



19
2ej.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA LINEA
MACROFAGO MONOCITICA U-937 A LA INFECCION
POR *Chlamydia trachomatis* Y SU UTILIDAD
EN EL DIAGNOSTICO CLINICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

C O R A I N E S G A R C I A B E L I O

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO ORDENÓ EL
DE ACUERDO CON LA LEY

MEXICO, D. F.,

SEPTIEMBRE DE 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo se realizó en el
Depto. de Infectología e
Inmunología Perinatal del Instituto
Nacional de Perinatología, bajo la
dirección del Dr. en C. Fernando
Martín Guerra Infante.**

AGRADECIMIENTOS.

UN RECONOCIMIENTO ESPECIAL AL DR. FERNANDO GUERRA: Por su invaluable ayuda en la realización de este trabajo, sus consejos y sobre todo, paciencia.

AL Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA: Por el apoyo brindado en este trabajo.

AL Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO: Por todo el apoyo que me brindó a lo largo de la carrera así como de sinodal en esta tesis.

A JAVIER: Por ayudarme a superar una etapa difícil en mi vida e impulsarme a empezar y terminar la tesis.

AL Q.B.P. SAUL FLORES MEDINA: Por compartir sus conocimientos sobre el aislamiento y detección de *Chlamydia trachomatis*.

A MIS REVISORES Q.F.B.YOLANDA FLORES CABRERA, Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO, Q.F.B ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ.: . Ya que sin duda sus comentarios ayudaron a mejorar este trabajo.

AL DR. F. JAVIER ORTIZ IBARRA.

A SANDY Y ANITA.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE EN ALGUN MOMENTO ME BRINDARON SU AYUDA.

GRACIAS.

DEDICO ESTE TRABAJO CON CARÍO:

A DIOS: Por permitirme llegar a este momento.

A MIS PADRES: Por darme los dos regalos mas grandes: la vida y los estudios.

A MI ABUELITA TOÑA: Por su cariño y dedicación.

AL DR. FERNANDO GUERRA: Con especial cariño, por ser un gran amigo y asesor.

A MIS AMIGOS: Javier, Eduardo, Rosalba, Norma, Andrés, Antonino, Luisito, Laura, Sra. Elena, Sandy, Luz, Esmeralda, Leonardo, Eli, Toño, Abner etc. por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"MIENTRAS HAYA ESPERANZA EL FRACASO ES IMPOSIBLE"

JURADO.

Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

DR. EN C. FERNANDO MARTIN GUERRA INFANTE

Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

INDICE GENERAL

*INDICE GENERAL.	i
*INDICE DE FIGURAS.	iv
*INDICE DE TABLAS.	v
*RESUMEN.	vii
*INTRODUCCION.	1
*MARCO TEORICO.	3
*PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	11
*OBJETIVOS.	14
*HIPOTESIS.	15
*DISEÑO DE INVESTIGACION.	16
TIPO DE ESTUDIO.	16

POBLACION.	16
VARIABLES.	16
CRITERIOS DE INCLUSION.	17
CRITERIOS DE EXCLUSION.	18
MATERIAL.	20
METODOLOGIA GENERAL.	22
I) TRIPSINIZACION DE CELULAS McCoy Y HeLa-229.	22
II) INOCULACION DE MUESTRAS CLÍNICAS Y DE <i>Chlamydia trachomatis</i> SOBRE CULTIVOS DE CELULAS McCoy Y HeLa-229.	23
III) INOCULACION DE CELULAS U-937 CON MUESTRAS CLINICAS PARA LA DETECTAR LA PRESENCIA DE <i>Chlamydia trachomatis</i>.	24

IV) DETECCION DE <i>Chlamydia trachomatis</i> POR INMUNOFLUORESCENCIA.	25
*DIAGRAMA DE FLUJO.	26
*DISEÑO ESTADISTICO.	28
*RESULTADOS.	31
*DISCUSION.	43
*CONCLUSIONES.	50
*PROPUESTAS.	51
*APENDICE I.	52
*APENDICE II.	54
*REFERENCIAS.	59

INDICE DE FIGURAS

***FIGURA 1. CELULAS McCoy INFECTADAS CON
DIFERENTES SEROTIPOS DE *Chlamydia trachomatis*** 35

***FIGURA 2. CELULAS U-937 INFECTADAS CON
DIFERENTES SEROTIPOS DE *Chlamydia trachomatis*** 37

INDICE DE TABLAS

*TABLA 1. DATOS CLINICOS Y DE LABORATORIO DE LAS MUESTRAS DE ASPIRADO BRONQUIAL.	32
*TABLA 2. PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN MUESTRAS CERVICOVAGINALES EN CELULAS McCoy Y U-937.	33
*TABLA 3. PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EN MUESTRAS URETRALES EN CELULAS McCoy Y U-937	34
*TABLA 4. NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE ASPIRADO BRONQUIAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EMPLEANDO INMUNOFUORESCENCIA	38
*TABLA 5. NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE RASPADO CERVICOVAGINAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EMPLEANDO INMUNOFUORESCENCIA	39

***TABLA 6. NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE RASPADO URETRAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EMPLEANDO INMUNOFLUORESCENCIA**

40

***TABLA 7. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA LINEA CELULAR U-937 EN EL DIAGNOSTICO DE *Chlamydia trachomatis*.**

42

RESUMEN.

Chlamydia trachomatis es el agente causal de diversos padecimientos a nivel ocular, genital y pulmonar. Para su diagnóstico se emplean diversos métodos entre los cuales se encuentran el cultivo de líneas celulares, la inmunofluorescencia directa, la técnica de ELISA y recientemente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método de referencia es el cultivo de células McCoy, sin embargo existe la evidencia de que otras líneas celulares son susceptibles a la infección por *Chlamydia trachomatis*. El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad y la especificidad, de las células U-937 en el diagnóstico de infecciones por clamidia, así como la utilidad que pueden tener estas células para futuras investigaciones sobre la evasión de los mecanismos de la fagocitosis y bactericidas por parte de *Chlamydia trachomatis*. Las células U-937 fueron inoculadas con muestras de aspirado bronquial, raspado cervicovaginal y raspado uretral, así como con cepas tipo de *Chlamydia trachomatis* (ATCC) productoras de linfogranuloma venéreo y tracoma. Los resultados demostraron que las cepas tipo (ATCC) crecieron dentro de las células U-937, sin embargo el linfogranuloma venéreo creció mejor que la cepa de tracoma. El empleo de muestras clínicas de aspirado bronquial y raspado uretral sobre las células U-937, mostró que estas células presentan una sensibilidad del 0% para ambos tipos de muestra y una especificidad del 100% y 94.7% respectivamente. Para el raspado cervicovaginal la sensibilidad obtenida fue del 25% y la especificidad fue del 92.0%. En conclusión la línea celular macrófago monocítica U-937 no es apropiada para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Por lo que las células McCoy siguen siendo el "estándar de oro" para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis*.

INTRODUCCION.

Los miembros de la familia Chlamydiaceae son bacterias gram negativas, intracelulares obligadas. *Chlamydia trachomatis* es un agente causal importante en las infecciones de transmisión sexual.

La prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en México es del 4 a 10 % (1) de los cuales se estima que el 4% son pacientes asintomáticos. La detección de estas infecciones es importante para reducir las complicaciones ginecológicas.

Las pruebas de laboratorio son necesarias para la detección de infecciones asintomáticas producidas por *Chlamydia trachomatis* y así poder dar un tratamiento rápido y adecuado.

El aislamiento de esta bacteria en cultivo celular está considerado como el método de laboratorio más sensible y específico, en comparación con otros métodos como: la inmunofluorescencia directa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de que el cultivo celular puede ser empleado cualquier tipo de secreción sin que se disminuya de forma aparente la replicación del microorganismo.

El cultivo en células McCoy, interpretado por anticuerpos monoclonales anti-clamidia marcados con fluoresceína es considerado como el "estándar de oro" (2), pero para ello se requiere de ciertos tratamientos químicos (Dextran, poli-L-lisina) que promuevan la penetración de los cuerpos elementales (3), lo que motiva se sigan investigando líneas celulares que no requieran de un tratamiento específico para la recuperación de cuerpos elementales.

Existe evidencia de que *Chlamydia trachomatis* puede infectar y crecer dentro de monocitos y macrófagos, estas células pueden actuar como

reservorios y vehículos para la diseminación en el huésped infectado por lo que este tipo de células podrían ser utilizadas tanto en el diagnóstico, como en los mecanismos de evasión que presentan esta bacteria para poder sobrevivir en estas células.

La línea celular macrófago monocítica U-937 es susceptible a la infección por *Chlamydia trachomatis* y *C. pneumoniae* (4) y por lo que es importante conocer la sensibilidad y especificidad de estas células a muestras clínicas, que comúnmente son empleadas en el diagnóstico de infecciones genitales y en infección respiratoria del recién nacido.

MARCO TEORICO.

El género *Chlamydia* se caracteriza por ser una bacteria Gram negativa intracelular obligada, que sobrevive tanto en células epiteliales como células fagocíticas, consta de cuatro especies:

1) *Chlamydia trachomatis* Es responsable de importantes enfermedades en el ser humano, su único hospedero natural. Entre las que destacan el tracoma, conjuntivitis de inclusión en adulto y recién nacido; uretritis y cervicitis no gonocócicas, neumonía infantil, linfogranuloma venéreo. (5)

2) *Chlamydia psittaci*. Tiene como huésped natural a cerca de 130 especies de aves. Apartir de estos reservorios, *C. psittaci* puede causar infección en el hombre, la llamada psitacosis; es además responsable de varias enfermedades en mamíferos no humanos como neumonía, encefalitis, conjuntivitis, enteritis, abortos y polioartritis. (5)

3) *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Se ha establecido como la causa más importante de infección respiratoria en humanos, se ha informado que el 10% de los casos de neumonía en adultos es causada por esta cepa de clamidia. (6)

4) *Chlamydia pecorum*. Recientemente propuesta por Fukushi e Hirai. Es una especie aislada de rumiantes (7), a la cual aún no se le ha descrito el tipo de padecimiento que produce.

El ciclo de replicación involucra dos formas distintas del microorganismo:

a) Una forma infectante adaptada a la vida extracelular, llamada cuerpo elemental (CE) con un tamaño aproximado de 0.2 a 0.4 μ m. Tiene una pared rígida, conferida por extensos enlaces disulfuro entrecruzados por la proteína mayor de membrana externa y por dos proteínas ricas en cisteína: la proteína de envoltura de 60 KDa y la lipoproteína de membrana exterior

de 12 KDa. La integridad estructural de los cuerpos elementales le confiere resistencia a los factores ambientales, lo que les permite sobrevivir después de la lisis de la célula huésped y durante el subsecuente tránsito de célula a célula como de huésped a huésped.

b) Un cuerpo inicial o reticulado (CR) que constituye la forma intracelular y reproductora, mide de 0,6 a 1 0 mm. Es metabólicamente activo, sintetiza ADN, ARN y proteínas. Son menos rígidos, a comparación con el CE son formas altamente lábiles que no sobreviven fuera de la célula huésped (8).

Las paredes celulares de las clamidias son muy análogas en estructura y composición a las paredes de las bacterias Gram negativas, están compuestas de fosfolípidos y proteína en un 70-75%, se componen además de un polisacárido ácido de alto peso molecular, el ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico, que corresponde al antígeno específico de grupo. Contienen una hemaglutinina y la proteína mayor de membrana externa que mantiene la barrera de permeabilidad y la estabilidad osmótica de los cuerpos elementales. La pared celular del cuerpo reticulado difiere del cuerpo elemental en que los peptidoglicanos no están ligados por uniones peptídicas, esto puede permitir un aumento en la permeabilidad del cuerpo reticulado, y por tanto el ATP puede atravesar. (5)

Las clamidias no tienen colesterol en su pared celular, tienen cantidades grandes de lípidos, carbohidratos y solo pequeñas porciones de ácidos nucleicos. Contienen ARN y ADN, este último en el cuerpo elemental se localiza en el nucleóide, como un círculo doblemente trenzado y enrollado (5). El material nuclear es menos electrodensito en el cuerpo inicial que en el elemental. La relación guanina-citosina es aproximadamente de 45% para *Chlamydia trachomatis* y de un 40% para *C. psittaci*. El tamaño del genoma es cercano a 980000000 daltons, el cual equivale a una tercera parte del genoma de *E. coli*. (9)

Todas las clamidias poseen un antígeno polisacárido que es estable a 100° C por 30 minutos y es detectado mediante la prueba de fijación del complemento. La porción inmunodominante de este antígeno es el ácido 1-ceto-3-desoxioctanoico, que es característico de la región "core" del glicopolisacárido bacteriano de Gram (-). (5)

El sitio del antígeno género-específico, especie-específico, subespecie-específico es, aparentemente la proteína mayor de membrana externa. Estos antígenos tienen un peso molecular de aproximadamente 40.000 daltons, y son el constituyente mayor de la membrana externa del cuerpo elemental. Se han demostrado varios polipéptidos especie-específicos y subespecie-específicos con diferentes pesos moleculares en la superficie de las clamidias.

La afinidad que demuestra *Chlamydia trachomatis* hacia el epitelio genital y ocular, y la que tienen *Chlamydia psittaci* y *C. pneumoniae* hacia el epitelio respiratorio se debe a que la célula huésped eucariótica posee microfilamentos en su membrana que sirven de receptores para las clamidias. Este organismo, una vez que ha logrado la fusión con su receptor, penetra a la célula por un proceso de endocitosis (fagocitosis), no hay evidencias de que exista un sistema de transporte activo que utilice el ATP. Las clamidias de algún modo, aún desconocido, son capaces de inducir su propia endocitosis. (5)

La ingestión del cuerpo elemental se acompaña de la pérdida de su cubierta con el correspondiente reblandecimiento de la pared celular. Aproximadamente, 2.5 horas después de que la bacteria fué fagocitada, el cuerpo elemental se reorganiza para dar lugar al cuerpo reticular entrando en una fase no infectiva. La presencia de la partícula infectante dentro del fagosoma no se acompaña de fusión con los lisosomas como sucede en el proceso normal de fagocitosis. Este fenómeno es dirigido por la clamidia como se ha demostrado con la ingestión de clamidias muertas por calentamiento en donde si ocurre la fusión de los lisosomas. Los cuerpos

elementales permanecen en una vacuola rodeada por una membrana derivada de la célula huésped que los protege de la acción de la lisozima. Sin perder su individualidad, los cuerpos elementales aumentan de tamaño para formar el cuerpo reticular que es metabólicamente activo.

Durante esta fase existe una intensa producción de ARN por la partícula. El ARNm se produce en el ADN cromosómico usando una polimerasa de ARN que depende del ADN contenido en el cuerpo elemental. El ARNr y el ribosomal también están presentes en el cuerpo elemental. Este proceso toma de 7 a 10 horas, tiempo durante el cual el fagosoma se mueve en dirección centripeta hacia el núcleo de la célula huésped. El cuerpo reticular ya formado empieza a experimentar una fisión binaria para formar más corpúsculos. El tiempo de generación es de 2-3 horas. A medida que se incrementa el número de corpúsculos, las inclusiones aumentan de tamaño para formar la característica manta semilunar al rededor del núcleo de la célula huésped.

En esta etapa *Chlamydia trachomatis* deposita una matriz de glucógeno responsable de la tinción marrón de la inclusión cuando se aplica yodo. Doce horas después de que se estableció la infección, se pueden observar hasta 16 cuerpos reticulares dentro de la vacuola citoplasmática; este proceso continúa hasta que la célula tiene una gran población de cuerpos reticulares. Después de 10-15 horas, el ADN vuelve a ser detectable. Esto corresponde a la condensación de los corpúsculos iniciales de 800 nm hasta 300 nm para producir los cuerpos elementales. Así gradualmente todos los cuerpos reticulares que son reemplazados por cuerpos elementales. A las 36 o 48 horas posteriores a la infección, las inclusiones maduras pueden liberar a los cuerpos elementales infectantes. Se produce la rotura de la célula huésped después de un proceso secuencial de lesión de la membrana y se completa el ciclo de crecimiento de las clamidias.⁽²⁾

Los serotipos de *Chlamydia trachomatis* asociados con el tracoma endémico (A, B, Ba, y el complejo C.), infectan preferentemente las células

de la mucosa epitelial, en contraste con los serotipos del linfogranuloma venéreo (LGV) que infectan principalmente las células macrófago-monocíticas de los nódulos linfáticos, causando infecciones sistémicas. (10)

Entre los diversos efectos patológicos de las clamidias, hay evidencia de que las infecciones producidas por clamidia ocurren en monocitos y macrófagos. Esto es, que probablemente los fagocitos mononucleares juegan un papel importante en la persistencia de las infecciones crónicas producidas por clamidia y actúan como reservorios y vehículos para la diseminación en el huésped infectado.

La capacidad de los serotipos del LGV y la incapacidad de los serotipos de tracoma para sobrevivir en los fagocitos mononucleares puede ser un factor importante para las diversas patologías manifestadas por cada serotipo.(4)

En 1978, Kuo (10) describe por primera vez un sistema de cultivo de *Chlamydia trachomatis* sobre macrófagos peritoneales de ratón, así como el análisis de varios factores que pueden afectar el crecimiento de este microorganismo; tales como el empleo de DEA-dextran, centrifugación, concanavalina A, citochalasin A, ciclofosfamida e hidrocortisona.

Kuo expuso que los macrófagos activados con tioglicolato podían ser infectados por cepas oculogenitales de *Chlamydia trachomatis* productoras de tracoma (B/TW-5/OT). El observó que, la cepa de linfogranuloma venéreo (L2/434/Bu) crecía mejor que la cepa de tracoma. Sin embargo, el porcentaje de cuerpos de inclusión y de cuerpos elementales encontrados dentro los macrófagos era muy pobre. Esto sugiere, que posiblemente la mayoría de los cuerpos elementales fagocitados están imposibilitados para crecer y desarrollarse, lo que demuestra que algunos mecanismos bactericidas que poseen los macrófagos son capaces de eliminar un porcentaje alto de cuerpos elementales. En 1967 Register y cols. (11), demostraron que los leucocitos polimorfonucleares de humanos al ser

inoculadas con cuerpos elementales de clamidia eran capaces de destruir entre el 80 y el 95% en un lapso de 10 horas, lo cual pone de manifiesto que este microorganismo es susceptible a los mecanismos bactericidas de los leucocitos polimorfonucleares. Dentro de los sistemas bactericidas que han sido descritos como los limitantes en el desarrollo de infecciones por clamidia podemos citar el sistema de mieloperoxidasa y a la lisozima, sin embargo es importante mencionar que los macrófagos carecen del sistema de mieloperoxidasa, lo que lleva a la pregunta de que si este hecho facilita el crecimiento de las clamidias dentro del macrófago.

En 1992 Guerra y colaboradores (12) investigan la sensibilidad y especificidad de los macrófagos peritoneales de ratón de la cepa NIH, para el diagnóstico de esta enfermedad, empleando muestras de aspirado bronquial y cervicovaginales. Los resultados mostraron que estas células tienen una sensibilidad del 55% y una especificidad del 96%, concluyendo que posiblemente este microorganismo presenta diferentes factores de virulencia y la susceptibilidad de infección los MPR dependen del tipo de la cepa de ratones que se emplea.

Posteriormente, Numazaki y cols. en 1995 (4) investigaron la capacidad de la línea de células macrófago-monocítica U-937, para infectarse así como la expresión de antígenos de superficie con cepas puras de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae*. Los resultados sobre la expresión de antígenos de superficie tales como CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD11b, HLA-DR y CD33 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis* mostraron que 7 días después de la infección había una disminución en el porcentaje de células que expresaran los marcadores CD4, CD45RA, CD11b y CD33. Otra observación interesante fué que en el día cuatro después de la infección, hubo un aumento en el porcentaje de células con el marcador CD4, en comparación con el grupo de células no infectadas, así como un restablecimiento en el porcentaje de células CD33 positivas. Sin embargo, estos autores desconocen si la inhibición en la expresión de estos marcadores está en función a la cantidad de microorganismo endocitado. Ya

que las células U-937 comparten varias funciones características de los monoblastos y monocitos inmaduros pueden ser inducidas para que se diferencien en células fagocíticas, ellos exponen que es necesario cierto grado de diferenciación para que se produzca la infección por *Chlamydia trachomatis*.

La línea celular monocítica humana U-937 fué establecida en 1976 por C. Sundström y K. Nilsson (13) de células malignas obtenidas de una efusión pleural de un hombre caucásico de 37 años de edad con linfoma histiocítico difuso.

Son células de tipo monocitoide, con un diámetro entre 8.1 y 16.9 μ , de forma redonda ovoide, el núcleo es irregular, lobulado y grande en la mayoría de las células. El retículo endoplásmico es escaso y muestran pequeñas mitocondrias hinchadas, el aparato de Golgi está bien desarrollado. Son células no adherentes que crecen como células únicas en suspensión sin necesidad de agitar. Requieren de un medio de cultivo completo como el F-10 o el RPMI-1640 suplementado con suero fetal de bovino.(13)

Las células U-937 pueden ser un modelo útil para investigar los mecanismos por los cuales *Chlamydia trachomatis* penetra a la célula y los mecanismos para inhibir la fusión fagolisosoma, ya que estas células muestran una débil capacidad fagocítica que es de aproximadamente de un 20%. Además de que son células inmaduras, sin embargo, estas células tienen la capacidad de producir lisozima, la cual puede ser sintetizada y secretada al exterior. (13), lo que podría ser un mecanismo para inhibir el crecimiento de *Chlamydia trachomatis*.

A pesar de todos estos datos se desconoce la susceptibilidad, sensibilidad y especificidad de las células U-937 a la infección por *Chlamydia trachomatis*, por lo que es necesario conocer estos parámetros para futuras

investigaciones sobre el papel que tienen los fagocitos mononucleares en la patogenia de infección por *Chlamydia trachomatis*.

Por otro lado, es de importancia seguir buscando líneas celulares que sean más susceptibles a la infección por *Chlamydia trachomatis* debido a que actualmente las líneas celulares que se emplean en el diagnóstico de esta enfermedad requieren ser tratadas previamente con sustancias químicas (Dextran, poli-L-lisina, etc) que permiten que las células sean susceptibles a la infección por esta bacteria. (3).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El estudio sobre *Chlamydia trachomatis* es relevante ya que esta bacteria es causante de enfermedades genitales y oculares de alta prevalencia a nivel mundial. Un alto porcentaje de pacientes con infertilidad o esterilidad se han asociado con la infección por *C. trachomatis*, y de las cuales el 9.2% fueron pacientes asintomáticas.⁽¹⁴⁾

Se ha sugerido que la infección por clamidia durante el embarazo puede producir endometritis post-parto y mortalidad perinatal.

Por otro lado, se ha observado que los hijos de madres infectadas pueden adquirir la infección al momento del parto debido al contacto con las secreciones cervicovaginales. Aunque no se ha demostrado totalmente, también se ha sugerido que clamidia puede atravesar las membranas fetales antes del parto, otra posibilidad es que exista una ruptura prematura de membranas lo que puede provocar que estos neonatos muestren alto riesgo de desarrollar conjuntivitis de inclusión, neumonía, otitis media y bronquiolitis.

La prevalencia por *Chlamydia trachomatis* en mujeres que acuden a una clínica de enfermedades de transmisión sexual es de 9%, mientras que en población abierta se ha descrito que la prevalencia es del 4%.⁽¹⁾ Recientemente se detectó una prevalencia por *Chlamydia trachomatis* del 10% en pacientes embarazadas.⁽¹⁵⁾

Debido a las infecciones que produce *Chlamydia trachomatis* provoca la necesidad de tener métodos de diagnóstico de mayor sensibilidad y especificidad.

Actualmente los métodos de diagnóstico disponibles son caros, lentos y que requieren de técnicos especializados; estos factores pueden en un

momento dado restringir tanto a los laboratorios como al número de muestras que estos pueden procesar.

En general los métodos se pueden dividir en dos grupos:

- 1) Aquellos que detectan el antígeno bacteriano.
- 2) Los que detectan anticuerpos producidos en contra de la bacteria (serológicos).

Hasta el momento, el método de elección considerado como el "estándar de oro" es el cultivo en células McCoy, interpretado por anticuerpos monoclonales anti-clamidia marcados con fluoresceína. (2)

La sensibilidad de técnicas directas como la citología, empleando la inmunofluorescencia se ha descrito que tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 73% (18).

Los métodos de biología molecular al parecer muestran una sensibilidad y especificidad del 100% siempre y cuando se empleen muestras de orina y raspado uretral ya que cuando se emplea raspado cervicovaginal la sensibilidad disminuye hasta un 95%. Sin embargo, se ha descrito que el grupo heme presente en este tipo de muestras puede producir inhibición de la prueba de PCR dando falsos negativos, y por tanto disminuye la sensibilidad.(17)

Una ventaja del cultivo celular, es que se puede emplear cualquier tipo de secreción, sin que disminuya de forma aparente la replicación del microorganismo, por lo que aún se considera el "estándar de oro" para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. A pesar de esto, el cultivo de células requiere de ciertos tratamientos químicos que promuevan la penetración de los cuerpos elementales. Esto es complicado, tedioso e inespecífico, por lo que se han seguido investigando nuevas líneas celulares que permitan la

recuperación de una buena cantidad de cuerpos elementales sin que estas sean tratadas previamente con sustancias químicas.

Los macrófagos pueden ser una línea celular adecuada debido a que son células fagocíticas profesionales. Las células U-937 son susceptibles a la infección por *Chlamydia trachomatis* y *C. pneumoniae*, es importante conocer la sensibilidad y la especificidad de estas células cuando se emplee en muestras clínicas.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la sensibilidad y especificidad de la línea macrófago monocítica U-937 para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Establecer las condiciones de cultivo de la línea celular U-937 para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*.

Comprobar que las células U-937 tienen la capacidad de ser infectadas por las cepas tipo de *Chlamydia trachomatis* productoras de Linfoglomuloma venéreo y Tracoma.

Evaluar la sensibilidad y especificidad de la línea celular U-937 con respecto a las células McCoy para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en muestras clínicas de recién nacidos con neumonía, mujeres con infecciones cervicovaginales y/o con esterilidad y de hombres con infecciones uretrales y/o con esterilidad.

HIPOTESIS.

La línea de macrófagos U-937 es susceptible a la infección por *Chlamydia trachomatis*, por lo que deben presentar una sensibilidad y especificidad mayor del 85% con respecto a las células McCoy.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

TIPO DE ESTUDIO.

El tipo de estudio realizado es prospectivo, comparativo, transversal, observacional, en un período de estudio de diez meses.

POBLACION.

Fueron analizadas 100 muestras en total: 21 muestras de aspirado bronquial provenientes de neonatos atendidos en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN); 58 muestras de raspado cervicovaginal de las cuales 26 provenían de pacientes atendidas en la clínica de enfermedades de transmisión sexual (ETS) (grupo I) y 32 de pacientes con esterilidad (grupo II); 21 muestras de raspado uretral, 22 provenientes de la clínica de ETS (grupo I) y 19 de pacientes con esterilidad (grupo II). Las muestras fueron colectadas de octubre de 1995 a julio de 1996.

VARIABLES.

VARIABLE DEPENDIENTE: Sensibilidad y especificidad de las células U-937 a la infección por *Chlamydia trachomatis*.

VARIABLE INDEPENDIENTE: Células HeLa y McCoy.

CRITERIOS DE INCLUSION.

A) Recién nacidos.

Muestras de aspirado bronquial provenientes de neonatos atendidos en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) de entre 1 y 72 días de nacidos los cuales en general fueron prematuros, con bajo peso y diagnóstico de neumonía o sépsis, y en donde no se logró el aislamiento de agentes causales de infecciones respiratorias más frecuentes.

B) Mujeres.

1. Las pacientes seleccionadas en este estudio fueron de la clínica de enfermedades de transmisión sexual que mostraban vida sexual activa, leucorrea de mal olor, prurito, ardor vulvoperineal, disuria, dispareunia y signos como eritema, escoriación, ulceración, edema vulvar y/o lesiones cervicales; y que además, no habían recibido tratamiento con antibióticos en forma sistémica o local.

2. Las pacientes atendidas por esterilidad fueron mujeres que no habían logrado el embarazo, en un período de tres años con relaciones sexuales intermitentes de por lo menos 24 meses y sin la utilización de anticonceptivos, además de que no mostraban leucorrea de mal olor, prurito, ardor vulvoperineal, disuria, dispareunia y signos como eritema, escoriación, ulceración, edema vulvar y/o lesiones cervicales; y que además, no habían recibido tratamiento con antibióticos en forma sistémica o local.

C) Hombres.

1. Las muestras de raspado uretral enviadas por la clínica de enfermedades de transmisión sexual provenían de pacientes con vida sexual activa con secreción uretral acuosa o mucopurulenta prurito uretral, sin sintomatología de uretritis no gonococcica ni inflamación de ganglios linfáticos inguinales, además que no hubieran recibido tratamiento con antibióticos en forma sistémica o local.

2. Los pacientes atendidos por esterilidad eran hombres cuyas parejas no habían logrado embarazo, con relaciones sexuales intermitentes de por lo menos 24 meses y sin la utilización de anticonceptivos, ni datos en el número espermático.

CRITERIOS DE EXCLUSION.

A) Recién nacidos.

Neonatos que estuvieran recibiendo antibióticos capaces de inhibir el desarrollo de *Chlamydia trachomatis*, muestras contaminadas o con presencia de sangre, muestras que no hayan sido colocadas en el medio de transporte 2SP, y que no hallan llegado al laboratorio 2 horas después de la toma del producto.

B) Mujeres.

Pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con antibióticos en forma sistémica o local, que se encontraran en periodo menstrual a la hora de la toma de muestra, muestras contaminadas, muestras que no hayan sido

colocadas en el medio de transporte 2SP, y que no hallan llegado al laboratorio 2 horas después de la toma del producto.

C) Hombres.

Pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con antibióticos en forma sistémica o local, muestras contaminadas, muestras que no hayan sido colocadas en el medio de transporte 2SP, y que no hallan llegado al laboratorio 2 horas después de la toma del producto.

MATERIAL.

A) EQUIPO.

- Campana de flujo laminar.....VECCO.
- Centrifuga clínica.....INTERNATIONAL EQUIPMENT CO.
- Bomba de vacío.....VECCO.
- Estufa de CO₂.....LAB LINE.
- Estufa de CO₂.....BELLCO.
- Microscopio invertido para cultivo de tejidos.....ZEISS.
- Microscopio de epifluorescencia.....IROSCOPE.
- Vortex.....THERMOLYNE.
- Mechero bunsen.

B) MATERIAL.

- Botellas para cultivo de tejidos de 25 cm².....COSTAR.
- Cámara de Neubauer.
- Cámara húmeda.
- Cubreobjetos circulares de 13 mm del #1.
- Gradilla.
- Microplacas de 96 pozos fondo U para cultivo de tejidos.....COSTAR.
- Pipeta automática de 50-200 µl y de 200-1000 µl.....FINIPIPETE.
- Pipetas desechables de 1, 5 y 10 ml.....COSTAR.
- Pipetas Pasteur de punta larga estériles.
- Placas para cultivo de tejidos de 24 pozos.....FALCON.
- Puntas para pipetas automáticas estériles.....EPPENDORF.
- Polizón desechable.....COSTAR.
- Portaobjetos.
- Tubos para centrifuga de fondo cónico de 15 ml.....CORNING.

C) REACTIVOS.

- Agua bidestilada.
- Azul tripano.
- Equipo de anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* dirigidos contra la proteína principal de membrana externa.....DAKO.
- Medio de cultivo MEM.....GIBCO.
- Medio de cultivo M-199.....GIBCO.
- Medio de cultivo RPMI-1640.....MICROLAB.
- Medio de transporte para clamidia 2SP.(ver apéndice)
- Metanol absoluto.
- Solución salina balanceada de Hanks.....GIBCO.
- Suero fetal de bovino.....GIBCO.
- Tripsina.....GIBCO.

D) MATERIAL BIOLÓGICO.

- Cepa de *Chlamydia trachomatis* serotipo Linfogranuloma venéreo II (434).....ATCC.
- Cepa de *Chlamydia trachomatis* serotipo Tracoma D (UW-3/Cx).....ATCC.
- Células HeLa-229 (CCL 2.1).....ATCC.
- Células McCoy (CRL 1696).....ATCC.
- Células U-937 (CRL 1593).....ATCC.
- Muestras de aspirado bronquial de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología, Hospital Infantil de Peralvillo y en el Hospital Infantil de México, además de raspado cervical y raspado uretral de pacientes atendidos en el INPer mantenidas en medio de transporte 2sp obtenidas por personal de estas instituciones.

METODOLOGIA GENERAL.

1) TRIPSINIZACION DE CELULAS McCoy Y HeLa-229.

A cultivos celulares confluentes que fueran mantenidos en botellas de 25 cm², se les eliminó el medio de cultivo, se lavaron dos veces con solución salina balanceada de Hanks y finalmente se adicionaron 3 ml de tripsina. Las botellas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 segundos hasta que las células tomaran forma redonda (observación microscópica), en ese momento se eliminó la tripsina y se agregaron 5 ml de medio de cultivo MEM (Medio Mínimo Esencial) suplementado con 10% de suero fetal de bovino y antibióticos (ver apéndice), posteriormente a la botella se le dió un fuerte golpe en un costado para despegar a las células y formar una suspensión celular que fué distribuida en botellas nuevas (pase 1:2 o 1:3), se adicionó medio de cultivo hasta completar un volumen final de 4 ml. Las botellas se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ hasta obtener una monocapa celular confluyente.

Para la preparación de una microplaca de 24 pozos, una vez que fué eliminada la tripsina se adicionaron 13 ml de medio de cultivo y un ml de esta suspensión celular fué depositada en cada pozo de la microplaca a los cuales previamente se les había colocado un cubreobjetos del No. 1 de 13 mm de diámetro. Posteriormente la microplaca se incubó durante 24 horas para la subsiguiente infección con muestras clínicas de los pacientes a estudiar.

Cuando se emplearon células HeLa-229, se siguió el mismo procedimiento con el que se tripsinizan las células McCoy solo que se emplea medio M-199 en lugar de MEM.

N) INOCULACION DE MUESTRAS CLINICAS Y DE *Chlamydia trachomatis* SOBRE CULTIVOS DE CELULAS McCoy Y HeLa-229.

Las muestras clínicas y las cepas tipo de *Chlamydia trachomatis* fueron descongeladas y agitadas durante un minuto con ayuda de un vortex.

A una microplaca de 24 pozos ya preparada con células McCoy o HeLa, se le eliminó el medio de cultivo de los pozos y se adicionó a cada pozo 500 μ l de poli-L-lisina a una concentración de 10 μ g/ml, posteriormente la microplaca se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se eliminó la poli-L-lisina y se adicionaron 300 μ l de la muestra clínica ó 100 μ l de la cepa tipo de *Chlamydia trachomatis* por pozo, cada muestra fué colocada por duplicado, así como el control negativo.

La microplaca fué centrifugada a 3000 rpm durante una hora a temperatura ambiente posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio M-199 suplementado con cicloheximida (1 μ g/ml), SFB (10%) y antibióticos (ver apéndice). Se incubaron las microplacas a 37°C en estufa de CO₂ durante 72 horas.

Pasado el tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante en condiciones asépticas y se fijaron las células adicionando 300 μ l de metanol por pozo. Se recuperó el cubreobjetos y se realizó el diagnóstico mediante tinción con anticuerpos anti-clamidia conjugados con fluoresceína.

III) INOCULACION DE CELULAS U-937 CON MUESTRAS CLINICAS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE *Chlamydia trachomatis*.

Las muestras clínicas conservadas en medio de transporte 2sp se agitaron durante un minuto mediante un vortex.

A una microplaca de 96 pozos con fondo en U se le adicionaron 200 μ l de cada una de las muestras, cada muestra se estudió por triplicado, se incluyeron como controles positivos las cepas tipo de *Chlamydia trachomatis* y como control negativo medio de cultivo.

La microplaca fué centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 μ l de una suspensión de células U-937 a una concentración de 5×10^5 células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con actinomicina D (1 μ g/ml), SFB.(10%) y antibióticos (ver apéndice). Posteriormente la microplaca se centrifugó durante 8 minutos a 1500 rpm. Por último, la microplaca se incubó durante 72 horas a 37°C, en estufa con atmósfera de CO₂ al 5%.

Pasado el tiempo de incubación la microplaca se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante. El botón celular se recuperó para realizar frotis, los cuales fueron fijados con metanol para su posterior tinción con anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* fluoresceinados.

IV) DETECCION DE *Chlamydia trachomatis* POR INMUNOFLUORESCENCIA.

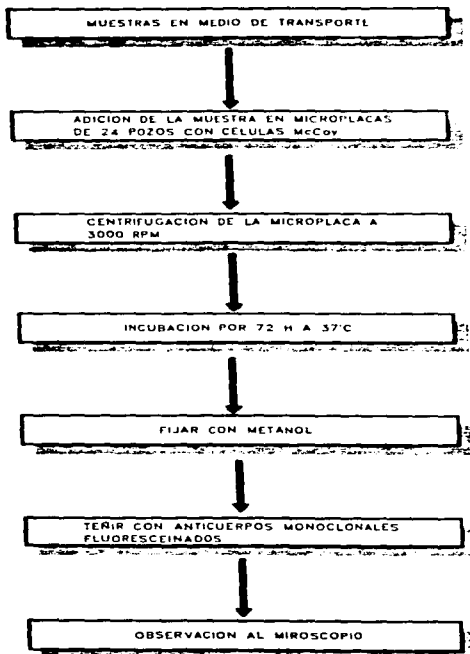
Cada laminilla fué teñida con 25 µl de anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* fluoresceinados. Las laminillas fueron incubadas a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 20 minutos. Posteriormente las preparaciones fueron lavadas durante un minuto empleando agua bidestilada, se eliminó el exceso de agua y antes de que secaran totalmente se añadió una gota de líquido de montaje entre porta y cubreobjetos. (18)

Se examinó el área usando un microscopio de epifluorescencia con objetivo de inmersión.

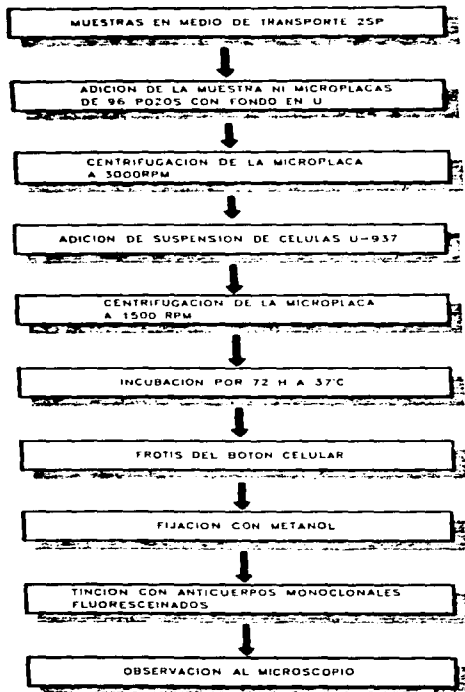
Se consideró como muestra positiva cuando fueron observados al menos dos cuerpos elementales o reticulares de color verde manzana brillante contrastado con el fondo por un color marrón-rojizo de las células en contratinción, (figura 1).

DIAGRAMA DE FLUJO

DIAGNOSTICO DE *Chlamydia trachomatis* POR CULTIVO EN CELULAS McCoy



DIAGNOSTICO DE *Chlamydia trachomatis* POR CULTIVO EN CELULAS U-937



DISEÑO ESTADÍSTICO.

Se determinó la sensibilidad (**S**), la especificidad (**E**), el valor predictivo positivo (**VPP**) y negativo (**VPN**), potencia diagnóstica (**PD**), índice de falsos positivos (**IFP**) e índice de falsos negativos (**IFN**) de las células U-937 como método de diagnóstico en comparación con el "estandar de oro".

La sensibilidad: corresponde a la capacidad de la prueba para identificar al microorganismo cuando esté presente en la muestra.

La especificidad: se define como la capacidad de la prueba para reconocer la ausencia del microorganismo cuando éste no está presente en la muestra.

El valor predictivo positivo: es la posibilidad de que la muestra analizada sea positiva cuando el método de estudio la reporta como positiva. la misma definición se aplica en el **valor predictivo negativo** para muestras negativas.(19)

La potencia diagnóstica: es sinónimo de confiabilidad.

La descripción matemática de estos parámetros se define como sigue:

REFERENCIA				
METODO		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
		POSITIVOS	A	B
A PRUEBA	NEGATIVOS	C	D	(C + D)
	TOTAL	(A + C)	(B + D)	(A + B + C + D)

EN DONDE:

A = TOTAL DE POSITIVOS POR AMBOS METODOS.

B = FALSOS POSITIVOS POR EL METODO A PRUEBA.

C = FALSOS NEGATIVOS POR EL METODO A PRUEBA.

D = TOTAL DE NEGATIVOS POR AMBOS METODOS.

S = SENSIBILIDAD

$$\% S = (A / (A + C)) \times 100$$

E = ESPECIFICIDAD

$$\% E = (D / (B + D)) \times 100$$

VPP = VALOR PREDICTIVO POSITIVO

$$VPP = (A / (A + B)) \times 100$$

VPN = VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

$$VPN = (D / (C + D)) \times 100$$

PD = POTENCIA DIAGNOSTICA

$$PD = ((A + D) / (A + B + C + D)) \times 100$$

RESULTADOS.

A) ASPIRADO BRONQUIAL.

Se estudiaron 21 muestras de aspirado bronquial de recién nacidos que mostraron dificultad respiratoria y sin aislamiento a los patógenos más frecuentes de neumonía en las células McCoy y HeLa para la búsqueda de *Chlamydia trachomatis*.

Diez fueron de recién nacidos atendidos en el INPer, 9 del Hospital Infantil de Peralvillo y 2 del Hospital Infantil de México. El porcentaje de muestras positivas fué 3 de 21 (14.3%) de las cuales una fué de Peralvillo y dos del INPer, la frecuencia de aislamiento fué del 0.11 y 0.2 respectivamente. (Tabla 1)

Una transmisión vertical se evidenció en uno de los recién nacidos del INPer al demostrar que a ambos padres se les aisló *Chlamydia trachomatis*.

La inoculación de estas muestras en células U-937, no detectó en ninguna muestra la presencia de infección por *Chlamydia trachomatis*. (Tabla 1)

TABLA 1.**DATOS CLINICOS Y DE LABORATORIO DE LAS MUESTRAS DE
ASPIRADO BRONQUIAL**

DATOS CLINICOS	INPer	Peratvillo	MM
MUESTRAS	10	9	2
NEUMONIA	1	3	1
SEPSIS	1	1	1
NEUMONIA-SEPSIS	8	5	-
EDAD GESTACIONAL (SEMANAS)	31	33.7	39
INFECCIONES MATERNAS	5	6	1
CLAMIDIA (CELULAS McCoy)	2	1	0
CLAMIDIA (CELULAS U-937)	0	0	0
% POSITIVIDAD	20.0	11.11	0.0
FRECUENCIA DE AISLAMIENTO	0.2	0.11	0.0
UREAPLASMA	negativo	negativo	negativo
VSR	negativo	negativo	negativo
MICOPLASMA	negativo	negativo	negativo

B) RASPADO CERVICOVAGINAL.

Se estudiaron 58 muestras cervicovaginales de las cuales 26 fueron de la clínica de enfermedades de transmisión sexual y 32 de la de esterilidad, éstas fueron inoculadas en células McCoy, HeLa y U-937.

Los resultados obtenidos en células McCoy y HeLa mostraron que 7 de 26 muestras de pacientes de la clínica de enfermedades de transmisión sexual fueron positivas, mientras que 1 de 32 pacientes con esterilidad fué positiva, lo que dió un porcentaje de positividad del 27 y 3.1% respectivamente. (Tabla 2)

Al emplear las células U-937 se detectó la presencia de *Chlamydia trachomatis* en 3/26 muestras de pacientes de la clínica de E.T.S. con una positividad del 11.5%; en tanto que en las muestras de pacientes de esterilidad se detectaron 3 positivas (9.4%). (Tabla 2)

TABLA 2
PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE *Chlamydia trachomatis* EN MUESTRAS CERVICOVAGINALES EN CELULAS McCoy Y U-937.

TIPO DE CELULAS	McCoy		U-937	
	E.T.S.	ESTERILIDAD	E.T.S.	ESTERILIDAD
No. MUESTRAS	26	32	26	32
No. MUESTRAS POSITIVAS	7	1	3	3
% POSITIVIDAD	27	3.1	11.5	9.4
FRECUENCIA DE AISLAMIENTO	0.27	0.03	0.11	0.09

C) RASPADO URETRAL.

Se estudiaron 21 muestras de raspado uretral de pacientes varones que asistieron al INPer, 19 fueron pacientes de esterilidad y 2 de pacientes de la clínica de enfermedades de transmisión sexual.

Los resultados empleando células McCoy y HeLa mostraron que 2/19 pacientes con esterilidad fueron positivos lo que representa el 10.52% de positividad y una frecuencia de aislamiento de 0.10 en pacientes con esterilidad, mientras que en pacientes de la clínica de E.T.S. en ninguno se aisló *Chlamydia trachomatis*. (Tabla 3)

En las células U-937 solo se detectó la presencia de clamidia en una muestra de un paciente de esterilidad dando un porcentaje de positividad del 5.3%.

TABLA 3

PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE *Chlamydia trachomatis* EN MUESTRAS URETRALES EN CELULAS McCoy Y U-937.

TIPO DE CELULAS	McCoy		U-937	
	E.T.S.	ESTERILIDAD	E.T.S.	ESTERILIDAD
No. MUESTRAS	2	19	2	19
No. MUESTRAS POSITIVAS	0	2	0	1
% POSITIVIDAD	0.0	10.5	0.0	5.3
FRECUENCIA DE AISLAMIENTO	0.0	0.1	0.0	0.05

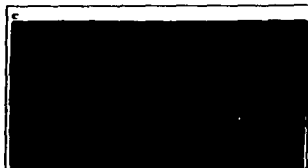
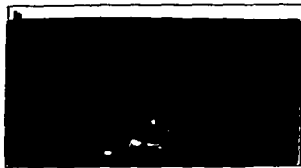
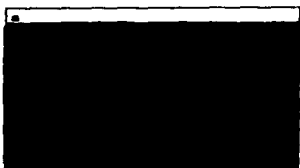


FIGURA 1: Células McCoy infectadas con diferentes serotipos de *Chlamydia trachomatis*.
a) Células McCoy no inoculadas (control negativo). b) Células McCoy inoculadas con *Chlamydia trachomatis* productor de Linfogranuloma venéreo. c) Células McCoy inoculadas con *Chlamydia trachomatis* productor de Tracoma.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA LINEA CELULAR U-937 PARA EL DIAGNOSTICO DE *Chlamydia trachomatis*.

Para demostrar que la línea de células U-937 es susceptible a la infección por *Chlamydia trachomatis*, se emplearon dos serotipos de clamidia (Linfogranuloma venéreo L2/434 y Tracoma D/UW-3Cx), la capacidad infectiva de éstas dos cepas se evaluó mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra la proteína principal de membrana externa. (Figura 2)

Los resultados mostraron que las células inoculadas con el serotipo de tracoma presentaron una cantidad menor de cuerpos elementales e inclusiones en comparación con las células que fueron inoculadas con el serotipo productor de linfogranuloma venéreo, en este último serotipo se observó un mayor número de inclusiones y cuerpos elementales. Además la intensidad de la fluorescencia de las células U-937 infectadas con linfogranuloma venéreo fué mayor, en comparación con las infectadas con tracoma. (Fig. 2)

En cuanto al empleo de muestras clínicas se observó que las células U-937 fueron incapaces de detectar *Chlamydia trachomatis* en muestras de aspirado bronquial y de uretra (Tablas 4 y 6), mostrando una sensibilidad del 0%, mientras que la especificidad fué del 100% y 94.7% respectivamente. (Tabla 7)

En el caso de muestras cervicovaginales sólo 2/3 positivas correlacionaron dentro de las 8 muestras positivas por células McCoy (Tabla 5), lo que dió una sensibilidad del 25% y una especificidad del 92.0% (Tabla 7).

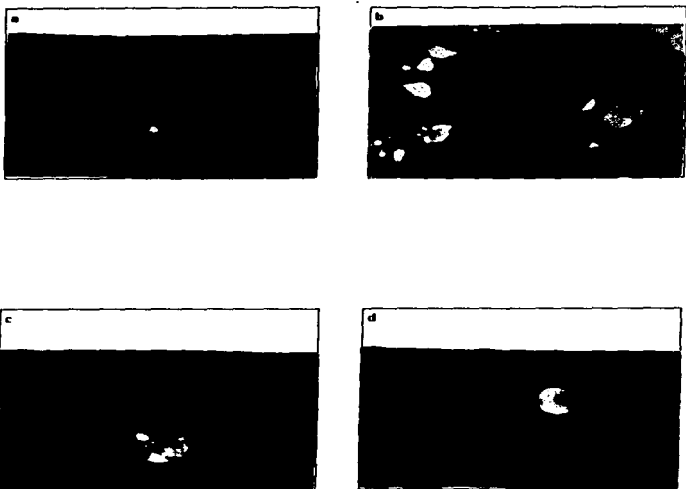


FIGURA 2: Células U-937 infectadas con diferentes serotipos de *Chlamydia trachomatis*. a) Células U-937 no inoculadas (control negativo). b) Células U-937 inoculadas con *Chlamydia trachomatis* productor de Linfogranuloma venéreo. c) Células U-937 inoculadas con *Chlamydia trachomatis* productor de Tracoma. d) Inclusión de *Chlamydia trachomatis* en célula U-937.

TABLA-4

NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE ASPIRADO BRONQUIAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EMPLEANDO INMUNOFLORESCENCIA SOBRE CELULAS U-937 Y Mr Coy.

		Mr Coy POR INMUNOFLORESCENCIA		
		+	-	TOTAL
		(%)	(%)	(%)
CELULAS U-937 FOR	(+)	0 (0.0)	0 (0.0) *	0 (0.0)
INMUNOFLORESCENCIA	(-)	3 (14.3) **	18 (85.7)	21 (100)
TOTAL		3 (14.3)	18 (85.7)	21 (100)

* FALSOS POSITIVOS

** FALSOS NEGATIVOS

TABLA 5

NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE RASPADO CERVICOVAGINAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EMPLEANDO INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE CELULAS U-937 Y Mc Coy.

	McCoy POR INMUNOFLUORESCENCIA			
		+	-	TOTAL (%)
CELULAS U-937 POR	(+)	2 (3.4)	4 (6.9)*	6 (10.3)
INMUNOFLUORESCENCIA	(-)	4 (10.3)**	46 (79.3)	52 (89.65)
TOTAL		6 (13.8)	50 (86.2)	56 (100)

* FALSOS POSITIVOS

** FALSOS NEGATIVOS

TABLA-6

NUMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS DE RASPADO URETRAL QUE FUERON POSITIVAS Y/O NEGATIVAS PARA LA PRESENCIA DE *Chlamydia trachomatis* EMPLEANDO INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE CELULAS U-937 Y Mc Coy.

	Mc Coy POR INMUNOFLUORESCENCIA			
		+(%)	-(%)	TOTAL (%)
CELULAS U-937 FOR	(+)	0 (0.0)	1 (4.8)*	1 (4.8)
INMUNOFLUORESCENCIA	(-)	2 (9.5)**	18 (85.7)	20 (95.2)
TOTAL		2 (9.5)	19 (90.5)	21 (100.0)

*FALSOS POSITIVOS

**FALSOS NEGATIVOS

VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

Se determinó el valor predictivo positivo y negativo de la línea celular U-937 con cada uno de los diferentes tipos de muestras, los resultados revelaron que tanto para las muestras de aspirado bronquial como para las muestras de raspados uretrales el valor predictivo positivo fué de 0.0%, mientras que para las muestras de raspados cervicovaginales fué del 33.33%. (Tabla 7)

El valor predictivo negativo mostró para las muestras de aspirado bronquial y uretrales un valor de 85.71%, y 90.0% respectivamente, mientras que en muestras cervicovaginales se obtuvo un valor predictivo negativo del 88.46%. (Tabla 7).

POTENCIA DIAGNOSTICA.

La potencia diagnóstica en las muestras de raspado cervicovaginal fué del 83.0% en tanto que para las muestras de aspirado bronquial y raspado uretral fué del 86%.

TABLA 7
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA LINEA CELULAR U937 EN EL DIAGNOSTICO
DE *Chlamydia trachomatis*

TIPO DE MUESTRA	ASPIRADO BRONQUEAL	RASPADO CERVICAL	RASPADO URETRAL
SENSIBILIDAD	99.9 %	75.8 %	99.8 %
ESPECIFICIDAD	99.8 %	92.8 %	96.7 %
VALOR PREDITIVO POSITIVO	99.9 %	33.3 %	99.9 %
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	96.7 %	96.4 %	99.8 %
POTENCIA DIAGNOSTICA	96.7 %	92.8 %	96.7 %

DISCUSION.

La infección por *Chlamydia trachomatis* constituye uno de los problemas más frecuentes de enfermedades de transmisión sexual a nivel mundial. La importancia de realizar una detección temprana de la infección radica en evitar las serias secuelas reproductivas que puede producir este microorganismo.

La neumonía causada por *Chlamydia trachomatis* es una enfermedad limitada principalmente a infantes menores de 6 meses de edad. Datos epidemiológicos disponibles sugieren que el tracto respiratorio de niños mayores y adultos no es un ambiente apropiado para *C. trachomatis*.⁽²⁰⁾

Palacios-Saucedo y cols. en 1989⁽²¹⁾ reportaron que los microorganismos aislados con mayor frecuencia como causantes de neumonía en neonatos atendidos en el INPer fueron *Chlamydia trachomatis* (16.7%); Enterobacterias (11.9%); *Staphylococcus* sp. (11.9%); *Streptococcus* del grupo B (7.1%); *Ureaplasma urealyticum* (4.8%) y *Listeria monocytogenes* (2.4%).

En este trabajo se encontró que los neonatos se hallaban con neumonía y sépsis polimicrobiana, encontrándose como agentes causales más frecuentes a *Staphylococcus aureus* 50%, *S. epidermidis* 40%, *Pseudomonas* spp. 20%, *Candida* spp. 20%, *Chlamydia trachomatis* 14.3%, *Micrococcus* spp. 10%, *E. faecalis* 10%, *E. faecium* 10%, *Klebsiella pneumoniae* 10%, *Enterobacter* spp. 10%.

Los resultados obtenidos en este estudio acerca del aislamiento de *Chlamydia trachomatis* en aspirados bronquiales de recién nacidos mediante el cultivo de células McCoy fué del 14.3%, de éstas el 20% eran del INPer y 11% del Hospital Infantil de Peralvillo. La frecuencia de aislamiento obtenida se encuentra por debajo de los datos reportados en la

literatura, los cuales estiman que clamidia está presente entre el 20 y el 30% de los casos de neumonía en recién nacidos.

Un aspecto interesante fué el demostrar una transmisión vertical en un recién nacido al detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en ambos padres, además la madre durante el embarazo presentó cervicovaginitis e infecciones en vías urinarias originando con esto diversas infecciones "in útero" causadas por estafilococo, pseudomonas y clamidia.

En los recién nacidos de madres infectadas, se ha descrito que del 25 al 50% de ellos desarrollan infecciones oculares y del 10 al 20% presentan neumonía por clamidia.(22)

El presente estudio reveló que las células U-937 es una línea celular no sensible para identificar a *Chlamydia trachomatis* en aspirado bronquial, debido a que no se logró aislar este microorganismo en ninguno de los casos.

En términos generales el estudio de muestras procedentes de las vías respiratorias altas o bajas, presentan en la práctica un mayor grado de dificultad para establecer el diagnóstico por cultivo o por métodos directos, la literatura reporta una sensibilidad del 33% y una especificidad del 88.7% para la inmunofluorescencia aplicada en forma directa sobre muestras de este tipo,(23) lo cual nos da una referencia del grado de dificultad que representa el manejo de este tipo de muestras, esto posiblemente se deba a una baja concentración de cuerpos elementales de clamidia en la muestra, ó a una alta carga microbiana y/o a la presencia de sustancias tóxicas para los cultivos celulares o para la clamidia.

En cuanto a las infecciones cervicovaginales causadas por *Chlamydia trachomatis* se estima que del 15 al 40% de las mujeres desarrollarán enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) y como consecuencia de este padecimiento se puede producir la cicatrización intraluminal y extraluminal,

lo que provoca finalmente esterilidad. Por otro lado las mujeres con EPI confirmada pueden padecer de infertilidad (20%), dolor pélvico prolongado (18%), embarazos ectópicos (9%). Se ha descrito cierta asociación entre la infección por clamidia y el riesgo incrementado de endometritis postparto, prematurez y bajo peso al nacer.(22)

En el presente estudio se demostró que el 3.1% de las pacientes con esterilidad y 27% de las pacientes atendidas en la clínica de enfermedades de transmisión sexual fueron positivas para el aislamiento de *Chlamydia trachomatis*, cuando se emplearon células McCoy, mientras que al emplear las células U-937 se encontró que el método presentó una baja sensibilidad ya que sólo detectó 2/8 muestras positivas por células McCoy, lo que pudo deberse a una baja concentración de cuerpos elementales en la muestra, o que el desarrollo de la clamidia fuera inhibido por alguna sustancia secretada por los macrófagos como lisozima o TNF- α .

Narciso cols. (1989) (1) han descrito que la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres con cervicitis es del 9.8%, este porcentaje fué menor que el que se obtuvo en este estudio, sin embargo la sensibilidad y la especificidad del método que utilizaron Narciso y cols es del 70% y de 95% respectivamente (técnica inmunoenzimática).

Bustos y cols. (1995) (24) detectaron *C. trachomatis* en mujeres con esterilidad con una frecuencia de 18.42%, mientras que en este estudio fué del 3.1% a pesar que en ambos estudios se empleó cultivo en células McCoy, la diferencia radica posiblemente en el número de pacientes estudiadas.

Aunque las complicaciones por la infección de *Chlamydia trachomatis* son menos importantes y comunes en hombres que en mujeres, *C. trachomatis* es la causa principal de epididimitis entre hombres menores de 35 años, resultando esto en una morbilidad significativa en términos de sufrimiento humano y pérdida de salarios.(22)

Pocos estudios sobre la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en hombres han sido reportados, se describe que entre el 15 y el 20% de los pacientes de la clínica de E.T.S muestran la infección por este microorganismo y del 3 al 5% son jóvenes asintomáticos.(22)

En este estudio la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* de pacientes con esterilidad fué del 10.5% cuando se utilizaron células McCoy.

El empleo de células U-937 con muestras de raspado uretral comparado con el método de referencia, reveló que el método no es sensible para detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en este tipo de muestra debido a que no detectó la presencia de clamidia en ninguna de las muestras analizadas.

Los macrófagos peritoneales de ratón (MPR) pueden ser un medio de conservación y propagación de cepas de clamidia principalmente la del linfogranuloma venéreo (10,12). Los resultados obtenidos en las células U-937 infectadas con linfogranuloma venéreo y tracoma muestran que las células U-937 pueden ser infectadas por estos dos serotipos.

Kuo demostró que los MPR tienen baja eficiencia para la producción de inclusiones intracelulares (observadas por tinción de Giemsa) a diferencia de las células HeLa, lo cual sugiere que los mecanismos bactericidas que estas células poseen, son capaces de eliminar un alto porcentaje de cuerpos elementales, este puede ser el caso cuando se emplea el serotipo de tracoma en las células U-937, ya que un porcentaje bajo de inclusiones y cuerpos elementales son observados en estas células (figura 2).

Register y cols en 1987 (25) demostraron que los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) humanos al ser inoculadas con cuerpos elementales de clamidia son capaces de destruir entre el 80 y el 95% de los cuerpos elementales en un lapso de 10 horas lo cual pone de manifiesto que este microorganismo es susceptible a los mecanismos bactericidas de

estas células fagocíticas. Aunque, los monocitos y macrófagos muestran una actividad bactericida similar a la de los LPMN, hay diferencias en cuanto al tiempo de respuesta, que es de horas para los macrófagos en comparación con unos pocos minutos para los LPMN.⁽²⁶⁾ Los monocitos poseen significativamente menos mieloperoxidasa (MPO) que los LPMN y los macrófagos carecen por completo de esta enzima ya que dentro de los sistemas bactericidas que han sido descritos como limitantes en el desarrollo de infecciones por clamidia podemos citar al sistema de la MPO, esto nos lleva a preguntarnos si este hecho facilita la proliferación de la clamidia dentro del macrófago, ya que las fases tardías de la generación de oxidantes no tienen lugar en sus fagolisosomas, esto puede explicar su actividad bactericida ligeramente menor para muchas especies bacterianas y fúngicas. Según Sundström y Nilsson (1976)⁽¹³⁾ las células U-937 no poseen peroxidasa la cual se encuentra presente en monocitos normales mientras que los monocitos malignos pierden la actividad de la peroxidasa, lo que podría favorecer el desarrollo de clamidia en este tipo de células.

Manor y Sarov (1986)⁽²⁷⁾ reportaron que los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana cultivados durante un periodo mayor de 7 días no fueron capaces de destruir el serotipo de linfogranuloma, sin embargo, Yong y cols. en 1987⁽²⁸⁾ demostraron que estas células cuando son cultivadas de 8 a 21 días eran capaces de matar el serotipo productor de tracoma, no así al serotipo productor de LGV. Los estudios ultraestructurales sobre la interacción macrófago-clamidia sugiere que la fusión fagolisosomal ocurre cuando la clamidia ha sido destruida, y falla cuando la clamidia aún sobrevive.

Recientemente Numazaki y cols (1995)⁽⁴⁾ estudiaron la replicación de *Chlamydia trachomatis* y *C. pneumoniae* en la línea celular monocítica humana U-937, observando que los monocitos mononucleares son capaces de destruir a *C. pneumoniae* mientras que el serotipo L₂ es capaz de producir una persistente infección crónica en las células U-937, lo que nos lleva a pensar que si son capaces de mantener a la clamidia viable y en

replicación, por lo que esta línea celular puede utilizarse en el método diagnóstico.

El porcentaje tan elevado de falsos negativos en el cultivo de células U-937 interpretado por inmunofluorescencia repercute en una baja sensibilidad de la técnica sugiriendo que la mayoría de los cuerpos elementales fagocitados por los macrófagos fueron imposibilitados para desarrollarse dentro de estas células, en ninguno de los pacientes se detectaron signos de linfogranuloma venéreo o tracoma indicando que la infección por *Chlamydia trachomatis* fué provocada por otro serotipo de ésta, el cual posiblemente sea menos resistente a los mecanismos bactericidas de las células U-937 por lo tanto no hubo desarrollo ni detección de la clamidia por éste método

Varios factores pueden provocar que *Chlamydia trachomatis* no crezca en las células U-937 como es la presencia de citocinas, por ejemplo: Sheme-Avni y cols. en 1988 (29) utilizaron Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) humano recombinante y células Hep-2, encontrando que el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gama (INF- γ) pueden actuar sinérgicamente para inhibir la replicación de *C. trachomatis*, sus estudios mostraron cierta bioactividad del TNF- α contra la replicación de *C. trachomatis* aún a una concentración de 200 pg/ml particularmente si se hallaba presente el IFN- γ . En 1989 Williams y cols (30) demostraron que el TNF- α en concentraciones de 10 U/ml o más es citotóxico para las células infectadas por la clamidia, además proponen que el TNF- α podría actuar ya sea limitando la replicación de *C. trachomatis* en las células huésped o por lisis de las células infectadas. Las células U-937 poseen receptores de alta afinidad por el TNF- α en su membrana (31); en un estudio realizado recientemente por Zamora Ruiz (1997) (32), se demostró que en presencia de lipopolisacárido bacteriano las células U-937 son capaces de producir TNF- α , tomando en cuenta los trabajos de los autores antes mencionados es probable que con la presencia del lipopolisacárido de la clamidia las células produjeran TNF- α y este tuviera efecto bactericida evitando con esto

el desarrollo y la propagación de la clamidia en las células y por lo tanto su detección.

En cuanto a los falsos positivos pudieron deberse a que las células U-937 muestran receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas por lo que los anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* pudieron unirse a este llegando a confundir con las inclusiones de la clamidia, por lo tanto se sugiere que previamente se bloqueen los receptores con un "pool" de sueros humanos antes de la adición de los anticuerpos monoclonales.

Los antecedentes mencionados así como nuestros resultados sugieren que la inoculación de células U-937 con muestras clínicas como aspirado bronquial raspado cervicovaginal y raspado uretral para detectar la presencia de *Chlamydia trachomatis* es un sistema que tiende a presentar baja sensibilidad aplicado como método de diagnóstico, sin embargo el cultivo en macrófagos (excepto macrófagos alveolares maduros) ha sido descrito como un sistema funcional para la conservación de cepas, así como un modelo para el estudio de los mecanismos inespecíficos de la infección por *Chlamydia trachomatis* (4, 10, 12, 28, 33, 34).

CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

. Se establecieron las condiciones de cultivo de la línea celular U-937 para lograr la infección con las cepas tipo de *Chlamydia trachomatis*.

. Se comprobó que las células U-937 son más susceptibles a la infección por el serotipo de Linfogranuloma venéreo que por el de Tracoma.

. La línea celular macrófago-monocítica U-937 no es útil para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en muestras uretrales y aspirado bronquial.

. La línea celular macrófago-monocítica U-937 no muestra una sensibilidad mayor del 28% para detectar la presencia de clamidia en las muestras de raspado cervicovaginal por lo que no es útil para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en este tipo de muestras clínicas.

Las células McCoy siguen siendo el "estándar de oro" para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis* por su susceptibilidad a este microorganismo.

PROPUESTAS.

Debido al aumento de infecciones por clamidia se debe seguir buscando métodos rápidos que nos permitan identificar al microorganismo y que muestren gran sensibilidad y especificidad, y que además puedan ser utilizados con cualquier tipo de muestra, las líneas celulares son útiles para esto, aunque en este estudio las células U-937 no tuvieron la sensibilidad y especificidad requerida, mostraron la capacidad para mantener el crecimiento de cepas tipo de *Chlamydia trachomatis*, lo que permitirá su uso para el estudio sobre los mecanismos bactericidas del macrófago, interacción de citocinas, así como conocimiento de los mecanismos de evasión que presentan estas bacterias.

Con todo esto se propone seguir investigando diferentes líneas celulares para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, así como emplear las células U-937 para estudio sobre la respuesta inmune inespecífica contra *Chlamydia trachomatis*.

APENDICE I

RECOLECCION DE MUESTRA.

La identificación confiable de *Chlamydia trachomatis* a partir de muestras obtenidas en la clínica, requiere una estrecha colaboración entre ésta y el laboratorio. Las muestras deben ser tomadas con cuidado, y transportadas en condiciones óptimas. La ineficacia en los procedimientos clínicos, o en los microbiológicos, puede propiciar resultados de laboratorio imprecisos.

En términos ideales, el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y la inoculación en el sistema de cultivo debe ser mínimo.

En el sexo femenino, las zonas que con mayor frecuencia se muestran son el cérvix y el útero, el área de crecimiento de clamidias es la unión escamocolumnar del canal endocervical. Es esencial una buena exposición del cérvix, por tanto la paciente debe ser examinada en la posición de litotomía, auxiliándose de un espejo bivalvo. Para obtener una muestra cervical se requiere previamente la remoción del exceso de moco presente en el canal endocervical, valiéndose para ello de un hisopo de algodón. un segundo hisopo de algodón es rotado firmemente en la zona para obtener células epiteliales columnares o cuboidales. Debe evitarse la contaminación con células epiteliales procedentes del ectocérnix. Recientemente ha sido implementado el uso de un cepillo citológico (Syva Company) para la recolección de muestras del endocérnix en mujeres no embarazadas. éste ha resultado ser más eficiente en la colección de células epiteliales columnares. El hisopo se deposita en un recipiente adecuado con medio de transporte 2SP.

En los varones, las muestras uretrales pueden ser obtenidas por medio de un hisopo uretral, que es insertado dentro de la uretra aproximadamente 4 cm, depositando el hisopo en medio de transporte 2SP. Si se sospecha de epididimitis, se puede tomar un aspirado del epidídimo aplicando anestesia local, inyectando solución salina estéril y retirando el fluido.

En el caso de neumonía infantil se toma aspirado bronquial de acuerdo a la técnica aceptada internacionalmente empleando laringoscopio con hojas del No. 0 y 1, de acuerdo a la edad gestacional y peso del paciente, cánulas endotraqueales No. 12, 14 y 16 (2.5, 3 y 3.5 French), de polivinilo, para el diagnóstico de clamidia se toman aproximadamente 3 ml de aspirado bronquial.

El transporte de las muestras al laboratorio debe hacerse dentro de las 24 horas siguientes, período durante el cual las muestras se conservan a 4°C. Cuando se les va a tener por más tiempo las muestras deben conservarse entonces a -70°C.(2)

APENDICE N

PREPARACION DE REACTIVOS

MEDIO 2ap

Sacarosa	68.460 g
K ₂ HPO ₄	2.008 g
K ₂ HPO ₄	1.088 g
Agua destilada	1000.0 ml

En un frasco limpio y seco con capacidad de un litro disolver todas las sales, ajustar el pH 7.0 y aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 110° C por 20 minutos.

Adicionar:

Suero bovino	5 %
Estreptomicina	50 µg/ml
Vancomicina	100 µg/ml
Nistatina	25 µg/ml

Distribuir 2 ml en viales de 3 ml con tapón de hule estériles. Conservar a 4° C hasta por un mes.

TRIPSINA 1x

Tripsina 5x	10 ml
Solución salina balanceada de Hanks	90 ml
HNaCO_3	para ajustar a pH 7.8

En un frasco estéril se coloca la solución de Hanks y la tripsina, se ajusta el pH con una solución de bicarbonato de sodio.

MEDIO MINIMO ESENCIAL (MEM) PARA MANTENIMIENTO DE CELULAS McCoy

MEM 1x	100.0 ml
Suero fetal de bovino	10.0 ml
L-Glutamina 100x	1.0 ml
Gentamicina	10 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	50 $\mu\text{g/ml}$
Anfotericina B	2 $\mu\text{g/ml}$

Se mezclan los componentes, se esterilizan por filtración en membrana de 0.22 μ de poro, y se conserva en refrigeración a 4° C.

MEM PARA AISLAMIENTO DE *Chlamydia trachomatis* EN CELULAS McCoy

MEM 1x	100.0 ml
Suero fetal de bovino	10.0 ml
L-Glutamina 100x	1.0 ml
Gentamicina	10 µg/ml
Streptomycina	50 µg/ml
Anfotericina	2 µg/ml
Cicloheximida	1 µg/ml
Glucosa	0.524%

Se mezclan los componentes y se esterilizan por filtración en membrana de 0.22µ de poro. Conservar en refrigeración a 4° C para su uso inmediato.

MEDIO DE CULTIVO RPMI-1640 (SIGMA)

Agua desionizada 1000.0 ml

Preparación: En un vaso de precipitado de un litro disolver el medio en 200 ml de agua desionizada. Adicionar el resto de agua. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ de poro. Distribuir en frascos de 100 ml y conservar a 4° C para su uso inmediato y a 70° C hasta por un año.

Añadir inmediatamente antes de su uso:

Vitaminas (100X)	1.0 ml
Aminoácidos no esenciales (100X)	1.0 ml
Piruvato de sodio (100X)	1.0 ml
L-Glutamina (100X)	1.0 ml
Antibiótico-Antimicótico (100X)	1.0 ml

Suero fetal de bovino se agrega de la siguiente manera dependiendo de su uso:

Medio de crecimiento: igual que el anterior adicionado con suero fetal de bovino a una concentración final de 10%.

Medio con actinomicina-D: Igual que el anterior adicionado con actinomicina-D a una concentración final de 1 μ g/ml.

RPMI-1640 PARA AISLAMIENTO DE *Chlamydia trachomatis* EN CELULAS U-937.

RPMI-1640	100.0 ml
Suero fetal de bovino	10.0 ml
L-Glutamina 100x	1.0 ml
Gentamicina	10 µg/ml
Streptomicina	50 µg/ml
Anfotericina	2 µg/ml
Actinomicina D	100 µg/ml
Glucosa	0.524%

Se mezclan los componentes y se esterilizan por filtración en membrana de 0.22µ de poro. Conservar en refrigeración a 4° C para su uso inmediato.

AZUL TRIPANO

Azul tripano	2.0 g
solución salina 0.85 %	1000.0 ml

Colocar el colorante en un vaso de precipitados agregar 200 ml de solución salina y disolver el colorante perfectamente, adicionar el resto de la solución salina. Distribuir a razón de 10 ml en frascos ámbar con tapón de rosca. Guardar en refrigeración hasta por seis meses, descartar si se observa precipitado.

Para preparar la solución de trabajo se diluye 1:10 en solución salina 0.85%.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS.

1. Narcio ML, Santos FS, Arredondo JL, Jaimes EC, Zúñiga MB, Etiología de la infección cervicovaginal en pacientes embarazadas y no embarazadas. *Ginec Obstet Mex.* 1989; 57:41-46.
2. Oriol JD, Ridway GL. Infecciones genitales causadas por *Chlamydia trachomatis*. 1ª ed. Editorial Científica PLM, S.A. de C.V. México, Tomo I: 1-166. 1995.
3. Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Effect of polycations, polyanions, and neuraminidase on the infectivity of trachoma-inclusion conjunctivitis and lymphogranuloma venereum organisms in HeLa cells: Sialic acid residues as possible receptors for trachoma-inclusion conjunctivitis. *Infect Immun.* 1973; 8:74-79.
4. Numazaki K, Suzuki K, Chiba S. Replication of *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* in the human monocytic cell line U-937. *J Med Microbiol.* 1995; 42:1911-195.
5. Tay Zavala J. et. al. Microbiología y parasitología médicas. 1ª ed. Méndez Editores. México. 1993, Capitulo 35, pp 1.383-1.397.
6. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis.* 1990; 161:618-625.
7. Iijima Y, Miyashita N, Kishimoto T, Kanamoto Y, Soejima R, Matsumoto A. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans, *J Clin Microbiol.* 1994; 32:583-588.

- 8. Beatty W L, Morrison R P, Byrne G I.** Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for Chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev.* 1994; 58:686-699.
- 9. Evans AS, Feldman HA.** Bacterial infections of humans. In: *Epidemiology and control*. 2a. ed. Plenum Medical Book Company. USA. pp 159-184. 1984.
- 10. Kuo CC.** Cultures of *Chlamydia trachomatis* in mouse peritoneal macrophages; factors affecting organism growth. *Infect Immun.* 1978; 200:439-445.
- 11. Register KB, Davis CH, Wyrick PB, Shafer WM, Spitznagel JK.** Nonoxidative antimicrobial effects of human polymorphonuclear leukocyte granule proteins of *Chlamydia spp.* in vitro. *Infect Immun.* 1987; 55:2520-2427.
- 12. Guerra FM, García FJ, Arredondo JL.** Sensibilidad y especificidad de los macrófagos peritoneales de ratón en el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Lat Amer Microbiol.* 1992; 34:7-10.
- 13. Sundström C, Nilsson K.** Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *J Cancer.* 1976; 17:565-577.
- 14. Lan J, Meijers I, Meijer CJ, Walboomers JM, Roosendaal R, Burguer C, Bleker OP, van den Brule AJ.** Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(12):3194-3197.
- 15. Díaz P, Díaz E, Servín J F.** Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en el cervix de pacientes embarazadas en control prenatal. *Ginecol Obstet Mex.* 1997; 65:48-51.

16. Guerra FM, Flores S, López M, Sosa IE, Arredondo JL. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Ginec Obstet Mex. 1995; 63:368-373.

17. Toye B, Peeling RW, Jessamine P, Claman P, Gemmill I. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men and women by PCR assay. J Clin Microbiol. 1996; 34:1396-1400

18. Dako. IMAGEN Chlamydia. A direct immunofluorescence test for the detection of *Chlamydia trachomatis*. Dako Diagnostics Ltd. United Kingdom. pp 1-12. 1992.

19. Méndez I, Guerrero D N, Moreno L, Sosa C. El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. 1ª ed. Editorial Trillas S.A. de C.V. México. 171-173. 1988

20. Nakajo MN, Roblin PM, Hammerschlag MR, Smith P, Nowakowski. Chlamydical activity of human alveolar macrophages. Infect Immun. 1990; 58:3640-3644.

21. Palacios GC, Santos FS, Arredondo JL. Neumonía neonatal. Diagnóstico y terapéutica. Infectología 1990; 10:287-294.

22. Hillis S, Black C, Newhall J, Walsh C, Groseclose SL. New opportunities for Chlamydia prevention: Applications of science to public health practice. Sex Transm Dis. 1995; 22:197-202.

23. Roblin PM, Hammerschlag MR, Cummings C, Williams TH, Worku M. Comparison of two rapid microscopic methods and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in ocular and nasopharyngeal specimens from infants. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:968-970.

24. Bustos HH, Vázquez ME, Arredondo JL, Lira J, Beltrán M, Guerra F. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con esterilidad y embarazo no complicados. *Perinatol Reprod Hum.* 1995; 9:227-234.

25. Register KB, Morgan PA, Wyrick PB. Interaction between *Chlamydia spp.* and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infect Immun.* 1986; 52:664-670.

26. Labro MT. Defensas corporales e infección. Hoechst. Dekker Inc. U.S.A. pag 9. 1994.

27. Manor E, Sarov I. Fate of *Chlamydia trachomatis* in human monocytes and monocyte derived macrophages. *Infect Immun.* 1986; 54:90-95.

28. Yong EC, Chi EY, Kuo CC. Differential antimicrobial activity of human mononuclear phagocytes against the human biovars of *Chlamydia trachomatis*. *J Immun.* 1987; 139:1297-1302.

29. Shemer-Avni Y, Wallach D, Sarov I. Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by recombinant tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1988; 56:2503-2506.

30. Williams DM, Bonewald LT, Roodman D, Byrne GI, Magee DM, Schchte J. Tumor necrosis factor alfa is a cytotoxin induced by murine *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun.* 1989; 57:1351-11355.

31. Loetscher H. Purification and structural properties of two distinct TNF receptors on human cells. p 169-170. In Aggarwal BB, Vilcek J. (ed). Tumor Necrosis Factors. Structure, function, and mechanism of action. Marcel Dekker Inc. U.S.A. 1992.

32. Zamora Ruiz MA. Efecto de la cefodizima sobre el estallido respiratorio y la producción de TNF- α en la línea de macrófagos humanos U-937. Tesis profesional. ENCB. IPN. 1997.

33. Wyrick PB, Brownridge EA. Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages. Infect Immun. 1978; 19:1054-1060.

34. Brownridge E, Wyrick PB. Interaction of *Chlamydia psittaci* reticulate bodies with mouse peritoneal macrophages. Infect Immun. 1979; 24:697-700.