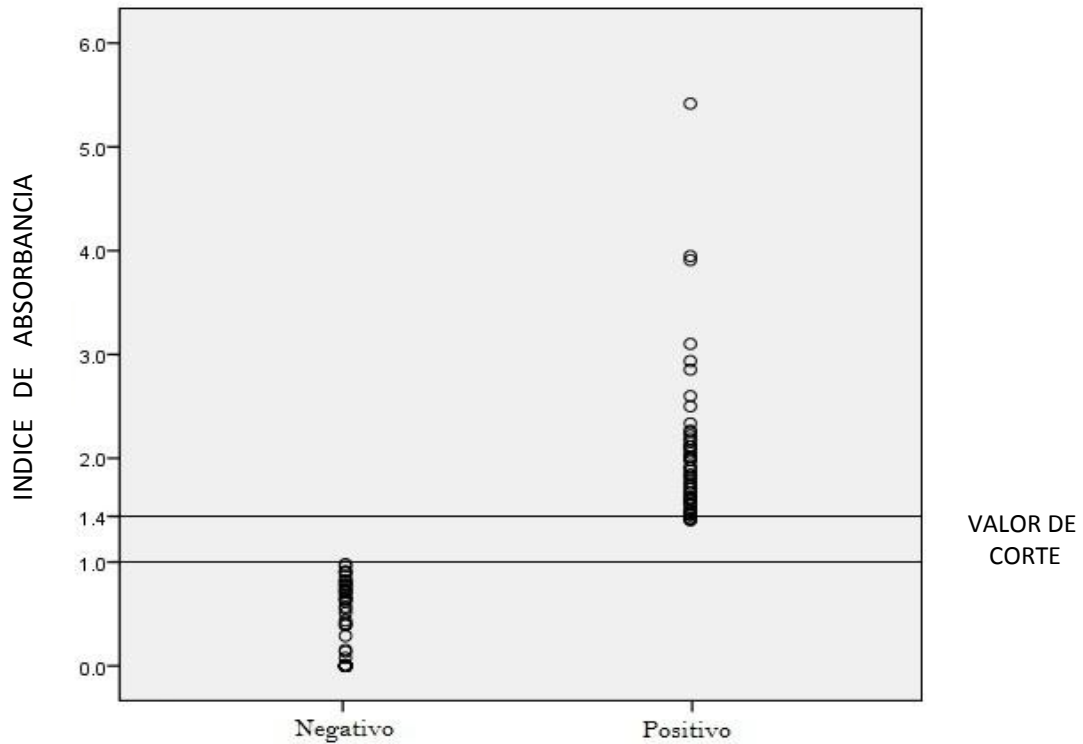


Fig. 8: Resultados del índice de absorbancia (IA) obtenidos por la técnica de ELISA. Se aprecia el grupo de sueros negativos (cuyo IA es menor a 1) y sueros positivos (IA mayor a 1.4).

6.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA utilizando la MIF como técnica de referencia.

Una vez probados los sueros por el método de ELISA, se analizaron por la técnica de MIF para confirmar la presencia de anticuerpos anti-Chlamydia además de determinar la especificidad y sensibilidad de la técnica de ELISA. De acuerdo a los resultados obtenidos por la técnica de MIF comercial empleada, se observa que la proteína es capaz de detectar anticuerpos contra diferentes especies de la familia *Chlamydiaceae*. De los 55 sueros positivos por ELISA solo 5 fueron MIF negativos y de los 55 sueros negativos por ELISA 35 fueron MIF positivos (fig. 9). Con estos resultados se obtuvo que la sensibilidad y



especificidad de la prueba de ELISA fue del 59 y 80% respectivamente, sin embargo, el valor predictivo positivo (VPP) fue del 91% y el valor predictivo negativo (VPN) del 36%.

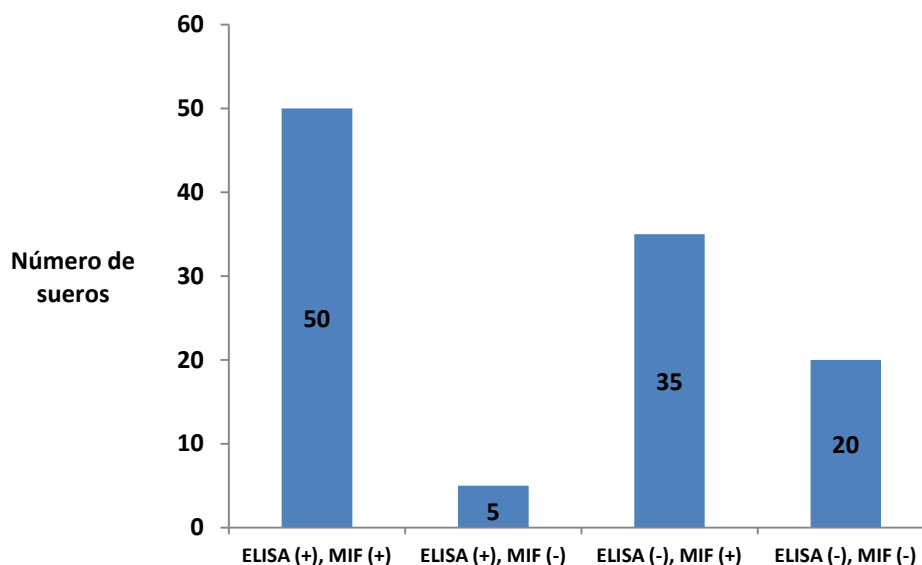


Fig. 9: Número de sueros con anticuerpos contra la familia *Chlamydiaceae*, analizados por el método de ELISA y MIF.

De los 55 sueros positivos por ELISA solo 8 mostraron anticuerpos anti *C. trachomatis* (Fig. 10), mientras que por la técnica de MIF sólo 12 presentaron anticuerpos contra *C. trachomatis*, al realizar el cálculo de sensibilidad y especificidad de la técnica de prueba, estos fueron de 67 y 52% respectivamente, así como el VPP que fue de 15 % y el VPN que fue del 93%.

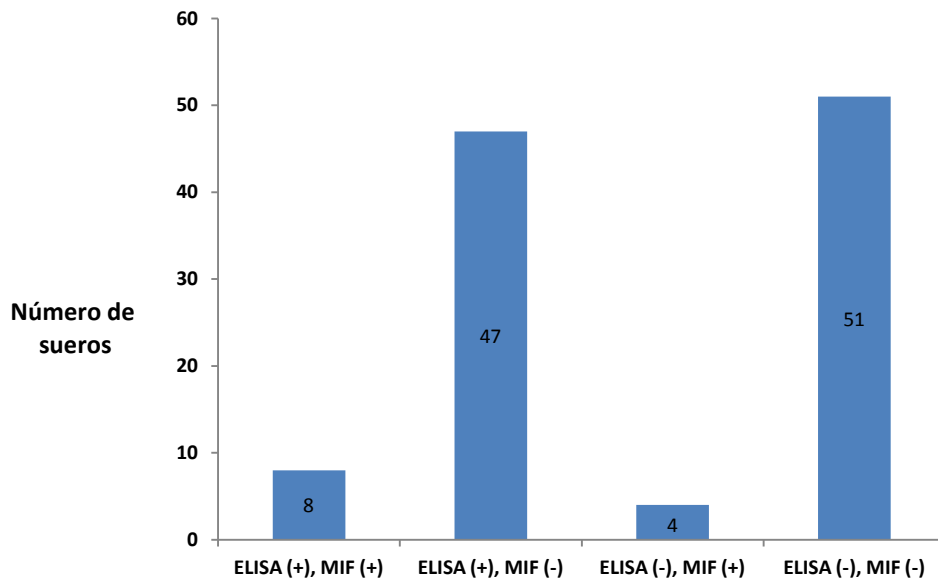


Fig. 10: Número de sueros que mostraron anticuerpos anti *Chlamydia trachomatis* por las técnicas de ELISA y MIF.

En cuanto a la detección de anticuerpos IgG anti *C. pneumoniae*, sólo 33 sueros de los 55 tipificados como positivos por la técnica de ELISA mostraron anticuerpos contra esta especie, el total de sueros positivos que mostraron anticuerpos anti *C. pneumoniae* por el método de MIF fue de 54 (Fig. 11). En este caso la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-*C. pneumoniae* es del 61% para ambos parámetros, del 60 % para el VPP y del 62 % para el VPN.

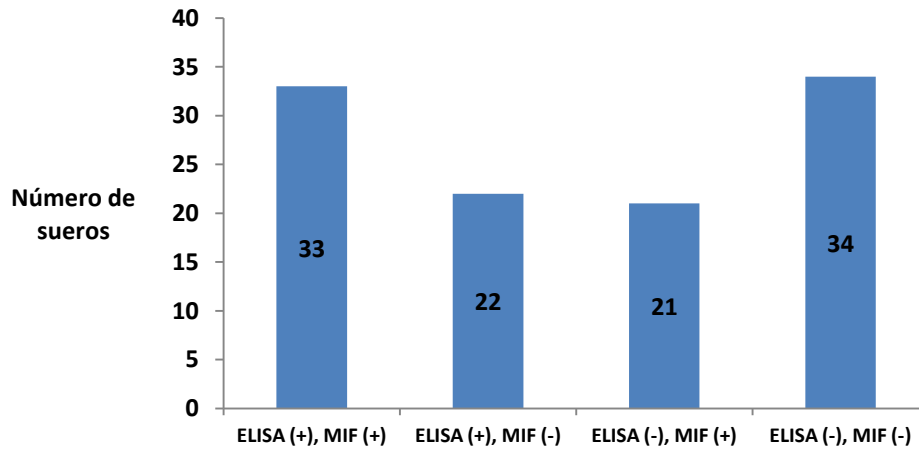


Fig. 11: Número de sueros con anticuerpos anti *Chlamydomphila pneumoniae* por el método de ELISA y MIF.

Del mismo modo se realizó la búsqueda de sueros que mostraran anticuerpos contra *C. psittaci*, de los sueros positivos por la técnica de ELISA sólo 9 presentaron anticuerpos anti-*C. psittaci* y 10 sueros fueron positivos por MIF pero ELISA negativos (Figura 12). La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-*C. psittaci* fueron del orden de: 47%, 49%, 16 y 82 % respectivamente.

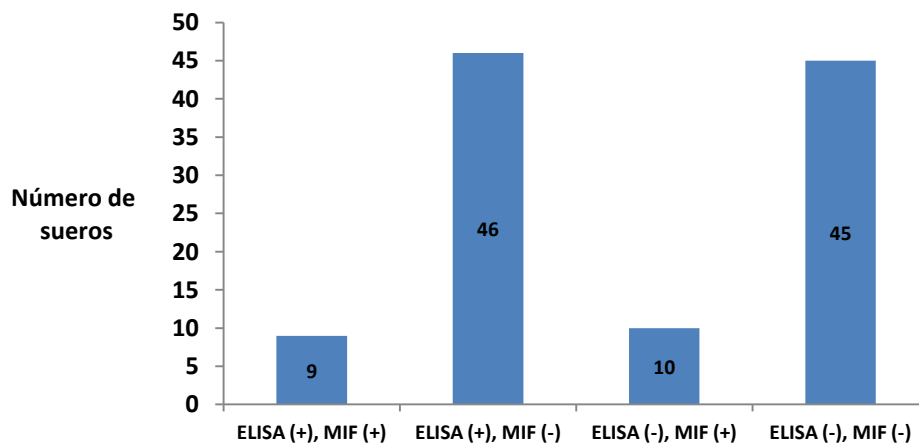


Fig. 12: Número de sueros con anticuerpos anti *Chlamydomphila psittaci* por el método de ELISA y MIF.



6.4 Detección de anticuerpos anti- MOMPr por inmunodetección.

Debido a la baja sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA se realizó una técnica de inmunodetección para observar que proteína están reconociendo los sueros positivos por ELISA, los resultados se presentan en las figuras 13 y 14. La tira etiquetada con el número 16 es la reacción de un anticuerpo IgG humano comercial (Hemagen Virgo) anti-*C. trachomatis* que es utilizado como control positivo de infección por *Chlamydia trachomatis*. En la tira 16 se aprecia como el anticuerpo comercial es capaz de reconocer una proteína de 29.16 kDa. La tira número 15 pertenece al control negativo utilizado tanto en la técnica de ELISA como en la inmunodetección.

Las tiras 7, 8 y 12 pertenecen a sueros que no reconocen a ninguna proteína recombinante transferida y que resultaron negativos para la detección de anticuerpos por ELISA y MIF.

Las tiras de los sueros del 1 al 5, del 9 al 11, 13 y 14 presentan anticuerpos IgG anti MOMPr de *C. trachomatis* los cuáles fueron positivos por su valor de IA ($IA > 1.4$) obtenido por la técnica de ELISA y reaccionan con la proteína de 29.16 kDa transferida. Los sueros de las tiras 3-5, 13 y 14 además reconocen una proteína de aproximadamente 32.5 kDa.

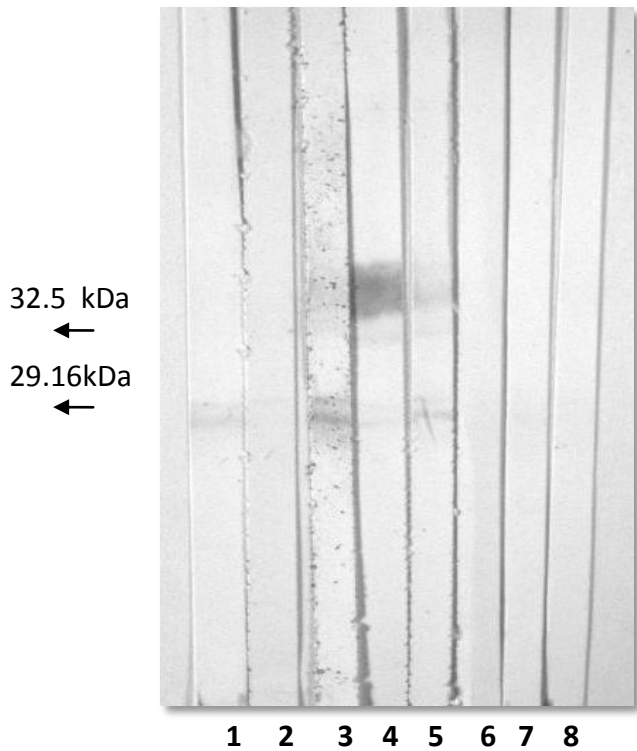


Fig. 13: Inmunodetección de anticuerpos contra la MOMPr. Carriles 1-6: Sueros positivos por ELISA, carriles 7 y 8: Sueros negativos por ELISA.

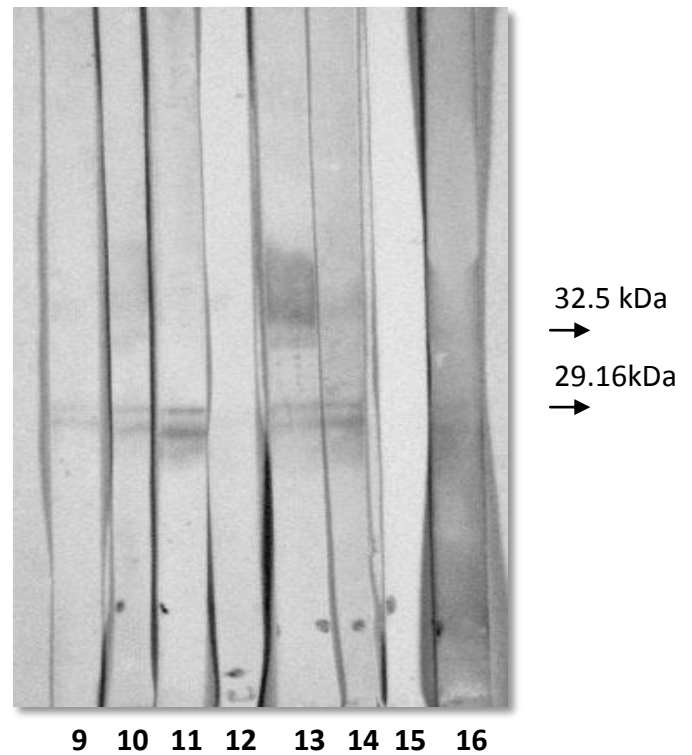


Fig. 14: Inmunodetección de anticuerpos contra la MOMPr. Carriles 9-11, 13 y 14: Sueros positivos por ELISA, carril 12: Suero negativo por ELISA, carril 15: Control negativo utilizado en ELISA, carril 16: Anticuerpo comercial (Hemagen Virgo) anti-Chlamydia.

El suero de la tira 6 es un suero tipificado como positivo por la técnica de ELISA y que al ser probado por inmunodetección el resultado fue negativo, en este suero se detectaron anticuerpos contra *C. trachomatis* y *C. psittaci* por MIF (Tabla 3).



TABLA 3: Detección de anticuerpos IgG anti- *Chlamydia* en sueros de algunas mujeres embarazadas por las técnicas de ELISA, MIF e Inmunodetección.

Tira	Análisis por ELISA Valor de IA	Análisis por MIF			Inmunodetección Bandas detectadas (kDa)
		C. <i>pneumoniae</i>	C. <i>trachomatis</i>	C. <i>psittaci</i>	
1	2.5000	+	++	+++	29.16
2	3.1018	++	-	+	29.16
3	2.8540	-	-	-	29.16,32.5
4	1.5492	+	+	++	29.16,32.5
5	1.8428	+	+	+	29.16,32.5
6	5.4166	-	+	+	-
7	0.0769	-	-	-	-
8	0.1361	-	-	-	-
9	2.5992	-	-	+	29.16
10	3.9087	-	-	-	29.16
11	1.4196	+	-	-	29.16
12	0.0000	-	-	-	-
13	1.4154	+++	+	++	29.16,32.5
14	1.9825	+	+	+	29.16,32.5
15	Control negativo (PBS)	-	-	-	-
16	Anticuerpo IgG anti <i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> (Hemagen Virgo)	-	+	-	29.16,32.5

IA >1.4 = Positivo, IA <1.0 = Negativo.



6.5 Utilidad de la prueba de ELISA en padecimientos asociados a la infección por *C. trachomatis*.

De las 110 mujeres que se presentaron en los dos diferentes hospitales para resolución de embarazo, el 50% de los sueros fueron positivas por la técnica de ELISA, el 31.8% fueron del Hospital General de Cuernavaca y el 18.2% del Hospital de la Mujer mostrando una diferencia estadística significativa de $p < 0.0001$ por el lugar de procedencia. En cuanto a la edad de las pacientes, se observó que la mayor proporción de muestras positivas se presentó en el grupo de pacientes que mostraba edades entre 17 y 35 años (sin haber diferencia estadísticamente significativa).

En relación a las complicaciones obstétricas tales como embarazo ectópico, óbito, ruptura prematura de membranas, aborto, corioamnionitis y parto prematuro, 52 de ellas mostraron alguno de estos padecimientos los cuales están asociados a la infección por *C. trachomatis* (tabla 4) a diferencia de las 58 que no mostraron ningún padecimiento. El análisis entre ambos grupos mostró una diferencia significativa de $p < 0.001$. Finalmente, se analizaron las semanas de gestación en las cuales se presentaron las pacientes al momento de solicitar la atención para la resolución de su embarazo. El análisis estadístico evidenció una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ en aquellas mujeres que presentaron resolución de embarazo entre las 2 a 20 semanas de gestación (aborto), de las cuales 16 de 25 presentan anticuerpos IgG anti-MOMPr (tabla 5).



TABLA 4: Características demográficas y obstétricas de las mujeres embarazadas cuyos sueros mostraron anticuerpos anti MOMPr de *Chlamydia trachomatis*.

VARIABLE	<i>Chlamydia</i> positivo (ELISA)		<i>Chlamydia</i> negativo (ELISA)		Valor <i>p</i>
	Frecuencia (%)	Frecuencia %	Frecuencia %	Frecuencia %	
Hospital de procedencia					<0.0001
Hospital general de Cuernavaca	48 (43.6%)	35 31.8	13 11.8		
Hospital de la Mujer	62 (56.4%)	20 18.2	42 38.2		
	110 (100.0%)	55 50.0	55 50.0		
Edad (años)					N. S.
<16	7 (6.4%)	4 3.6	3 2.7		
17-25	64 (58.2%)	32 29.1	32 29.1		
26-35	29(26.4%)	14 12.7	15 13.6		
36-40	9 (8.2%)	5 4.5	4 3.6		
>40	1 (0.9%)	0 0.0	1 0.9		
	110 (100.0%)	55 50.0	55 50.0		
Complicaciones					<0.0001
Ninguna	29 (26.4%)	24 21.8	5 4.5		
Ectópico	2 (1.8%)	2 1.8	0 0.0		
Óbito	2 (1.8%)	1 0.9	1 0.9		
Ruptura prematura de membranas	25 (22.7%)	6 5.5	19 17.3		
Aborto	15 (13.6%)	10 9.1	5 4.5		
Corioamnioitis	3 (2.7%)	0 0.0	3 2.7		
Parto prematuro	5 (4.5%)	0 0.0	5 4.5		
Otras no relacionadas	20 (18.2%)	10 9.1	10 9.1		
Condiloma	1 (0.9%)	0 0.0	1 0.9		
Infección en vías urinarias	8 (7.3%)	2 1.8	6 5.5		
	110 (100.0%)	55 50.0	55 50.0		



TABLA 5: Semanas de gestación de las mujeres que resolvieron su embarazo y presencia de anticuerpos IgG anti- Chlamydia.

VARIABLE	Chlamydia positivo (ELISA)		Chlamydia negativo (ELISA)		Valor <i>p</i>
	Frecuencia (%)	Frecuencia %	Frecuencia %	Frecuencia %	
Semanas de gestación					0.014
2 a 20 (aborto)	21 (19.1%)	16 14.5	5 4.5		
21 a 28 (inmaduro)	4 (3.6%)	0 0.0	4 3.6		
29 a 36 (prematureo)	31 (28.2%)	13 11.8	18 16.4		
37 a 42 (término)	54 (49.1)	26 23.6	28 25.5		
	110 (100.0%)	55 50.0	55 50.0		



7.- DISCUSIÓN

A mediados de los años 70's se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de ADN recombinante, el objetivo era construir organismos genéticamente modificados con el fin de solucionar problemas en diferentes sectores como el agropecuario, industrial, medio ambiente y salud. El área con mayor impacto fue la de biofármacos, ya que desde 1981 se utilizaron proteínas recombinantes con fines terapéuticos como la insulina, hormona de crecimiento, interferones y anticoagulantes de la sangre entre otros productos que se utilizan para contender con varias problemáticas y que han contribuido significativamente a mantener y mejorar la salud humana. ⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Con la producción de proteínas recombinantes se han desarrollado pruebas de diagnóstico con el objetivo de mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales. Por ejemplo, se ha obtenido como antígeno la flagelina recombinante de *Bartonella bacilliformis*, que es el agente causal de la enfermedad de Carrión que representa un problema de salud importante en Perú o el antígeno recombinante K39 de *Leishmania donovani* en Venezuela. Ambos antígenos empleados para el serodiagnóstico por ensayo inmunoenzimático (ELISA) y que han mejorado los resultados de esta prueba inmunológica al minimizar los problemas por reacciones cruzadas. ^(37,38, 42)

En la presente investigación también se obtuvo una proteína recombinante del gen *ompA* de *C. trachomatis* clonado en *E.coli*, que fue utilizada para la detección de anticuerpos anti *Chlamydia* y cuyo peso molecular es parecido a la secuencia de genes del *ompA* y que corresponde a 29.16 kDa, el cual fue verificado por análisis electroforético. Además, se



confirmó el reconocimiento de la proteína recombinante por inmunodetección con el uso del anticuerpo IgG humano comercial (control positivo) contra *C. trachomatis*.

Se observó que algunos sueros reconocen una proteína de 32.5 kDa, que puede deberse a la capacidad de la MOMP de formar enlaces inter o intramoleculares, debido a que es una molécula rica en aminoácidos de cisteína los cuales pueden formar puentes de disulfuro con otros aminoácidos de la misma proteína o de otras proteínas. Por lo anterior posiblemente puede tratarse de un complejo proteico formado por la MOMPr y que también es reconocido por los sueros empleados ⁽¹⁶⁾

También se demostró el uso de la MOMPr como antígeno en la prueba de ELISA, evidenciando que 0.1 µg de la proteína por pozo es capaz de identificar sueros con anticuerpos y sin anticuerpos anti *Chlamydia*. Sin embargo, la sensibilidad en la detección de anticuerpos anti *C. trachomatis* de la prueba de ELISA utilizando la proteína recombinante obtenida en este estudio fue del 67% y la especificidad del 52% comparando con la técnica de MIF. La sensibilidad y especificidad fue similar a la reportada por Bas y col. pero diferente a las reportadas por Forsbach-Birk que fue del 83 y 100% respectivamente, aunque cabe señalar que Forsbach- Birk utilizó un método diferente a la técnica de ELISA que fue la inmunodetección de dos dimensiones. ^(43,44)

Al observarse los resultados arrojados por ambas técnicas se aprecia que la prueba de ELISA resulta positiva en casos en donde no se tienen anticuerpos para *C. trachomatis* pero si los hay para *C. psittaci* o para *C. pneumoniae* por lo que se concluye que la proteína recombinante obtenida es capaz de detectar a miembros de la familia



Chlamydiaceae. Esta reactividad cruzada se debe a que los genomas de estas especies contienen genes similares, incluido el gen *ompA* y existe una similitud entre las proteínas generadas por este en las diferentes especies, explicando así el potencial de la proteína para generar reactividad cruzada. ⁽⁴⁵⁾

Considerando lo anterior, se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA que es del 59 y 80% respectivamente. El valor bajo de sensibilidad de la ELISA comparado con la MIF, se debe posiblemente a que la técnica del MIF posee cuerpos elementales completos de las diferentes especies de la familia *Chlamydiaceae* analizadas, por lo que anticuerpos séricos reaccionan contra todos los antígenos que conforman al cuerpo elemental, mientras que la técnica de ELISA sólo es capaz de detectar aquellos anticuerpos dirigidos contra la MOMP. ^(32,36)

Las pruebas serológicas generalmente no son útiles en el diagnóstico de infección activa por *C. trachomatis* en el aparato genital femenino debido a que no se distingue de una infección pasada, y la presencia de anticuerpos IgM es un marcador inexacto de infección aguda ya que este anticuerpo a menudo no está presente. ^(15,31)

A pesar de esto, el uso de técnicas serológicas como la detección de anticuerpos IgG anti *C. trachomatis* por ELISA ha demostrado ser una herramienta indirecta rápida, efectiva y no invasiva en la detección de pacientes con obstrucción tubárica. A principios del año 2000 se demostró esta asociación entre los niveles elevados de anticuerpos IgG y la detección de la patología tubárica por lo que este método se ha utilizado como método de escrutinio, y en combinación con otros métodos diagnóstico la sensibilidad y especificidad



en la detección de esta patología ha aumentado al 80%. Por lo anterior, algunos países industrializados han implementado pruebas serológicas que identifican la presencia de anticuerpos anti *Chlamydia* como un método simple para la detección de mujeres con infertilidad por factor tubárico, mientras que en países latinos estas pruebas no han sido evaluadas, por lo que es necesario validarlas para considerarlas útiles en el diagnóstico de infertilidad por factor tubárico. ^(3, 4, 6,15)

Una desventaja de las pruebas de ELISA para detección de *C. trachomatis* que se encuentran comercialmente, es que utilizan como antígeno el LPS por lo que los anticuerpos detectan contra todo el género y no es específica para *C. trachomatis*, además de que el LPS es de estructura similar al que poseen algunas bacterias entéricas como *Salmonella sp.* por lo que es potencialmente capaz de generar reactividad cruzada, de allí la importancia de este estudio que utiliza la MOMP como antígeno, proteína que representa el 60% del total de las proteínas de membrana externa y que es específica para especie, evitando la reacción cruzada con patógenos filogenéticamente emparentados, la importancia de este estudio es además que el método serológico implementado se basa en el uso de proteínas recombinantes que permite obtener este antígeno en cantidades suficientes y mejora la sensibilidad de los métodos convencionales. ^(31,37)

Sin embargo, la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* por medio de la técnica de ELISA obtenida en esta investigación podría mejorarse si se buscara un epítotope más específico de la proteína MOMP recombinante para detección específica de anticuerpos anti *Chlamydia trachomatis*, tal y como lo ha reportado Bas y col. quienes demostraron



que epitopes en la región VS4 de la MOMP aumentan la sensibilidad a 76% y la especificidad al 85% de la técnica de ELISA aunque este trabajo lo realizó con sueros de pacientes con artritis reactiva. Se ha informado que la región VS4 muestra epitopes que pueden inducir la producción de anticuerpos en conejos inmunizados con el péptido formado con los aminoácidos 288 a 316. ^(46,47)

Las pruebas serológicas para *C. trachomatis*, también se pueden ser utilizar en programas de escrutinio que han demostrado ser efectivas considerando que el costo de las infecciones no tratadas y sus secuelas son considerables, ya que el 70% de las pacientes con infección por este patógeno cursan de manera asintomática. Además esta técnica puede aplicarse en un gran volumen de muestras, ya que como se sabe, la tendencia mundial es al aumento de casos por año, con excepción de Suecia que implementó el programa de escrutinio desde 1996 y cuyo resultado ha sido una reducción importante de la infección por *C. trachomatis* y de sus complicaciones, debido al pronto tratamiento en individuos seropositivos, por lo anterior otros países de Europa, (Dinamarca y Finlandia) se están llevando a cabo programas de escrutinio con resultados similares. Por estas razones, es importante que se lleve a cabo la investigación a profundidad de las técnicas serológicas y el desarrollo de proteínas recombinantes útiles, además de la educación en prevención de enfermedades de transmisión sexual. ⁽⁹⁾

Los estudios epidemiológicos son necesarios para establecer los tratamientos presuntivos, siendo la mejor aproximación en la prevención y control de la infección por *C. trachomatis* en países como México, donde la prevalencia es considerable y el presupuesto asignado para la salud es limitado. En la investigación epidemiológica de las infecciones por



Chlamydia en donde las pruebas serológicas siempre son las de elección la prueba más utilizada es el MIF, sin embargo, esta prueba es laboriosa y los antígenos sobre los que se trabaja son costosos por lo que una técnica de ELISA utilizando proteínas recombinantes podría sustituir el uso de la MIF asegurando buenos resultados. ^(25,31)

Una vez que se ha sometido a una prueba serológica como la ELISA y el resultado es positivo deberá confirmarse por una segunda prueba, que puede ser la más confiable siendo esta el uso de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, pruebas exquisitamente sensibles (90%) y altamente específicas (99-100%) que también ofrecen la ventaja de utilizar muestras no invasivas. ⁽³¹⁾

La prevalencia de infección por *C. trachomatis* en mujeres embarazadas es del 2-37%, dependiendo de la población estudiada y el método diagnóstico utilizado. Los estudios han demostrado un papel definitivo de la infección por *C. trachomatis* en resultados adversos en el embarazo ya que esta bacteria es el patógeno con mayor potencial nocivo para las trompas de Falopio. ^(30,48)

En el presente estudio se encontró que 12 de las 110 mujeres probadas son positivas para la presencia de anticuerpos IgG anti *C. trachomatis* (10.9%), 8 de ellas también detectadas por la ELISA utilizando la MOMPr como antígeno, la detección y tratamiento de estas pacientes es de vital importancia ya que se conoce el riesgo de complicaciones obstétricas asociadas con la presencia de este patógeno en esta población en particular.

Una vez obtenidos los resultados de la prueba de ELISA, se realizó un análisis estadístico para relacionar la positividad de la prueba con datos clínicos de problemas de embarazo,



se aprecia una diferencia estadística $p < 0.0001$ en mujeres que presentan alguna complicación obstétrica (embarazo ectópico, óbito, ruptura prematura de membranas, aborto, corioamnioitis y parto prematuro). Aunque no se realizó la asociación de cada una de las patologías observadas por el número pequeño de muestra, se aprecia que si hay una diferencia entre ambos grupos (con y sin complicaciones obstétricas), estas patologías ya han sido asociadas con la presencia de este microorganismo y este estudio se suma a estas investigaciones. ^(27, 29,30)

Por ejemplo, se aprecia que las 2 pacientes que presentaron embarazo ectópico fueron positivas para anticuerpos anti *Chlamydia* por la técnica de ELISA, la incidencia del embarazo ectópico ha ido en aumento en los últimos 20 años y es responsable del 10 al 15 % del total de las muertes maternas, uno de los factores que aumentan el riesgo de esta patología son los procesos inflamatorios de los órganos superiores genitales que son causados en su mayoría por agentes transmitidos sexualmente, y en especial, el antecedente de infección por *C. trachomatis*. En publicaciones de estudios de casos y controles se informa una fuerte asociación entre embarazo ectópico e infección por *Chlamydia*, con un aumento del riesgo calculado de 2 a 8 veces. Un ejemplo claro de la importancia de la detección oportuna de este patógeno se da en Suecia donde la disminución de embarazos ectópicos concuerda con la implementación del programa de diagnóstico y tratamiento precoz de personas infectadas con *Chlamydia trachomatis*. ⁽³⁰⁾

Se observó también en este estudio que de las 21 pacientes con aborto entre 2 a 20 semanas de gestación resultó que 16 fueron positivas a la detección de anticuerpos



anti-Chlamydia, cuya significancia estadística fue $p=0.014$. Se sabe que la presencia de infección endocervical por *C. trachomatis* no tratada en mujeres embarazadas representa un alto riesgo de contagio para el producto, un posible mecanismo de daño por parte de la bacteria es la producción de prostaglandinas que estimulan la contractibilidad uterina, así mismo la producción de colagenasas y proteasas que llevan al debilitamiento de las membranas, y por ende a nacimientos prematuros y abortos. ^(49,50)

Otro de los hallazgos interesantes al realizar el análisis estadístico es que 35 de las 55 pacientes positivas para detección de anticuerpos anti *Chlamydia sp.* provienen del Hospital General de Cuernavaca, mostrando una diferencia significativa de $p<0.0001$ con respecto a las mujeres que provienen del Hospital de la Mujer en el D.F. En estas 35 pacientes se observó una alta sero-reactividad para *C. psittaci*, agente etiológico de la psitacosis y que es transmitida al humano por materia fecal y flujo nasal de los pájaros enfermos que pueden ser infectados por este microorganismo. Aunque en este estudio no se confirmó la presencia de aves en el hogar de las pacientes existe una alta probabilidad de que las pacientes atendidas en el Hospital General de Cuernavaca muestren más riesgo de infección por *C. psittaci* debido al contacto con fauna de la zona y a la relación con aves que pudieran ser portadoras asintomáticas lo que explicaría la presencia de anticuerpos anti *C. psittaci*. ^(11,12)

Las limitaciones en las técnicas de diagnóstico de *C. trachomatis* dificultan la estimación de su verdadera prevalencia en países en desarrollo, por lo que se deben implementar



técnicas más sencillas y menos costosas para la realización de un buen diagnóstico y evitar complicaciones graves en el humano. ⁽⁸⁾

Finalmente, se espera que el uso de esta proteína recombinante sea útil en estudios de escrutinio para detección de pacientes con obstrucción tubárica o mujeres con problemas de embarazo. Sin embargo, con los resultados obtenidos en esta investigación será necesario obtener péptidos de esta proteína que nos permitan aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba.



8.- CONCLUSIONES

- Se logró obtener, purificar y caracterizar la proteína recombinante principal de membrana externa de *C. trachomatis*.
- Los anticuerpos anti *Chlamydia* reaccionaron con una proteína de aproximadamente 29.16 kDa, y algunos con la proteína de 32.5 kDa.
- Se logró estandarizar una técnica de ELISA utilizando la proteína recombinante MOMP obtenida como antígeno en la detección de anticuerpos IgG anti-*Chlamydia trachomatis*.
- La técnica de ELISA posee una sensibilidad de 67% y especificidad del 52% para detectar anticuerpos contra *C. trachomatis*, comparada con la técnica de MIF.
- Se observó que la proteína es capaz de detectar anticuerpos IgG de especies de la familia *Chlamydiaceae*, con una sensibilidad y especificidad del 59 y 80% respectivamente.
- Se acepta la hipótesis alterna, ya que la proteína es capaz de detectar anticuerpos IgG anti *Chlamydia trachomatis*, sin embargo, esta no es específica ya que presenta reactividad cruzada con las especies de la familia *Chlamydiaceae* analizadas.



9.- REFERENCIAS

- 1.- Roca B. Infecciones por clamidias. An. Med. Interna (Madrid). 2007; 24: 292-299.
- 2.- Corrales H, Nieves B, Sánchez K, Vegas L, Santos M. Infección por *Chlamydia trachomatis* en embarazadas con complicaciones obstétricas. Rev Fac Farm 2003; 45: 27-31.
- 3.- Hartog JE, Land JA, Stassen FRM, Kessels AGH, Bruggeman CA. Serological markers of persistent *C. trachomatis* infections in women with tubal factor subfertility. Human reprod 2005; 20 (4): 986-990.
4. - Keltz MD, Sharma P, Moustakis M. *Chlamydia* serology screening in infertility patients. Fertility and Sterility. 2006; 85: 752-754.
- 5.- Hartog JE, Land JA, Stassen FRM, Slobe-van MEP, Kessels AGH, Bruggeman CA. The role of chlamydia genus-specific and species-specific IgG antibody testing in predicting tubal disease in subfertile women. Human Reprod 2004; 19 (6): 1380-1384.
- 6.- Malik A, Jain S, Meher R, Shukla I, Hakim S. *Chlamydia trachomatis* infection in women with secondary infertility. Fertil and Steril 2008; 20: 1-5
7. - Machado ACS, Guimaraes EMB, Sakurai E, Fioravante FCR, Amaral WN, Alves MFC. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. Infect Dis in Obstetric and Ginecol 2007; 10: 1-6.
- 8.- Cervantes E. Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*. Rev Fac Med UNAM 2009; 52: 18-22.



- 9.- Cacho J, Sanz F, Blanco M. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: necesidad urgente de detección y tratamiento en mujeres. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 419-421.
- 10.- Haro Cruz MJ. Genotipificación de cepas de *Chlamydia trachomatis* aisladas de pacientes con infertilidad mediante patrones en la longitud de fragmentos de restricción [Tesis doctoral]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
- 11.- Martínez A, Diomedi A, Kogan R, Borie C. Taxonomía e importancia clínica de las nuevas familias del orden *Chlamydiales*. *Rev. chil. Infectol.* 2001; 18:15-30.
- 12.- Arango A, Máttar S, Visbal J. *Chlamydia trachomatis*: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *MVZ-Córdoba* 2001; 6: 87-96.
- 13.- *Chlamydiales* family tree [en línea]. 2001. [consultado 2011 Mar 25]; [1 página].
Disponible en URL: <http://www.Chlamydiae.com/docs/chlamydiales/diagram/taxondiag.htm>.
- 14.- Ostos O, Sánchez R. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *NOVA* . 2003; 1: 81-93.
- 15.- López-Hurtado M, Guerra-Infante FM. Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatol Reprod Human* 2002; 16: 140-150.
- 16.- Wang Y, Berg E, Feng X, Shen L, Smith T, Costello CE, Zhang YX. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Science* 2006; 15: 122-134.



-
- 17.- Rodríguez-Marañón MJ, Bush RM, Peterson EM, Schirmer T, De la Maza LM. Prediction of the membrane-spanning β -strands of the major outer membrane protein of *Chlamydia*. *Protein Science* 2002; 11: 1854-1861.
18. - Findlay HE, McClafferty H, Ashley RH. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein. *BMC Microbiology* 2005; 5: 1-15.
19. - Roan NR, Starnbach MN. Immune- mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol* 2008; 10: 9-19.
- 20.- Gonzalez-Almaraz G, Pineda-Cárdenas AA. Presente y futuro de las infecciones por *Chlamydia trachomatis*. Análisis de las perspectivas de la Organización Mundial de la Salud y su importancia para México. *Rev Mex Oftalmol.* 2003; 77: 110-119.
- 21.- Cravioto MC, Matamoros O, Villalobos-Zapata Y, Peña O, García-Lara E, Martínez M, Castelo J, Sifuentes-Osornio J. Prevalencia de anticuerpos anti- *Chlamydia trachomatis* y anti-*Neisseria gonorrhoeae* en grupos de individuos de la población mexicana. *Salud pública Mex* 2003; 45: 681-689.
22. - Bakken IJ. *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy: recent epidemiological findings. *Current Opinion in infectious diseases* 2008; 21: 77-82.
23. - Land JA, Van Bergen JEAM, Morré SA, Postma MJ. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in woman and the cost-effectiveness of screening. *Human Reproduction Update* 2010; 16: 189-204.



-
- 24.- Guerra-Infante FM, Tapia-Yañez JR R, López-Hurtado M, Flores-Medina S, Díaz-García JF. Infección por *Chlamydia trachomatis* en varones y su asociación con las alteraciones ginecológicas de su compañera sexual. Rev Invest Clín. 2005; 57: 406-414.
- 25.- Guerra-Infante FM, Flores-Medina S, Arteaga-Troncoso G, Zamora-Ruiz A, López-Hurtado M, Ortiz-Ibarra FJ. Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociados a la infección por *Chlamydia*. Salud pública Mex 2003; 45: 672-680.
- 26.- Gallegos-Avila G. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* Su relación con la infertilidad masculina. Colegio Mexicano de Urología 2003; 18: 106-112.
- 27.- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. Europ J obstet Ginecol Reprod Biol 2008; 140: 3-11.
- 28.- Idahl A, Boman J, Kumlin U, Olofsson JI. Demonstration of *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. Human Reprod 2004; 19:1121-1126.
- 29.- Bardasquera-Corcho D, Fariñas-Reinoso AT, Ramos-Valle I. Las enfermedades de transmisión sexual en embarazadas. Un problema de salud a nivel mundial. Rev Cubana Med Gen Integr 2001; 17: 185-190.
- 30.- Paredes V. *Chlamydia trachomatis* y embarazo ectópico. Rev Hosp Clín Univ Chile 2006; 17: 5-12.
- 31.- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 160-184.
- 32.- Jones CS, Maple PAC, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* by commercial enzyme immunoassays and inmunofluorescence



in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed *Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Pathol 2003; 56: 225-230.

33.- Thomas K, Coughlin L, Mannion PT, Haddad NG. The value of *Chlamydia trachomatis* antibody testing as part of routine infertility investigations. Human Reproduction 2000; 15: 1079-1082.

34. - Baud D, Regan L, Greub G. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti- *Chlamydia trachomatis* antibodies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29: 669-675.

35. - Bax CJ, Mutsaers JAEM, Jansen CL, Trimbos JB, Dorr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10: 174-176.

36.- Morré SA, Munk C, Persson K, Kruger-Kjaer S, Van-Dijk R, Meijer CJLM, Van den Brule AJC. Comparison of three commercially available peptide-based Immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to micrommunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. J Clin Microbiol 2002; 40: 584-587.

37.-Gallegos VK, Baldeviano VC, Marcelo ÑA, Padilla RC. Clonamiento, expresión y seroreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella baculiformes*. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2005; 22: 39-46.

38.- Cannova D, Cañate R, Castillo L, Cruces M, Zambrano G, Simons M. Evaluación del antígeno recombinante K39 para el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Rev de la Fac de Ciencias de la Salud 2007; 11. 26-29.



39.- Drago M, Sainz T. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes.

Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas 2006; 37: 38-44.

40.- Gamboa RA, Trujillo-Roldán MA. Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas 2009; 4: 87-91.

41. - Zanlungo SM, Arrese JM, Rigotti RA. Medicina molecular: presente y futuro. Rev Méd Chile 1999; 127: 19-28.

42.- Espejo J, Sosa A, Carrascal A, Cifuentes C, Barreto A. Producción de la proteína recombinante humana HSC70 y su aplicación en el desarrollo de un sistema de detección por ELISA. Universitas Scientiarum 2004; 9: 69-80.

43. - Bas S, Muzzin P, Vischer TL. *Chlamydia trachomatis* Serology: Diagnostic Value of Outer Membrane Protein 2 Compared with That of Other Antigens. J Clin Microbiol 2011; 39: 4082-4085.

44.- Forsbach-Birk V, Simnacher U, Pfrepper KI, Soutschek E, Kiselev AO, Lampe MF, Meyer T, Straube E, Essig A. Identification and evaluation of a combination of chlamydial antigens to support the diagnosis of severe and invasive *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1237-1244.

45. - Johnson AM, Horner P. A new role for *Chlamydia trachomatis* serology?. Sex Transm Infect 2008; 84: 79-80.

46. - Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of *Chlamydia trachomatis* reactive arthritis. Rheumatology 2002; 41: 1017-1020.



-
47. - Zhong G, Reid RE, Brunham RC. Mapping Antigenic Sites on the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* with Syntetic Peptides. *Infect Immun.* 1990; 58: 1450-1455.
48. - Malenie R, Joshi PJ, Mathur MD. *Chlamydia trachomatis* antigen detection in pregnancy and its verification by antibody blocking assay. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2006; 24: 97-100.
- 49.- Ruiz AI, Sánchez R, Ostos O, Angel E, Bonilla H, Cifuentes C, Correa C. 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 Col Obstetr Ginecol* 2005; 56: 225-230.
- 50.- Frontela M, Rodríguez Y, Verdejas O, Valdés F. Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres cubanas en edad reproductiva. *Rev Cubana Endocrinol* 2006; 17: 27-37.
- 51.- Jiménez J, Escobedo M, Arteaga G, López M et al. Detection of *Chlamydia abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *American Journal of Animal Veterinary Sciencies* 2008; 3 (4): 91-95.



10. ANEXO

A) Preparación de reactivos

1.- Caldo LB

Pesar 25 g de medio para caldo LB (USB) y disolver en 1000 mL de agua desionizada, esterilizar en autoclave.

2.- Caldo LB con ampicilina

Preparar Caldo LB como se describe anteriormente y agregar ampicilina (Amresco) a una concentración final de 100 µg/mL.

3.- Buffer de lisis

Se pesan 0.0605 g de Trizma base (USB), 0.1861 g de EDTA (PIERCE), 0.1460 g de NaCl, y 0.1 g de SDS (BIORAD) y 0.01 g de proteinasa K (Sigma). Se colocan en un matraz aforado de 50 mL, se disuelven y se llevan al aforo.

4.- Solución reguladora Tris-Acetato-EDTA (TAE)

Se pesan 4.84 g de trizma base (USB), 1.142 g de ácido acético glacial (Merck) y 0.3722 g de EDTA (PIERCE), se colocan en un matraz aforado de 1000 mL y se lleva al aforo.

5.- Lactosa 64 mM

Disolver 2.18 g de lactosa (Merck) y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración.

6.- Solución fosfato salina (PBS) 1X pH 7.2



Pesar 8g de NaCl (J.T. Baker), 0.2 g de KH_2PO_4 (J.T. Baker), 2.17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 0.2 g de KCl (Sigma). Aforar con agua desionizada a 1000 mL, esterilizar en autoclave.

7.- PBS adicionada de Tween 20 al 0.05% (PBS-T).

Añadir 0.5 mL de Tween20 (Sigma) a 1 litro de PBS preparado como se menciona anteriormente.

8.- Regulador de elusión pH 8.

Pesar 0.788 g de Tris-HCl (USB) y 0.307 g de glutatión reducido (Sigma). Ajustar a pH 8 y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración.

9.-Gel sellador para electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se coloca, en un vaso de precipitados, 1 mL de la solución de monómeros, 1 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 1 mL de agua y 37.5 μL de persulfato de amonio (Promega Corporation, USA)) en un vaso de precipitados de 50 mL. Al momento de utilizarse se agregan 2.5 μL de TEMED (PiSA) y se mezcla.

10.- Gel de separación para electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se colocan, en un vaso de precipitados de 50 mL, 4 mL de solución de monómeros, 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.2 mL de SDS al 10%, 3.35 mL de agua desionizada y 66.6 μL de persulfato de amonio (Promega Corporation, USA), al momento de usarse se agregan 5 μL de TEMED.



11.- Gel concentrador para electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se colocan en un vaso de precipitados de 50 mL, 1.5 mL de solución de monómeros, 0.375 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 25 μ L de SDS al 10%, 750 μ L de agua desionizada y 7.5 μ L de persulfato de amonio (Promega Corporation, USA)). Finalmente, y al momento de usarse, se agregan 2.5 μ L de TEMED (PiSA).

12.- Solución de monómeros para geles de poliacrilamida al 12%

Pesar 30 g de acrilamida (Sigma), 0.8 g de bisacrilamida (Sigma) y llevar a 100 mL con agua destilada. Filtrar en papel Whatman y guardar en la oscuridad a 4° C.

13.- Regulador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Pesar 18.15 g de Trizma base (USB), colocar 90 mL de agua destilada, ajustar a pH 8.8 con HCl (Merck) concentrado. Aforar con agua destilada a 100 mL. Filtrar en papel Whatman y guardar a 4° C.

14.- Regulador del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Pesar 3.0 g de Trizma base (USB), colocar 40 mL de agua destilada. Ajustar a pH 6.8 con HCl (Merck) concentrado y aforar a 50 mL con agua destilada. Filtrar en papel Whatman y guardar a 4° C.

15.- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Pesar 10 g de SDS (BIORAD), aforar con agua destilada a 100 mL.

16.- Persulfato de amonio al 10%

Pesar 100 mg de persulfato de amonio (Promega Corporation, USA) y colocar 1.0 mL de agua destilada. Se deberá preparar al momento de usarse.



17.- Regulador de corrimiento Tris 0.025 M-glicina 0.192 M- SDS al 0.1 % pH 8.3.

Pesar 3.0 g de Trizma base(USB), 14.4 g de glicina (Sigma) y 10 mL de SDS al 10%. Aforar con agua destilada a 1 L. El pH no se debe ajustar.

18.- Regulador de muestra 2X.

Mezclar 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 4.0 mL de SDS al 10%, 0.5 mL de agua destilada y 2.0 mL de glicerol (Merck). Dividir en fracciones de 900 μ L y congelar. Agregar por cada 900 μ L de regulador cristales de azul de bromofenol (Sigma), al momento de usarse.

19.- Solución madre para tinción de proteínas.

Pesar 2.0 g de azul de Coomassie R250 (BIO-RAD) y disolver en 200 mL de agua destilada.

20.- Colorante de trabajo para tinción de proteínas: Azul de Coomassie al 0.125% en metanol: acético: agua.

Mezclar 62.5 mL de solución de azul de Coomassie R250(BIORAD), 250 mL de metanol absoluto (J.T.Baker), 50 mL de ácido acético glacial (Merck) y 137.5 mL de agua destilada. Filtrar en papel whatman.

21.- Solución decolorante para geles de poliacrilamida.

Mezclar 500 mL de metanol absoluto (J.T. Baker), 100 mL de ácido acético glacial (Merck) y 400 mL de agua destilada.

22.- Solución reguladora carbonato-bicarbonato 1M, pH 9.5

Disolver 35 g de carbonato de sodio (Merck) y 56 g de bicarbonato de sodio (J.T. Baker) en 800 mL de agua desionizada, ajustar pH a 9.5 y aforar a 1 litro.



23.- Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.1 M, pH 9.5

Diluir 10 veces la solución reguladora 1M.

24.- Solución reguladora de citrato de sodio -ácido cítrico pH 5.5

Disolver 29 g de citrato de sodio trisódico (Gibco) y 4.1 g de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) en 1 litro de agua, ajustar a pH 5.5.

25.- Regulador de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192M, metanol 20%)

Se pesan 3.023g de Trizma base (USB), 14.4 g de glicina (Sigma) y 200 mL de metanol (Merck) se afora con agua destilada a 1 litro.



B) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA.

El cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la técnica de ELISA se realizó utilizando la tabla de 2x2 que se muestra a continuación.

		Método de referencia (MIF)	
		POSITIVO	NEGATIVO
Método de prueba. (ELISA)	POSITIVO	A	B
	NEGATIVO	C	D

Se colocó el número de sueros positivos por la técnica de ELISA y que también lo fueron por MIF en la celda A que corresponde a los verdaderos positivos. El número de sueros que al ser evaluados fueron positivos por ELISA y negativos por MIF (falsos positivos), se colocaron en la celda B. La celda C corresponde a la cantidad de sueros negativos por la técnica de prueba y positivos por la de referencia (falsos negativos), finalmente la celda D corresponde al número de sueros negativos por ambas técnicas (verdaderos negativos).



Con estos datos se aplicaron las siguientes fórmulas para determinar los parámetros de interés.

Sensibilidad: $A / (A+C)$

VPP: $A / (A+B)$

Especificidad: $D / (B+D)$

VPN: $D / (C+D)$