



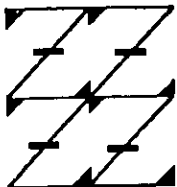
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS IgG ANTI Chlamydia DURANTE UNA INFECCION ACTIVA

T E S I S PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA : RAUL CARBALLO PEREA

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

2000

3910



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE PERINATOLOGIA BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DOCTOR FERNANDO MARTÍN
GUERRA INFANTE.**

MÉXICO, D. F.

2000



AGRADECIMIENTOS



A Dios Nuestro Señor:

Por darme vida y fuerza para lograr cada una de las metas que me he planteado.

De manera muy especial al director de Tesis:

Doctor Fernando Martín Guerra Infante, quien con su calidad científica y humana ha sabido guiar adecuadamente la presente investigación. Además de brindarme sus consejos y amistad.

A Marcela, Angélica, Saúl, Rocío y Daniel:

Por su apoyo que me brindaron para la realización de esta investigación, así como su amistad.

A mis sinodales:

M.C. Jose Luis A. Mora Guevara, Dr. Fernando Guerra Infante, Q.B.P. Gustavo Miranda Contreras, Q.F.B. Francisco Javier Parada García, y al Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera por su interés y sugerencias para mejorar este trabajo.

✧ DEDICATORIA ✧

Dedico este trabajo de tesis a María Guadalupe Zavaleta Morales por toda la confianza, apoyo y tiempo incondicional que me ha brindado. Gracias por todo.

Dedico este trabajo de tesis de manera muy especial a mi Familia:

Padres: Carlos Carballo Casanova.
Xochilt Perea Gallegos.

Hermanos: Carlos Carballo Perea.
Javier Alfredo Carballo Perea.
Leticia Carballo Perea.
Arturo Carballo Perea.

Que se encuentran presente en todos mis logros, gracias por todo su apoyo y confianza.

INDICE GENERAL

i.	Indice general.	
ii.	Indice de tablas.	
iii.	Indice de figuras.	
1.	Introducción.	1
2.	Marco teórico.	2
2.1	Generalidades.	2
2.2	Importancia de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	4
2.3	Respuesta inmune específica contra <i>Chlamydia trachomatis</i> .	6
2.4	Importancia de los anticuerpos en el diagnóstico de <i>C. trachomatis</i> .	10
2.5	Prevalencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	13
3.	Objetivos.	14
3.1	Objetivo general.	14
3.2	Objetivos particulares.	14
4.	Material y Métodos.	15
4.1	Diseño experimental.	15
4.2	Método Laparoscopia.	16
4.3	Detección de anticuerpos anti <i>Chlamydia trachomatis</i> por Inmunofluorescencia.	17
4.4	Identificación de <i>C. trachomatis</i> por Hibridación en fase líquida.	18
4.5	Análisis estadístico.	20
5.	Resultados.	21
5.1	Asociación del título de anticuerpo y la presencia de infección.	21
5.2	Asociación del título de anticuerpo y los datos laparoscópicos.	24
6.	Discusión.	29
7.	Conclusiones.	34
8.	Referencias.	35
9.	Glosario de abreviaturas.	41
10.	Apéndice.	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Categorías de las pruebas de diagnóstico con respecto a la proporción de probabilidad de los resultados.	20
Tabla 2.	Asociación entre el título de anticuerpos anti <i>Chlamydia</i> y el diagnóstico de infección por hibridación en fase líquida.	22
Tabla 3.	Características de los títulos de anticuerpos IgG asociados significativamente a la infección por <i>C. trachomatis</i> .	23
Tabla 4.	Título de anticuerpos anti <i>Chlamydia trachomatis</i> en pacientes con diferentes desordenes ginecológicos.	24
Tabla 5.	Asociación entre el título de anticuerpos anti <i>Chlamydia</i> y la presencia de adherencia.	25
Tabla 6.	Asociación entre los títulos de anticuerpos anti <i>Chlamydia</i> y la presencia de la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI).	26
Tabla 7.	Sensibilidad y especificidad de la prueba serológica anti <i>Chlamydia</i> para el diagnóstico de adherencia.	27
Tabla 8.	Diferentes niveles de anticuerpos IgG anti <i>Chlamydia</i> , asociados a la presencia de la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI).	28
Tabla 9.	Sensibilidad y especificidad de la prueba de microinmunofluorescencia para el diagnóstico de adherencia.	32

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Equipo de hibridación in situ en fase líquida de DNA_{copia} con RNA_{ribosomal} de Gen-Probe Pace 2 *C. trachomatis*. 19
- Figura 2. Células infectadas con inclusiones de *C. trachomatis* en el citoplasma, que exhiben fluorescencia. 21
- Figura 3. Células infectadas con inclusiones de *C. trachomatis* en el citoplasma, que no exhiben fluorescencia. 21

RESUMEN.

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligada que produce diversas enfermedades, entre ellas la esterilidad y la infertilidad. La determinación de anticuerpos en contra de *Chlamydia* es una prueba que puede diagnosticar la infección activa, sin embargo, la mayoría de los reactivos empleados describen que la prueba es positiva cuando hay una fluorescencia a la dilución 1:8, sin conocer realmente si hay una diferencia entre pacientes con infección activa o pacientes con memoria inmunológica, por consiguiente el objetivo de este trabajo fue el de encontrar un título de corte que describa la presencia de infección activa por *Chlamydia trachomatis*, así como a los desórdenes ginecológicos a los que se asocia por lo que se determinó el título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* mediante la técnica de microinmunofluorescencia.

Los resultados mostraron que la prevalencia de *C. trachomatis* mediante la técnica de hibridación in situ en fase líquida de DNA_{copia} con RNA_{ribosomal} de Gen-Probe pace 2, fue del 10% en las pacientes que asisten a la clínica de infertilidad. La dilución más adecuada para realizar el diagnóstico serológico de infección activa fue 1:512 ya que este mostró una sensibilidad y especificidad de 70% y 80% respectivamente.

Con respecto a la presencia de desórdenes ginecológicos, la enfermedad pélvica inflamatoria fue el único padecimiento que se logró describir satisfactoriamente por la técnica de microinmunofluorescencia, con un título 1:1024.

La técnica de microinmunofluorescencia a los títulos anteriormente citados, puede ser una herramienta útil para el diagnóstico de infección activa de *Chlamydia trachomatis*.

1. INTRODUCCIÓN.

C. trachomatis es un microorganismo patógeno genital importante, el cual produce enfermedades en hombres, mujeres y niños pequeños del mismo modo que *Neisseria gonorrhoeae*. La técnica de cultivo celular para el diagnóstico de *C. trachomatis* es el método estándar de elección, sin embargo, las técnicas serológicas han tomado importancia en el diagnóstico de este microorganismo.

En México, se desconoce el número de pacientes con infertilidad o esterilidad que han estado en contacto con *C. trachomatis*, ya que un gran número de estas cursa con una infección asintomática por lo que se requiere conocer la prevalencia de la infección y el título de anticuerpos en la población Mexicana que sugiera si las pacientes cursan con infección activa o si estuvieron en contacto con esta bacteria y de esta manera determinar la posible participación de este microorganismo como la causa de su padecimiento.

La determinación de anticuerpos en contra de *Chlamydia* es una prueba que puede describir este fenómeno, sin embargo, la mayoría de los reactivos empleados en el comercio describen que la prueba es positiva cuando hay una fluorescencia a la dilución 1:8, sin conocer realmente si hay una diferencia entre pacientes con infección activa o pacientes con memoria inmunológica. Además, es de gran interés determinar la asociación entre el título de corte de anticuerpo IgG y el diagnóstico de obstrucción tubo ovárica evaluado por histerosalpingografía (HSG) ó laparoscopia en los pacientes que asisten a consulta en el Instituto Nacional de Perinatología; con estos resultados se lograría conocer la importancia del diagnóstico de infección por *C. trachomatis*, mediante el título de anticuerpos anti *Chlamydia*.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES.

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* se caracterizan por ser microorganismos Gram negativos que tienen en común un exclusivo ciclo de desarrollo intracelular obligado. Pueden existir en dos formas diferentes: como cuerpo elemental(CE) o como cuerpo reticular(CR) o inicial. La primera, es la forma infecciosa adaptada para la supervivencia extracelular, es la partícula más pequeña, su tamaño es cercano a 300 nm, y se tiñe por Giemsa de color rojo. La pared celular de esta bacteria es de una estructura trilaminar rígida, análoga a la de las bacterias Gram negativas. La segunda es el cuerpo reticular o inicial, tiene un tamaño variable entre 800 y 1200 nm. Su capacidad para infectar es baja, es la forma intracelular, metabólicamente activa y se tiñe por Giemsa de color azul.

La pared celular de las partículas contiene lisina y D-alanina pero no contiene ácido diaminopimélico. La pared celular del cuerpo reticular difiere de la del cuerpo elemental en que los péptidoglicanos no están ligados por uniones peptídicas. Esto permite un aumento de la permeabilidad del cuerpo reticular, para que su pared celular pueda ser atravesada por el trifosfato de adenosina (ATP).

Estos microorganismos están muy bien adaptados a su vida intracelular, ya que evitan los esfuerzos para ser destruidos por el sistema inmunológico del hospedero. La casi total ausencia de mecanismos bioquímicos para producir energía, los restringe a una existencia tan sólo intracelular; siendo estos en principio parásitos energéticos, que obtienen el ATP de la célula huésped¹.

Esta familia contiene un único género, *Chlamydia*; que se subdivide en 4 especies: *C. pecorum* (es patógeno de animales), *C. psittaci* (puede causar zoonosis), *C.*

pneumoniae (es un patógeno del sistema respiratorio de humanos) y *C. trachomatis* (causa una variedad de enfermedades clínicas principalmente oculares y genitales).

C. trachomatis es un microorganismo que se conoce hace poco más de 80 años, esto debido a que no crece en medios artificiales, anteriormente se le consideraba como un virus. Fue hasta 1966, en que Page, después de una extensa revisión acerca de la morfología, citología, naturaleza química y metabolismo de estos microorganismos, estableció que se trataban de bacterias¹.

Todas las *Chlamydias* comparten antígenos específicos de género. El antígeno específico del grupo dominante es un lipopolisacárido ácido, termoestable, que se parece al lipopolisacárido de *Salmonella*². En *Chlamydia trachomatis*, el antígeno de especie predominante, que es compartido aparentemente por todas las cepas, excepto por el agente responsable de la neumonitis en ratones, es una proteína termolábil asociada a membrana denominada como proteína principal de membrana externa (MOMP). Los antígenos específicos de especie pueden detectarse con anticuerpos fluorescentes, por inmunodifusión o por hemaglutinación directa³.

2.2 IMPORTANCIA DE *Chlamydia trachomatis*.

Las enfermedades de transmisión sexual son muy comunes en nuestros días, y se están haciendo múltiples intentos para controlarlas. En general, los esfuerzos más importantes se han enfocado contra las "enfermedades venéreas" clásicas, es decir, sífilis y gonorrea, pero en varias poblaciones estas infecciones han sido superadas en frecuencia por un grupo importante de enfermedades, tales como la uretritis no gonocócica y el linfogranuloma venéreo; cuyo agente etiológico es *Chlamydia trachomatis*^{3,4}. Esta bacteria muestra 15 serotipos, que se agrupan según su expresión clínica: Los serotipos A-C son asociados con enfermedades oculares como el trachoma. Los serotipos L₁-L₃ son asociados a linfogranuloma venéreo (LGV), los cuales son muy utilizados en pruebas de antígeno único para determinar la presencia de anticuerpo contra *Chlamydia* en el suero humano, y los serotipos D-K están asociados con las infecciones genitales como es uretritis no gonocócica, cervicitis, proctitis, epididimitis y neumonía del recién nacido³.

La mayoría de las infecciones genitales por *Chlamydia* no son tratadas debido a que el 70% de estas cursan asintomáticas, presentándose posteriormente complicaciones graves como son la esterilidad tubárica, embarazos ectópicos, adherencias pélvicas, endometritis crónicas y enfermedad pélvica inflamatoria(EPI). *C. trachomatis* se ha descrito persistente en una forma subclínica por periodos prolongados en el tracto genital superior^{5,6}, estas infecciones subclínicas son la mayor causa de esterilidad tubárica. Las pruebas de diagnóstico son difíciles de realizar debido a la región donde se encuentra la infección por lo que las pruebas serológicas pueden ser útiles para identificar a las mujeres que pueden presentar una infección en los órganos genitales superiores⁷. Se ha determinado que del 20 al 30% de las infecciones endocervicales por *C. trachomatis* tienen una diseminación a endometrio y trompas de Falopio. De los cuales el 15% de las mujeres resultan con daño tubario y riesgo de esterilidad^{8,9}.

La infertilidad y esterilidad en conjunto con los embarazos ectópicos son reconocidos como secuelas de EPI que puede o no ser asintomática; aunque la patología uterina que afecta la fertilidad en general no excede el 10% de las parejas con problemas de esterilidad, la fertilidad puede verse seriamente afectada por problemas uterinos^{4,10,11}.

Se ha sugerido que una infección persistente de *Chlamydia trachomatis* puede aumentar la susceptibilidad de la pérdida de embarazo en el primer trimestre infectando al tejido fetal o estimulando una respuesta inflamatoria en el compartimiento fetal. Sin embargo, no todos los investigadores han encontrado evidencia que soporten estas hipótesis. Aún permanece incierto el papel de *C. trachomatis* en la pérdida fetal recurrente¹².

El fracaso para controlar infecciones genitales de *Chlamydia* se refleja que en muchos de los casos esta es asintomática: El estado de portador en hombres y mujeres al prolongarse aumenta el potencial para la transmisión. Se ha identificado que el 25% de hombres con infecciones en la uretra causadas por *C. trachomatis* no muestran señal o síntomas de infección por lo que estos varones asintomáticos pueden ser una fuente importante de infección.

En el caso de mujeres, el 70% de ellas muestran una infección por *C. trachomatis* esencialmente asintomática^{4,13}, aunque algunos síntomas apacibles pueden estar presentes como es la descarga de sangre vaginal y el dolor bajo abdominal, o la disuria. La infección asintomática de la uretra y el recto causada por *C. trachomatis* puede estar acompañado de una infección en el cérvix. Así la identificación temprana de personas infectadas y la aplicación de terapia curativa es probablemente la mejor manera de controlar éstas infecciones⁴.

2.3 RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA CONTRA *Chlamydia trachomatis*.

Los mecanismos inmunológicos involucrados en la protección contra una infección genital por *Chlamydia* es poco conocido. La respuesta inmune celular y humoral pueden ser críticos en las diferentes fases de la infección¹⁴. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la entrada del cuerpo elemental bloqueando receptores celulares o modificando la carga del cuerpo elemental. La mucosa genital puede responder a una infección produciendo anticuerpos IgA secretorios que bloquean al patógeno en el sitio de entrada. El cuerpo elemental también puede ser opsonizado por anticuerpos IgG o puede ser muerto por células mediante un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos¹⁵.

La respuesta serológica del huésped a la infección con *Chlamydia*, se inicia al aparecer anticuerpos séricos del tipo IgM y posteriormente IgG, también aparecen anticuerpos locales (en las lágrimas o en el cérvix) del tipo IgG e IgA. No obstante, es más evidente que, entre personas que acostumbran la promiscuidad sexual, las concentraciones basales de anticuerpos IgG son altas, debido a la memoria inmunológica¹. Con respecto a los perfiles de los anticuerpos que se desarrollan durante infecciones genitales agudas o crónicas de *Chlamydia*; se considera que las infecciones superficiales mantienen un estímulo pobre en la formación de anticuerpos, mientras que las infecciones genitales profundas y complicadas están asociadas con la seroconversión. Se sabe que la producción de IgM es de corto tiempo, y no es frecuente encontrar títulos elevados, en cambio, los anticuerpos IgG persisten durante años y son usados como marcadores para determinar un contacto anterior o infección activa con *Chlamydia*³, sin embargo, éstos últimos no se han usado como único criterio para el diagnóstico de la infección ya que deben de estar apoyados con datos clínicos de infección o de fallo reproductivo.

Con el advenimiento de métodos modernos de investigación de *Chlamydia*, se ha hecho posible preguntar qué antígenos dan lugar a los anticuerpos y en qué punto en el ciclo de desarrollo de éstos microorganismos pueden intervenir estos anticuerpos¹⁶.

Ha sido conocido que los anticuerpos anti *Chlamydia* de pollos y conejos, producidos a partir de la inoculación de preparaciones crudas de cuerpos elementales, pueden neutralizar la infección de estos organismos en embrión de pollo y en ratones de una manera específica¹⁷. Aunque las infecciones de *C. trachomatis* son frecuentemente persistentes, se sugiere que el anticuerpo tiene una influencia moduladora importante en la magnitud de la infección¹⁸.

Los mecanismos por el cual el anticuerpo evita la infección es mediante la inhibición de la adherencia del cuerpo elemental¹⁹, demostrándose que estos anticuerpos son eficaces en la neutralización de la infección por *Chlamydia*; sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes generalmente son bajos, por lo que no se llega al control de la infección¹⁶.

Chlamydia trachomatis es similar a las bacterias Gram negativas tanto en las características morfológicas como en la susceptibilidad a la neutralización mediada por complemento. Principalmente los anticuerpos de clase IgG e IgM son los que activan al complemento en la neutralización de las bacterias Gram negativas²⁰, posiblemente ocurre lo mismo con *C. trachomatis*. Aunque la relevancia de esta observación a la infección natural, es incierta debido a que la mayoría de las infecciones por *Chlamydia* se limitan a un parasitismo en la superficie de la mucosa en donde existe un ambiente deficiente de complemento¹⁶.

Caldwell et al.¹⁹ han demostrado que la MOMP, induce anticuerpos que pueden neutralizar la infección in vitro. El anticuerpo policlonal contra cuerpos elementales, bloquea la adherencia e ingestión de *C. trachomatis* (LGV) en células HeLa²¹. Mediante anticuerpos monoclonales se ha demostrado que éstos están dirigidos a epitopes de las regiones inconstantes II y IV de la MOMP, regiones que participan en la adherencia de

Chlamydia trachomatis en las células HeLa²². Sin embargo, se ha identificado que otros anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra MOMP, pueden neutralizar la infección sin que se llegue a inhibir la adherencia^{16,19}.

Se ha establecido además, que éste anticuerpo policlonal de conejo IgG dirigido contra MOMP produce la neutralización de *C. trachomatis* con y sin el complemento agregado, por lo que la neutralización independiente del complemento no depende de la agregación del organismo, de la inhibición de la adherencia, o de la entrada a la célula hospedera, más bien, la neutralización ocurre después de la endocitosis. Basado en estos resultados, se ha sugerido que este anticuerpo IgG intacto sobre la superficie del microorganismo promueve la fusión del fagolisosoma, inhibe la entrada de nutrientes esenciales de la bacteria, y previene la diferenciación del cuerpo elemental a cuerpo reticular^{16,19}.

Por otro lado, la secreción vaginal inhibe la formación de inclusiones de *C. trachomatis* en presencia de anticuerpos IgG e IgA hasta en un 75% a un pH de 3.5 a 4.5, sin embargo, a un pH > 6 la inhibición se reduce solamente al 33%²³. Por lo anterior se sugiere que estos anticuerpos diferentes pueden neutralizar la infección por *Chlamydia trachomatis* en momentos diferentes del ciclo de desarrollo^{16,17}.

Las proteínas de *C. trachomatis* que han sido identificadas en la unión a las células del hospedero son de 18, 31 y 32 kDa²¹, mientras que las de *C. psittaci* son de 17 y 19 kDa²⁴. Estas adhesinas, se encuentran en la pared de los cuerpos elementales y no en los cuerpos reticulares^{21,24}. La heparina que se ha identificado como un inhibidor de la adherencia, actúa a nivel de las proteínas de 18 y 32 kDa²⁴, demostrando que estas proteínas juegan un papel importante en la adherencia a las células epiteliales.

La MOMP es una proteína con peso molecular de 44 kDa, la cual actúa como adhesina; ésta funciona promoviendo la unión electrostática e hidrofóbica con células del hospedero²². Se ha sugerido que existe un receptor común termolábil, sensible a la tripsina que se encuentra distribuido extensamente en las células del hospedero²⁵.

A partir de 1995, se ha identificado la presencia de anticuerpos contra la proteína de choque térmico en especial a la familia de 60 kDa (hsp₆₀) en pacientes con infertilidad y EPI que presentan infección por *C. trachomatis*. Se ha descrito que la hsp₆₀ de *Chlamydia trachomatis*, se expresa después de 2 a 26 hs de haber iniciado la infección²⁶, además se ha demostrado que esta proteína presenta un 80 % de homología con la hsp 60 de humanos(Chsp₆₀) por lo que se ha sugerido que estas pacientes pueden desarrollar una respuesta autoinmune produciendo anticuerpos contra proteínas de las células de órganos genitales superiores promoviendo de esta manera el proceso inflamatorio y el daño por fijación de *Chlamydia* en las trompas de Falopio de pacientes con OTB ó EPI.

2.4 IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS EN EL DIAGNÓSTICO DE *C. trachomatis*.

Uno de los principales problemas para evidenciar las implicaciones que tiene *C. trachomatis* en las diversas patologías, son los métodos de detección y la expresión de la enfermedad que en la mayoría de los casos es asintomática. Otro de los problemas de diagnóstico es la variación de la prevalencia de acuerdo a los factores de riesgo o población estudiada. Los factores de riesgo más importantes son; la edad, el embarazo, la raza, el estrato socioeconómico, los anticonceptivos orales, la utilización de preservativos, los cambios hormonales y la asociación con otras infecciones como gonorrea²⁷. Además, un número subsecuente de estudios sugieren que la práctica de duchas vaginales esta implicado como un factor de riesgo de infección cervical de *C. trachomatis* y con ello de EPI, infertilidad y embarazos ectópicos²⁸.

El aislamiento de *C. trachomatis* en el cultivo celular continúa siendo el método más sensible y específico de diagnóstico de las infecciones por éste microorganismo. Las células de McCoy tratadas con cicloheximida producen un número mayor de cuerpos de inclusión que cualquier otra línea celular y son las más utilizadas. La centrifugación de las muestras sobre la monocapa celular aumenta considerablemente el resultado de la prueba. A pesar de la gran sensibilidad del cultivo, se conocen algunos problemas técnicos que modifican negativamente la recuperación de *Chlamydia trachomatis*, como es la contaminación bacteriana que es inherente al manejo inadecuado del cultivo celular, el tipo de muestra, ya que si se trata de una infección superior no se logra recuperar a *C. trachomatis* a partir de un raspado cervico vaginal. Además, el cultivo celular sólo se puede efectuar en algunos laboratorios que cuentan con las condiciones de equipo y reactivo para llevar a cabo esta técnica. Debido a estos inconvenientes del cultivo celular se han desarrollado métodos de detección antigénica que pueden adquirirse ya en el mercado^{29,30}. Entre los que se encuentra la microinmunofluorescencia que es uno de los

métodos más empleados en los laboratorios que no pueden realizar el cultivo celular o métodos más sensibles debido a su alto costo. Esta técnica se basa en la aplicación del suero de las pacientes sobre una capa de células infectadas con *C. trachomatis* y seguido de una aplicación de anti anticuerpos que se encuentran conjugados con isotiocianato de fluoresceína, con el fin de detectar los anticuerpos dirigidos contra *C. trachomatis* en las muestras de suero de pacientes con esterilidad²⁹. Por lo que la detección de anticuerpos anti *Chlamydia* en suero de pacientes con esterilidad o infertilidad de 2 años de evolución está fuertemente asociada con la infección de ésta bacteria en órganos de los genitales superiores. La sensibilidad de esta técnica ha sido descrita del 78%, mientras que la especificidad es del 82%³¹.

Se sabe que en las infecciones genitales de *Chlamydia trachomatis*, se producen anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos de superficie de este microorganismo; como son los anticuerpos IgG²⁹, los cuales pueden ser titulados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta; que en comparación con los anticuerpos IgM son menos transitorios y se encuentran en mayor cantidad en suero que los anticuerpos IgA.

Debido a que el 70% de las infecciones pélvicas con *C. trachomatis* son asintomáticas, los anticuerpos (Ab) en suero contra *Chlamydia* se han usado como una prueba para descubrir a los individuos que han estado en contacto con esta bacteria. Los estudios retrospectivos muestran una correlación entre la presencia del elevado título de anticuerpos en suero y el factor de infertilidad tubárica³². Los niveles altos de anticuerpo dirigidos contra *Chlamydia* son el resultado de una infección que se extiende más allá de la mucosa y pueden observarse títulos altos, seguido de una salpingitis aguda, perihepatitis, proctitis, o epididimitis³³.

El diagnóstico de infección de *Chlamydia* ha estado determinado tradicionalmente por cultivo celular y, más recientemente, por descubrimiento de antígeno en muestras

cervicales o anticuerpos en muestras de suero con inmunofluorescencia directa e indirecta respectivamente. Sin embargo, se debe de tener presente que en las pruebas de diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos anti *Chlamydia* existe la posibilidad de presentar anticuerpos de reacción cruzada contra otros microorganismos, ya que se ha reportado presencia de anticuerpos de reacción cruzada entre *Chlamydia*, *Salmonella*, *Acinetobacter* y *Bartonella*. Este último presenta un interés particular en la posibilidad de casos de infección con *Bartonella* presentando endocarditis que son erróneamente diagnosticados como infección por *Chlamydia* o viceversa^{34,35}, por lo que, el empleo de otras pruebas de diagnóstico como es la prueba de hibridación de ácidos nucleicos proporciona una alternativa rápida, sensible, y específica a las técnicas que actualmente se están usando, ya que la técnica de hibridación de ácidos nucleicos Gen-Probe Pace 2 *Chlamydia* reporta una sensibilidad del 96.7% y una especificidad del 99.6%³⁶. Sin embargo, aún se tiene el problema de la localización de la infección que en el caso de EPI y OTB ocurren en los órganos superiores del aparato genital urinario.

Otros métodos de diagnósticos de enfermedades del tracto genital comúnmente usados son la laparoscopia y la histerosalpingografía(HSG). La HSG ha sido una de las herramientas más útiles en el diagnóstico de esterilidad en la mujer. Se considera que la primera indicación para la realización de la HSG es la valoración de la permeabilidad tubárica; sin embargo, la HSG también puede ser de gran valor en la valoración de la cavidad endometrial, sin embargo, no puede señalar la causa de la obstrucción tubárica. En varias investigaciones se sugiere que el diagnóstico serológico de infección por *C. trachomatis* puede llegar a ser tan predictivo en la detección de enfermedades tubáricas como la HSG. Por otro lado, la laparoscopia es un estudio invasivo pero valioso en el diagnóstico de patologías pélvicas; siendo considerado como el método de diagnóstico estándar para la evaluación del daño de los órganos genitales superiores^{31,37}.

2.5 PREVALENCIA DE *Chlamydia trachomatis*.

La infección por *Chlamydia trachomatis* constituye una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial. En la literatura internacional, existe una importante variación en la prevalencia de esta infección en mujeres sexualmente activas, considerando cifras entre 5-35% en población abierta, se reportan prevalencias de infección por *Chlamydia trachomatis* desde 16.6% hasta 52.8% en mujeres con esterilidad, y desde 2% hasta 47% en mujeres embarazadas. En México, Echaniz y cols en 1992,³⁹ informaron una prevalencia del 4% de infección, en una población de bajo riesgo en Cuernavaca, Morelos, empleando como prueba diagnóstica el cultivo celular. Recientemente, Guerra y cols en 1995⁴⁰, informaron una prevalencia del 9.3% de infección, en pacientes con síntomas cervico vaginales, empleando el cultivo celular. Se reporta la prevalencia por *Chlamydia trachomatis* del 9% en mujeres que acuden a una clínica de enfermedades de transmisión sexual y una prevalencia del 4% en población abierta. sin embargo, existe variaciones en la prevalencia, ya que en 1995, Bustos-Lopez y cols²⁷ informaron de una prevalencia de 18.42% en pacientes con esterilidad y un 15.55% en pacientes con embarazo no complicados, empleando el cultivo celular (McCoy), éste amplio intervalo de prevalencia, se ha tratado de explicar en términos de factores socioeconómicos, culturales, clínicos y de métodos de diagnóstico.

3 . OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- ◆ Determinar el título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* en pacientes con infección activa.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la presencia de infección activa mediante la técnica de biología molecular de hibridación de DNA-RNA ribosomal en pacientes infértiles.
- Determinar el título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* en pacientes con y sin infección activa.
- Correlacionar los niveles de anticuerpos con la presencia de infección activa.
- Determinar el punto de corte óptimo de títulos de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* que describa los pacientes con infección activa.
- Determinar el punto de corte óptimo de títulos de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* que describa los datos de laparoscopia.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

☞ TAMAÑO DE MUESTRA.

- Se estudiaron a 100 pacientes que asistieron al Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

☞ CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes femeninos que asistieron a la clínica de esterilidad del INPer.
- Entre 14 y 45 años de edad.
- Que no mostraron una enfermedad de autoinmunidad.
- Que no hayan recibido fármacos inmunosupresores.
- Que no tengan neoplasias.

☞ CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pacientes femeninos que no asistió al INPer.
- Menor de 14 años de edad y mayor de 40 años de edad.
- Pacientes que recibieron tratamiento de antibiótico durante el estudio.

☞ TIPO DE ESTUDIO.

- Este estudio fue retrospectivo, clínico y comparativo que se llevo a cabo en el departamento de infectología, en el área de virología del INPer.

4.2 MÉTODO DE LAPAROSCOPIA.

El paciente se pone en la posición de litotomía bajo la anestesia general. El catéter se pone en el útero para permitir el movimiento y la visión adecuada. Se lleva a cabo una incisión en el área periumbilical de 1.5-2.0 cm, y se introduce gas con una cánula para crear un pneumoperitoneo. Cuando la presión adecuada es obtenida, se inserta una troca con una conexión a la luz para observar todas las estructuras pelvianas.

Todos los pacientes se clasifican según de acuerdo a la American Fertility Society por la presencia o ausencia de lo siguiente: 1) endometriosis; 2) miomas; 3) adherencias pélvicas que modifican significativamente las relaciones anatómicas pelvianas, y 4) oclusión de trompas de Falopio.

4.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI *Chlamydia trachomatis* POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Para la determinación del título de anticuerpo en suero se utilizó el reactivo de IFA Fluoro-kit INCSTAR *Chlamydia* (Stillwater, Minnesota, U.S.A).

Procedimiento.

La muestra de suero se preparó por diluciones dobles seriados desde 1:8 hasta 1:1024 con solución de PBS (ver apéndice). Antes de iniciar la reacción con los sueros, los portaobjetos con el antígeno se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Después a cada pozo del portaobjeto se les colocó 20 μ L de los sueros control positivo, negativo y del suero problema, a sus diferentes diluciones.

Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos, posteriormente se lavaron con PBS durante 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpos. A cada pozo se le agregó 20 μ L del conjugado (anticuerpos anti IgG humano conjugado a FITC), se incubaron los portaobjetos en cámara húmeda tal y como se describió anteriormente, para eliminar el exceso de conjugado las laminillas se lavaron con PBS. Finalmente, a cada pozo se le adicionó una gota de la solución de montaje lentamente sin producir burbujas, los portaobjetos se observaron en un microscopio de EPI fluorescencia (Axiover 100T, Carl Zeiss). Se consideró positiva la muestra cuando más del 30% de las células infectadas exhibieron fluorescencia de inclusiones de *Chlamydia* en el citoplasma.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE *C. trachomatis* POR HIBRIDACIÓN EN FASE LÍQUIDA.

Para el diagnóstico de *C. trachomatis* se realizó la técnica de hibridación in situ en fase líquida de DNA_{copia} con RNA_{ribosomal} de Gen-Probe Pace 2 *C. trachomatis* (San Diego, California, U.S.A), la cual es aceptada por la Federal Drug Administration (FDA).

Procedimiento.

Los hisópos obtenidos del raspado cervicovaginal se colocaron en tubos que contenían previamente el medio de transporte 2sp y detergentes. Los tubos se etiquetaron con números de identificación de muestra de raspado cervicovaginal, incluyendo tres tubos para la referencia negativa y uno para el control positivo.

Las muestras se agitaron con el vortex durante 5 segundos. De cada una de las muestras se pipeteó 100 µL en tubos de polipropileno de 13x100 insertados en una gradilla magnética, así como de los controles negativos y positivos [el control positivo es RNA_{ribosomal} de *C. trachomatis* (CRNA_r)].

Posteriormente a cada tubo con la muestra contenida se le adicionó 100 µL de la Sonda de DNA [DNA_{copia} (DNA_c) dirigido contra CRNA_r]. Los tubos se cubrieron, se agitaron en vortex de 3-5 veces para mezclar y se incubaron en un baño María a 60° C por 1 hora. La gradilla con los tubos se retiraron del baño María al término del tiempo de incubación y a cada tubo se le pipeteó 1 mL del Reactivo de Separación (esferas magnéticas conjugadas con anticuerpos que reconocen el híbrido DNA_c-CRNA_r).

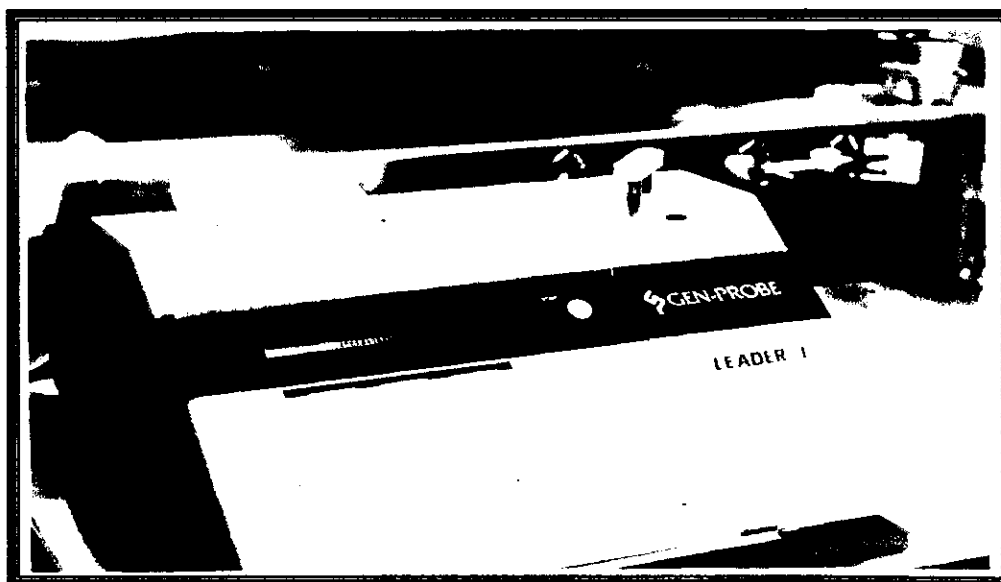
Los tubos se cubrieron y se agitaron vigorosamente sobre la gradilla magnética la cual se incubó a 60° C durante 10 minutos. La gradilla magnética se retiró del baño María al término del tiempo de incubación, la gradilla magnética conteniendo a los tubos se colocó

en la base de la unidad de separación magnética, mediante inversión se decantó el sobrenadante. Antes de revertir los tubos, se colocaron por 5 segundos en un papel absorbente sin quitar los tubos de la base de separación magnética.

A cada tubo se adicionó con solución de lavado hasta llegar al margen y la gradilla magnética nuevamente se incubó con los tubos a temperatura ambiente por 20 min. El exceso de reactivo se eliminó como se describió anteriormente y las esferas se resuspendieron con la solución restante (de 50 a 100 μ L debe permanecer en cada tubo de solución de lavado).

Los tubos se insertaron en el portatubos del equipo de quimioluminiscencia para su lectura: El resultado se interpretó como positivo cuando la diferencia fue más grande o equivalente a 350 unidades relativas de luz(RLU).

Figura 1. Equipo de hibridación in situ en fase líquida de DNA_{copia} con RNA_{ribosomal} de Gen-Probe Pace 2 *C. trachomatis*.



4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La significancia estadística entre el título de anticuerpos IgG y la infección por *Chlamydia trachomatis*, se realizó mediante la prueba exacta de Fisher (0.05), realizando una correlación de los títulos de anticuerpos y la presencia de infección en tablas de contingencia de arreglos de 2X2, además, se determinó la sensibilidad y la especificidad de la prueba y se calcularon las proporciones de la probabilidad de un resultado positivo LR(+) y de un resultado negativo LR(-) mediante las fórmulas siguientes:

$$LR(+)= \% \text{ sensibilidad} / (1- \% \text{ especificidad}); LR(-)= (1- \% \text{ sensibilidad})/ \% \text{ especificidad}.$$

El cálculo de las proporciones LR(+) y LR(-), permite categorizar los resultados de la prueba a diferentes títulos³⁸ :

Tabla 1. Categorías de las pruebas de diagnóstico con respecto a la proporción de probabilidad de los resultados.

PRUEBA	LR(+)	LR(-)
NO ADECUADA	Menor de 2	Mayor de 0.5
ACEPTABLE	Entre 2 y 5	Entre 0.5 y 0.2
BUENA	Entre 5 y 10	Entre 0.2 y 0.1
EXCELENTE	Mayor de 10	Menor de 0.1

5. RESULTADOS.

5.1 ASOCIACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS IgG ANTI *Chlamydia* EN SUERO Y LA PRESENCIA DE INFECCIÓN ACTIVA DE *C. trachomatis*.

Se estudiaron 100 muestras de suero y de raspado cervicovaginal de pacientes con diagnóstico de infertilidad. A cada uno de los sueros se les determinó el título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia*, con la técnica de microinmunofluorescencia, la muestra se consideró positiva cuando más del 30% de las células infectadas exhibieron fluorescencia de inclusiones de *Chlamydia trachomatis* en el citoplasma, como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Células infectadas con *C. trachomatis*, muestra positiva.

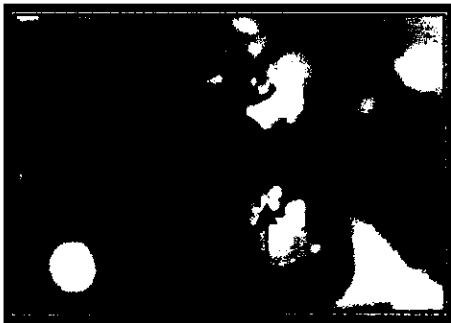
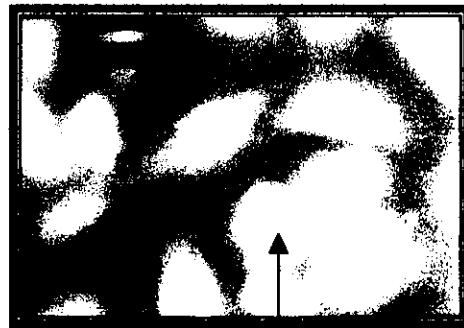


Figura 3. Células infectadas con *C. trachomatis*, muestra negativa.



Células Infectadas. Cuerpos reticulares con fluorescencia. Células infectadas que no exhiben fluorescencia.

Por el contrario, la muestra se consideró negativa cuando menos del 30% de las células infectadas exhibieron fluorescencia de inclusiones de *Chlamydia trachomatis* en el citoplasma, o la exhibición de fluorescencia se encontró ausente como se muestra en la figura 3.

El diagnóstico de la infección activa se realizó mediante la prueba de Gen-Probe la cual detectó 10/100 pacientes con infección. De las pacientes con infección, tres presentaron un título 1:8, cinco presentaron un título 1:512 y dos un título 1:1024 de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* en suero.

Tabla 2. Asociación entre el título de anticuerpos anti *Chlamydia* y el diagnóstico de infección por hibridación en fase líquida.

Títulos	CON INFECCION	SIN INFECCIÓN	P < 0.05
1:8 +	10	70	N.S.
	0	20	
<u>1:128</u> +	7	24	0.009
	3	66	
<u>1:256</u> +	7	19	0.002
	3	71	
<u>1:512</u> +	7	18	0.001
	3	72	
1:1024 +	2	8	N.S.
	8	82	

N.S., no significativo.

Con respecto al diagnóstico serológico para la detección de infección con *C. trachomatis*, los títulos de corte 1:128, 1:256 y 1:512, resultaron ser significativos en el diagnóstico; mientras que los títulos de corte 1:8 y 1:1024 resultaron ser no significativos. La edad promedio de las pacientes que presentaron infección por *C. trachomatis* fue de 31 años. La edad límite inferior de este grupo fue de 23 años y la edad límite superior fue de 45 años. El predominio más alto de infección por *Chlamydia* se encontró en jóvenes adultos, asociado principalmente a la vida sexual activa.

La determinación de el título de corte óptimo para el diagnóstico serológico de la infección por *C. trachomatis* se llevo a cabo mediante el análisis de las características más importantes de cada título; como es la sensibilidad, la especificidad, la proporción de la probabilidad de un resultado positivo[LR(+)] y la proporción de la probabilidad de un resultado negativo[LR(-)](Tabla 3).

Tabla 3. Características de los títulos de anticuerpos IgG asociados significativamente a la infección por *C. trachomatis*.

DIAGNOSTICO	SEROLOGICO	DE	INFECCIÓN	POR
		<i>C. trachomatis</i>		
Títulos	Sensibilidad	Especificidad	LR(+)	LR(-)
1:8	100%	22%	1.2 (NA)	0.0 (E)
<u>1:128</u>	70%	73%	2.6 (A)	0.4 (A)
<u>1:256</u>	70%	78%	3.1 (A)	0.3 (A)
<u>1:512</u>	70%	80%	3.5 (A)	0.3 (A)
1:1024	20%	91%	2.2 (A)	0.8 (NA)

NA = Prueba no adecuada. A = Prueba aceptable. B = Prueba buena. E = Prueba Excelente.

El título de corte adecuado para realizar el diagnóstico serológico de una infección activa fue de 1:512 ya que esta dilución presentó la mayor significancia y la mejor combinación de sensibilidad y especificidad, además, de que las proporciones de probabilidad de resultados positivos y negativos, lo calificaron como aceptable.

5.2 ASOCIACIÓN ENTRE EL TÍTULO DE ANTICUERPOS IgG ANTI *Chlamydia trachomatis* Y LOS DATOS LAPAROSCOPICOS.

Se ha determinado una fuerte asociación entre la positividad de anticuerpos anti *Chlamydia trachomatis* y la presencia de EPI. Por lo que en esta parte del estudio se determinó la asociación entre los diferentes títulos de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* y la presencia de los siguientes desordenes ginecológicos diagnosticados por laparoscopia: Adherencias, Miomas, Obstrucción Tubo ovárica(OTB), EPI y Endometriosis. De los 100 pacientes con infertilidad 25 presentaron adherencias, 3 presentaron miomas, 9 presentaron OTB, 4 presentaron EPI, 11 presentaron endometriosis y 48 no presentaron desordenes ginecológicos (Tabla 4).

Tabla 4. Título de anticuerpos anti *Chlamydia trachomatis* en pacientes con diferentes desordenes ginecológicos.

	S/DESORDEN GINECOLOG.	EPI	ADHERENCIA	OTB	MIOMAS	ENDOMETRIOSIS
NEGATIVOS	12	0	6	1	0	1
1:8	25(2)	2	8	4(1)	3	7
1:128	1	0	1	2	0	1
1:256	1	0	0	0	0	0
1:512	6(2)	0	6(2)	1	0	2(1)
1:1024	3	2(1)	4(1)	1	0	0
TOTAL DE PACIENTES	48	4	25	9	3	11

(Número) = Detección positiva de *C. trachomatis* por hibridación en fase líquida.

De las 48 pacientes sin desordenes ginecológicos 11 pacientes mostraron títulos de anticuerpos 1:128; además 2 de ellos mostraron infección activa (1:512); de los pacientes con EPI, 2 presentaron un título 1:1024 y 10 pacientes con adherencia presentaron un título 1:512 (3 con infección activa).

Con respecto a la asociación entre el título de anticuerpos y la presencia de adherencias se muestra en la Tabla 5 los títulos de anticuerpos IgG anti *Chlamydia*, 1:256 y 1:512, fueron significativos y la mayor significancia lo presentó el título 1:512.

Tabla 5. Asociación entre el título de anticuerpos anti *Chlamydia* y la presencia de adherencia.

Títulos		CON ADHERENCIA	SIN ADHERENCIA	P < 0.05
1:8	+	20	60	N.S.
	-	5	15	
1:128	+	11	20	N.S.
	-	14	55	
<u>1:256</u>	+	10	16	0.05
	-	15	59	
<u>1:512</u>	+	10	15	0.04
	-	15	60	
1:1024	+	4	6	N.S.
	-	21	69	

N.S., no significativo.

La asociación entre la enfermedad pélvica inflamatoria y la presencia de anticuerpos anti *Chlamydia* fue evaluado estadísticamente tal y como se muestra en la Tabla 6. El título 1:1024 de anticuerpos IgG anti *Chlamydia*, resultó ser la única dilución significativa para asociarse con la presencia de EPI.

La presencia de miomas y endometriosis no se lograron describir por títulos de anticuerpos. Con respecto a la obstrucción tubo ovárica, se sabe que este padecimiento se asocia a la presencia de infección con *Chlamydia trachomatis*, sin embargo, en este estudio no se logró describir por título de anticuerpo.

Tabla 6. Asociación entre los títulos de anticuerpos anti *Chlamydia* y la presencia de la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI).

Títulos		CON EPI	SIN EPI	P < 0.05
1:8	+	4	48	N.S.
	-	0	14	
1:128	+	2	13	N.S.
	-	2	49	
1:256	+	2	12	N.S.
	-	2	50	
1:512	+	2	11	N.S.
	-	2	51	
<u>1:1024</u>	+	2	3	0.02
	-	2	59	

N.S., no significativo.

Para poder determinar el título de corte óptimo para el diagnóstico serológico de la presencia de adherencias y EPI, se determinaron las características más importantes de cada título; como es la sensibilidad, la especificidad, la proporción de la probabilidad de un resultado positivo[LR(+)] y la proporción de la probabilidad de un resultado negativo [LR(-)] (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de la prueba serológica anti *Chlamydia* para el diagnóstico de adherencia.

	DIAGNOSTICO	DE	ADHERENCIAS	
Títulos	Sensibilidad	Especificidad	LR(+)	LR(-)
1:8	80%	20%	1.0 (NA)	1.0 (NA)
1:128	44%	73%	1.6 (NA)	0.7 (NA)
<u>1:256</u>	40%	78%	1.8 (NA)	0.7 (NA)
<u>1:512</u>	40%	80%	2.0 (A)	0.7 (NA)
1:1024	16%	92%	2.0 (A)	0.9 (NA)

NA = Prueba no adecuada. A = Prueba aceptable. B = Prueba buena. E = Prueba Excelente.

Con respecto a los resultados, sobre el título de anticuerpos y la presencia de adherencia, se observó que la sensibilidad disminuye y la especificidad aumenta al ir aumentando la dilución. El análisis de las proporciones de probabilidad de resultados positivos y negativos, categorizaron a esta prueba serológica de diagnóstico de *C. trachomatis* como no adecuada para describir la presencia de adherencia en pacientes infértiles (Tabla 7).

Tabla 8. Diferentes niveles de anticuerpos IgG anti *Chlamydia*, asociados a la presencia de la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI).

	DIAGNOSTICO	DE	EPI	
Títulos	Sensibilidad	Especificidad	LR(+)	LR(-)
1:8	100%	22%	1.2 (NA)	0.0 (E)
1:128	50%	79%	2.3 (A)	0.7 (NA)
1:256	50%	80%	2.5 (A)	0.6 (NA)
1:512	50%	82%	2.7 (A)	0.6 (NA)
<u>1:1024</u>	50%	95%	10.0 (B)	0.5 (A)

NA = Prueba no adecuada. A = Prueba aceptable. B = Prueba buena. E = Prueba Excelente.

En cuanto a los resultados del título de anticuerpos IgG anti *C. trachomatis* asociados con la presencia de EPI, se muestra en la Tabla 8 que el título adecuado para el diagnóstico serológico fue el título 1:1024. La prueba presentó a este título una sensibilidad del 50% y una especificidad del 95%, además, se categorizó como buena en la proporción de probabilidades de resultados positivos y como aceptable en la proporción de probabilidades de resultados negativos.

6. DISCUSIÓN.

La determinación de la prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* se ve influenciada por varios factores entre los que se encuentra la técnica empleada, la población de estudio y otros.

La prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en este estudio fue del 10% en mujeres infértiles. Aunque existe diferencia en los ensayos, se observa que la prevalencia reportada en este trabajo es menor a las prevalencias reportadas en la población anglosajona y se encuentra dentro de las reportadas en México (9-10%).

Una de las pruebas empleadas para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* es la detección de anticuerpos anti *Chlamydia*. Meikle y col.⁴¹ Determinaron que el título 1:16 de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF, kit VIRGO), es adecuado para la detección de infección por *C. trachomatis*. En este trabajo, los resultados mostraron que el diagnóstico serológico de infección activa con *Chlamydia trachomatis*, se puede realizar a las diluciones 1:128, 1:256 y 1:512, siendo estos significativos con respecto al diagnóstico de infección activa, un título mayor a estos resultó no ser significativo en el diagnóstico, debido posiblemente a que la concentración de anticuerpos disminuyó. Aunque en 8 pacientes se logró detectar la presencia de anticuerpos anti *Chlamydia*, a la dilución 1:1024 sin presencia de infección activa cabe señalar que el microorganismo podría estar presente en órganos genitales superiores, por lo que no se debe descartar que la dilución 1:1024 pudiese describir una infección activa. Otra posibilidad podría ser que la paciente donde no se logró identificar al microorganismo, hubiese tenido una infección reciente de otros microorganismo como *Salmonelosis*, *Bartonelosis* ó de *Rickeettsia*, ya que estos microorganismos presentan reacción cruzada con *Chlamydia trachomatis*. Finalmente cabe señalar que el título de

anticuerpos adecuados fue de 1:512 ya que este mostró una sensibilidad y una especificidad de 70% y 80% respectivamente.

La asociación entre la presencia de anticuerpos y el diagnóstico de infección descrita por Minassian y col.⁴² describe el porcentaje de predicción que tienen los títulos de anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis* determinados por una prueba de ELISA. Estos autores mostraron que la infección de *Chlamydia* se diagnostica correctamente en un 87%.

Con respecto a la asociación entre el título de anticuerpos y la presencia de EPI, se ha descrito que de cada 12 mujeres infértiles con daño tubárico, 8 mujeres tienen una historia clínica de EPI, además de presentar títulos de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* de 1:1024. Sin embargo, Mattila y col⁴³ han realizado determinaciones de anticuerpos IgG contra *C. trachomatis* en pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria utilizando la técnica de Inmunoensayo enzimático (EIA) con un título de corte 1:16. A este título aumenta la sensibilidad de la prueba, sin embargo, disminuye la especificidad por lo que se ve reflejado en la proporción de resultados serológicos positivos sin la presencia de EPI, ya que en 19 pacientes con EPI sólo 9 fueron positivos.

En este trabajo el título mayor fue de 1:1024 en el cual se detectó en 2/4 pacientes con EPI, mientras que 8/62 sin EPI fueron positivos. Aunque la EPI se ha clasificado en leve, moderada y severa, cabe señalar que el estudio laparoscópico no puede describir que tan leve es la enfermedad pélvica inflamatoria, y posiblemente algunas de estas pacientes cursaban con un fenómeno inflamatorio en los órganos genitales superiores y tal y como se ha demostrado en algunos líquidos peritoneales donde la detección de citocinas como FNT- α en mujeres infértiles ha demostrado la presencia de un fenómeno inflamatorio en aquellas mujeres que no presentan sintomatología.

Con respecto a las pacientes que presentaron resultados serológicos negativos en este trabajo y que además presentaron adherencia u OTB; posiblemente el agente etiológico

fue diferente a *Chlamydia trachomatis*, ya que estos padecimientos pueden ser causados por otros microorganismos. Sin embargo, aunque es supuesto de que la infección por *Chlamydia*, da lugar a la formación de anticuerpos persistentes, hay evidencias de que los títulos de IgG pueden disminuir con el tiempo. Durante un período de 3-6 años, Puolakkainen y col.⁴⁴, encontraron una disminución significativa en los títulos de IgG en 26 pacientes (43%). Por otro lado, Chaim y col.⁴⁵ (1992) encontraron que de 18 pacientes seropositivos, 15 pacientes presentaron una disminución en las concentraciones de IgG en un intervalo de 5 años, sin embargo, ningún paciente se volvió seronegativo, mientras que Henry-Suchet y col. ⁴⁶(1994) encontraron títulos de IgG decrecientes en 22% de las pacientes durante 12 meses continuos y en dos (4%) pacientes se presentó la seroconversión, de positivo pasaron a ser negativos.

Los títulos de anticuerpos pueden permanecer elevados por un período largo de tiempo y no presentar desorden ginecológico, por lo que los resultados serológicos positivos de las pacientes que no mostraron adherencias o EPI de este trabajo son atribuidos a estas etapas inaparentes de la infección, o a posibles reacciones cruzadas.

En este trabajo, se presentaron títulos significativos de anticuerpos anti *Chlamydia trachomatis* en el diagnóstico de adherencias, pero debido a la baja sensibilidad que presentaron los títulos de anticuerpos, se determinó como una prueba no apropiada. Existen estudios similares, como es el caso de Kane y col.⁴⁷ que reportan una sensibilidad del 30% y una especificidad del 88%, por lo que se presentó como una prueba no aceptable en la proporción de resultados negativos(LR(-)). Moore y col.⁴⁸ es también un caso similar ya que reporta una sensibilidad del 54% y una especificidad de 100%, por lo que se presentó como una prueba al límite de lo aceptable en la proporción de resultados negativos. Por el contrario, existen estudios donde se han encontrado la especificidad baja, como es el caso de Anestad y col.⁴⁹ que reportan una sensibilidad del 88% y una especificidad del 45%, por lo que se encontró como una prueba no aceptable en la

proporción de resultados positivos (LR(+)). Sin embargo, Guderian y Trobough⁵⁰ reportan una sensibilidad 83% y una especificidad de 84%, por lo que se presentó como una prueba buena en la proporción de resultados positivos y negativos (Tabla 9).

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad de la prueba de microinmunofluorescencia para el diagnóstico de adherencia.

Autor	Antígeno	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	LR(+)	LR(-)	Título de corte
Kane y col. (1984)	DK	30	88	2.6(A)	0.8(NA)	8
Moore y col. (1982)	B-J	54	100	0.0(E)	0.5(A)	16
Anestad y col. (1987)	L ₂	88	45	1.6(NA)	0.3(A)	8
Guderian y Trobough (1986)	L ₂	83	84	5.2(B)	0.2(B)	8

NA = Prueba no adecuada. A = Prueba aceptable. B = Prueba buena. E = Prueba Excelente.

En este trabajo la baja sensibilidad pudo deberse a posibles reacciones cruzadas entre *Chlamydia trachomatis* y otros microorganismos dando de esta manera falsos positivos. Aunque también pudo deberse al método estándar de comparación (hibridación en fase

líquida Pace-2), debido a que este necesita de 24 o más unidades formadoras de inclusión para que la muestra sea positiva por lo que en menor cantidad de bacterias puede ser dado como un falso negativo.

Una de las limitantes en este trabajo es el tipo de muestra, que también pudo influir en la baja sensibilidad ya que una infección activa de órganos genitales superiores pudo no haberse detectado en el raspado cervico vaginal.

Con respecto a los miomas y la endometriosis, no se lograron describir por títulos de anticuerpos, como se esperaba, ya que los orígenes de los miomas y la endometriosis por lo general son asociados con otros factores, además, se ha reportado que las mujeres con títulos de IgG negativo tienen una incidencia mayor de endometriosis y sus parejas sexuales un factor de esterilidad masculino más alto³². Con respecto a la obstrucción tubo ovárica se sabe que existe asociación entre la presencia de infección de *Chlamydia trachomatis* y el padecimiento, sin embargo, en este estudio no se logró describir este fenómeno.

Con respecto a los resultados de las proporciones LR(-) y LR(+), en este trabajo la microinmunofluorescencia como prueba diagnóstica de la presencia de adherencia no resultó adecuada, sin embargo para la enfermedad pélvica inflamatoria resultó ser aceptable a un título de corte de 1:1024. El diagnóstico serológico en general tiene un valor predictivo, debido a que tiene varias limitaciones como es la reacción cruzada que puede ocurrir entre especies de *Chlamydia* o con otros microorganismos, limitando la especificidad de la prueba, sin embargo, los datos estadísticos de este trabajo muestran que al categorizar la prueba, ésta es aceptable a un título de 1:512, con respecto al diagnóstico de infección por *C. trachomatis*.

7. CONCLUSIONES.

- La prevalencia de infección activa con *Chlamydia trachomatis* en pacientes que asisten a la clínica de infertilidad fue del 10%.
- El título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* 1:512 es el título de corte óptimo para el diagnóstico serológico de una infección activa por *Chlamydia trachomatis*.
- El título de anticuerpos IgG anti *Chlamydia* 1:1024 es el título de corte óptimo para realizar el diagnóstico serológico de una enfermedad pélvica inflamatoria.
- El diagnóstico serológico de anticuerpos anti *Chlamydia* realizado mediante un raspado cervico vaginal no es útil para predecir la presencia de OTB y adherencias.

8. REFERENCIAS.

1. J.D. Oriel, G.L.Ridgway (Eds). Infecciones genitales causadas por *Chlamydia trachomatis*. México: Editorial Científica , 1985: 10-12,15 .
2. Bob. A. Freeman (Eds). Microbiología . 22 edición. México: Ed. Nueva Editorial Interamericana, 1989: 771-784.
3. Land A. Jolande, Evers L.H. Johannes, Goossens J. Valere. How to use *Chlamydia* antibody testing in subfertility patients.Hum Reprod.1998;13:1094-8 .
4. Cates W., Wasserheit J.N. Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. Am. J. Obstet. Gynecol. 1991;164:1771-1781.
5. Cleary E. R., Jones B. R. Recovery of *Chlamydia trachomatis* from the endometrium in infertile women with serum antichlamydial antibodies. Fertil Steril.1985; 44:233-235.
6. Patton L. D., Elbhar A. M., Suchet H. J., Campbell A. L., Cappuccio A., Tannous W., Wang S.-p. Kuo C.-C. Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with posinfectious tubal infertility. Am J Obstet Gynecol. 1994;171:95-101.
7. Jones B. R., Ardery R. B., Hui L. S., Cleary E. R. Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. Fertil Steril.1982; 38:553-558.
8. Lucisano A, Morandoti G, Marana R. Chlamydial genital infections and laparoscopic findings in infertile women. Eur J Epidemiol.1992; 8: 645-9.
9. Peralman M, McNeely. A review of the microbiology, immunology and clinical implication of *Chlamydia trachomatis* infections. Obstet Gynecol.1992; 7:448-61.
10. Munday P.E. Clinical aspects of pelvic inflammatory disease. Hum. Reprod.1997; 2; 121 –126.

11. Sellors W. J., Mahony B. J., Chernesky A. M., Rath J. D. Tubal factor infertility: an association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis. *Fertil Steril.* 1988; 49: 451- 457.
12. Paukku M., Tulppala M., Poulakkainen M., Anttila T., Pavoneen J. Lack of association between serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* and a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1999; 72:427-430.
13. Dicker W. L., Mosure J. D., Levine C. W. *Chlamydia* positivity versus prevalence, what's the difference? *Sex Trans Dis.* 1998; 25:251-253.
14. Ward, M.E. Chlamydial vaccines-future trends. *J. Infect.* 1992; 25:S11-S26.
15. Sukumar P., Ida T., Ellena M., Peterson and De la Maza L. Immunization with an acellular vaccine consisting of the outer membrane complex of *Chlamydia trachomatis* induces protection against a genital challenge. *Infect. Immun.* 1997; 65:3361-3369.
16. Peeling R., Maclean I.W. and Brunham R.C. In vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibody to an epitope on the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 1984; 46:484-488.
17. Moulder W. James. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 1991; 55:143-190.
18. Bruham, R., C.-C. Kou, L. Cles, K. K. Holmes. Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the human endocervix. *Infect. Immun.* 1983; 39:1491-1494.
19. Caldwell D. Harlan, Perry J. Linda. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 1982; 38:745-754.
20. Howard V. Lawrence. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. *Infect. Immun.* 1975; 11:698-703.

21. Wenman W. M. and Meuser R. *Chlamydia trachomatis* elementary bodies possess proteins which bind to eucaryotic cell membranes. J. Bacteriol. 1986; 165:602-607.
22. Su H., Watkins G. N., Zhuang Y.-X., Caldwell D. H. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the Chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. Infect. Immun. 1990; 58:1017-1025.
23. Mahmoud E. A., Svensson L. O., Olsson S. E., Mardh P. A. Antichlamydial activity of vaginal secretion. Am. J. Obstet. Gynecol. 1995; 172:1268-1272.
24. Hackstadt T. Identification and properties of chlamydial polypeptides that bind eucaryotic cell surface components. J. Bacteriol. 1986; 165:13-22.
25. Vretou E., Goswami P. C., Bose S. K. Adherence of multiple serovars of *Chlamydia trachomatis* to a common receptor on HeLa and McCoy cells is mediated by thermolabile proteins. J. Gen. Microbiol. 1989; 135:3329-3337.
26. Domeika M., Domeika K., Paavonen J., Mardh P.A. and Witkin S.S. Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. J. Infect. Dis. 1998; 177:714-719.
27. Bustos-López H., Vázquez-Juárez M.E., Arredondo-García J. L., Lira-Placencia, Beltrán-zúñiga M., Guerra-Infante F.M. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con esterilidad y embarazo no complicados, Perinatol Reprod Hum. 1995; 9:227-234.
28. Scholes D., Stergachis A., Ichikawa E. L., Heidrich E. F., Holmes K. K., Stamm E. W. 1998. Vaginal douching as a risk factor for cervical *Chlamydia trachomatis* infection. Obstet Gynecol. 1998; 91:993-997.
29. Murray P. R., W. L. Drew (Eds). Microbiología Médica. Barcelona: Editorial Times Miror de España S.A., 1992: 267-277.

30. Robinson T. D. Evaluation and comparison of tests to diagnose *Chlamydia trachomatis* genital infections. Hum. Reprod. 1997; 2:113-120.
31. Meikle F. S., Zhang X., Marine M. W., Calonge N. B., Hamman F. R., Betz G. *Chlamydia trachomatis* antibody titers and hysterosalpingography in predicting tubal disease in infertility patients. Fertil Steril. 1994; 62:305-312.
32. Sharara FI, Queenan JT Jr, Springer RS, Marut EL, Scoccia B, Scommegna A. Elevated serum *Chlamydia trachomatis* IgG Antibodies. What do they mean for IVF pregnancy rates and loss? Reprod Med. 1997; 42: 281-6.
33. Barnes C. R. Laboratory diagnosis of human *Chlamydia* infections. Microbiol. Rev. 1989; 2:119-136.
34. Brade H., Brunner H. Serological cross-reactions between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Chlamydiae*. J. Clin. Microbiol. 1979; 10:819-822.
35. Maurin M., Eb. F., Etienne J., Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: Implications for diagnosis. J. Clin. Microbiol. 1997; 35:2283-2287.
36. Warren R., Dwyer B., Plackett M., Pettit K., Rizvi N., Baker A.-M. Comparative evaluation of detection assays for *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1663-1666.
37. Chernesky M., Luinstra K., Sellors J., Schachter J., Moncada J., Caul O., Fibms P. I., Mikaelian L., Toye B., Paavonen J., Mahony J. Can serology diagnose upper genital tract *Chlamydia trachomatis* infection? Sex. Trans. Dis. 1998; 1:14-19.
38. Echániz A. G., Calderón J. E., Camalla B. N., Soto N. A., Cruz V. A., Gatica M. R. Prevalencia de infección cervicovaginal por *Chlamydia trachomatis* en población femenina de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Salud Publica Mex. 1992; 34; 301-307.

39. Guerra Infante F.M., S. Flores Medina, M. Lopez Hurtado, I. E. Sosa Gonzalez, J. L. Arredondo Garcia. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Ginecol Obstet Mex. 1995; 63:368-373.
40. Griner P.F., Mayewski R.J. Mushlin A. I. Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic test and procedures. Principles and applications. Ann Intern. Med. 1981; 94:553-600.
41. Meikle S.F., Zhang X, Marine W. M. et al. *Chlamydia trachomatis* antibody titers and hysterosalpingography in predicting tubal disease in infertility patients. Fertil Steril. 1994; 62:305-312.
42. Minassian S.S., Wu C.H., Jungkind D., Gocial B., Filer R., Glassner M. *Chlamydia* antibody, as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay, in tubal factor infertility. J. Reprod. Med. 1990; 35:141-145.
43. Mattila A., Miettinen A., Heinonen P. K., Teisala K., Punnonen R., Paavonen J. Detection of serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* in patients with Chlamydial and nonchlamydial pelvic inflammatory disease by the IPAzyme *Chlamydia* and Enzyme Immunoassay. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 998-1000.
44. Poulakkainen M., Vesterinen E., Purola E., Saikku P., Pavoneen J. Persistence of chlamydial antibodies after pelvic inflammatory disease. 1986; 23:924-928.
45. Chaim W., Edelstein Z., Sarov B. and Sarov I. The long term followup of asymptomatic women with *Chlamydia trachomatis*. Arch. Gynecol. Obstet. 1992; 251:159-164.
46. Henry-Suchet J., Askienazy-Elbhar M., Thibon M. et al. Post-therapeutic evolution of serum chlamydial antibody titres in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertil Steril. 1994; 62:296-314.

47. Kane J.L., Woodland R.M., Forsey T. et al. Evidence of Chlamydial infection in infertile women with and without Fallopian tube obstruction. *Fertil Steril.* 1984; 42:843-848.
48. Moore D.E., Foy H.M., Daling J.R. et al. Increased frequency of serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertility due to distal tubal disease. *Lancet.* 1982; ii. 574-577.
49. Anestad G., Lunde O., Moen M. And Dalaker K. Infertility and *Chlamydia* infection. *Fertil Steril.* 1987; 48:787-790.
50. Guderian A.M., and Trobough G.E. 1986. Residues of pelvic inflammatory disease in intrauterine device users: a result of the intrauterine device or *Chlamydia trachomatis* infection? *Am. J. Obstet Gynecol.* 1986; 154:497-503.

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

- IgG = Inmunoglobulina G.
- EPI = Enfermedad pélvica inflamatoria.
- CE = Cuerpo elemental.
- CR = Cuerpo reticular.
- ATP = Trifosfato de adenosina.
- MOMP = Proteína principal de membrana externa.
- LGV = Linfgranuloma venéreo.
- IgA = Inmunoglobulina A.
- IgM = Inmunoglobulina M.
- Hsp₆₀ = Proteína de *Chlamydia trachomatis* de 60 kDa.
- Chsp₆₀ = Proteína de humano de 60 kDa.
- OTB = Obstrucción tubo ovárica.
- HSG = Histerosalpingografía.
- CRNA_r = RNA ribosomal de *Chlamydia trachomatis*.
- DNA_c = DNA copia.
- RLU = Unidades relativas de luz.
- LR(+) = Proporción de la probabilidad de resultados positivos.
- LR(-) = Proporción de la probabilidad de resultados negativos.
- EIA = Inmunoensayo enzimático.
- FNT_α = Factor de necrosis tumoral alfa.

10. APÉNDICE.

SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS (PBS).

Cloruro de sodio 8.0 g.

Fosfato dibásico de potasio 0.2 g.

Fosfato monobásico de sodio 2.9 g.

Cloruro de potasio 0.2 g.

Disolver en 800 mL de agua desionizada.

Ajustar a pH 7.4.

Aforar con agua desionizada hasta 1000 mL