



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Estandarización de la técnica de hibridación por dot blotting para la
identificación de genotipos de *Chlamydia trachomatis*”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta:

ELIZABETH BERENICE AGUILERA TINAJERO

ASESOR: DR. FERNANDO M. GUERRA INFANTE

COASESORA: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2015



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.



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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización de la técnica de hibridación por dot blotting para la identificación de genotipos de *Chlamydia trachomatis*.

Que presenta la pasante: Elizabeth Berenice Aguilera Tinajero
Con número de cuenta: 402073598 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Junio de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

Agradecimientos

A dios por permitirme culminar este trabajo, gracias por tu infinito amor por que en ningún momento me dejaste, gracias porque en los días difíciles siempre pusiste gente en mi camino que me guio y me alentó a seguir adelante frente a todas las adversidades que se me presentaron a lo largo de mi vida. Gracias por renovar mis fuerzas para continuar en este trayecto y retribuir todo lo que has hecho por mí.

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado y respetar mis decisiones, gracias por el ejemplo de vida que me dieron para luchar por mis sueños, por todos los valores que me inculcaron, por enseñarme a ver la vida con humor, por los consejos y sus diversas formas de demostrarme su cariño.

A mis abuelitos Conchita y Roberto por su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos Luis y Julio por cuidarme, por ser estar ahí cuando los necesite.

Al Dr. Guerra Infante quien me dio la oportunidad de realizar este proyecto, gracias por su confianza y compartir sus conocimientos y experiencias.

A la M. en C. Marcela López por su apoyo en la realización de este proyecto y por la convivencia agradable en el laboratorio.

A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por hacerme participe en el programa de becas de inicio a la investigación.

Al personal del departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del INPerier por brindarme su apoyo, amistad y compartir sus conocimientos.

A la Dra. Alejandra Fernández por su gran apoyo y confiar en mí, por sus consejos y ser una luz en mi camino.

A la Dra. Susy por ser un gran ejemplo, gracias por su apoyo y compartir sus experiencias.

A mi alma máter y profesores por la formación académica que me brindaron y por su calidad humana.

A mis amigos de la FESC con los que compartí momentos agradables y aprendí mucho de sus experiencias.

V fH dnH3z w3 VbQhQ 93563 nz bJHzUHbHQ 3z 35f3 UVwHzQ, 6JVUHV5 bQJ VwHzQJvJ wH5 UVH9V5, bQJ 35fVJ 5H3wbJ3 V7 bH3 937 UVŽQz UQz wH5 35fn9HQ5, 6JVUHV5 bQJ fn +H3wbQ, bVUH3zUHV h +Q9V5 +n5 7QUñJV5 dn3 w3 IHUH3JQz 53zfHJ 35b3UHV7.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología, Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Características generales.	2
2.2 Genoma.	2
2.2.1 Gen <i>ompA</i>	3
2.3 Factores de virulencia.	4
2.3.1 Proteína principal de membrana externa (MOMP).	4
2.3.2 Lipopolisacárido (LPS).	5
2.3.3 Proteínas polimórficas de membrana (PMPs).	6
2.3.4 Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína (COMC).	6
2.3.5 Proteínas del proceso celular: proteínas Hsp.	7
2.3.6 Sistema de secreción tipo III.	7
2.3.7 Tóxina clamidial.	8
2.3.8 Plásmido críptico	8
2.4 Taxonomía y Clasificación.	9
2.5 Ciclo de vida.	11
2.6 Manifestaciones clínicas.	13
2.6.1 Infección genitourinaria.	13
2.6.1.1 En mujeres.	14
2.6.1.2 En hombres.	14
2.6.2 LGV.	15
2.6.3 Infecciones perinatales.	15
2.7 Epidemiología	17
2.7.1 Distribución a nivel mundial de los genotipos de <i>C.trachomatis</i> .	19
2.8 Diagnóstico.	22
2.8.1 Técnicas moleculares	23
2.9 Tipificación de cepas de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	25
2.9.1 RFLP: patrones en la longitud de los fragmentos de restricción.	25
2.9.2 Secuenciación.	26
2.9.3 PCR en tiempo real.	26
2.9.4 Hibridación.	27
2.9.4.1 Reverse line blot	27
2.9.4.2 Reverse dot blot	27
2.9.4.3 Microsphere suspensión assay	27
2.9.5 Otras técnicas.	28

3. OBJETIVOS	29
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Obtención de ADN plasmídico.	31
5.2 Integridad de ADN plasmídico.	31
5.3 Obtención de un fragmento de 879 pb del gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	32
5.4 Obtención de un fragmento de 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	32
5.5 Purificación y Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	33
5.6 Obtención de la sonda.	34
5.7 Procedimiento básico de la técnica dot blotting	34
6. RESULTADOS	37
6.1 Obtención e Integridad del ADN plasmídico.	37
6.2 Obtención del fragmento de 879 pb del gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	38
6.3 Obtención del fragmento de 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	39
6.4 Purificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	40
6.5 Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	41
6.6 Obtención de la sonda.	42
6.7 Estandarización de la técnica de hibridación por dot blotting.	43
6.7.1 Variación de la concentración del conjugado (avidina-peroxidasa).	43
6.7.2 Modificación en la concentración de la sonda.	44
6.7.3 Modificación en el lavado de las membranas.	45
6.7.4 Efecto de la desnaturalización del ADN.	46
6.7.5 Variación del tiempo de exposición a luz UV para la fijación de ADN.	47
6.7.6 Optimización del procedimiento básico de dot blotting.	48
6.7.7 Identificación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F.	49
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	55
9. PERSPECTIVAS	56
10. REFERENCIAS	57
11. ANEXO	67
11.1 Materiales	67
11.2 Preparación de soluciones.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la MOMP de <i>C.trachomatis</i> donde muestran las 4 regiones variables (VS1, VS2, VS3 y VS4) expuestas en la superficie.	5
Figura 2.	Modelo hipotético de la envoltura trilminar de <i>C.trachomatis</i> .	6
Figura 3.	Taxonómia de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	9
Figura 4.	Clasificación de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	10
Figura 5.	Árbol filogénético de los diferentes serovares considerando el gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	11
Figura 6.	Ciclo biológico de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	13
Figura 7.	Estimación global de la Incidencia y Prevalencia de <i>C. trachomatis</i> en infecciones urogenitales.	17
Figura 8.	Representación esquemática de enzimas de restricción y patrón electroforético del gen <i>ompA</i> de diferentes genotipos por RFLP.	26
Figura 9.	Diagrama de flujo del trabajo experimental	36
Figura 10.	Análisis electroforético de ADN plasmídico de cepas recombinantes de <i>E.coli</i> JM109 con el gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	37
Figura 11.	Amplificación del fragmento de 879 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	38
Figura 12.	Patrón electroforético de fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	39
Figura 13.	Patrón electroforético de los fragmentos purificados de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	40
Figura 14.	Patrón electroforético del fragmento de 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> biotinilado.	42
Figura 15.	Efecto de la concentración de conjugado (avidina–peroxidasa) para la detección del gen <i>ompA</i> .	43
Figura 16.	Efecto de la concentración de la sonda.	44

Figura 17. Efecto del Tween 20 en el lavado de las membranas en la técnica dot blotting.	45
Figura 18. Efecto de la desnaturalización de ADN.	46
Figura 19. Determinación del tiempo óptimo de exposición con luz UV para la fijación de ADN.	47
Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas de la técnica dot blotting.	48
Figura 21. Identificación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Síndromes clínicos y complicaciones causadas por los genotipos D-K de <i>C. trachomatis</i> .	16
Tabla 2.	Estimación global de acuerdo con la OMS de la incidencia de <i>C. trachomatis</i> en infecciones urogenitales en el 2005 y 2008.	18
Tabla 3.	Prevalencia de genotipos de <i>C. trachomatis</i> en el mundo.	20
Tabla 4.	Prevalencia de genotipos en infecciones mixtas por <i>C. trachomatis</i> .	21
Tabla 5.	Métodos de diagnóstico empleados para la detección de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	22
Tabla 6.	Técnicas comerciales para la detección de <i>C. trachomatis</i> .	24
Tabla 7.	Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen <i>ompA</i> de <i>C. trachomatis</i> .	41
Tabla 8.	Cuantificación de la sonda.	42
Tabla 9.	Sistema general para la detección del gen <i>ompA</i> con diferentes diluciones de conjugado.	43
Tabla 10.	Efecto de las diferentes concentraciones de la sonda	44
Tabla 11.	Efecto del Tween 20 en el lavado de las membranas en la técnica dot blotting.	45
Tabla 12.	Efecto de la desnaturalización en el ADN.	46
Tabla 13.	Fijación de ADN a diferentes tiempos de exposición de UV.	47
Tabla 14.	Determinación de las condiciones óptimas de la técnica dot blotting.	48
Tabla 15.	Determinación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F.	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABREVIACIÓN	SIGNIFICADO
A	Absorbancia.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico.
ATP	Adenosín trifosfato.
CE	Cuerpo elemental.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad.
CR	Cuerpo reticulado.
COMC	Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
EIA	Inmunoensayo enzimático.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
EPI	Enfermedad pélvica inflamatoria.
FA	Forma aberrante.
FDA	Food and Drug Administration
HRM	High resolution melting.
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres.
HSP	Proteína de choque térmico.
ITS	Infecciones de transmisión sexual.
IFD	Inmunofluorescencia directa.
kDa	Kilodalton.
LB	Luria-Bertani.
LCR	Reacción en Cadena de la Ligasa.
LPS	Lipopolisacárido.
MIF	Microinmunofluorescencia Indirecta.
MLST	Tipificación del secuenciado de multiples locus.
MLVA	Multilocus-VNTR- <i>ompA</i>
MOMP	Proteína de membrana externa.
MSA	Microsphere suspension assay.
NAAT	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.
Pb	Pares de bases.
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar.
RBD	Reverse dot blot.
RFLP	Patrones en la longitud de los fragmentos de restricción.
PFGE	Electroforesis de campo pulsado.
PMPs	Proteínas polimórficas de membrana.

RIA	Radioinmunoensayo.
RLB	Reverse line blot.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDA	Amplificación de desplazamiento estándar.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Seg	Segundos.
Sol	Solución.
TAE	Solución Tris-Acetato-EDTA
TMA	Amplificación mediada por transcripción.
U	Unidad de actividad enzimática.
UV	Luz ultravioleta.
UNG	Uretritis no gonocócica.
VNTR	Diferencias en regiones repetidas de un mismo nucleótido.
VPH	Virus de Papiloma Humano.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
VS	Región variable.

RESUMEN

Uno de los agentes patógenos de transmisión sexual de mayor importancia en nuestro país y en el mundo es *Chlamydia trachomatis* ya que la mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas, sin embargo esta bacteria puede generar ciertos padecimientos que pueden ser graves en adultos y neonatos. El incremento del número de casos por infecciones mixtas por *Chlamydia trachomatis* reportadas en diversos países ha sido gracias a los estudios de genotipificación que se han realizado en los últimos años. En la población mexicana la prevalencia de genotipos e infecciones mixtas por *C. trachomatis* se desconoce, es por ello que el objetivo de este trabajo fue la estandarización de una técnica de hibridación por dot blotting para la identificación de genotipos de *C. trachomatis*.

Los ensayos realizados para la estandarización de la técnica de hibridación dot blotting mostraron que las condiciones óptimas para su desarrollo fueron: desnaturalizar el ADN a 94°C, fijar el mismo con luz UV en membrana de nylon durante 2 minutos, emplear una concentración de sonda de 1ng/μl y usar una dilución de conjugado avidina-peroxidasa 1:1000. Se evaluó la capacidad de la técnica para identificar diferentes genotipos la cual reveló que puede detectar genotipos de *C. trachomatis* de una manera rápida y sencilla.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *C. trachomatis* son consideradas como un problema de salud pública por su alta prevalencia y debido a que la mayoría de los pacientes infectados desconocen su situación, convirtiéndose en un reservorio capaz de transmitir la infección a sus parejas sexuales, ya que las etapas iniciales de las infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis* son asintomáticas en hombres y mujeres (del 50 y 90% respectivamente) (Darville *et al.*, 2010; Land *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2007). Sin embargo pueden tener un carácter sintomático produciendo diversos cuadros clínicos, tales como uretritis, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), epididimitis, proctitis, etc. Aunque el principal impacto de la infección es dirigido a la salud reproductiva de la mujer, también puede afectar a hombres y neonatos. Además de que aumenta el riesgo de adquirir otras ITS como VIH y virus de papiloma humano (VPH) (Koskela *et al.*, 2000 y Zheng *et al.*, 2007). Debido a lo anterior el diagnóstico oportuno de infecciones por *Chlamydia trachomatis* es de suma importancia ya que este patógeno puede persistir por meses o años en órganos superiores de los genitales, aun cuando no se detecte en el endocervix (Villagrana *et al.*, 2013), lo que generará complicaciones antes mencionadas.

Un hecho importante es si una persona portadora asintomática de *C. trachomatis* y no usa métodos anticonceptivos de barrera y tiene una o múltiples pareja(s) sexual(es) infectada(s) con otros genotipos, corre el riesgo de estar coinfectado por más de un genotipo de *C. trachomatis*. A pesar de lo anterior, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido identificar a los individuos infectados por este patógeno. Sin embargo, para identificar estos genotipos se han empleado otras técnicas, tales como: patrones de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) ó secuenciación de nucleótidos que requiere de un secuenciador, ambas técnicas tienen la desventaja de no detectar infecciones múltiples por *C. trachomatis* es decir no identifican más de un genotipo en una muestra clínica y además son técnicas costosas. Sin embargo, la identificación de genotipos se puede realizar mediante la técnica de hibridación por dot blotting, el cual permite la identificación de infecciones mixtas por *C. trachomatis*. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estandarizar una técnica que sea accesible, rápida y de bajo costo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales

Chlamydia trachomatis es una bacteria aeróbica caracterizada por ser un patógeno intracelular obligado. Tiene la peculiaridad de ser dimórfico, ya que se presenta como cuerpo elemental (CE) y cuerpo reticulado (CR), ambos contienen ADN, ARN y ribosomas procarióticos típicos. El CE es la forma infectiva, es inmóvil no ciliada la cual tiene una forma esférica u ovalada, su tamaño varía entre 0.2 a 0.4 μm . La pared celular de estas bacterias tienen un alto contenido de lípidos y a diferencia de otras bacterias carece de peptidoglicano y ácido murámico, pero presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro confiriéndole rigidez para brindarle protección contra situaciones de estrés mecánico y osmótico. Presenta antígenos especie-específicos que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica y no pueden replicarse fuera de las células del hospedero. (Ostos y Mérida, 2003; Arráiz *et al*, 2008)

El CR es la forma que adopta la bacteria cuando está dentro de la célula, no es infectiva y lleva a cabo funciones metabólicas y de replicación, es pleomórfico y tiene un tamaño que oscila entre 0.6-1 μm . A diferencia del CE posee una membrana frágil. Es capaz de inhibir la fusión fagolisosómica y la subsecuente lisis de las bacterias por los lisosomas de la célula huésped. (Ostos y Mérida, 2003; Arráiz *et al.*, 2008)

Es un patógeno que no es de vida libre y es exclusivo del humano el cual puede infectar diversos tejidos como el conjuntivo, urogenital y linfático o bien células como monocitos y macrófagos. (Molina *et al.*, 2010; Stephen, 2013)

2.2 Genoma

El análisis genómico ha demostrado un genoma cromosómico pequeño el cual tiene alrededor de 1-1.2 millones de nucleótidos donde el 58.7% son A-T. (Ostos y Mérida, 2003; Molina *et al*, 2010; Stephen *et al.*, 1998)

Recientemente, las comparaciones genómicas de los serotipos A, D, L2, han mostrado que los genomas de los diferentes serotipos son muy similares en tamaño, la secuencia de nucleótidos y en número de proteínas previstas. Estos genomas codifican entre 889 y 920 proteínas, de los genes previstos y también funcionales, 846 son comunes en los tres genomas. (Stephen *et al.*, 1998)

A diferencia de otros genomas bacterianos, el genoma de *C. trachomatis* tiene un alto nivel de conservación en el contenido de los genes (80% al 98%). Las diferencias menores se deben al tropismo celular y la forma en la que se presenta la enfermedad.

La dilucidación del genoma ha permitido una introspección importante dentro de la genética, estructura molecular, fisiología, metabolismo, la biología intracelular, la patogenicidad y la genotipificación de este patógeno. La información importante que se ha recabado del análisis de las secuencias del genoma completo incluye la presencia de genes para una biosíntesis completa de peptidoglicanos y su reciclaje, las proteínas 2 y 3 de unión a la penicilina y el inesperado número elevado de genes de clamidia están relacionados con organismos superiores, particularmente los cloroplastos de las plantas. También el descubrimiento de genes que codifican ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares probablemente involucradas en la síntesis de ATP, descartan a *Chlamydia trachomatis* como un auxótrofo estricto de ATP, ya que por mucho tiempo se consideró como un microorganismo energético debido a que era incapaz de sintetizar ATP y por tanto lo obtenía de la célula hospedadora para asegurar cantidades suficientes y satisfacer sus necesidades metabólicas. El análisis de la transcripción de genes en la infección activa contra la infección persistente sugiere que en la primera fase de la infección clamidia utiliza el ATP derivado de la célula hospedera, mientras que en la infección persistente la fuente primaria de energía no es producida por la célula hospedera. (Ostos y Mérida, 2003; Stephen, 2013)

2.2.1 Gen *ompA*

Es el gen responsable de codificar la proteína principal de membrana externa (MOMP) por sus siglas en inglés, conocido en principio como gen *omp1* el cual está constituido por 1,182 pb en un marco de lectura abierto, codifica para 394 aminoácidos y tiene 3 codones de terminación (Molina *et al.*, 2010). Este gen está formado por 4 regiones denominados

dominios variables (VS) separados por 5 regiones altamente conservadas llamados dominios constantes. (Land *et al.*, 2010; Morre *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1993) Brunelle *et al.*, (2006) analizaron secuencias nucleotídicas de genes constitutivos, regiones intergenicas no codificantes, genes de proteínas polimórficas de membrana (*pmp*) y el gen *ompA* demostraron que este último presenta mayor número de sitios de variabilidad en su secuencia nucleotídica por lo que lo hace ser el más polimórfico (27.7%) seguido del gen *pmpH* (8.8%). Debido a lo anterior el gen *ompA* se ha empleado como blanco en técnicas de genotipificación, lo cual ha permitido identificar nuevas genovariantes de *Chlamydia trachomatis* (Lysén *et al.*, 2004). En estudios previos se han reportado que de la mitad de las mutaciones en el gen *ompA* ocurren en la región constante donde el 50% de estas son silenciosas. Sin embargo las mutaciones que ocurren en las regiones variables originan cambios en la secuencia de aminoácidos, lo que puede alterar las funciones biológicas de *Chlamydia trachomatis*. (Abdelsamed *et al.*, 2013; Dean y Millman, 1997; Guerra *et al.*, 2011)

2.3 Factores de virulencia

Hay muchos factores potenciales de virulencia, que promueven la colonización e invasión al hospedero los cuales juegan un papel importante en la patogénesis, la mayoría son estructurales principalmente componentes de la membrana externa entre otras moléculas proteicas. A continuación se describen brevemente:

2.3.1 Proteína principal de membrana externa (MOMP)

La MOMP es una proteína que constituye el 60% del peso de las proteínas presentes en la membrana externa y aproximadamente el 30% del peso del organismo, tiene una masa de subunidad de aproximadamente 38-43 kDa (varía según el serotipo). Esta proteína externa está involucrada en la interacción inicial con las células del hospedero, es el antígeno dominante de la bacteria desde el punto de vista inmunológico, y expone los epítomos específicos de cada serotipo. La MOMP tiene diversas funciones: confiere integridad en la estructura externa del CE, actúa como adhesina, facilitando la penetración de los CE al interior de la célula eucariota, en el CR tiene actividad de porina que sirve como vía de difusión de nutrientes, productos de desecho y antibióticos (Stothard *et al.*, 1998; Wang *et*

2.3.3 Proteínas polimórficas de membrana (Pmp)

Las Pmp son una familia de 9 genes (*pmpA-I*) pueden ser significativos en la severidad de la enfermedad entre cepas de clamidias. Dichos genes codifican proteínas en la membrana externa de los CE (**figura 2**), las cuales tienen un papel importante en la patogénesis debido a su función de adhesinas y autotransporte, además tienen una alta inmunogenicidad. (Abdelsamed *et al.*, 2013; Byrne, 2010; Nunes y Gomes, 2014)

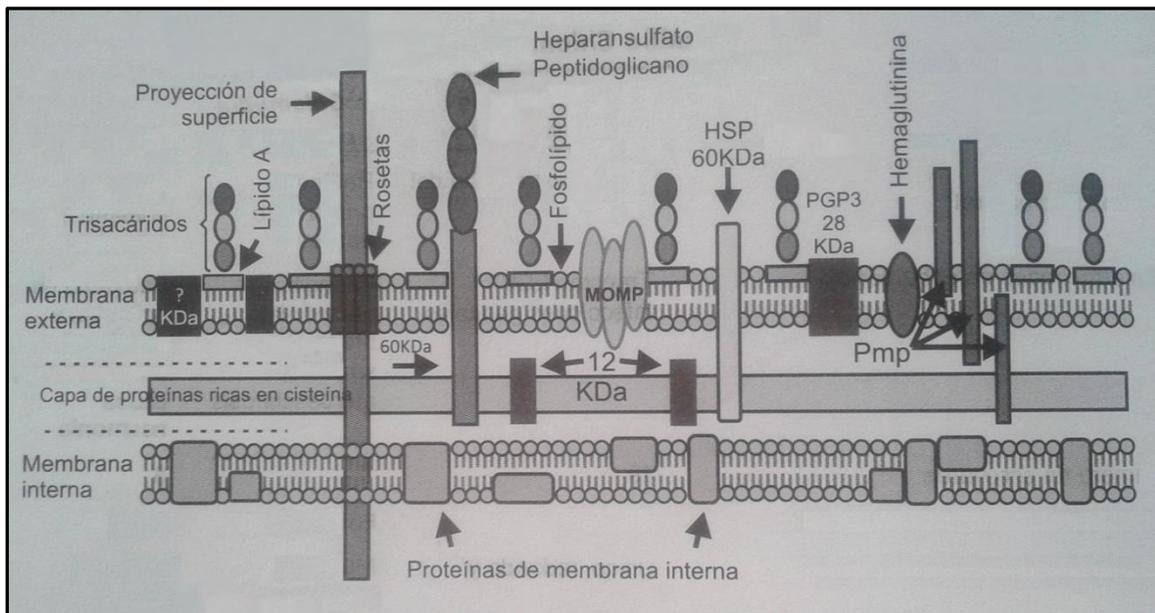


Figura 2. Modelo hipotético de la envoltura trilaminar de *C. trachomatis* (Molina, 2010). **MOMP:** Proteína Principal de Membrana Externa, **PGP3:** Proteína glicosilada del Plásmido, **HSP-60KDa:** Proténa de Choque Térmico y **Pmp:** Proteínas Polimórficas de Membrana.

2.3.4 Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína (COMC)

Este complejo contribuye a la rigidez y estabilidad osmótica del CE y participa en las primeras fases del anclaje del CE a la célula eucariota como otra adhesina. Recientemente se ha podido definir que hasta 28 proteínas forman parte de ese complejo, entre ellas *PmpB*, *PmpC*, *PmpE*, *PmpF*, *PmpG*, *PmpH*, *OprB* o *PorB*. Pero las 2 proteínas más prevalentes de este complejo son *OmcA* y *OmcB*. La proteína *OmcB* (también denominada *Omp2* o *EnvB*)

es la más abundante del complejo y está en una proporción 1:5 respecto de MOMP. Parece estar implicada en la transición de CR a CE. (Liu *et al*, 2010)

2.3.5 Proteínas de choque térmico (Hsp)

Son proteínas con una estructura muy conservada presentes en todos los organismos. Su función principal es actuar como chaperonas, se inducen en respuesta al estrés, modulan la respuesta inmune del hospedero, y se considera que tienen un papel inmunopatogénico. (Darville y Hiltke, 2010; Mascellino *et al*, 2011)

La proteína de choque térmico de 60kDa (Hsp60) aparece durante las infecciones crónicas persistentes, y parece asociarse a fenómenos de infertilidad tubárica, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) o gestación ectópica en pacientes infectados crónicamente con *C. trachomatis*.

La proteína Hsp70 se localiza en el citoplasma y en la membrana externa de los CE. Se cree que tiene un papel mediador en la adhesión de *C. trachomatis* a la célula hospedadora induciendo una respuesta inmune de tipo humoral. (Alonso *et al*, 2012)

2.3.6 Sistema de secreción tipo III

Es un mecanismo clave de la virulencia ya que facilita la interacción entre clamidia y la célula hospedera. El sistema de secreción tipo III puede introducir las proteínas efectoras de clamidia, como por ejemplo las proteínas de membrana de inclusión (Incs), CopN y Tarp (potencialmente involucradas en la invasión) dentro de las vacuolas de inclusión y membranas, o dentro del citoplasma del hospedero, lo que puede alterar la función normal de la célula hospedera para el beneficio de la bacteria.

Existen 7 proteínas Inc bien caracterizadas en *C. trachomatis* (IncA-G). Se ha considerado que IncB podría tener un papel importante en impedir la fusión del lisosoma una vez que el CE ha sido fagocitado (Alonso *et al.*, 2012), así también la IncG juega un papel importante en infecciones crónicas y agudas, ya que es un inhibidor indirecto de la apoptosis permitiendo a *Clamidia trachomatis* mantenerse viable dentro de la célula

hospedera o bien pueda completar su ciclo de desarrollo para infectar otras células. (Abdelsamed *et al.*, 2013; Byrne, 2010)

Otra posible proteína secretada por este sistema es la CPAF por sus siglas en inglés chlamydial protease-like activity factor. Se ha comprobado que puede degradar los factores implicados en la transcripción del hospedador, necesarios para la presentación de antígenos por parte de los complejos CMH-I y CMH-II, lo que interfiere en la habilidad del hospedador a la hora de responder frente a la infección clamidial. (Alonso *et al.*, 2012; Byrne, 2010)

2.3.7 Tóxina Clamidial

La cepa de *C. trachomatis* del serovar D que se ha aislado de tracto urogenital humano presenta un gen homólogo de citotoxinas reportadas en *E.coli* enterohemorrágica 0157 y *Clostridium*. En un estudio se demostró que esta cepa de clamidia expresó una proteína que causó la reorganización de actina de una manera muy similar a la toxina B de *Clostridium* en células HeLa, lo que evidencia una actividad citotóxica por parte de esta cepa de clamidia. (Abdelsamed *et al.*, 2013; Belland *et al.*, 2001; Byrne, 2010; Carabeo *et al.*, 2002; Nunes y Gomes, 2014)

2.3.8 Plásmido críptico

En casi todas las clamidias aisladas de humanos están presentes de 7-10 copias de plásmidos crípticos por célula bacteriana. Todos los plásmidos crípticos son extremadamente similares con menos de un 1% de variaciones en la secuencia de nucleótidos, todos tienen aproximadamente 7.5 kb (4.4kDa), con 8 marcos de lectura y las secuencias nucleotídicas están altamente conservadas entre las diferentes cepas. (Stephen, 2013). Aún no se comprende su función del plásmido, sin embargo, Carlson *et al.*, (2008) han demostrado que la inoculación de cepas de *C. trachomatis* sin plásmido a ratones no producen la enfermedad lo cual demuestra el papel que juega el plásmido críptico en la virulencia.

2.4 Taxonomía y Clasificación

La clasificación taxonómica de las bacterias pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* ha sido muy discutida en los últimos años. Basándose en el análisis genético de las subunidades 16S y 23S del ARNr. Everett *et al.*, (1999) establecieron, los géneros *Chlamydophila* y *Chlamydia*, los cuales poseen 6 y 3 especies respectivamente (**Figura 3**). Ambos géneros se diferencian por sus características fenotípicas, patológicas, tipo de hospedero que infectan, secuenciamiento genético y análisis filogenético de operón ribosomal. Por ejemplo se ha observado que especies del género *Chlamydophila* no producen glucógeno y tiene un solo operón ribosomal, mientras las especies del género *Chlamydia* producen glucógeno y poseen dos operones ribosomales. (Nunes y Gomes, 2014

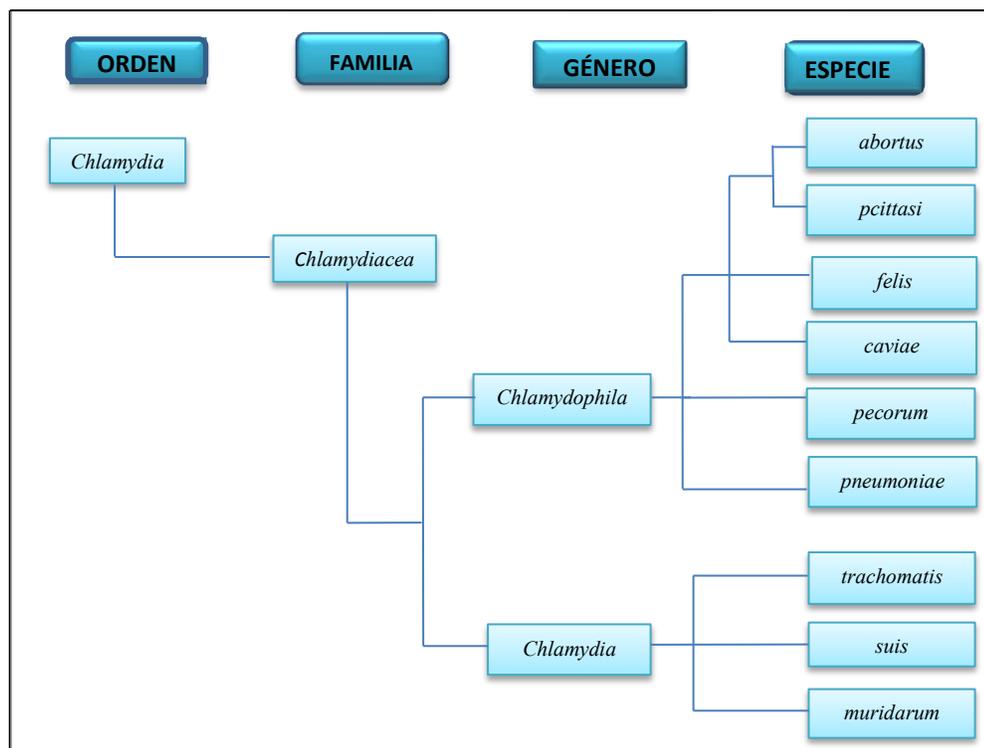


Figura 3. Taxonomía de *Chlamydia trachomatis*.

C. trachomatis es el agente infeccioso de mayor importancia debido a las diversas patologías que produce en el humano pero existen otras especies del género *Chlamydophila* que pueden causar enfermedad en el humano como *C. pneumoniae* que

causa neumonía, bronquitis y faringitis. Algunas otras especies pueden causar enfermedades zoonóticas como *C. psittaci* que causa neumonía al tener contacto con aves infectadas, *C. abortus* causa abortos por contacto con ovejas y carneros infectados y *C. felis* causa conjuntivitis por tener contacto con gatos infectados. (Alonso *et al.*, 2012)

Las cepas de *Chlamydia trachomatis* se han clasificado en: biovares o patotipos en base al tropismo celular, serovares (serotipos) por las diferencias serológicas de la MOMP y en genovares (genotipos) de acuerdo a la similitud de secuencias nucleotídicas del gen *ompA* (Figura 4). (Abdelsamed *et al.*, 2013)

La primera clasificación de las cepas de *Chlamydia trachomatis* fue realizado en 1970 por Wang y Grayston donde se identificaron 15 serovares mediante la técnica de microinmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales, contra diferentes epítomos antigénicos sobre la MOMP. Esta técnica fue el sostén principal de la tipificación epidemiológica durante varias décadas.

De acuerdo con Abdelsamed *et al.*, (2013) las cepas de *C. trachomatis* están divididas en 2 biovares: oculogenital y LGV. Los cuales a su vez se subdividen en 19 serovares que están asociados con diferentes enfermedades (Figura 4).

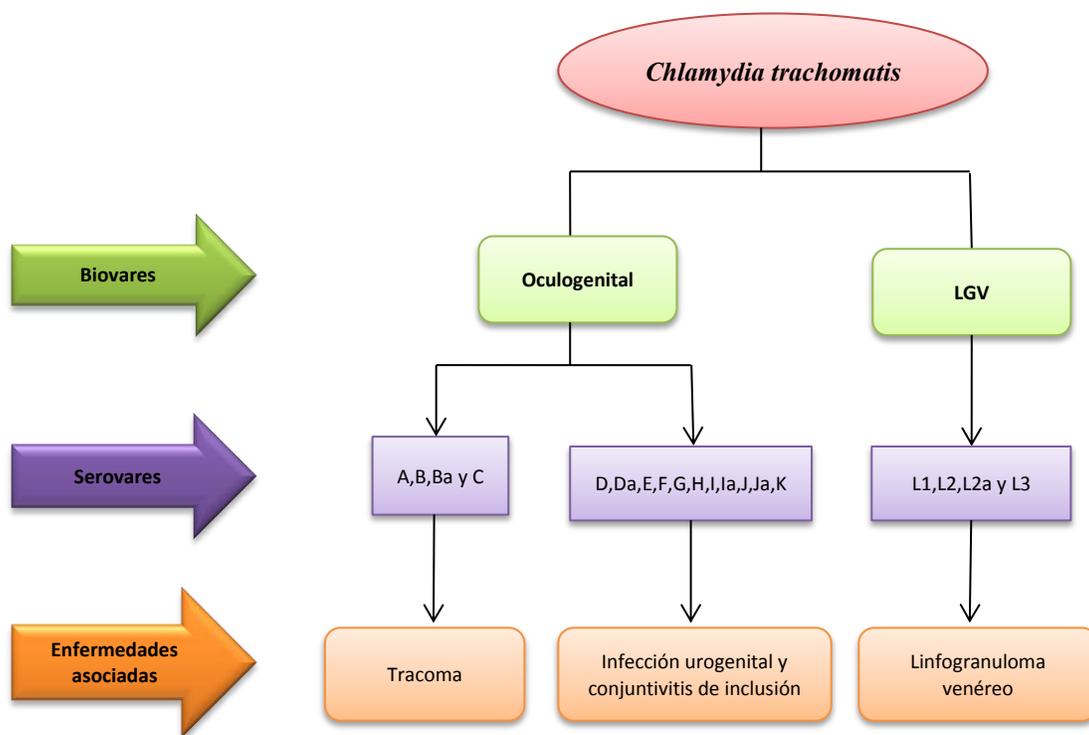


Figura 4. Clasificación de *Chlamydia trachomatis*.

Por otra parte el análisis filogenético ha permitido clasificar a las cepas de *Chlamydia trachomatis* en base a la secuencia nucleotídica del gen *ompA* en 3 grupos: El grupo B que está conformado por los serovares B, Ba, D, Da, E, L1, L2a y L2b, el grupo C consiste en los serovares A, C, H, I, Ia, J, Ja, K y L3 y un grupo intermedio que incluye los serovares F y G (**Figura 5**). (Yuan *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 2007)

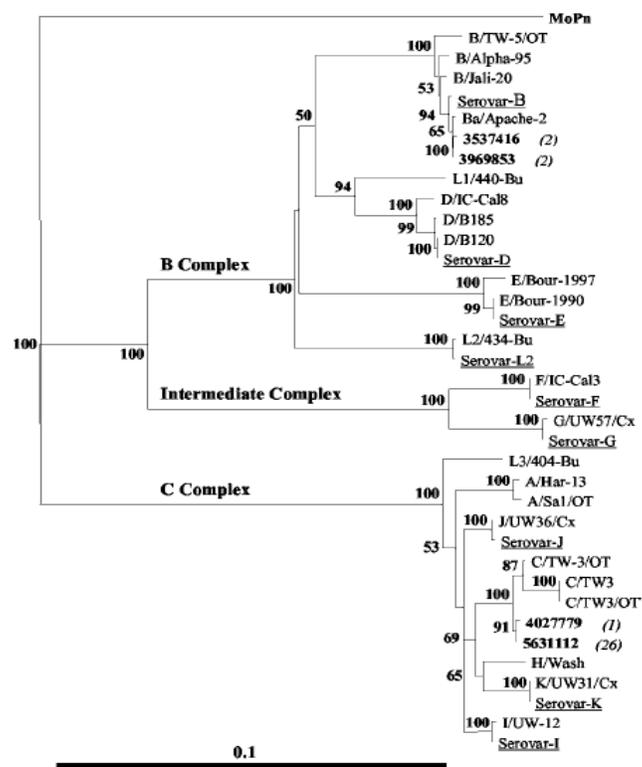


Figura 5. Árbol filogenético de los diferentes genotipos considerando el gen *ompA* de *C. trachomatis*. (Stevens *et al.*, 2004)

2.5 Ciclo de vida

Las clamidias experimentan un ciclo biológico bifásico único donde presenta dos formas: el cuerpo elemental (CE) es la forma infecciosa y el cuerpo reticular (CR) es la forma replicativa. (Arráiz *et al.*, 2008)

El ciclo inicia con la adherencia de los CE a un receptor, aunque no se conocen bien los receptores específicos de la célula hospedera ni de la bacteria implicados en este proceso, pero se sugiere que los distintos serovares pueden emplear diferentes estrategias de adhesión como: MOMP, PMPs, Tarp, etc. (Abdelsamed *et al.*, 2013; Byrne, 2010; Nunes y

Gomes, 2014). Se han descrito varias vías de entrada a las células como son: fagocitosis parásito específica, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis dependiente de microfilamentos. (Molina *et al.*, 2010). Una vez dentro de la célula, los CE presentes en la vesícula, comienzan un proceso de reorganización o diferenciación de CE a CR, los primeros cambios son el inicio de la síntesis proteica y la transformación de la MOMP de su forma trimérica a monomérica, con lo que aparecen poros de un tamaño adecuado para el paso de ATP y nutrientes. A las 12 horas post-infección, todas las bacterias intracelulares están en forma de CR las cuales se dividen por fisión binaria dentro de la vesícula formando un cuerpo de inclusión. Durante esta etapa se produce un crecimiento exponencial dentro del fagosoma existiendo 100-1000 bacterias, con un tiempo de duplicación de 2-3 horas. Ya concluido el ciclo de crecimiento, comienza una nueva reorganización de los CR a CE para formar una inclusión madura. La reorganización no es un proceso sincrónico, es decir coexisten CR en reproducción junto a CE maduros. Al cabo de 48 a 72 horas, la célula se rompe y libera más de 1000 CE infecciosos, aunque el mecanismo de liberación no se conoce aún con exactitud, en algunos casos estudiados se ha descrito un mecanismo semejante a la exocitosis, pero generalmente los CE son detectados en el medio extracelular por lisis celular. (Alonso *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2012)

El ciclo normal descrito anteriormente puede ser afectado por muchos factores incluyendo INF- γ , depleción de nutrientes (p.ej. triptófano), tratamiento con antibióticos como β -lactámicos, choque térmico, AMP cíclico y hormonas. Estos factores pueden inducir la formación de cuerpos reticulares anormales denominados formas aberrantes (FA) en donde su actividad metabólica disminuye, no se replica y suele ser resistente al tratamiento antibiótico. (Ostos y Mérida, 2003)

Las FA permanecen en el interior de la célula como agente infeccioso latente o persistente y su presencia se ha asociado con procesos crónicos infeccioso y no infecciosos. Cuando son eliminados del medio los factores inductores de las FA, estos se convierten en CE infectivos regresando así al ciclo normal para ser liberados e infectar las células vecinas perpetuando así el ciclo (**Figura 6**). (Dean *et al.*, 2000)

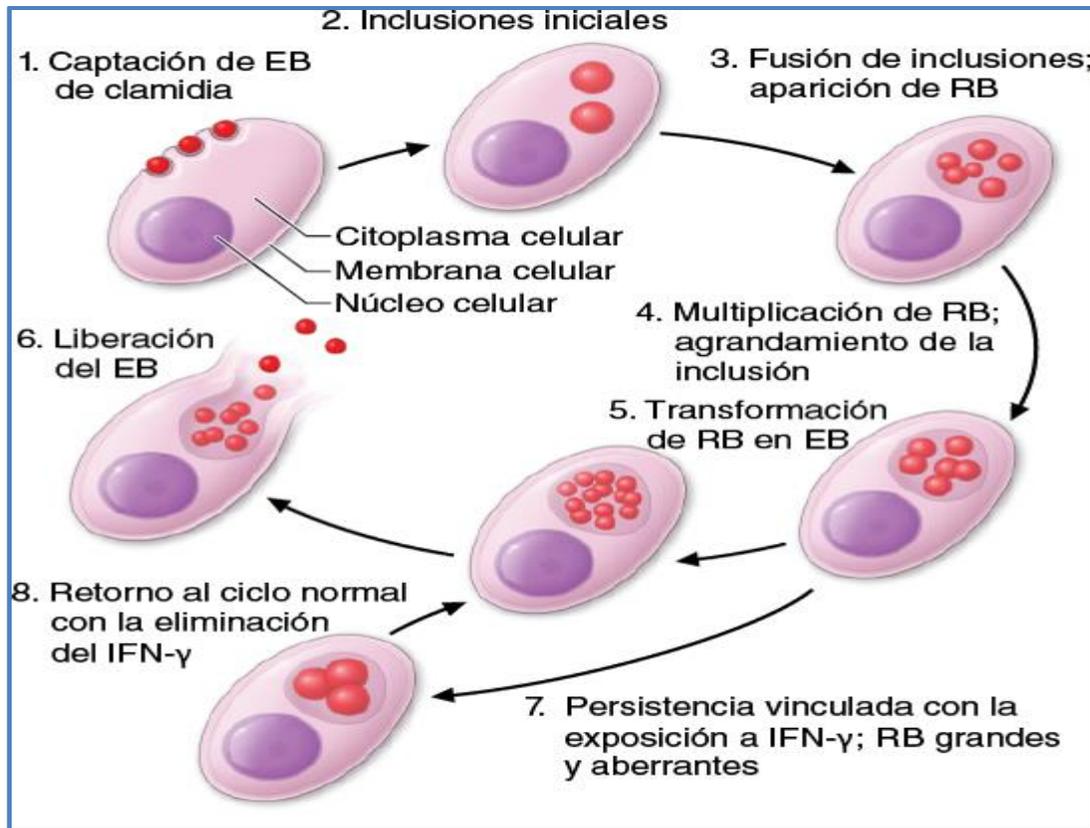


Figura 6. Ciclo biológico de *Chlamydia trachomatis*. (Longo *et al.*, 2012)

El tiempo de necesario para completar el ciclo de desarrollo de *C. trachomatis* depende de cada serotipo que puede variar entre 36 y 72 horas. (Alonso *et al.*, 2012)

2.6 Manifestaciones clínicas

2.6.1 Infección genitourinaria

Los serotipos D-K de *C. trachomatis* inicialmente infectan células de la mucosa genital de hombres y mujeres, aunque en raros casos se han aislado los genotipos B y C que comúnmente causan tracoma debido al contacto accidental de la conjuntiva hacia los genitales. Entre el 70-90% de las mujeres y del 30 -50% de los hombres cursan una infección asintomática (De Haro *et al.*, 2011; Ostos y Mérida, 2003), sin embargo algunos individuos muestran diversos síndromes clínicos que a continuación se describen:

2.6.1.1 En Mujeres

Algunas mujeres después de un periodo de incubación de 1 a 3 semanas pueden presentar síntomas generales como: secreción purulenta, prurito vaginal, dolor abdominal o pélvico, alteraciones menstruales, disuria, bartolinitis y fiebre.

La manifestación clínica más frecuente es la cervicitis, aunque existen casos donde el único sitio de infección es la uretra, asociada a síntomas tales como la disuria y polaquiuria. En más del 60% de los casos, *C. trachomatis* es el principal agente causal del síndrome de uretritis no gonocócica (UNG). (Stephen, 2013)

Las complicaciones que puede generar una infección por *C. trachomatis* son a nivel tracto genital superior. La propagación ascendente de la bacteria desde el canal cervicovaginal, puede provocar endometritis, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), y finalmente peritonitis o perihepatitis asociada (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis) es la complicación más seria de la infección por clamidia en las mujeres que puede provocar una diseminación sistémica de la bacteria. Las secuelas más graves de la enfermedad aun cuando se ha erradicado el patógeno es dolor crónico pélvico e infertilidad por obstrucción tubárica (OBT). (Ostos y Mérida, 2003)

En la mujer embarazada infectada puede presentar embarazo ectópico, abortos de repetición, ruptura prematura de membranas y comúnmente presentar fiebre postparto. (Ramos *et al.*, 2001)

2.6.1.2 En Hombres

Las manifestaciones clínicas que pueden presentar son: uretritis generalmente con descarga mucoide, aunque se reconoce un espectro que va desde la ausencia de la descarga a una descarga purulenta, disuria, prurito uretral y ocasionalmente poliaquiuria. El periodo de incubación de la UNG es mayor que el de la gonorrea, variando entre 1 y 3 semanas en la mayoría de los casos. *C. trachomatis* es el principal agente causal en más del 50% de los casos de UNG, también se ha convertido junto con *N. gonorrhoea* es la principal causa de epididimitis aguda el cual se presenta usualmente como una UNG con dolor epididimario o testicular unilateral asociado a edema, sensibilidad y fiebre. También puede causar prostatitis crónica e infertilidad. (Young y Kyu, 2013)

2.6.2 LGV

El linfogranuloma venéreo es una enfermedad sistémica producida por los serotipos L1, L2 (y sus genovariantes recientemente descritas 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f y 2g) y L3. (Guerra *et al.*, 2012) El cuadro clínico consiste en tres fases:

La primera etapa (3-30 días después del contacto sexual) se caracteriza por la aparición de una úlcera pequeña e indolora en la mucosa genital o piel adyacente. Esta lesión inicial puede ser intrauretral, cervical o rectal causando uretritis, cervicitis o proctitis respectivamente. Pero generalmente esta etapa suele ser asintomática o con muy pocos síntomas. La segunda etapa se caracteriza por una linfadenopatía inguinal eritematosa y dolorosa lo cual da origen a la formación de bubones, sobre uno o ambos lados del ligamento inguinal (signo del surco). Los bubones pueden romperse espontáneamente drenando pus. También pueden palparse ganglios alrededor del recto de varones o mujeres que practican relaciones sexuales anales. Alrededor de los ganglios hay sangre, flujo de pus o diarrea, dolor abdominal y tenesmo. Las manifestaciones a nivel sistémico durante esta etapa son fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, hepatitis, neumonitis y meningoencefalitis. La tercera etapa es crónica cuando no se trata y se caracteriza por la formación de estenosis ano-rectal, abscesos perirrectales, elefantiasis e infertilidad. (Alonso *et al.*, 2012; (SINAVE/DGE/SALUD, 2009)

Actualmente esta enfermedad se considera frecuente en hombres homosexuales y mujeres que practican relaciones sexuales anales y en muchos casos se ha relacionado con VIH y gonorrea. (Guerra *et al.*, 2012)

2.6.3 Infecciones perinatales

Entre un 25 a 50% de los neonatos nacidos por vía vaginal de madres infectadas con *C. trachomatis* desarrollan conjuntivitis de inclusión entre los primeros 5 y 14 días de nacimiento, en algunos casos esta manifestación puede volverse crónica y producir daño irreversible en la córnea. Se ha visto que la conjuntivitis no tratada aumenta el riesgo en un 50% de desarrollar neumonía, este padecimiento ocurre alrededor del 10 al 25% de los casos, que se caracteriza por: tos persistente sin sibilancias, taquipnea y fiebre.

Además pueden desarrollarse otros síndromes con menos frecuencia como rinitis, rinofaringitis, otitis del oído medio, miocarditis y encefalitis. (Alonso *et al*, 2012)

Un estudio realizado por Hernández Trejo *et al.*, (2014) demostraron que este patógeno puede causar infección sistémica al detectar ADN de *C. trachomatis* en diferentes órganos como: pulmones, corazón, hígado, cerebro y riñones lo que provoca la muerte del neonato.

Como previamente se mencionó, la infección por *C. trachomatis* puede causar diferentes signos y síntomas. A continuación se muestra en la siguiente tabla un resumen de las manifestaciones clínicas:

Tabla 1. Síndromes clínicos y complicaciones causadas por los genotipos D-K de *C. trachomatis*.

INFECCIONES EN:	SÍNDROMES CLÍNICOS	COMPLICACIONES
HOMBRES	Uretritis Epididimitis Proctitis Conjuntivitis Proctitis Orquitis	Infertilidad Síndrome de Reiter
MUJERES	Uretritis Cervicitis Bartolinitis Conjuntivitis Proctitis	Embarazo ectópico Infertilidad Abortos de repetición Ruptura prematura de membranas EPI , OBT, salpingitis, endometriosis Diseminación sistémica Perihepatitis Síndrome de Reiter
RECIÉN NACIDO	Conjuntivitis	Neumonitis intersticial Bajo peso al nacer Diseminación sistémica Mortalidad

2.7 Epidemiología

La infección causada por *Chlamydia trachomatis* es la segunda causa de ITS después de la infección por virus de papiloma humano (Satterwhite *et al.*, 2013), cada una de las patologías descritas tiene una distribución geográfica diferente afectando, distintas poblaciones y sociedades tanto en países desarrollados como subdesarrollados.

Se ha observado que el número de casos por clamidia ha ido en aumento, en el 2005 la OMS estimó 101.5 millones de nuevos casos en el mundo (WHO, 2011). En el 2007 la CDC refirió que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* fueron 3 veces más frecuentes que la gonorrea (CDC, 2012). Para el 2008 hubo un incremento del 4.1% en el número de casos llegando a 105.7 millones (WHO, 2012). Sin embargo, no está claro si este incremento está directamente relacionado con mayores tasas de transmisión o con la implementación generalizada de técnicas de diagnóstico molecular, más sensibles y específicas.

De acuerdo con los datos reportados en el 2008 por la OMS las regiones con mayor incidencia y prevalencia en individuos infectados con *C. trachomatis*, fueron: Pacífico Occidental, América y Europa, mientras que las regiones de menor incidencia y prevalencia fueron África, Asia y Mediterráneo Oriental (**Figura 7**).

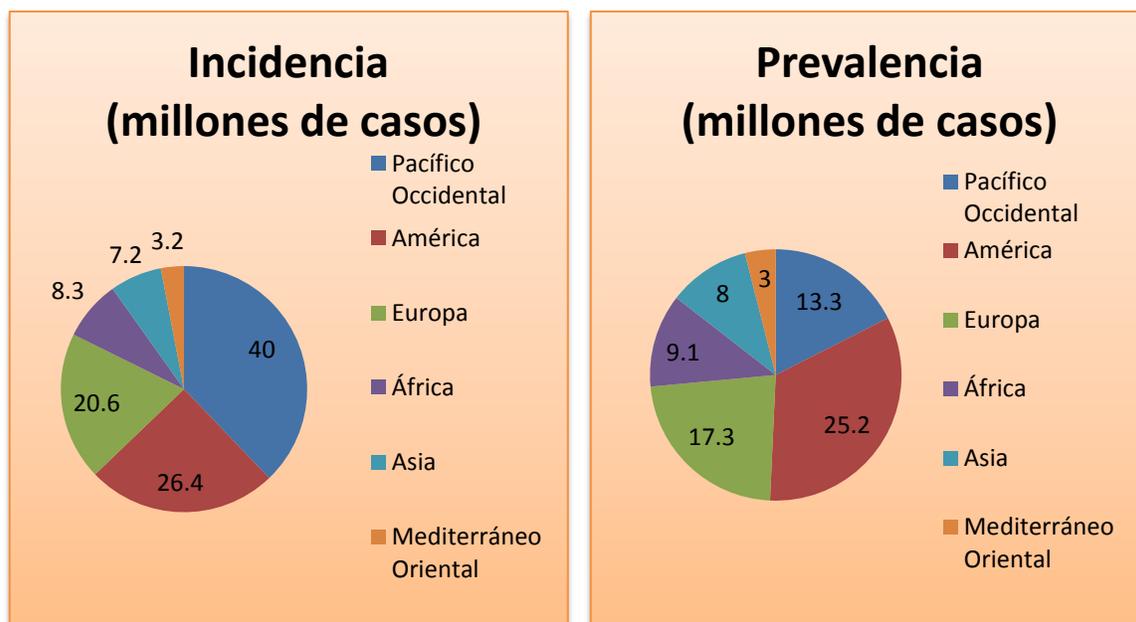


Figura 7. Estimación global de la Incidencia y Prevalencia de *C. trachomatis* en infecciones urogenitales. (WHO, 2012)

En América la incidencia entre el 2005 y 2008 se ha incrementado, siendo las mujeres las más afectadas a diferencia de lo que ocurre en las regiones como Europa y Mediterráneo Oriental en donde los hombres son los más afectados por este patógeno (**Tabla2**).

En México son pocos los estudios sobre prevalencia de infecciones por *C. trachomatis* y solo se han realizado en algunos estados como Mérida, Chiapas, Puebla, D.F, Morelos y Durango, sin embargo han sido diferentes las poblaciones estudiadas. Actualmente la prevalencia oscila entre el 4% y 20% siendo el D.F como la región con un alto número de casos. (Alvarado *et al.*, 2000; Canto de Cetina *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2013; Jiménez, 2001; Sánchez *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2010)

Tabla.2. Estimación global de acuerdo con la OMS de la incidencia de *C. trachomatis* en infecciones urogenitales en el 2005y 2008.

Región	Año	Incidencia por 1000		Nuevos casos(millones)	
		Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Pacífico Occidental	2005	43.31	23.39	20.38	21.22
	2008	38.4	20.9	18.4	21.5
América	2005	53.04	44.32	12.15	10.26
	2008	72.6	38.2	17.4	9.1
Europa	2005	39.89	21.4	9.03	6.17
	2008	37.1	10.9	8.3	12.3
África	2005	32.79	27.06	5.86	4.16
	2008	22.3	54.2	4.3	4
Sureste de Asia	2005	9.2	5.63	4.01	2.6
	2008	9.2	6.2	4.2	3
Mediterráneo Oriental	2005	19.35	42.7	2.6	3.06
	2008	9.8	42.5	1.5	1.7

Las infecciones urogenitales causadas por los genotipos D-K de *Chlamydia trachomatis* tienen una distribución mundial mientras que los genotipos del LGV son más restringidos. Se ha visto que el LGV es más prevalente en África, Asia y Sudamérica pero tiene una baja frecuencia en Norteamérica y Europa (Ostos y Mérida, 2003). Sin embargo, desde el 2003 en países como: Suecia, Amsterdam, Alemania, Estados Unidos, Canadá y Australia han ocurrido brotes por una nueva genovariante del serotipo L2 que origina proctitis, en lugar del linfogranuloma venéreo, en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), siendo

éstos el principal reservorio de la enfermedad, por lo que es considerada hoy en día como un problema de Salud Pública, especialmente por la estrecha asociación entre LGV y el VIH. (Alonso *et al.*, 2012; Carlson *et al.*, 2008)

Debido a lo anterior, en países europeos es de declaración obligatoria los casos de personas infectadas por *C. trachomatis*. En México el LGV se reporta a la dirección general de epidemiología de la Secretaría de Salud por parte de las Instituciones de Salud. Durante 2009 en México se reportaron 276 casos nacionales e incidencia de 0.26, en el periodo comprendido del año 2000 al 2008. Las entidades que más casos reportaron fueron Chihuahua con 54 casos, Edo. de México con 35 y Chiapas con 18. Por nivel de incidencia, las entidades más afectadas fueron Chihuahua, Tlaxcala y Nayarit con 1.59, 1.15 y 0.83 casos por 100 000 habitantes. Respecto a la distribución por sexo, las mujeres son más afectadas que los hombres. En las mujeres se reportaron el 73.6% de las notificaciones. La incidencia por grupo de edad muestra que la población más afectada es la de 20 a 49 años. (SINAVE/DGE/SALUD, 2009)

A pesar de los estudios epidemiológicos que se han realizado es difícil determinar la verdadera prevalencia a nivel mundial, debido al carácter asintomático de la infección y las limitaciones para su diagnóstico en algunos países.

2.7.1 Distribución a nivel mundial de los genotipos de *C. trachomatis*

En los últimos años se han realizado estudios genotipificación para conocer la prevalencia de los distintos genotipos de *C. trachomatis* en diferentes países (**Tabla 3**), empleando diferentes técnicas como RFLP, secuenciación e hibridación. Lo cual revela que los genotipos más prevalentes a nivel mundial son: **E** (8.7-100%), **F** (8-54.2%), **G** (2.3-45%), y **D** (4.2-34.4%) mientras que los de baja prevalencia son: **K** (2.2-15.9%), **J** (1.5-19%), **Ia** (1-14.5%), **H** (0.6-13%).

Tabla 3. Prevalencia de genotipos de *C. trachomatis* en el mundo.

País	Alta Prevalencia (%)		Baja Prevalencia (%)		Referencia
Colombia	D	22.2	I	8.6	Molano <i>et al.</i> , 2004
	F	18.5	J	7.4	
	G	13.6	K	4.9	
	E	12.3	H	3.7	
Suecia	E	39	D/Da, K	9	Lysén <i>et al.</i> , 2004
	F	21	J	7	
	G	11	H	2	
			B, Ia	1	
EUA	E	30	J	9.9	Millman <i>et al.</i> , 2006
	F	20.6	K, G	4.4	
	J	14.5	Ja	1.5	
	D	13.5	Ba, H	0.6	
Italia	E	38.8	J	4.8	Margoni <i>et al.</i> , 2012
	G	23.3			
	F	13.5			
	D/Da	11.6			
Holanda	E	38	D/Da, K	7	Quint <i>et al.</i> , 2007
	F	23	J	5	
	G/Ga	11	H	2	
			I, Ia	1	
Uganda	G/Ga	45	F	8	Quint <i>et al.</i> , 2007
	E	21	D/Da	6	
	K	13			
Australia	E	48.9	D/Da	8.9	Banda <i>et al.</i> , 2008
	F	22.2	K	2.2	
	J, Ja	11.1	G	6.7	
Taiwán	D, F	22.2	J	3.2	Huang <i>et al.</i> , 2008
	E	17.4	Ba, H	1.6	
	K	15.9			
	G	12.6			
Hungria	D	34.4	G, J	9.4	Petrovay <i>et al.</i> , 2009
	E	21.9	H, I	3.1	
	F	18.8			
China	E	26	H, K	6	Yang <i>et al.</i> , 2010
	F	24	G	4	
	G	19	Ba, I	1	
	D	13			
México	F	54.2	E, G, K, L2	8.7	De Haro-Cruz <i>et al.</i> , 2011
		D, H, Ia	4.2		
India	E	100	-----	-----	Gita <i>et al.</i> , 2011
Tunéz	E	74	K, Ba	3	Gharsallah <i>et al.</i> , 2012A
	F	16			
	G, H	13			
	D	10			

Mediante métodos de hibridación se han podido detectar en individuos infectados con más de un genotipo de *C. trachomatis*. En el 2001 Stothard reportó una prevalencia del 2-15% con más de 2 genotipos. Sin embargo en los últimos años se ha observado en diferentes estudios una prevalencia del 3.2-26% (**Tabla 4**), lo cual es evidente el incremento del número de casos en individuos infectados con más de un genotipo.

Tabla 4. Prevalencia de genotipos en infecciones mixtas por *C. trachomatis*.

País	Genotipos	No. De casos	Prevalencia (%)	Referencia
Colombia	D y E	3	8.7	Molano <i>et al.</i> , 2004
	D y I	1		
	K y H	1		
	D,E y F	1		
	G,J y K	1		
Australia	C y I	1	13	Xiong <i>et al.</i> , 2006
	D y E	2		
	E y F	2		
	H y K	5		
	J y K	9		
	A,C y J	2		
	C,J y K	1		
	D,E y H	1		
	F,G y K	1		
Holanda	E,F , I/Ia	2	4	Quint <i>et al.</i> , 2007
	E y F	1		
	E, I/Ia	1		
Uganda	E,F	1	4	Quint <i>et al.</i> , 2007
	E,G/Ga	1		
Taiwán	D y K	1	3.2	Huang <i>et al.</i> , 2008
	K y E	1		
Tunéz	E y F	1	26	Gharsallah <i>et al.</i> , 2012B
	E y G	2		
	E y D	1		
	E y H	1		
	D y F	1		
	E,H y K	1		
	B, D y H	1		
	E,F y H	1		

2.8 Diagnóstico

Existen varias técnicas de diagnóstico utilizadas para detectar infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*, a continuación se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Métodos de diagnóstico empleados para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
Cultivo celular	Empleo de líneas celulares: células McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa (células de cáncer cervicouterino humano) y BHK-21 (células de riñón de hámster). Tiene una sensibilidad del 50 -90% y una especificidad del 100%. (Pederen <i>et al.</i> , 2009)
Inmunoensayo enzimático (EIA)	Se basa en la detección del antígeno por la detección de una señal colorimétrica generada por la reacción del antígeno (generalmente regiones epitopo-específicas del LPS) con el anticuerpo. Pueden presentar una sensibilidad del 65-85% pero presentan una baja especificidad. (Stephen, 2013)
Tinciones	Con Giemsa los CE se tiñen de color azul y por la tinción de Machiavello se tiñe de rojo. Iodo, Hematoxilina-Eosina, Papanicolau, Gram. Son de baja sensibilidad y no son específicas. (Ostos Ortiz y Mérida Sánchez, 2003)
Inmunofluorescencia Indirecta (MIF)	Emplea anticuerpos monoclonales conjugado con fluorocromo (isocianato de fluoresceína) contra el LPS, la MOMP o frente a la proteína HSP60 de los CR en las células epiteliales. Tienen la desventaja de que se presenten reacciones cruzadas. Sensibilidad entre 80-90% y especificidad del 98-99% usando anticuerpos contra la MOMP. (Stephen, 2013)
Pruebas rápidas	Se basan en el flujo lateral y la captura antigénica mediante anticuerpos anticlamidiales marcado con oro coloidal presentes en la membrana sobre franjas inmunocromatográficas. Las pruebas comerciales más usadas son: Clearview Chlamydia, QuickVue Chlamydia y Biostar OIA Chlamydia, PDA Chlamydia Rapid Test (CTR), HandiLab-C Surescreen y SELF Check. Tienen baja sensibilidad y pobre especificidad. (Stephen, 2013)
Fijación del Complemento	Detecta anticuerpos contra LPS de <i>C. trachomatis</i> . Es poco sensible y específico en las infecciones urogenitales y oculares, a pesar de ello se ha empleado para el diagnóstico de LGV. (Stephen, 2013)
Microinmunofluorescencia Indirecta (MIF)	Detecta los anticuerpos contra la MOMP y puede diferenciar los anticuerpos específicos de las especies y serotipos. Presenta una sensibilidad del 68%, presenta baja especificidad debido a la reacción cruzada con <i>C. pneumoniae</i> . (Stephen, 2013)
ELISA	Se basan en antígenos MOMP específicos recombinantes o en LPS que detectan anticuerpos contra <i>C. trachomatis</i> . Tiene una sensibilidad del 98%, pero baja especificidad. (Stephen, 2013)

2.8.1 Técnicas Moleculares

Las técnicas de biología molecular han venido a reemplazar muchas de las técnicas convencionales empleadas en la detección de *C. trachomatis*, debido a que presenta muchas ventajas como: diagnosticar cualquier patógeno sin necesidad de que este viable, no hay reacciones cruzadas como sucede en las pruebas serológicas, pueden emplearse muestras no invasivas como orina, semen, y rectales, facilitando en gran medida la detección de infecciones genitales por clamidia en especial en adolescentes, son técnicas rápidas, altamente sensibles, proporcionan alto grado de especificidad (**Tabla 6**), lo que contribuye a la obtención de resultados de óptima calidad. Muchas técnicas están basadas en la amplificación de ácidos nucleicos conocidas como (NAAT) por sus siglas en inglés y se han convertido en las herramientas de diagnóstico más habituales en los laboratorios. Existen técnicas comerciales basadas en esta tecnología aprobados por la FDA para el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis*. En estas pruebas se usan distintos métodos como:

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa), SDA (Amplificación de desplazamiento estándar) y TMA (Amplificación mediada por transcripción). Los primeros tres métodos amplifican o detectan ADN genómico (principalmente el gen *ompA*) y plásmido críptico, mientras que el último método amplifica secuencias de ARN ribosómico (**Tabla 6**).

También existen pruebas que no requieren amplificación basadas en la hibridación de ácidos nucleicos que usan un tipo de sonda de DNA quimioluminiscente, complementario de una secuencia de ARN ribosómico (ARNr) del genoma de clamidia. Una vez formado el híbrido DNA-ARNr se absorbe sobre una perla magnética y se detecta mediante un luminómetro como es el caso de la prueba PACE 2 CT desarrollado por Gen-Probe.

Tabla 6. Técnicas comerciales para la detección de *C. trachomatis*.

Marca	Prueba	Técnica	Blanco que detecta	Tipo de Muestra	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
Abbott	M2000 v2	PCR en tiempo real	plásmido	Orina	96.94	100	Levett <i>et al</i> , 2008
BD	ProbeTec	SDA	plásmido	Orina, endocervical	≥89.4	≥99.5	Levett <i>et al</i> , 2008; Gaydos <i>et al</i> , 2013
Digene	Hybrid Capture II	Hibridación	Plásmido ADN genómico	Endocervical	93.3	100	Van Der Pol <i>et al</i> , 2002
Gen-Probe	PACE 2 CT	Hibridación	ARNr 23S	Endocervical, uretral y conjuntivales	≥80	≥97	Gen-Probe, 2011
Gen-Probe	AC2	TMA	ARNr 23S	Orina, endocervical	≥96.3	100	Levett <i>et al</i> , 2008; Gaydos <i>et al</i> , 2013
Gen-Probe	APTIMA CT	TMA	ARNr 16S	Rectal	86	99.2	Goldenberg <i>et al</i> , 2012
Roche	COBAS Taqman	PCR	Plásmido gen ompA	Orina	≥95.5	≥99.8	Roche Molecular System, 2013
Cepheid	GeneXpert CT/NG	PCR en tiempo real	ADN genómico	Orina, vaginal, endocervical y rectal	≥92.5	≥98.4	Goldenberg <i>et al</i> , 2012 Gaydos <i>et al</i> , 2013

AC2 : Aptima Combo2 Assay

Un aspecto importante en las NAAT es emplear dos blancos para la detección de este patógeno ya que puede ocurrir que no se detecten cepas mutantes como ocurrió en el 2006 con la aparición de una nueva cepa sueca del genotipo E (nvCT variante), lo cual la hizo indetectable a pruebas comerciales como Abbott m2000 (Abbott) y Amplicor/COBAS Amplicor/TaqMan48 (Roche), debido a que se detectó en su secuencia una deleción de 377 pb en el plásmido críptico. (Klint *et al.*, 2011; Unemo *et al.*, 2010)

También es importante considerar que si se desea verificar si el paciente ha sido curado por completo, lo recomendable es hacer otro tipo de estudio que no implique amplificación de ácidos nucleicos, debido a que puede dar falsos positivos después de 4 semanas de haber estado infectado aun cuando el paciente haya recibido tratamiento. Una alternativa es confirmar por cultivo celular o bien realizarse el estudio por NAAT después de 6 meses. (Persing, 2011)

2.9 Tipificación de cepas de *Chlamydia trachomatis*

Las primeras pruebas que se realizaron para la tipificación de cepas de *C. trachomatis* fue mediante la serotipificación empleando técnicas como microinmunofluorescencia, ELISA dot y RIA. Sin embargo la microinmunofluorescencia fue considerada como el estándar de oro para la tipificación de *C. trachomatis* que permitió realizar los primeros estudios seroepidemiológicos. Posteriormente se emplearon anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la MOMP (Pedersen *et al.*, 2009). Estas técnicas fueron reemplazadas debido al surgimiento de la biología molecular, lo que dio pauta a nuevas tecnologías basadas en la amplificación de ácidos nucleicos y la secuenciación surgiendo así las técnicas de genotipificación que permitieron realizar técnicas más sensibles y específicas para la identificación de cepas de *C. trachomatis*.

Las técnicas de genotipado basadas en el análisis del DNA genómico de *Chlamydia trachomatis* que se han empleado hasta el momento son: PFGE (electroforesis de campo pulsado) y RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), dichas técnicas no son muy accesibles ya que requieren de cultivo y algunas son difíciles de estandarizar (Pedersen *et al.*, 2009). Recientemente, Hernández Cortez *et al.*, (2012) encontraron secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) en el genoma de *C. trachomatis* con la finalidad de usar esta secuencia como blanco para identificar los diferentes genotipos de esta bacteria. Sin embargo, las técnicas más utilizadas para la identificación de genotipos son aquellas que se basan en la detección del gen *ompA*, entre ellas podemos citar:

2.9.1 RFLP: patrones en la longitud de los fragmentos de restricción

Se basa en la amplificación del gen *ompA* mediante PCR, el cual es fragmentado mediante enzimas de restricción como *AluI*, *HinfI*, *HindIII*, *EcoRI*, etc. Posteriormente se hace un análisis electroforético que revela los diferentes patrones específicos para cada tipo de *C. trachomatis* (**Figura 8**).

Mediante esta técnica se han identificado genotipos como también genovariantes, pero tiene algunas limitaciones ya que es complicado su procedimiento, tiene baja capacidad para detectar infecciones mixtas por *C. trachomatis*. (Pedersen *et al.*, 2000)

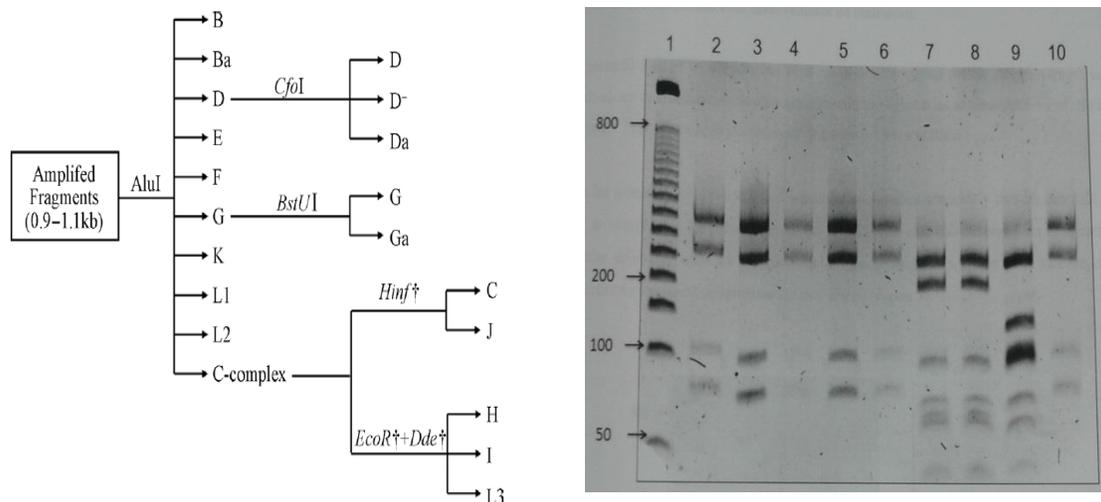


Figura 8. Representación esquemática de enzimas de restricción y patrón electroforético del gen *ompA* de diferentes genotipos por RFLP. (Basurto, 2011; Yong y Likuan, 2014)

2.9.2 Secuenciación

Es una técnica que tiene una alta resolución ya que revela directamente la secuencia nucleotídica del gen *ompA*, lo que ha permitido detectar mutaciones y recombinaciones que dan origen a nuevos genotipos. Es considerada el estándar de oro para la genotipificación, técnicamente es un procedimiento fácil debido a que es automatizado pero tiene la desventaja de no detectar infecciones mixtas por *Chlamydia trachomatis* ya que la interpretación de los resultados pueden ser ambiguo.

2.9.3 PCR en tiempo real

Esta técnica de PCR consiste en la amplificación de ácidos nucleicos empleando sondas marcadas con diferentes fluoróforos como: Rox, Joe, Cy5, FAM, etc. Los cuales reconocen a su respectivo fragmento diana emitiendo una fluorescencia que es captado por un equipo que permite medir la generación de los distintos productos específicos. (Stevens *et al.*, 2010)

Jalal *et al.*, (2007) fueron los primeros en validar esta técnica para la genotipificación de *Chlamydia trachomatis* donde las sondas fueron diseñadas solo para genotipos D-K y LGV, tuvieron buenos resultados ya que no se observó reacción cruzada con otros patógenos del tracto genital y describieron una alta sensibilidad y especificidad. Tiene la

capacidad de detectar más de un genotipo en una muestra clínica debido a que se usa una sonda para cada genotipo.

Quint *et al.*, (2010) realizaron esta técnica pero empleando como blanco el gen *pmpH* de *C. trachomatis* pero la técnica mostró una baja sensibilidad (64%).

2.9.4 Hibridación

La técnica de hibridación se fundamenta en la unión de dos fragmentos de ADN de cadena sencilla de diferente procedencia, en el cual una de las cadenas monocatenarias esta marcada (sonda) y es la que detecta el fragmento de interés. En los últimos años se han desarrollado las siguientes técnicas de hibridación para la detección de genotipos de *Chlamydia trachomatis*:

2.9.4.1 Reverse line blot (RLB)

Esta técnica está basada en la amplificación de ácidos nucleicos; puesto que la esencia de la técnica es la hibridación de los productos de la PCR, con sondas específicas inmovilizadas en una membrana, con un respectivo orden de identificación, lo que permite analizar múltiples muestras y realizar una detección simultánea de los diferentes genotipos de *C. trachomatis*. En Australia y Colombia se ha empleado esta técnica donde identificaron infecciones mixtas por *C. trachomatis* (**Tabla 4**). (Molano *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006; Quint *et al.*, 2007)

2.9.4.2 Reverse dot blot (RBD)

Tiene el mismo fundamento que la técnica RLB pero es más fácil y rápida de realizar porque no requiere ningún equipo para leer los resultados ya que se puede observar directamente. (Stothard *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2007; Gharsallah *et al.*, 2012)

2.9.4.3 Microsphere suspension assay (MSA)

A diferencia de las técnicas anteriores la hibridación se lleva a cabo en fase líquida el cual utiliza microesferas de 5,6 μm de diámetro que permite la detección de diferentes genotipos, ya que cada microesfera contiene una sonda que detecta un genotipo en específico, al adicionar el fragmento de ADN problema previamente amplificado se desnaturaliza para que pueda unirse con su sonda complementaria, la reacción de

hibridación se hace evidente con la adición de un conjugado (estreptovidina-R-Phycoerythrin), el cual emite una señal que es detectada por un equipo que mide los niveles de intensidad media de fluorescencia (MFI).

Estudios realizados por Huang *et al.*, (2008) y Quint *et al.*, (2011) reportaron una alta sensibilidad y especificidad con esta técnica, identificándose también infecciones mixtas por *C. trachomatis* (**Tabla 4**).

A pesar de ser técnicas con gran potencial para la genotipificación tienen la desventaja de que no puede detectar nuevas genovariantes de *C. trachomatis*.

2.9.5 Otras técnicas

Recientemente, se han desarrollado métodos mucho más discriminatorios, tales como el MLST (Tipificación del secuenciado de múltiples locus), basado en la secuenciación de 5 regiones genómicas: CT046 (hctB), CT682 (pbpB), CT058, CT144, CT172 (Batteiger *et al.*, 2014; Dean *et al.*, 2009). En 2008 se describió el sistema VNTR, definido como diferencias en regiones repetidas de un mismo nucleótido. Las variaciones en el número de repeticiones da lugar a diferente longitud del segmento genómico, lo que permite diferenciar cepas. Se eligieron 3 regiones: CT1335, CT1299 y CT1291. El poder discriminativo de esta técnica aumenta al secuenciar también el gen *ompA*, técnica denominada Multilocus-VNTR-ompA (MLVA). Por MLVA se ha alcanzado gran poder de discriminación en cepas estudiadas de distintos serotipos de *C. psittaci* y *C. trachomatis* de diferentes orígenes geográficos (Pedersen *et al.*, 2008). Existe una segunda propuesta de MLST basada en 7 genes, pero el índice de discriminación no es superior al MLST de 5 genes. Por ello, el subcomité sobre la taxonomía de las clamidias sugirió, en su reunión de 2009, que al menos 5 genes housekeeping deberían ser usados y que los criterios de distancia génica deberían ser comparados con análisis filogenéticos, cuando exista un número suficientemente alto de secuencias conocidas (Rodríguez *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha publicado un estudio basado en la amplificación de una región variable de *ompA* con un sistema de PCR en tiempo real, seguido de un análisis del amplicón por high resolution melting (HRM). El sistema, sencillo y rápido, demostró su eficiencia en la detección y tipificación de *C. trachomatis*. (Jian *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estandarizar la técnica de hibridación “dot blotting” para la identificación de genotipos de *Chlamydia trachomatis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Amplificar un fragmento de 879 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* mediante PCR de los genotipos D, E, F, Ia y L2 clonados en un vector plasmídico en cepas de *Escherichia coli* JM109.
2. Obtener un fragmento de 450 pb del gen *ompA* mediante la reamplificación del fragmento de 879 pb.
3. Preparar una sonda mediante la conjugación de un fragmento de 450 pb del gen *ompA* con biotina.
4. Estandarizar la técnica de hibridación dot blotting para la identificación de los genotipos D, E, F, Ia y L2 de *Chlamydia trachomatis*.

4. JUSTIFICACIÓN

Chlamydia trachomatis es considerado en el mundo como un patógeno importante en las ITS debido al aumento de número de personas infectadas. En diferentes países se ha reportado casos con infecciones mixtas por *C. trachomatis*. En nuestro país es nulo este tipo de investigaciones, el único estudio que se ha hecho sobre genotipificación fue mediante la técnica de patrones en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) donde se reportó que el genotipo F fue el más prevalente en mujeres infértiles, sin embargo dicha técnica carece de la capacidad de detectar infecciones con más de 2 cepas de *C. trachomatis*, con base a lo anterior el objetivo de esta investigación es implementar una técnica accesible para la identificación de los genotipos de *Chlamydia trachomatis* que permita detectar más de un genotipo en una muestra clínica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo se emplearon 5 cepas recombinantes de *E. coli* JM109 con el gen *ompA* de los genotipos D, E, F, Ia y L2 de *Chlamydia trachomatis*, los cuales fueron donadas amablemente por la Dra. María de Jesús de Haro Cruz de la ENCB.

5.1 Obtención de ADN plasmídico.

Se realizó la extracción de plásmidos con el inserto del gen *ompA* de las cepas de *E. coli* recombinantes mediante la técnica de lisis alcalina de acuerdo con la técnica de Birnboim y Doly, (1979). Esta técnica consistió en transferir una colonia de *E. coli* recombinante en 5 ml de medio Luria Bertani con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Los tubos se dejaron incubar a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se transfirió el medio de cultivo a un tubo limpio y se centrifugó a 8,000 xg por 30 segundos a 4°C. A continuación se retiró el medio de cultivo por aspiración dejando el paquete bacteriano lo más seco posible, en seguida se resuspendió el paquete bacteriano con 100 µl de solución I previamente fría (**ver anexo**), se agitó para dispersar completamente las bacterias. Posteriormente se adicionó 200 µl de solución II (**ver anexo**), mezclando el contenido por inversión 5 veces, después se adicionó 150 µl de solución III (**ver anexo**) y se mezcló por inversión durante 10 segundos para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano. Luego se centrifugó a 8,000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió en tubos limpios de 1.5 ml debidamente rotulados y se precipitó el ADN plasmídico adicionando 800 µl de isopropanol, dejando incubar por 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 8,000 xg por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante dejando secar el ADN plásmidico durante 15 minutos y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua estéril.

5.2 Integridad de ADN plasmídico.

Se comprobó la integridad de ADN plasmídico obtenido de cada cepa recombinante mediante electroforesis en gel de agarosa. El corrimiento de las muestras se llevó a cabo en un gel al 0.8 % de agarosa preparado con solución TAE Ix (**ver anexo**) a un voltaje de 90 volts durante 45 min. Dicho gel fue revelado con bromuro de etidio (**ver anexo**) por 10

minutos y expuesto a radiación UV en un transiluminador Multimage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, CA. EUA). Para documentar la integridad de dicho ADN.

5.3 Obtención de un fragmento de 879 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

Una vez verificado la integridad del ADN plasmídico, se realizó la técnica de PCR de punto final, utilizando los iniciadores: P3 (5'-TTTTGTTGACGACTTCCGTGTTTT-3') y P4 (5'-TTTTCTAGATTTTACCTTTTC AAT/CTG-3') descritos por Yang *et al.*,(1993). En cada reacción se empleó 12.5 µl de PCR Master Mix de Promega© Madison, WI, EUA. (**ver anexo**), 25 pM de cada iniciador y 1 µl del ADN plásmidico en un volumen final de 25 µl. Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador Maxygene™ de Axygen® CA, EUA. Bajo las siguientes condiciones: 5 min de desnaturalización a 95°C seguido por 25 ciclos de amplificación a 95°C por 1 min, 59°C por 1min con 30 seg, 70°C por 2 min y una extensión final a 70°C por 5 min.

Los productos de PCR (amplicones) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 % previamente teñido con bromuro de etidio. Se empleó un marcador de tamaño molecular de 100 pb a 1500 pb de Promega© Madison WI, EUA. Para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados.

5.4 Obtención de un fragmento de 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

A partir de los amplicones de 879 pb de los genotipos D, E, F, Ia y L2 de *Chlamydia trachomatis*, se realizó una segunda PCR de punto final (PCR anidada), empleando los iniciadores NLO (5'-ATGAAAAA ACTCTTGAAATCG-3') y CT4 (5'-GATTGAGCGTATTGGAAAGAAGC-3') descritos por Gharsallah *et al.*,(2012A). Para la preparación de las mezclas de reacción se empleó el kit Master Mix de Promega© (**ver anexo**), 25 pM de cada iniciador y 2 µl de amplicones (fragmento de 879 pb) en un volumen total de 25 µl por reacción. Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Axygen®). Bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos de amplificación a 95°C por 45 seg, 45°C por 45 seg, 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 2 min.

Los fragmentos de 450 pb fueron visualizados en un gel de agarosa al 2 % previamente teñido con bromuro de etidio. Se empleó un marcador de tamaño molecular de 100 pb a 1500 pb (Promega©). Para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados.

5.5 Purificación y Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del *gen ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

La purificación de los fragmentos obtenidos se realizó de acuerdo al protocolo del Kit Quiaquick gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Alemania). El procedimiento consistió en escindir los fragmentos de ADN incluidos en el gel de agarosa con un escalpelo. Posteriormente se colocaron las porciones de gel con los fragmentos de ADN en tubos limpios de 1.5 ml debidamente rotulados, en seguida se adicionó 300 µl de solución QG por cada 100 mg del gel de agarosa. Los tubos se incubaron a 50°C hasta observar que el gel quedara totalmente disuelto, después se agregó 100 µl de isopropanol por cada 100 mg de gel y se mezcló por inversión. Después se transfirieron 700 µl de cada una de las mezclas a su respectiva columna con tubo colector y se centrifugó a 8,000 xg por 1 min a 4°C. Después de centrifugar, se descartó el contenido del tubo colector y se adicionó 750 µl de solución PE en cada columna, posteriormente se centrifugó a 8,000 xg por 1 min a 4°C. Los tubos limpios de 1.5 ml se rotularon y se colocaron las columnas dentro de los mismos. Para eluir el ADN presente en la columna se depositó 30 µl de agua templada libre de nucleasas en el centro de la membrana y se centrifugó a 8,000 xg durante 1 min a 4°C. Se descartaron las columnas quedando el ADN diluido en los tubos de 1.5 ml, los cuales fueron almacenados a -20 °C.

La cuantificación de los fragmentos purificados se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington CN, EUA), colocando 1 µl de DNA de cada muestra en el lector del equipo.

Por último se verificó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría, considerando la relación de lecturas de absorbancia de 260 y 280nm (A_{260}/A_{280}).

5.6 Obtención de la sonda.

El marcaje del fragmento de 450 pb del gen *ompA* con biotina se realizó de acuerdo las instrucciones del kit Bionick DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA). El cual consistió en colocar en un tubo de 1.5ml los siguientes reactivos: 5 µl de una mezcla de dNTPs 10x (**ver anexo**), el volumen necesario para ajustar a 1 µg del fragmento de 450 pb del gen *ompA*, 5 µl de las enzimas DNA Polimerasa I y DNasa I 10x (**ver anexo**) y por último se adicionó la cantidad necesaria de agua bidestilada a un volumen final de 45 µl. La preparación de la mezcla fue centrifugada a 8,000 xg por 5 segundos a 4°C. Posteriormente, el tubo se incubó durante dos horas a 16°C. Transcurrido el tiempo, se adicionó 5 µl de solución de paro (EDTA pH 8, 0.5 M). En seguida, la sonda se precipitó mediante la adición de un volumen 1/10 de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío para eliminar los nucleótidos que no fueron incorporados en el proceso de marcaje. Después se incubó a -70°C durante 15 min. Para recuperar la sonda se centrifugó a 8,000 xg por 10 min a 4°C, después se removió el sobrenadante y se dejó secar la sonda para su posterior resuspensión con 20 µl de agua libre de DNAsas. Finalmente se realizó la cuantificación de la sonda mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Finalmente se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

5.7 Procedimiento básico de la técnica dot blotting.

Para llevar a cabo la técnica de dot blotting, se prepararon discos de membrana de nylon (immobilonTM-Ny+ de Millipore, Bedford, MA. EUA) de 0.6 mm de diámetro los cuales se depositaron en microplacas de 96 pozos. Posteriormente las membranas se hidrataron toda la noche a 4 °C con solución de TAE Ix. A cada pozo se le depositó 5 µL del fragmento de 879 pb de los diferentes genotipos de *Chlamydia trachomatis* más 5 µL de solución de pre-hibridación (**ver anexo**). Posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se colocó la microplaca en un transiluminador UV para permitir la unión del fragmento de 879 pb a la membrana durante 5 minutos. Se depositaron 100 µL de la solución de bloqueo (**ver anexo**). La microplaca se incubó durante 2 horas a 42°C con agitación. Posteriormente, se desechó la solución de bloqueo y se agregó la sonda adicionada junto con la solución de pre-hibridación a diferentes

concentraciones (1 ng/ μ l a 5 ng/ μ l). La microplaca se incubó durante 4 horas a 42°C. Finalizado el tiempo de incubación se llevó a cabo los siguientes lavados: dos veces con la solución de lavado I (**ver anexo**) durante 10 min a temperatura ambiente y dos veces con la solución de lavado II (**ver anexo**) durante 10 min a 65°C.

La detección de los fragmentos híbridos se realizó mediante la adición de 100 μ L conjugado avidina-peroxidasa a diferentes concentraciones (**ver anexo**) y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C. Para eliminar el exceso de conjugado, se realizó 3 lavados de 5 min con solución SSC 1x. Posteriormente se adicionó 100 μ L de la solución de revelado (**ver anexo**). La microplaca se dejó incubar a temperatura ambiente protegido de la luz durante 20 min. Finalmente se detuvo la reacción adicionando en cada pozo 200 μ L de agua bidestilada (Thermo Scientific, 2012).

Diagrama General de Trabajo

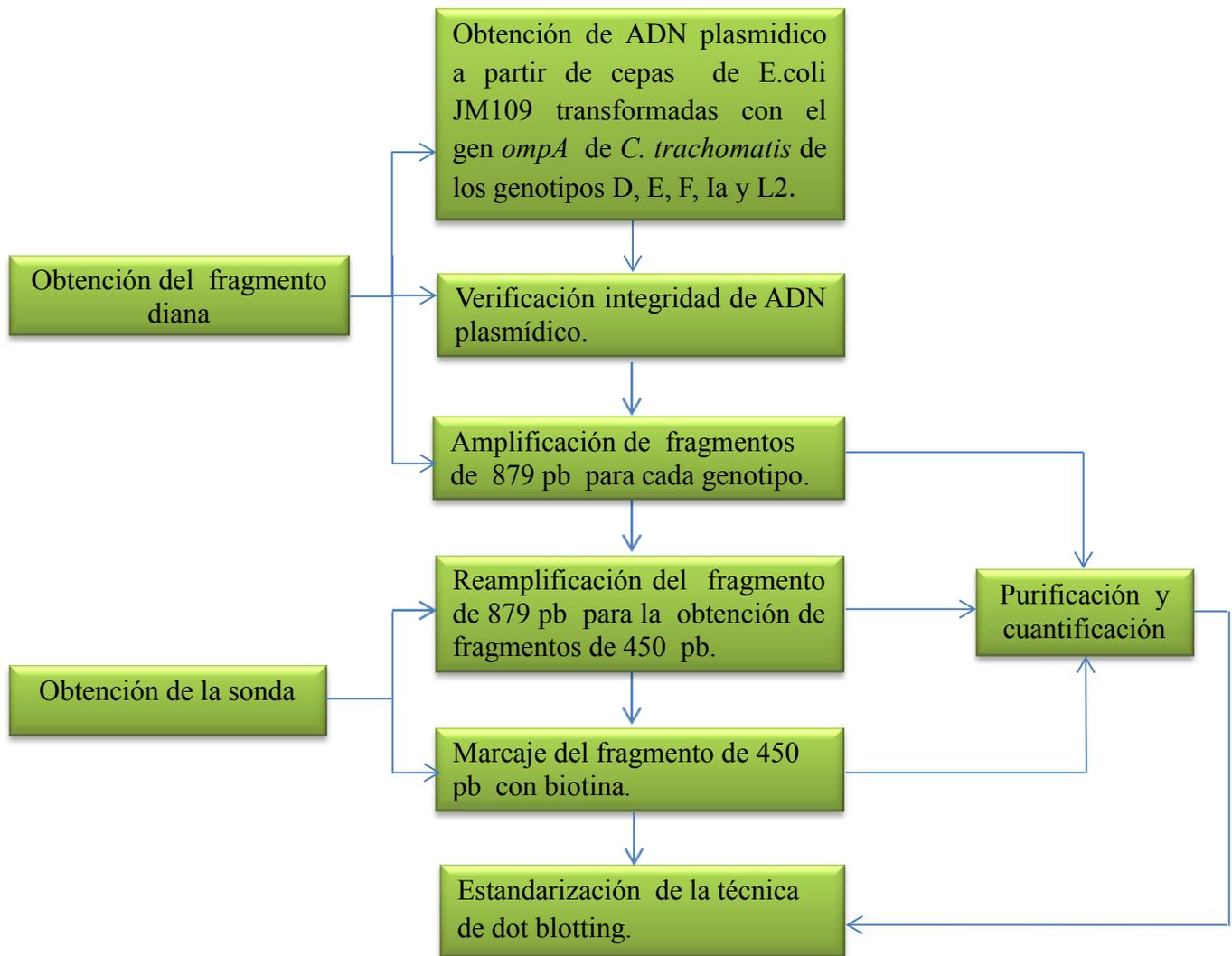


Figura 9. Diagrama de flujo del trabajo experimental.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención e Integridad del ADN plasmídico

En la figura 10 se muestra la integridad del ADN plasmídico obtenido de las cepas de *E. coli* JM109 transformadas con el gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* de los genotipos D, E, F, Ia y L2. Se realizaron tres corridas electroforéticas donde se observaron tres bandas definidas que evidencian las distintas conformaciones estructurales del ADN plasmídico.

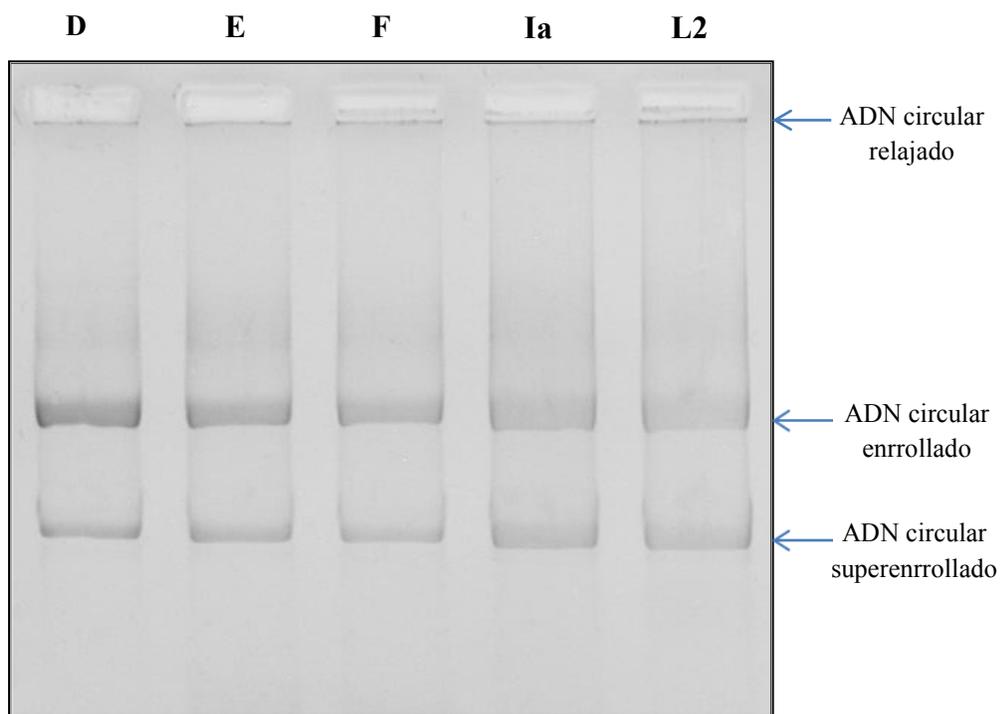


Figura 10. Análisis electroforético de ADN plasmídico de cepas recombinantes de *E. coli* JM109 con el gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*. Las letras representan cada uno de los genotipos. (Gel de agarosa al 0.8%)

6.2 Obtención de un fragmento de 879 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

A partir del ADN plasmídico se amplificaron los fragmentos de 879 pb para cada uno de los genotipos mediante PCR de punto final empleando los iniciadores P3 y P4. En la figura 11 se observan los amplicones de 879 pb en un gel de agarosa al 2%.

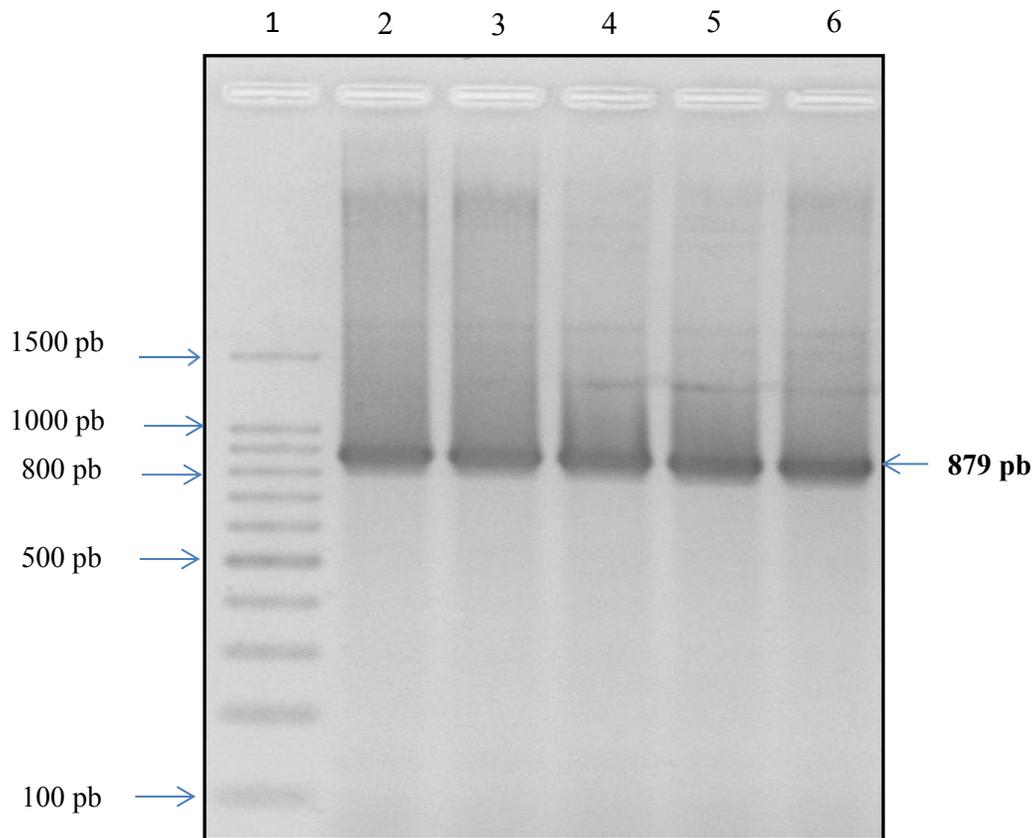


Figura 11. Amplificación del fragmento de 879 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega®), carril 2) amplicon del genotipo D, carril 3) amplicon genotipo del E, carril 4) amplicon del genotipo F, carril 5) amplicon genotipo del Ia, carril 6) amplicon del genotipo L2.

6.3 Obtención del fragmento de 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

Se realizó una segunda amplificación a partir del fragmento de 879 pb utilizando los iniciadores NLO y CT4 para obtener fragmentos de 450 pb para cada genotipo. En la figura 12 se observan amplicones de 879 pb y 450 pb en un gel de agarosa al 2%.

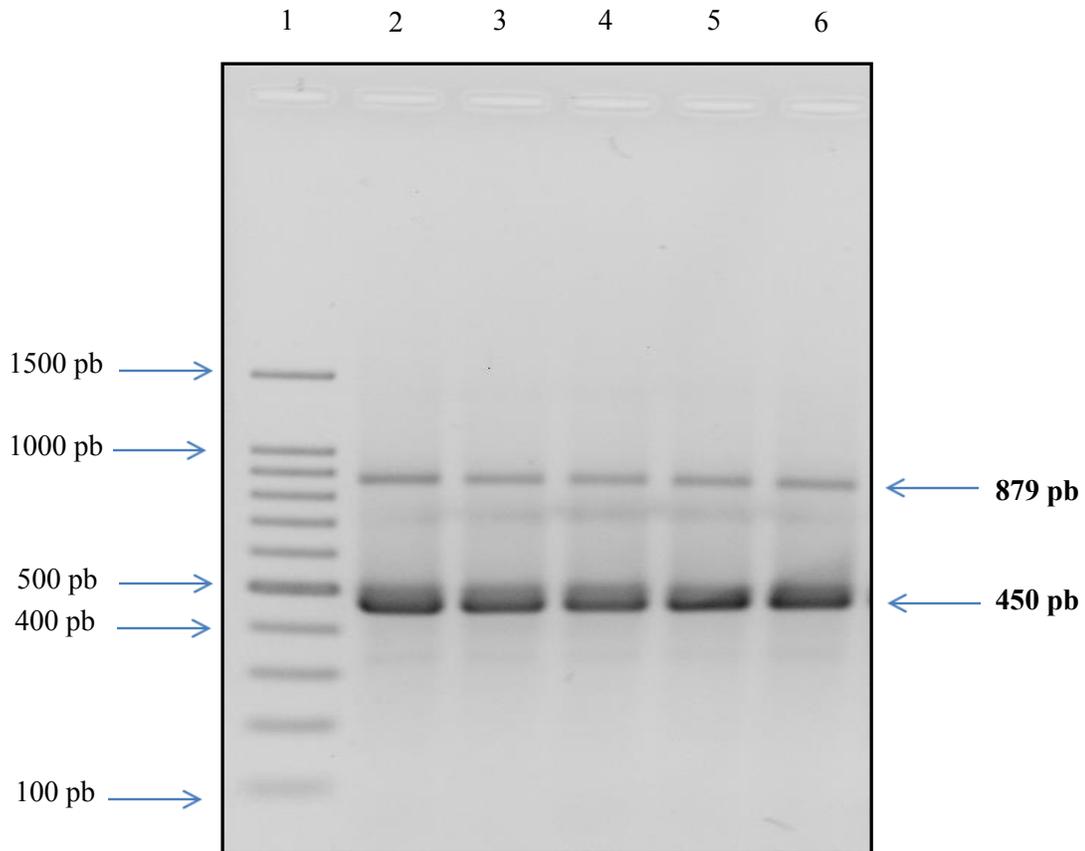


Figura 12. Patrón electroforético de fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega ®), carril 2) amplicon del genotipo D, carril 3) amplicon genotipo del E, carril 4) amplicon del genotipo F, carril 5) amplicon del genotipo Ia, carril 6) amplicon del genotipo L2.

6.4 Purificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*.

Se purificaron los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* para cada uno de los genotipos, obtenidos a partir de gel de agarosa al 2% mediante el kit Quiaquick (QIAGEN). En la figura 13 se observan los fragmentos de 879 pb y 450 pb purificados correspondientes al genotipo F.

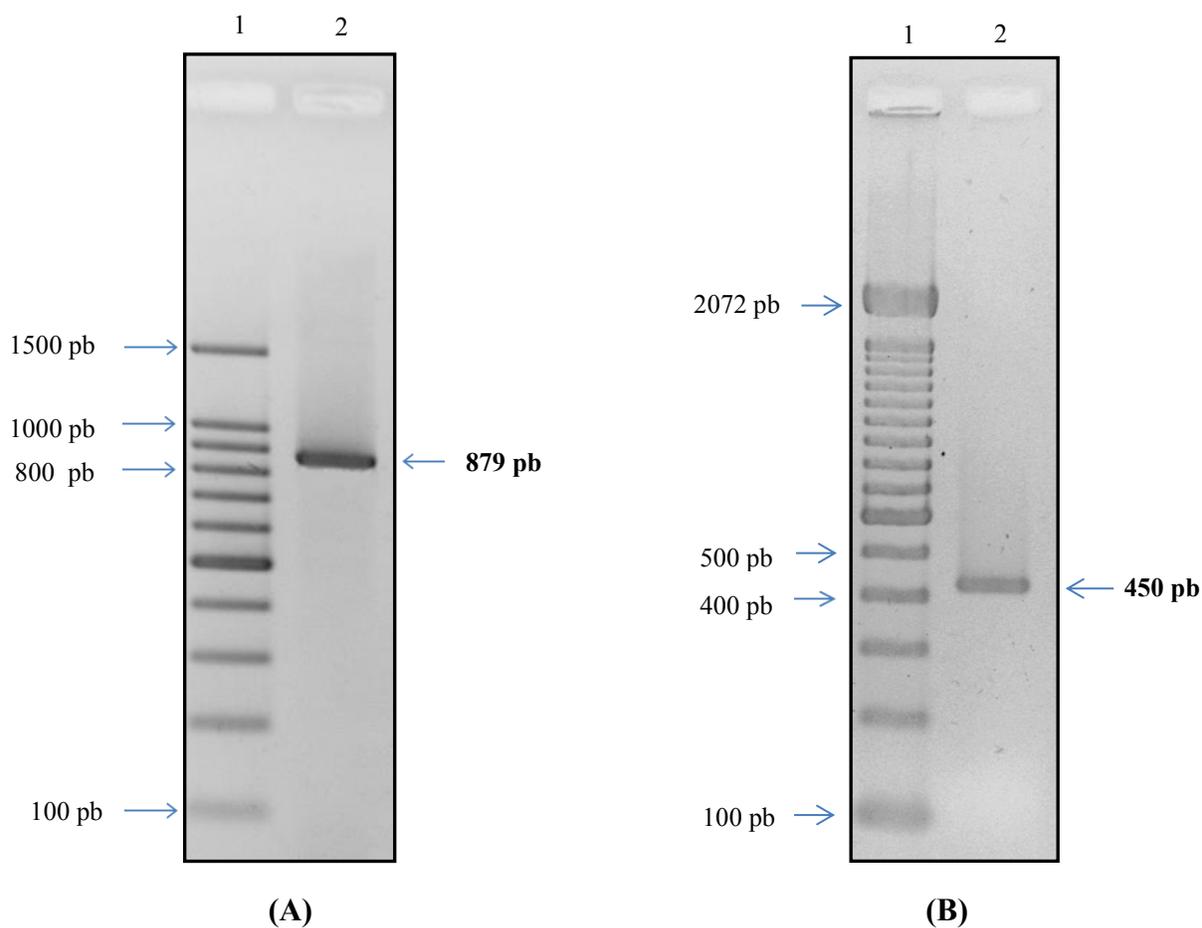


Figura 13. Patrón electroforético de los fragmentos purificados de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*. (A) Carril 1) Marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega ®), carril 2) Fragmento de 879 pb purificado. (B) Carril 1) Marcador de tamaño molecular (100 pb, Invitrogen™), carril 2) Fragmento de 450 pb purificado.

6.5 Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis*.

Los fragmentos de 879 pb y 450 pb purificados se cuantificaron mediante espectrofotometría obteniéndose rendimientos desde 10 a 128 ng/μl (**Tabla 7**).

La pureza de los fragmentos de ADN se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (**Figura 13**) y por espectrofotometría, donde se obtuvo una relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) de 1.7 a 2 (**Tabla 7**).

Tabla 7. Cuantificación de los fragmentos de 879 pb y 450 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis*.

Tamaño de fragmento	Genotipo	Concentración [ng/μl]	A_{260}/A_{280}
879 pb	D	30.9	1.80
	E	35.3	1.78
	F	20.9	1.86
	Ia	17.5	1.99
	L2	31.3	1.78
450 pb	D	48.5	1.94
	E	41.4	1.75
	F	128.0	1.91
	Ia	37.5	1.78
	L2	10.4	2.00

6.6 Obtención de la sonda

El marcaje del fragmento de 450 pb del genotipo F con biotina se realizó mediante el kit Bionick DNA LabelingSystem, a partir de una concentración de 1 µg del fragmento de 450 pb del gen *ompA* (Figura 14).

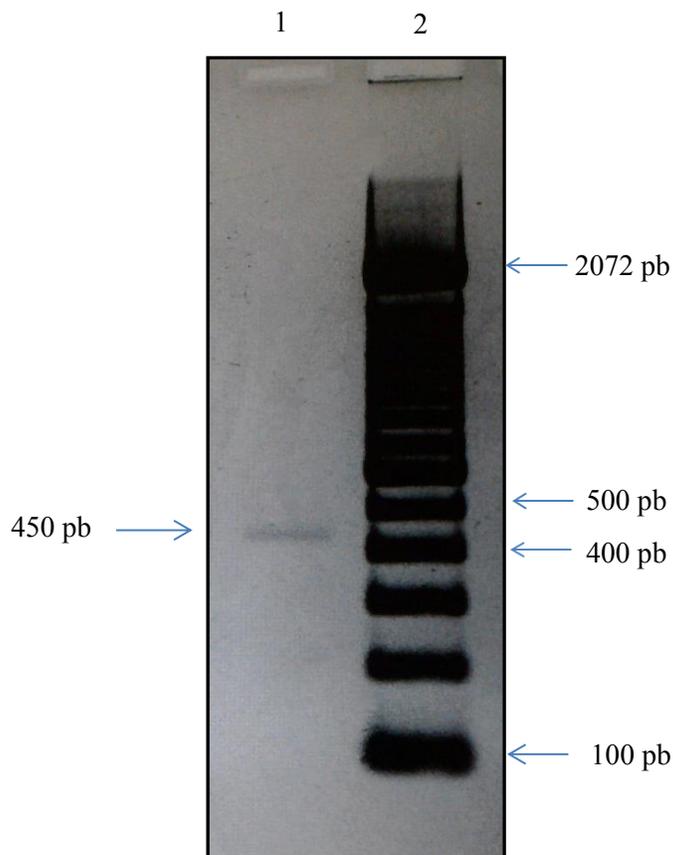


Figura 14. Patrón electroforético del fragmento de 450 pb del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* biotilado. Carril 1) Sonda; carril 2) Marcador de tamaño molecular (100 pb, Invitrogen™).

Se realizó la cuantificación de la sonda mediante espectrofotometría, obteniéndose las siguientes lecturas de absorbancia (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de la sonda.

Concentración (ng/µl)	19.3	13.1	11.9	11.8	20	17
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1.42	1.64	1.7	1.93	1.57	1.94

6.7 Estandarización de la técnica de hibridación por dot blotting.

Para la optimización de la técnica se utilizó el fragmento de 879 pb del genotipo F y una sonda del fragmento de 450 pb del mismo genotipo, el cual estuvo marcado con biotina. En el procedimiento general de dot blotting se realizaron cambios de acuerdo a cada uno de los pasos de la técnica.

6.7.1 Variación de la concentración del conjugado (avidina-peroxidasa)

En la tabla 9 se muestra el sistema general en donde la variación fue la concentración del conjugado. Para ello se realizaron diluciones de conjugado 1: 1000, 1: 1500 y 1: 2000, partiendo de una concentración de 5 U/mg. Cada uno de los controles se realizó por duplicado.

Tabla 9. Sistema general para la detección del gen *ompA* con diferentes diluciones de conjugado.

	Control positivo	Controles negativos		
	A	B	C	D
[Fragmento de 879 pb] 80 ng/μl	+	+	+	-
[Sonda] 1 ng/μl	+	-	+	+
Conjugado (diferentes diluciones)	+	+	-	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

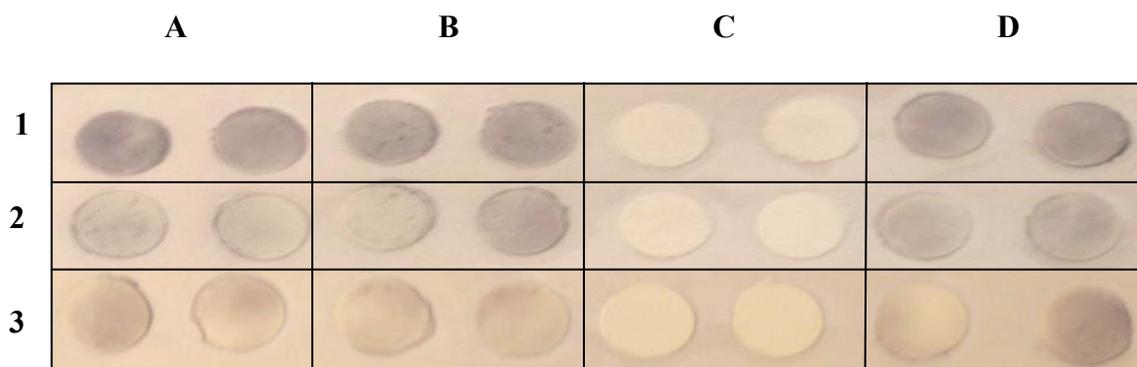


Figura 15. Efecto de la concentración de conjugado (avidina-peroxidasa) para la detección del gen *ompA*. Se emplearon diferentes concentraciones de conjugado: **Fila 1.** Dilución 1:1000; **Fila 2.** Dilución 1:1500; **Fila 3.** Dilución 1:2000. **A)** Control positivo. **Controles negativos: B)** sin sonda; **C)** sin conjugado y **D)** sin gen *ompA* de 879 pb.

En la figura 15 se aprecia el efecto de las 3 diluciones de conjugado (avidina–peroxidasa) para la detección del gen *ompA*. En la fila 1 se utilizó una dilución de conjugado de 1: 1000, en la fila 2 se empleó una dilución 1: 1500 y en la fila 3 una dilución de 1: 2000. En todas las diluciones del conjugado se observó un precipitado de color azul índigo en las membranas, excepto aquellas membranas donde no se adicionó conjugado. En el caso de la columna B y D se aprecia reacción inespecífica ya que carecen de la sonda y del fragmento de 879 pb respectivamente. La intensidad de color en las membranas fue directamente proporcional a la concentración del conjugado, siendo la dilución 1:1000 la de mayor intensidad de color.

6.7.2 Modificación en la concentración de la sonda

Se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de la sonda. Para ello se empleó exclusivamente la sonda y el conjugado, es decir sin emplear el gen *ompA* de 879 pb. Ya que la sonda contiene la biotina con lo cual la avidina (conjugado) se unirá. Las concentraciones de sonda usadas en este ensayo fueron a partir de 1 ng/μl hasta 5 ng/μl. La dilución de conjugado que se adicionó a cada uno de los pozos fue de 1:1500 como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Efecto de las diferentes concentraciones de sonda.

	A	B	C	D	E	F	G
Sonda [ng/μl]	1	2	3	4	5	3	-
Conjugado dilución 1:1500	+	+	+	+	+	-	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

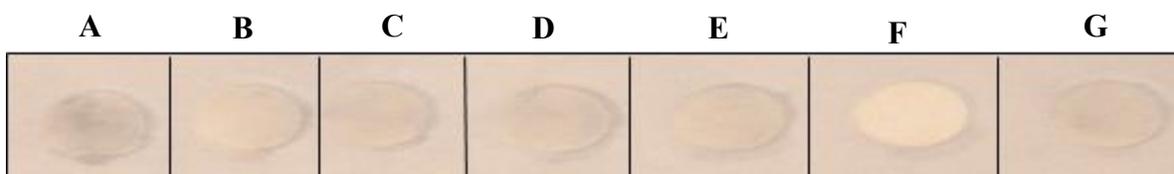


Figura 16. Efecto de la concentración de la sonda. Se emplearon diferentes concentraciones de sonda. Controles positivos: **A)** 1 ng/μl; **B)** 2 ng/μl; **C)** 3 ng/μl; **D)** 4 ng/μl y **E)** 5 ng/μl. Controles negativos: **F)** sin conjugado y **G)** sin sonda.

En la figura 16 se puede apreciar que en la membrana A, la intensidad de color es mayor a diferencia de las demás membranas donde se observa una ligera coloración y en la membrana F donde no se adicionó conjugado no hubo reacción. En la membrana G se observa reacción inespecífica debido a que no se adiciono sonda.

6.7.3 Modificación en el lavado de las membranas

El lavado es una parte esencial para eliminar el exceso de cada uno de los constituyentes en cada ensayo. En esta parte de la investigación se utilizó la solución de lavado SCC IX (Solución de citratos) con y sin Tween 20 al 0.1%. En la tabla 10 se muestra el sistema que se realizó en este ensayo. Cada uno de los controles se realizó por duplicado.

Tabla 11. Efecto del Tween 20 en el lavado de las membranas en la técnica dot blotting.

	Control Positivo	Controles Negativos		
Fragmento 879pb [18 ng/μl]	+	+	+	-
Sonda [1ng/μl]	+	-	+	+
Conjugado Dilución 1:1000	+	+	-	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

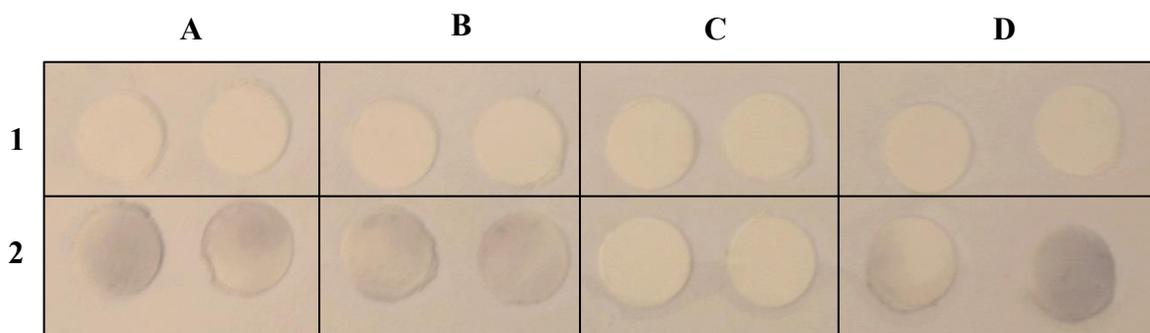


Figura 17. Efecto del Tween 20 en el lavado de las membranas en la técnica dot blotting.
Fila 1: lavado con Tween 20; **Fila 2:** lavado sin Tween 20.

En la figura 17 muestra el efecto de los lavados de las membranas con y sin Tween 20. En la fila A se realizó el lavado con Tween 20 mientras que en la fila B se realizó el lavado de las membranas sin Tween 20. Los resultados mostraron que el uso de Tween 20 elimina la unión inespecífica del conjugado.

6.7.4 Efecto de la desnaturalización del ADN.

En esta parte del estudio se analizó la desnaturalización de ADN por efecto de agentes químicos y por efecto de la temperatura. La desnaturalización química se realizó de acuerdo al procedimiento general de dot blotting, mientras que en la desnaturalización por temperatura se efectuó en un termociclador donde las mezclas de hibridación se incubaron a 94°C durante 1 minuto, en seguida se llevó a cabo la hibridación a 65°C por 1 minuto, colocando posteriormente las mezclas de hibridación en la membrana de nylon. En la tabla 5 se muestra los controles empleados para cada uno de los ensayos los cuales fueron realizados por triplicado.

Tabla 12. Efecto de la desnaturalización en el ADN.

	Control Positivo	Controles Negativos		
Fragmento 879pb [80 ng/μl]	+	+	+	-
Sonda [1ng/μl]	+	-	+	+
Conjugado Dilución 1:1000	+	+	-	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

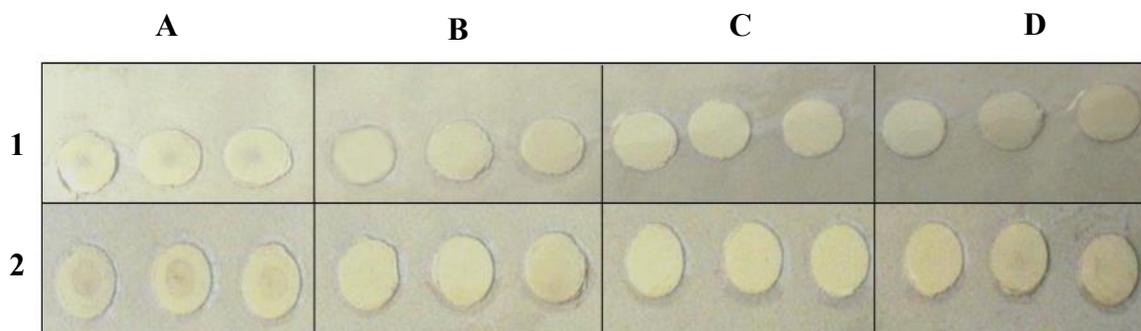


Figura 18. Efecto de la desnaturalización de ADN. **Fila 1:** Desnaturalización por agentes químicos; **Fila 2:** Desnaturalización por temperatura. **A)** Control positivo. Controles negativos: **B)** Sin sonda; **C)** Sin conjugado; **D)** Sin gen de 879 pb.

En la figura 18 se muestra la desnaturalización por agentes químicos (**fila 1**) donde se aprecia una menor intensidad de color en las membranas de la columna A), mientras que en la desnaturalización por temperatura (**fila 2**) se observó mayor intensidad de color. En las columnas B, C y D (controles negativos) no se mostró ninguna reacción para ambos métodos de desnaturalización.

6.7.5 Variación del tiempo de exposición a luz UV para la fijación de ADN.

Este ensayo consistió en exponer el fragmento de ADN a radiación ultravioleta (UV) a diferentes tiempos desde 2 a 7 minutos (**Tabla 13**), debido a que es indispensable el tratamiento previo con UV para la fijación de ADN en la membrana de nylon. A continuación se muestra en la siguiente tabla el sistema que se empleó:

Tabla 13. Fijación de ADN a diferentes tiempos de exposición de UV.

	Controles Positivos			Controles negativos			
Tiempo de exposición (minutos)	2	5	7	5	5	5	-
Fragmento 879pb [150 ng/μl]	+	+	+	+	+	-	+
Sonda [1 ng/μl]	+	+	+	+	-	+	+
Conjugado Dilución 1:1000	+	+	+	-	+	+	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

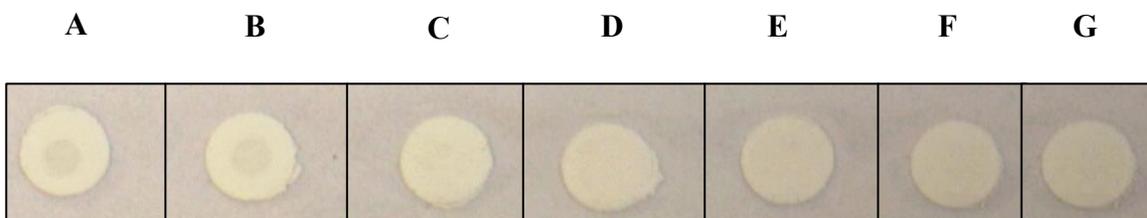


Figura 19. Determinación del tiempo óptimo de exposición con luz UV para la fijación de ADN. El ADN se expuso con UV a diferentes tiempos: **A)** 2 minutos **B)** 5 minutos **C)** 7 minutos. Controles Negativos: **D)** Sin Conjugado **E)** Sin sonda **F)** Sin gen de 879 pb **G)** Sin exposición a UV.

En la figura 19 se observó reacción positiva a los 2 y 5 minutos de exposición en UV mientras que en las demás membranas no hubo evidencia de hibridación.

6.7.6 Optimización del procedimiento básico de dot blotting.

Los ensayos realizados con el genotipo F permitieron determinar las condiciones finales para llevar a cabo la técnica de dot blotting. Por consiguiente el procedimiento general planteado fue modificado y la técnica se realizó bajo las condiciones que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 14. Determinación de las condiciones óptimas de la técnica dot blotting.

Característica	Condición óptima
Tipo de Desnaturalización	Temperatura (94°C/1 min)
Tiempo de exposición en luz UV	2 minutos
Concentración de la sonda	1 ng/μl
Dilución de conjugado(avidina-peroxidasa)	1:1000

Se realizó el experimento por triplicado con las condiciones óptimas establecidas empleando un control positivo y 3 controles negativos. La concentración que se utilizó del fragmento de 879 pb fue de 150 ng/μl.

En la figura 20 en el control positivo A las membranas presentaron manchas de color violeta lo que indica que se llevó a cabo la hibridación entre el fragmento de 879 pb y la sonda, mientras que en los controles negativos B, C y D no hubo evidencia de reacción.

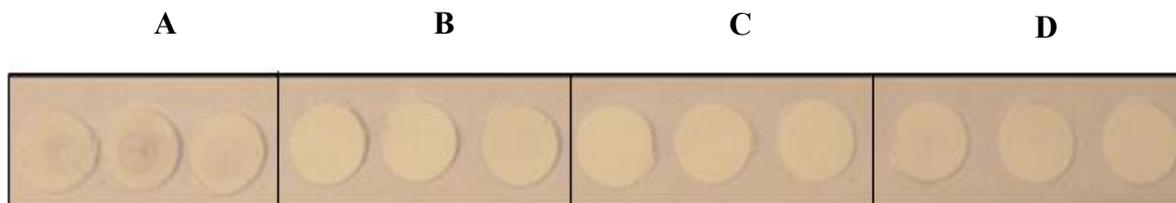


Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas de la técnica dot blotting. Control positivo A. Controles negativos: B) sin sonda; C) sin conjugado y D) Sin fragmento de 879 pb.

6.7.7 Identificación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F.

En este ensayo se empleó el fragmento de 879 pb de diferentes genotipos a una concentración de 80 ng/μl para la identificación del genotipo homólogo a la sonda del serotipo F.

En la tabla 15 se muestra los controles que se utilizaron para la realización de la técnica dot blotting.

Tabla 15. Determinación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F.

Genotipo Fragmento de 879pb [80 ng/μl]	Controles positivos Genotipos					Controles negativos		
	L2	D	Ia	E	F	F	F	-
	+	+	+	+	+	+	+	-
Sonda genotipo F [1 ng/μl]	+	+	+	+	+	-	+	+
Conjugado Dilución 1:1000	+	+	+	+	+	+	-	+

(+) Presencia, (-) Ausencia

En la figura 21 se observó una reacción positiva a la prueba de dot blotting para los genotipos L2 y F lo que indica que la sonda reconoció a su homólogo y al genotipo L2, mientras que para los genotipos D, Ia y E y controles negativos no hubo reacción.

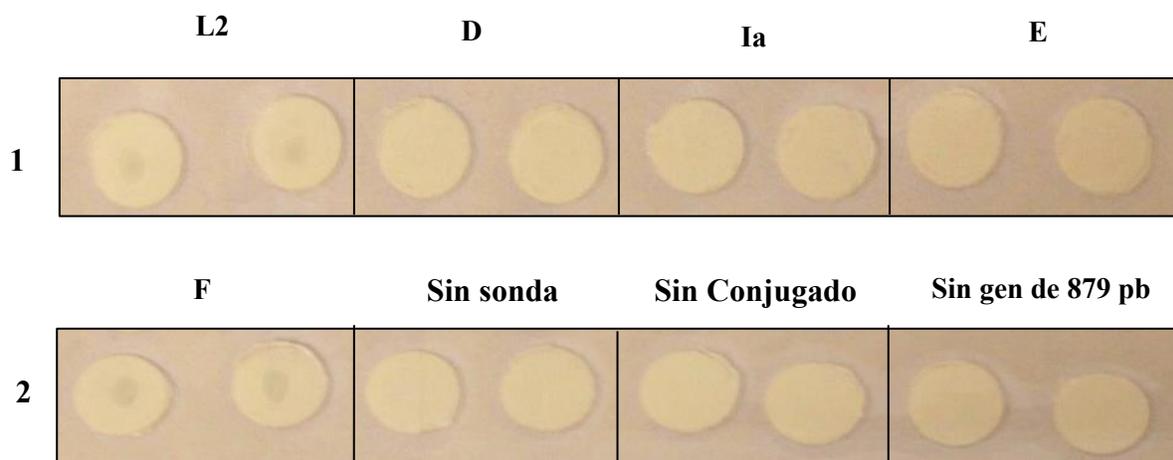


Figura 21. Identificación del genotipo homólogo utilizando la sonda del genotipo F. **Fila 1:** genotipos L2, D, Ia y E; **Fila 2:** genotipo F y controles negativos.

7. DISCUSIÓN

Chlamydia trachomatis es una de las infecciones bacterianas de transmisión sexual de mayor importancia debido a su distribución mundial y a que el número de casos reportados van en aumento. Actualmente, se reconocen por lo menos 19 serotipos de *C. trachomatis*, los cuales presentan diversas manifestaciones clínicas, por ejemplo, los tipos A, B, Ba y C, causan tracoma, los tipos D a K causan infecciones genitales y los tipos L1, L2, y L3 causan Linfogranuloma venéreo (LGV). Los principales genotipos reportados que causan infecciones genitales con una alta prevalencia en el mundo son: D, E, F, G, y mientras que los de baja prevalencia son: H, Ia, J y K (**Tabla 3**).

En México, se desconoce la prevalencia de genotipos de *C. trachomatis* en poblaciones sexualmente activas, debido a que hay muy poca investigación y a que las instituciones de salud sólo reportan los casos de *C. trachomatis* que causan la enfermedad de LGV. El único estudio de genotipificación que se ha realizado hasta el momento ha sido por RFLP en mujeres infértiles, siendo el genotipo F el más prevalente en esta población (Basurto, 2011; De Haro, 2008; De Haro *et al.*, 2011). Actualmente se ha visto que la técnica de RFLP no es buena opción para realizar estudios de genotipificación debido a que es una técnica laboriosa de realizar, emplea enzimas de restricción que son costosas y se debe tener cuidado de no generar fragmentos largos debido a que disminuye la sensibilidad de la técnica. (Molano *et al*, 2004; Quint *et al*, 2007; Yang *et al*, 1993)

Los resultados de RFLP son a menudo difíciles de interpretar, especialmente cuando se encuentran infecciones mixtas, además de que tiene poca habilidad para encontrar genovariantes. Es por ello la necesidad de implementar una técnica rápida y accesible para identificar los genotipos en diferentes poblaciones que estén expuestas a la infección por este patógeno. Debido a lo anterior, en este estudio se estandarizó la técnica de hibridación dot blotting.

El desarrollo de técnicas para identificar diversas cepas de *C. trachomatis* han cambiado desde la serotipificación o serovariedad. La identificación de los serotipos fue gracias a la identificación de la proteína de membrana externa llamada MOMP la cual constituye el 60% de las proteínas que forman la membrana de *C. trachomatis* y que además es responsable de

la respuesta inmunológica contra esta bacteria. Hoy en día se han desplazado las técnicas serológicas por técnicas de genotipificación debido a que resultan ser más específicas y sensibles, las cuales se basan en la amplificación de ácidos nucleicos, utilizando como blanco DNA genómico o bien un gen en particular. El gen más empleado para identificar genotipos es el gen *ompA* el cual codifica para la MOMP. Este gen está formada por 4 regiones denominados dominios variables (VS) separados por 5 regiones altamente conservadas llamados dominios constantes (Lampe *et al.*, 1993; Morré *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1993). Los dominios variables VS1, VS2, VS3 y VS4 se encuentran expuestos en la superficie y son los responsables de la clasificación de los serovares. (Findlay *et al.*, 2005; Lysén *et al.*, 2004; Morré *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 1989).

En el presente estudio, se realizó la prueba de hibridación dot blotting con el objetivo de identificar genotipos de *C. trachomatis*. Para ello se empleó dos fragmentos del gen *ompA* uno de 879 pb que comprende las regiones variables VS1-VS4 y otro de 450 pb que contiene las regiones VS1 y VS2, los cuales fueron utilizados como blanco y sonda respectivamente. Estudios previos han utilizado como sonda las regiones VS1 y VS2 y en algunos casos únicamente la región VS2, ya que en estas regiones se muestra una alta variabilidad nucleotídica en comparación con las regiones variables VS3 y VS4 del gen *ompA* (Gharsallah *et al.*, 2012B; Molano *et al.*, 2004; Quint *et al.*, 2007; Stephens *et al.*, 1998; Stothard *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 2007)

El desarrollo de este trabajo constó principalmente de dos pasos: el primero en la obtención de la sonda y el segundo se basó en la estandarización de la técnica de hibridación dot blotting.

El primer procedimiento que se realizó fue la amplificación del fragmento 879 pb de gen *ompA* de los genotipos D, E, F, Ia y L2 de *Chlamydia trachomatis* los cuales fueron secuenciados e incorporados previamente a un vector plasmídico (pGEMT-Easy) en cepas de *E.coli* JM109 por Basurto Tranquilino, (2011) y De Haro Cruz, (2008). A partir de este producto (genotipo F) se reamplificó el producto de 450 pb que fue utilizado como sonda para ello se utilizaron los iniciadores CT4 y NLO, descritos por Gharsallah *et al.*, (2012A), quienes demostraron que dichos iniciadores son específicos para las regiones VS1 y VS2 y que además no amplifican con el ADN de otros microorganismos. Posteriormente la

sonda fue marcada con el kit comercial Bionick Labeling System de Invitrogen, el cual es un kit fácil de manejar y muy eficaz, ya que se han obtenido buenos resultados en diversos estudios de hibridación. (Chiapero *et al.*, 2013; Lavrov *et al.*, 2004; Mancilla *et al.*, 2008; Rádís *et al.*, 2003)

En la segunda etapa del estudio se hicieron diversas modificaciones para obtener las condiciones óptimas de la técnica, en el cual se emplearon membranas de nylon cargadas positivamente debido a su fácil manejo ya que permite que el ADN quede unida covalentemente a está, lo que evita pérdidas de ADN a lo largo del proceso. A diferencia de otras membranas como nitrocelulosa, las membranas de nylon son más duraderas y tienen mejor capacidad de fijación. (Sambrook y Russell., 2001)

La primera variación que se realizó a la técnica, fue la concentración del conjugado avidina-peroxidasa, se conoce ampliamente que la biotina se une a la avidina de forma altamente específica y que no es afectado por cambios extremos de pH, solventes orgánicos o agentes desnaturizantes. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que a altas concentraciones del conjugado aumenta el número de falsa positividad al observar que las membranas a las cuales no se les adicionaron sonda o fragmento de 879 pb mostraban precipitado azul índigo debido a la reacción con el sustrato.

La segunda variación fue la concentración de la sonda, empleando concentraciones de 1-5 ng/ μ l (**Tabla 10**). En este ensayo se unió únicamente la sonda a la membrana de nylon, es decir sin la adición del fragmento de 879 pb. Observándose que a menor concentración de sonda fue mayor la intensidad de color en la membrana, esto probablemente fue debido a la unión inespecífica del conjugado a las membranas a pesar de que se empleó ADN de esperma salmón como sustancia de bloqueo de los posibles espacios libres en la membrana. Debido a lo anterior se incrementó el tiempo de lavado y se substituyó el detergente fuertemente iónico SDS por un detergente no iónico como el Tween 20, el cual logró disminuir la inespecificidad, evitando así la unión del conjugado a la membrana (**Figura 17**).

Otro aspecto evaluado fue la desnaturización del ADN, el cual puede llevarse de manera química como física ya sea utilizando agentes desnaturizantes o temperatura

respectivamente (Sambrook y Russell., 2001). En la metodología básica de dot blotting que se describió en materiales y métodos, la técnica inicia con la desnaturalización del fragmento de 879 pb con formamida. Los resultados obtenidos con este procedimiento evidenciaron menor intensidad de color en la membrana (señal débil) lo que dificultó la detección de la hibridación. Para mejorar la señal del ensayo, se desnaturalizó la mezcla con el fragmento de 879 pb y la sonda a 94°C. Posteriormente se llevó a cabo la hibridación de los fragmentos a 65°C. Los resultados obtenidos demostraron un incremento en la señal, además de reducir considerablemente el tiempo de hibridación en un tiempo total de 3 minutos, ya que en diversos estudios (Gharsallah *et al.*, 2012B; Molano *et al.*, 2004; Quint *et al.*, 2007; Stothard *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007) se han reportado tiempos muy prolongados en el reconocimiento de la sonda y el fragmento diana hasta de 12 horas, por lo que la desnaturalización por temperatura realizada en este proyecto fue una mejor opción en comparación con la desnaturalización química.

El tiempo de exposición a la luz UV para la fijación de ADN en la membrana fue otra variación analizada. En diversos estudios (Gharsallah *et al.*, 2012B y Zheng *et al.*, 2007) el tiempo de fijación de ADN es de 30 minutos a 120°C, lo que es un tiempo muy prolongado. En este estudio se expuso el ADN a luz UV para reducir el tiempo de fijación. Los resultados obtenidos mostraron que a tiempos mayores de 7 minutos de exposición a luz UV el ADN se fragmenta y no es posible evidenciar la reacción de hibridación por lo que el tiempo mínimo de exposición adecuado para observar una reacción positiva fue de 2 minutos.

Los ensayos realizados en este trabajo aportaron información importante para conocer las condiciones óptimas para desarrollar la técnica de dot blotting, las cuales fueron: desnaturalizar del ADN a 94°C durante 1 minuto, fijar el ADN con luz UV por 2 minutos en membrana de nylon, emplear una concentración de sonda de 1 ng/μl y usar una dilución de conjugado avidina-peroxidasa 1:1000.

En comparación con el procedimiento general de dot blotting se logró simplificar, mejorar la señal y reducir el tiempo de realización de la técnica. Ya estandarizada la técnica de hibridación se realizó un ensayo utilizando diferentes fragmentos de 879 pb del

gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* de los genotipos L2, D, Ia, E y F, los cuales fueron expuestos con la sonda del genotipo F para evaluar la capacidad de la técnica para el reconocimiento de su genotipo homólogo. Los resultados revelaron que la sonda reconoció tanto a su genotipo homólogo (F) como al genotipo L2, mientras que en los genotipos D, Ia y E no hubo hibridación. Lo que sugiere que los genotipos F y L2 posiblemente presentan una gran similitud ya sea en la región VS1 o VS2 del gen *ompA*. De acuerdo con el análisis filogenético reportado en el 2011 por De Haro Cruz et al, entre el genotipo F y L2 existe una distancia muy cercana en comparación de la distancia del genotipo F con los genotipos D, Ia y E (**Figura 5**).

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas de genotipificación para la identificación de serotipos de *Chlamydia trachomatis*. Las técnicas MLST y MLVA son muy sofisticadas, las cuales son más discriminativas, pero demasiado laboriosas y costosas por lo que no podrían ser usadas como técnica de rutina. La secuenciación tiene una alta resolución y tiene la capacidad de detectar genovariantes pero requiere de equipo especializado. Tanto la técnica de RFLP y secuenciación no son convenientes para la identificación de muestras clínicas que contengan más de un genotipo de *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, la técnica de hibridación dot blotting y PCR en tiempo real tienen esa ventaja ya que emplean una sonda para cada genotipo. En estudios recientes se ha reportado un incremento en el número de casos de individuos infectados con más de un genotipo (**Tabla 4**), por lo que es importante emplear técnicas que detecten infecciones mixtas por *C. trachomatis*. La desventaja de emplear PCR en tiempo real para este fin es que se requiere de equipo especializado mientras que la técnica de dot blotting no necesita ninguna instrumentación especial para realizar la lectura de los resultados.

En la literatura se ha demostrado que la técnica de dot blot tiene una sensibilidad del 98.2% (Zheng *et al.*, 2007), el cual tiene una sensibilidad mayor a diferencia de la técnica RFLP que muestra una sensibilidad del 49% de acuerdo a Yang *et al.*, (2010). Lo que hace evidente que la técnica de hibridación es una buena opción para realizar estudios de genotipificación. Debido a lo anterior, la técnica de hibridación dot blotting es útil para tipificar serotipos de *C. trachomatis* ya que es una técnica accesible, de bajo costo y que no requiere de alta tecnología.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró amplificar un producto de 879 pb con las regiones VS1-VS4 del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* de cada uno de los genotipos D, E, F, Ia y L2.
- ❖ Se logró amplificar un producto de 450 pb con las regiones VS1 y VS2 del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* del genotipo F.
- ❖ Se obtuvo una sonda de 450 pb del gen *ompA* conjugado a biotina, el cual identificó su fragmento homólogo y el genotipo L2.
- ❖ El proceso de desnaturalización e hibridación por temperatura mejoró la intensidad de la señal y disminuyó considerablemente el tiempo de reconocimiento entre el fragmento diana y la sonda.
- ❖ La optimización del procedimiento básico de dot blotting mostró que el uso del detergente Tween 20 mejoró la señal evitando la unión inespecífica del conjugado en la membrana.
- ❖ El empleo de membranas de nylon y la fijación de ADN por luz UV facilitaron y redujeron el tiempo de fijación.
- ❖ Se logró determinar la concentración de sonda, la cual fue de 1ng/μl.
- ❖ La dilución de conjugado avidina-peroxidasa óptima fue de 1:1000.
- ❖ La técnica de dot blotting es simple, rápida y que no requiere de instrumentación especializada para la detección e identificación de genotipos de *Chlamydia trachomatis*.

9. PERSPECTIVAS

El número de casos de individuos infectados con *C. trachomatis* en los últimos años han ido en aumento por lo que se ha convertido en un problema de salud pública en nuestro país y en todo el mundo. La falta de investigación en estudios de genotipificación ha motivado el desarrollo de la técnica de hibridación dot blotting con lo que se pretende mejorar y validar esta técnica para poder aportar información importante que nos permitirá conocer la asociación de manifestaciones clínicas y de patogenicidad, diferenciar entre una infección persistente y una reinfección por otro genotipo, resolver casos de abuso sexual, conocer patrones de transmisión en trabajadores sexuales, conocer la frecuencia de infecciones mixtas por *C. trachomatis*. Debido a que esta técnica tiene la capacidad de identificar más de un genotipo en una muestra clínica, así también saber cuál es la prevalencia de genotipos en la población mexicana que permita una selección de genotipos para el desarrollo de una vacuna.

10. REFERENCIAS

- Abdelsamed, H., Peters, J., and Byrne, G.I. (2013). Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiology*, 8(9), 1129–1146. DOI:10.2217/fmb.13.80.
- Alonso,R.,Galán,J.C., Gutiérrez Fernández,J., Rodríguez-Domínguez,M.,Salinas J., Sanbonmatsu Gámez,S. (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf> [Consultado en Mayo 2013]
- Arráiz,N.,Marcucci,R.,Urdaneta.,B.,Colina,S.,Romero,Z. (2008). Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela.*,68(3); 195-201.
- Alvarado- Esquivel, C., García-Villanueva, A., Castruita- Limones, D., Cardoso- Nevárez, F., Ruiz-Astorga R. (2000). Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en prostitutas registradas de la ciudad de Durango, México. *Salud pública de México*, 42(1), 43-47.
- Banda, C., Debattista, J., Joseph,K., Joseph I.,Timms, P., and Black,C. (2008). *Chlamydia trachomatis* Serovars among Strains Isolated from Members of Rural Indigenous Communities and Urban Populations in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 355–356. DOI:10.1128/JCM.01493-07.
- Basurto Tranquilino, M. (2011). Análisis de genotipos de *Chlamydia trachomatis* mediante diversas enzimas de restricción. (Tesis inédita de maestría). IPN, ENCB. México.
- Batteiger,B., Wan, R., Williams,A., He,L., Ma,J., Fortenberry,D. and Dean,D.(2014). *Chlamydia trachomatis* Strains in Heterosexual Sex Partners, Indianapolis, Indiana, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11),1841-1847. DOI:10.3201/eid2011.140604.
- Belland, R.J., Scidmore,M.A., Crane,D.D, Hogan,D.M.,Whitmire,W. McClarty,G., and Caldwell,H.D.(2001). *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13984–13989.
- Birnboim, H.C., and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7(6), 1513-1523.
- Brunelle, B.W., and Sensabaugh, G.F. (2006). The *ompA* in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infeccion and Immunity*, 74,578-85. DOI:10.1128/IAI.74.1.578–585.2006.

- Byrne, G.I. (2010). *Chlamydia trachomatis* strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. *Journal of Infectious Diseases*. 201(2), 126-33. DOI:10.1086/652398.
- Canto de Cetina T., Polanco Reyes, Cupul Dzul,G., Fernández González,V.,Piña Castro,M.R., Ballote Zapata,M. (2001). Prevalencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de una clínica de planeación familiar en Mérida, Yucatán. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 21(3), 102-105.
- Carabeo RA, Grieshaber SS, Fischer E, Hackstadt T. (2002). *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infection and Immunity*, 70(7), 3793–3803. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3793–3803.2002
- Carlson, J.H, Whitmire ,W.M., Crane ,D.D., Wicke ,L., Virtaneva ,K., Sturdevant ,D.E.,*et al.* (2008).The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infection and Immunity*,76, 2273-2283. DOI:10.1128/IAI.00102-08.
- CDC.(2012). Sexually Transmitted Disease Surveillance Reports 2011.Recuperado de [www.cdc.gov/std/stats11/ Surv2011.pdf](http://www.cdc.gov/std/stats11/Surv2011.pdf) [Consultado en Marzo 2014]
- Chiapero A, Las Peñas M. L, Amela García M. T, Bernardello G. (2013). Estudios citogenéticos en especies de pasiflora subgénero Passiflora (Passifloraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(1), 103-110.
- Darville, T., and Hiltke J.T. (2010). Pathogenesis og Genital Tract Disease Due to *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 114-125. DOI: 10.1086/652397.
- De Haro Cruz, M.J. (2008). Genotipificación de cepas de *Chlamydia trachomatis* aisladas de pacientes con infertilidad mediante patrones en la longitud de los fragmentos de restricción. (Tesis inédita de doctorado) IPN, ENCB. México.
- De Haro-Cruz ,M.J, . Deleón-Rodríguez ,I.,Escobedo-Guerra,M.,López-Hurtado,M., Arteaga-Troncoso,G.,Ortiz-Ibarra,F.,Guerra-Infante,F.M. (2011). Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 102-108. DOI:10.1016/j.eimc.2010.08.014.
- Dean,D., and Millman, K. (1997). Molecular and mutation trends analyses of *omp1* alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Investigation*, 99 (3), 475-483.
- Dean, D., Suchland, R.J., and Stamm, W.E. (2000). Evidence for longtermcervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by *omp1* genotyping. *Journal of Infectious Diseases*, 182, 909–916.

- Dean, D., Bruno, W.J., Wan, R., Gomes, R.P., Devignot, S., Mehari, T., De Vries, H., Morré, S.A., Myers, G., Read, T.D., and Spratt, B.G. (2009). Predicting Phenotype and Emerging Strains among *Chlamydia trachomatis* Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1385-1394. DOI: 10.3201/eid1509.090272.
- Everett, K., Bush, R., and Andersen, A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 415-440.
- Findlay, H., McClafferty, H., and Ashley R. (2005). Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* outer membrane protein. *BMC Microbiology*, 5, 5. DOI: 10.1186/1471-2180-5-5.
- Gaydos, C., Van Der Pol, J., Jett-Goheen, M., Barnes, M., Quinn, N., Clark, C., Daniel G., Dixon, P., and Hook, E. (2013). Performance of the Cepheid CT/NG Xpert Rapid PCR Test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1666–1672. DOI: 10.1128/JCM.03461-12.
- Gen-Probe. (2011). Pace 2 *Chlamydia trachomatis*. Recuperado de www.gen-probe.com [Consultado en Mayo 2013]
- Gharsallah, H., Frikha-Gargouril, S., Sellami, H., Besbes, F., Znazen, A., and Hammami, A. (2012). *Chlamydia trachomatis* genovar distribution in clinical urogenital specimens from Tunisian patients: high prevalence of *C. trachomatis* genovar E and mixed infections. *BMC Infectious Diseases*, 12, 333. DOI: 10.1186/1471-2334-12-333.
- Gharsallah H., Frikha-Gargouril, O., Fesbes, F., Sellami, H., Znazen, A., and Hammami, A. (2012). Development and application of an in house reverse hybridization method for *Chlamydia trachomatis* genotyping. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 846-855. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05375.x.
- Gita, S., Suneeta, M., Anjana, S., Niranjana, N., Sujata, M., and Pandey, R. (2011). *C. trachomatis* in Female Reproductive Tract Infections and RFLP-Based Genotyping: A 16-Year Study from a Tertiary Care Hospital. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011, 6. DOI: 10.1155/2011/548219.
- Goldenberg, D., Finn, J., Sedudzi, E., White, A., and Tong, W. (2012). Performance of the GeneXpert CT/NG Assay Compared to That of the Atima AC2 Assay for detection of rectal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Use of Residual Aptima Samples. *Journal of Microbiology*, 50(12), 3867-3869. DOI: 10.1128/JCM.01930-12.
- Guerra-Infante, F.M., Basurto-Tranquilino, M., De Haro-Cruz, M.J., López-Hurtado, M. (2011). Análisis del gen *ompA* del serotipo F de *Chlamydia trachomatis*. *Revista de Investigación Clínica*, 63(5), 544-546.

- Guerra Infante, F.M., López Hurtado, M., Villagrana Zesati, R. (2012). Nuevas genovariantes del serovar L2 de *Chlamydia trachomatis* causantes de proctitis. *Ginecología y Obstetricia de México*, 80(3), 208-217.
- Hernández-Cortez, C., Majalca-Martínez, C., Hernández-Méndez, J., Giono-Cerezo, S., Aguilera-Arreola, M. y Castro-Escarpullí G. (2012) Presencia de secuencias ERIC en *Chlamydia trachomatis*. *Revista Biomedica*, 23: 87-93.
- Hernández-Martínez, F., Hernández-García, J., Martínez-Peña, M., Muñiz-Becerril, B., Hernández-Cortez, C., Castro-Escarpullí, G. and Aguilera-Arreola, M. (2013). Aetiology and frequency of cervico-vaginal infections among Mexican women. *African Journal of Microbiology Research*, 7(1), 27-34. DOI:10.5897/AJMR12.651.
- Hernandez-Trejo, M., Herrera-Gonzalez, N.E., Escobedo-Guerra, M.R., De Haro-Cruz M.J., Moreno-Verduzco, E.R., Lopez-Hurtado, M., Guerra-Infante, F.M. (2014). Reporting detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in tissues of neonatal death cases. *Journal Pediatrics*, 90, 182-189. DOI:10.1016/j.jpeds.2013.09.002.
- Huang, C.T., Wong, W.W., Li, L.H., Chiang, C.C., Chen, B.D. and Li, S.Y. (2008). Genotyping of *Chlamydia trachomatis* by microsphere suspension array. *Journal Clinical Microbiology*, 46, 1126–1128. DOI:10.1128/JCM.02278-07.
- Jalal, H., Stephen, H., Alexander, S., Carne, C. and Sonnex, C. (2007). Development of Real-Time PCR Assays for Genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2649-2653. DOI:10.1128/JCM.00451-07
- Jian-Hong L., Yue-Ping Y., He-Ping Z., Ming-Ying Z., Rui-Rui P., Baoxi W., Xiang-Sheng C. (2010). A high-resolution melting analysis for genotyping urogenital *Chlamydia trachomatis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, 366–74. DOI:10.1016/j.diagmicrobio. 2010.07.013.
- Jiménez Pirrón, T., Trujillo Olivera, L., Roblero Ochoa, S., Domínguez López, R., Montoya Maza, S. (2001). Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres usuarias de un hospital general en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 21(4), 123-125.
- Klint, M., Hadad, R., Christerson, L., Lore, B., Anagrus, C., Sterlund, A., Larsson, I., Sylvan, S., Fredlund, H., Unemo, M., Herrmann, B. (2011) Prevalence trends in Sweden for the new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 683-689. DOI: 10.1111/j. 1469-0691.2010.03305.x
- Koskela, P., Antila, T., Bjorge, T., Brunsvig, A., Dillner, J., Hakamas, M. et al. (2000). *Chlamydia trachomatis* infection as risk factor for invasive cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 85, 35-39.

- Lampe, M.F., Suchland, R.J., and Stamm, W.E.(1993). Nucleotide Sequence of the Variable Domains within the Major Outer Membrane Protein Gene from Serovariants of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 61(1), 213-219.
- Land, J.A., Van Bergen, J.E., Morr , S.A, Postma, M.J. (2010). Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Human Reproduction Update*,16 (2), 189-204. DOI:10.1093/humupd/dmp035.
- Lavrov, S., D jardin, J., and Cavalli, G. (2004). Combined immunostaining and FISH analysis of polytene chromosomes. *Methods in Molecular Biology*, 247, 289-303.
- Levett, P.N., Brandt, K., Olenius, C., Brown, K., Montgomery, K.,and Horsman,G. (2008). Evaluation of Three Automated Nucleic Acid Amplification Systems for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in First-Void Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2109–2111. DOI:10.1128/JCM.00043-08.
- Liu, X., Afrane, M.,Clemmer, D.E., Zhong, G., Nelson, D.E.(2010). Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics. *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2852-2860. DOI:10.1128/JB.01628-09.
- Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hause S.L., Jameson, J.L., y Loscaizo, J. (2012). *Harrison: Principios de medicina Interna*.18^a ed.Vol.I.McGraw-Hill.M xico,1095.
- Lys n, M., Sterlund,A., Rubin,C., Persson,T., Persson,I,and Herrmann,B.(2004). Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish Country. *Journal of Clinical Microbiology*, 4,1641-7. DOI: 10.1128/JCM.42.4.1641–1647.2004.
- Mancilla, M.,Villarroel, M.,Sald as, M.E., Soto,J., Z rraga, A.M. (2008).Genotipos de aislados de campo de *Brucella abortus* de distintas regiones geogr ficas de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40,187-192.
- Margoni ,A., Foschi,C., Nardini,P., D’Antuono,A., Banzola,N., Di Francesco,A., Ostanello, F., Russo, I., Donati,M., Cevenini,R. (2012). *Chlamydia trachomatis* serovar distribution another sexually transmitted coinfections in subjects attending an STD outpatients clinic in Italy. *New Microbiologica*, 35, 215-219.
- Mascellino, M.T., Boccia, P., and Oliva, A. (2011). Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* Infected Women. *ISRN Obstetric and Gynecology*, 2011, 9. DOI:10.5402 /2011/436936.
- Millman, Kim., Black,C., Stamm,W., Jones,R.B., Hook III ,E., Martin ,D.H., Bolan ,G., Tavare,S., Dean ,D. (2006). Population-based genetic epidemiologic analysis of *Chlamydia trachomatis* serotypes and lack of association between *ompA* polymorphisms and clinical phenotypes. *Microbes and Infection*, 8, 604-611. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.08.012.

- Molano, M., Meijer, C.J., Morré, S.A., Pol, R., and Van Den Brule, A.J. (2004). Combination of PCR targeting the VD2 of *omp1* and reverse line blot analysis for typing of urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in cervical scrape specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2935–2939. DOI: 10.1128/JCM.42.7.2935–2939.2004.
- Molina, J. Manjarrez, Z.M., y Tay, Z.J. (2010). *Microbiología: Bacteriología y Virología*. Méndez Editores. México, 359-371.
- Morré, S.A., Ossewaarde, J.M., Lan, J., VanDoornum, G.J., Walboomers, J.M., MacLaren, D., Meijer, C.J., and Van Den Brule, A. (1998). Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G, and J as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 345-351.
- Nguyen, B.D., Cunningham, D., Liang, X., Chen, X., Toone, E.J., Raetz, C.R., Zhou, P., Valdivia, R.H. (2011) Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10284-10289. DOI:10.1073/pnas.1107478108.
- Nunes, A., and Gomes, J.P. (2014). Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 49-64. DOI:10.1016/j.meegid.2014.01.029.
- Ostos Ortiz, O. y Mélida Sánchez, R. (2003). *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *NOVA-Publicación científica*, 1 (1), 1-116.
- Pedersen, L.N., Kjaer, H.O., Moller, J.K., Orntoft, T.F. and Ostergaard, L. (2000). High resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* from recurrent urogenital infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3068–3071.
- Pedersen, L.N., Pødenphant, L., and Møller, J.K. (2008). Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using *omp1* and a set of variable number tandem repeats. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 644–652. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02011.x.
- Pedersen, L.N., Hermann, B. and Moller, J.K. (2009). Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55, 120-130. DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00526.x
- Persing, H.D. (2011). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2nd edition. ASM Press. EEUU, 383-393.
- Petrovay F, Balla, E., Ne' meth, I., and Gonczol, E. (2009). Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from the endocervical specimens of high-risk women in Hungary. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 760-764. DOI: 10.1099/jmm.0.008607-0.

- Quint, K.D., Van Doorn,L.J., Kleter B., De Koning,B.M., Van den Munckhof ,H.,A.,*et al.* (2007) highly sensitive, multiplex broad-spectrum PCR-DNA-enzyme immunoassay and reverse hybridization assay for rapid detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars. *Journal of Molecular Diagnostics*, 9: 631–638. DOI: 10.2353/jmoldx.2007.070011.
- Quint K.D., Bom,R.J., Bruisten ,S.M., Van Doorn ,L.J., Hajipour N. Melchers ,W.J.,*et al.* (2010). Comparison of three genotyping methods to identify *Chlamydia trachomatis* genotypes in positive men and women. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 266-270. DOI: 10.1016 /j.mcp.2010.04.007.
- Quint,K.D, Geraets ,D., Van den Munckhof ,H., De Koning,M., Smelov ,V., Melchers,W.*et al.* (2011). Evaluation of a Novel *Chlamydia trachomatis* Microsphere Suspension Assay for Detection and Genotyping of the Different Serovars in Clinical Samles. *Journal of Molecular Diagnostics*,13(2): 152-159. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.017
- Rádís Baptista, G., Kubo,T., Oguiura,N., Svartman,M., Almeida,T., Batistic,R.*et al.* (2003). Strucure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South amercan rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 2003:6. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.10.019.
- Ramos-Zepeda, R., Pérez-Medina, R., Barba-Barajas,M., Palma-Ramírez,T.,Flores-García, A.,Garibaldi-Becerra,V., *et al.* (2001). *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant women with premature membrane rupture or premature delivery threat. *RevistaBiomédica*, 12:158-165.
- Roche Molecular System. (2013). Recuperado de <http://molecular.roche.com/assay / Pages/COBASTaqManCTTestv20.aspx>. [Consultada en Mayo 2014]
- Rodriguez-Dominguez M, Sanbonmatsu,S., Salinas,J., Alonso,R., Gutiérrez,J.,y Galán,J.C. (2014). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* ssp. y especies relacionadas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.,32(6), 380-385. DOI:10.1016/ j.eimc. 2013.01.015.
- Sambrook, J., and Russell DW. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor. EEUU.Chaper 6,Protocol 10;6.5.
- Sánchez Monroy, V., Torres Mata, T.E., Villalba Magdaleno, J.D.(2009). Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Ginecología y Obstetricia de México*,77(1),13-18.
- Satterwhite ,C., Torrone,E., Meites,E., Dunne,E., Mahajan ,R., Su ,J.,*et al.*(2013). Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates,2008.*Sexually Transmitted Diseases*, 40(3): 187-193.

- SINAVE/DGE/SALUD. (2009). Descripción y comportamiento de las enfermedades de notificación semanal. Síntesis epidemiológica. Recuperado de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx> [Consultado en Junio 2014]
- Stephen, M. (2013). *Atlas de Enfermedades Transmitidas sexualmente y Sida*. 4ª Edición. Amolca. Venezuela, 40-63.
- Stephens, S.R., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, A., et al. (1998). Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282, 754-759. DOI: 10.1126/science.282.5389.754.
- Stevens, M.P., Tabrizi, S.N., Muller, R., Krause, V. and Garland, S.M. (2004). Communities Samples from Remote Australian omp1 Genotypes Detected in Eye Swab Characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6):2501. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2501-2507.2004
- Stevens, M.P., Twin, J., Fairley, C.K., Donovan, B., Tan, S.E., Yu, J., Garland, S.M. and Tabrizi, S.N. (2010). Development and Evaluation of an *ompA* Quantitative Real-Time PCR Assay for *Chlamydia trachomatis* Serovar Determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6), 2060-2065. DOI:10.1128/JCM.02308-09.
- Stothard, R.D., Boguslawski, G. and Jones, R.B. (1998). Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infection and Immunity*, 66, 3618-3625.
- Stothard, D.R. (2001). Use of a Reverse Dot Blot Procedure To Identify the Presence of Multiple Serovars in *Chlamydia trachomatis* Urogenital Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2655-2659. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2655-2659.2001.
- Thermo Scientific. (2012). Protocol Southern Blotting. Dot blotting. Recuperado de <http://www.lifetechnologies.com> [Consultado en Mayo 2013]
- Unemo, M., Seth-Smith, H.M., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Barlow, D., Goulding, D., et al. (2010). The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology*, 156 (5), 1394-1404. DOI:10.1099/mic.0.036830-0.
- Vallejos Medic, C., Enríquez Guerra, M.A., López Villegas, M.R., Valdez García, J.A., Pérez Pría Kasusky, P. (2010). Cérvico-vaginitis por *Chlamydia trachomatis* en mujeres atendidas en un hospital de Acatlán de Osorio, Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30 (2), 49-52.
- Van Der Pol, B., Williams, J.A., Smith, N.J., Batteiger, B.E., Cullen, A.P., Erdman, H., et al. (2002). Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the Rapid Capture System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (10), 3558-3564. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3558-3564.2002.

- Villagrana Zesati,R., López Hurtado, M., Flores Salazar, V., De Haro-Cruz, M.J., Escobedo Guerra, M., Guerra Infante,F.M. (2013). Persistencia de *Chlamydia trachomatis* en el endometrio y líquido peritoneal de pacientes con infertilidad pero cultivo cervical negativo. *Ginecología y Obstetricia de México*,81,23-28.
- Wang S.P., and Grayston J.T.(1970). Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *American Journal of Ophthalmology*,70:367–374.
- Wang Y., Berg,E.A., Feng,X., Shen,L., Smith, T.and CostelloC.E. (2005). Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Science*, 15: 122-133. DOI:10.1110/ps.051616206.
- WHO. (2011). Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, C.trachomatis, N. gonorrhoeae, syphilis and T. vaginalis: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates.. Recuperado de http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502450_eng.pdf [Consultado en Marzo2014]
- WHO. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. Recuperado de <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html> [Consultada en Marzo 2014]
- Xiong, L., Kong, F., Zhou, H. and Gilbert, G.L. (2006). Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1413–1418. doi:10.1128/JCM.44.4.1413–1418.2006.
- Yang ,C.L., Maclean, I. and Brunham ,R.C. (1993). DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis omp1* gene. *Journal Infectious Diseases*, 168(5):1225-30.
- Yang ,W.L., Ning, P., Yang,J. (2000). Genotyping of Chlamydia trachomatis from the patients with sexually transmitted infections. *Chinese Journal of Dermatology*,33,185. DOI: 10.4111/ kju. 2013. 54.2.73.
- Yang B., Zheng,H.P., Feng,Z.Q., Xue,Y.H., Wu,X.Z., Huang,J.M., *et al.* (2010). The Prevalence and distribution of *Chlamydia trachomatis* Genotypes among Sexually Transmitted Disease Clinic Patients in Guangzhou, China, 2005-2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 63: 342-345.
- Yong, X. and Likuan X. (2014). Progress in genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *Chinese Medical Journal.*, 127(22): 3980-3986. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20141415.
- Young-Suk,L. and Kyu-Sung,L. (2013). *Chlamydia* and male lower urinary tract diseases. Korean. *Journal of Urology*, 54 (2), 73-7. DOI:10.4111/kju.2013.54.2.73.

Yuan Y., Zhang, Y.X., Watkins N.G. and Caldwell, H.D. (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Infection and Immunity*, 57(4), 1040-1049.

Zheng, H.P., Jiang, L.F., Fang, D.Y., Xue, Y.H., Wu, Y.A., Huang, J.M. and Ou, Z.Y. (2007). Application of an oligonucleotide array assay for rapid detecting and genotyping of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57, 1- 6. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.007.

11. ANEXO

11.1 Materiales

Material Biológico

- Cepas recombinantes de *Escherichia coli* JM109 .
- ADN de esperma de salmón. (Boehringer Ingelheim)

Material

- Tubos estériles de: 100 μ l, 600 μ l y 2 ml.
- Micropipetas de: 0.5-10 μ l, 10-100 μ l y 200-1000 μ l.
- Vasos de precipitados de: 50, 100, 250 y 1000 ml.
- Puntas estériles.
- Tubos de ensayo con tapa.
- Escalpelo.
- Asa bacteriológica.
- Mechero bunsen.
- Membranas de nylon. (immobilonTM-Ny+ de Millipore)
- Microplaca de poliestireno de 96 pozos.
- Tubos cónicos de 15 y 50 ml.
- Barra magnética.
- Filtros de 0.45 μ m.
- Jeringas de 10 ml.
- Guantes de nitrilo.

Reactivos

- Acetato de potasio.
- Ácido acético glacial.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Agarosa.
- Albúmina sérica bovina (BSA).
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga para ácidos nucleicos.
- Citrato de sodio.
- Conjugado avidina-peroxidasa.
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).
- Etanol absoluto.
- Ficoll.
- Formamida.
- Glucosa.
- Iniciadores P3, P4, NLO y CT4.
- Isopropanol.

- Kit Bionick DNA Labeling System. (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA)
- Kit Quiaquick gel Extraction. (QIAGEN)
- Kit PCR Master Mix. (Promega®)
- Marcador de tamaño molecular. (Invitrogen™ y Promega®)
- Medio Luria Bertani (LB).
- Metanol.
- NaCl.
- NaOH.
- HCl.
- Peróxido de hidrógeno.
- Polivinilpirrolidona (PVP).
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS,pH=7.2).
- Solución amortiguadora Tris-Acetato-EDTA (TAE,pH=8).
- Tris-HCl.
- Tween 20.
- 4-cloro -1-naftol. (Research Organics Inc)

Equipos

- Agitador magnético.
- Agitador de microplacas.
- Balanza analítica (Ohaus)
- Baño seco.
- Baño María.
- Cámara de electroforesis.
- Centrífuga refrigerada.
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific)
- Fuente de poder para cámara de electroforesis.
- Incubadora de CO₂.
- Potenciometro.
- Termociclador (Axygen® Maxygen™)
- Termómetro de mercurio.
- Transiluminador. (VWR Scientific)
- Vortex.

11.2 Preparación de soluciones

Obtención de plásmidos por lisis alcalina.

Soluciones Stock:

- | | |
|-------------|------------|
| 1. Glucosa | 1M |
| 2. Tris-HCl | 1M, pH 8 |
| 3. EDTA | 0.5M, pH 8 |
| 4. NaOH | 1M |
| 5. SDS | 10 % |

Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución I

Glucosa, 50mM	500 µl sol.stock Glucosa
Tris-HCl, 25mM	125 µl sol.stock Tris-HCl
EDTA, 10mM	100 µl sol.stock EDTA
Agua bidestilada cbp	5 ml

Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

Solución II

NaOH, 0.2 M	400 µl sol.stock NaOH
SDS, 1%	200 µl sol.stock SDS
Agua bidestilada cbp	2ml

Preparar al momento de su empleo.

Solución III

Acetato de potasio	30 ml
Ácido acético glacial	5.75ml
Agua bidestilada cbp	50ml

Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C.

Caldo LB (Luria-Bertani)

Caldo LB	1.25g
Agua bidestilada cbp	50ml

Esterilizar por autoclave.

Preparación caldo LB con ampicilina:

Colocar 5ml de medio LB en tubos de ensayo estériles, colocando a cada uno 100 µl de una solución stock de ampicilina (5mg/ml) para obtener una concentración final en cada tubo de 100 µg/ml.

Bromuro de etidio:

Adicionar en un contenedor 40 µl de una solución stock de bromuro de etidio al 1% en 400 ml agua bidestilada, para obtener una concentración de 10 µg/ml. Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Gel de agarosa al 0.8%

Colocar en un matraz Erlenmeyer 0.32 g de agarosa más 40 ml de solución TAE 1x, posteriormente calentar la mezcla por 1 minuto en microondas hasta observar disuelto la agarosa. Por último colocar la mezcla sobre un molde con el peine en posición correcta permitiendo a que gelifique por completo.

Obtención de los fragmentos del gen *ompA*

Mezclas de reacción para PCR

Se utilizó el Kit de PCR Master Mix de Promega® para la preparación de las mezclas de reacción.

Componentes de la Master Mix 2x:

Taq DNA Polimerasa	50 U/ml en solución buffer pH 8.5
dNTPs	400µM
MgCl ₂	3 mM

Almacenar a 4°C.

Se emplearon los siguientes volúmenes y concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción ajustando cada una a un volumen total de 25 μ l.

Componente	1 mezcla volumen(μl)	Concentración
PCR Master Mix 2x	12.5	1x
Reverse primer	1	25pM
Forward primer	1	25pM
DNA molde	2	\leq 250ng
Agua libre de nucleasas	8.5	---

Gel de agarosa al 2%

Colocar en un matraz Erlenmeyer 0.8 g de agarosa más 40 ml de solución TAE 1x, posteriormente calentar la mezcla por 1 minuto en microondas hasta observar disuelto la agarosa. Por último colocar la mezcla sobre un molde con el peine en posición correcta permitiendo a que gelifique por completo.

Marcaje de la sonda

Se utilizó el kit Bionick DNA Labeling System (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA) que contiene los siguientes componentes:

Mezcla dNTPs, 10X

dCTP,dGTP, dTTP	0.2mM
dATP	0.1mM
biotina-14- dATP	0.1mM
Tris-HCl (pH 7.8)	500mM
MgCl ₂	50 mM
β -mercaptoetanol	100 mM
BSA libre de nucleasa	100 μ g/ml

Almacenar a 4°C

Mezcla de enzimas, 10X

DNA Polimerasa I	0.5 U/ μ l
DNasa I	0.007 U/ μ l
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	0.1 mM
Glicerol	50% (v/v)
BSA libre de nucleasa	100 μ g/ml

Almacenar a 4°C.

Técnica dot blotting

Solución salina de citratos (SSC) 20x, pH=7.

NaCl, 3M	17.53 g
Citrato de sodio ,0.3M	8.23g
Agua bidestilada cbp	100ml

Ajustar pH a 7.0, esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Solución Denhardt 100x

Albúmina sérica bovina (BSA), 2%	2g
Ficoll, 2%	2g
Polivinilpirrolidona (PVP), 2%	2g
Agua bidestilada cbp	100ml

Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm y almacenar a 4°C.

Solución de pre-hibridación

SSC, 6x	15 ml de SSC 20x
Denhardt, 5x	2.5ml de sol. Denhardt 100x
Formamida, 50%	25ml
SDS, 0.5%	0.25g
Agua bidestilada cbp	50ml

Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm y almacenar a 4°C.

Solución de bloqueo.

Adicionar en un tubo eppendorf 1 μl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) más 1ml de solución de pre-hibridación (dilución 1:1000) mezclar. En otro tubo eppendorf, colocar 1 μl de la dilución 1:1000 más 1 ml de solución de pre-hibridación para obtener una concentración de 10 ng/ml. Calentar la solución durante 5 minutos a 95 °C y enfriar en seguida a -20 °C por 10 minutos. Se debe preparar al momento de su uso.

Solución de lavado I

SSC 2x	10ml de sol 20x SSC
SDS 0.1%	0.1g
Agua bidestilada cbp	100ml

Solución de lavado II

SSC 0.1x	0.5ml de sol 20x SSC
SDS 0.1%	0.1g
Agua bidestilada cbp	100ml

Conjugado avidina-peroxidasa.

Primero se realizó una dilución 1:100 tomando 3 µl de conjugado más 298 µl de PBS, posteriormente se hicieron diluciones 1:10, 1:15 y 1:20 para obtener las diluciones 1:1000, 1:1500 y 1:2000, respectivamente.

Dilución	Volumen conjugado 1:100 (µl)	Volumen PBS (µl)	Dilución final
1:10	100	900	1:1000
1:15	67	933	1:1500
1:20	50	950	1:2000

Preparar al momento de su uso.

Solución Salina Citratos (SSC) 1x

SSC 20x	5ml
Agua bidestilada cbp	100ml

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de revelado.

4-cloro-1naftol	30mg
Metanol	3ml
SSC 1x	3ml
H ₂ O ₂	30 µl

Preparar al momento de su uso y protegerlo de la luz.