

11661

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTITLAN**

**IMPLEMENTACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR) PARA EL DIAGNOSTICO DE *Chlamydia trachomatis*  
EN MUJERES CON INFECCION GENITAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(AREA MICROBIOLOGÍA)  
P R E S E N T A  
JOSE TOMAS HERNANDEZ MENDEZ**

**DIRECTORES DE TESIS  
EVERARDO CURIEL QUESADA  
ABEL CIPRIAN CARRASCO**

**Cuatitlán Izcalli, Estado de México.**

**2004**



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.

Este trabajo fue realizado por el **QBP. José Tomás Hernández Méndez**, en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Bioquímica y en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del **Dr. Everado Curiel Quesada** y del **Dr. Abel Ciprián Carrasco**.

Este trabajo fue financiado por **La Coordinación de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional** a través del programa “**Diagnóstico caracterización citoquímica y epidemiológica de *Chlamydia trachomatis***”, clave 931309, con el proyecto “**Identificación de *Chlamydia trachomatis* por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**”, clave 952338.

## DEDICATORIAS

### Fin de etapa

De vez en vez

y durante el transcurso de la vida  
es necesario hacer un alto.

En este fin de etapa

Hagamos un alto

para repasar lo vivido  
y decir ....

Que agradezco a la UNAM  
la formación docente y  
Académica que me dió.

2004

José Tomás  
✍

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Everardo Curiel Quesada** por permitirme incorporarme a su extraordinario grupo de trabajo y porque su participación en el presente trabajo es parte de su ser científico.

Al **Dr. Abel Ciprian Carrasco**, por el apoyo recibido durante toda mi permanencia en la Facultad y porque el representa a los extraordinarios maestros que nos formaron.

A las siguientes personas por su apoyo, comentarios, sugerencias e intercambio de experiencias que fueron de gran utilidad para llegar a los resultados obtenidos: **Dr. Miguel Castro** de los Laboratorios Bio-Synthesis, Inc. Texas, USA, **Dr. Timmo Hyppiä** de la Universidad de Turku, Finlandia, **QBP. Víctor Juárez** y **QFB.Héctor de Baz** del Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), **Dr. Fernando Morales Martínez** del Instituto de Biotecnología de la UNAM, **Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez** y **Dr. Juan Carlos Canseco** del Laboratorio de Acidos Nucléicos del Departamento de Bioquímica de la ENCB y a la **Dra. María Valdés Ramírez** del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Departamento de Microbiología de la ENCB.

A los miembros del jurado, **Dra. Silvia Giono Cerezo**, **Dra. Cristina Escalante Ochoa**, **Dra. Susana Mendoza Elvira**, **Dr. Everardo Curiel Quesada** y **Dr. Abel Ciprian** por el tiempo dedicado para la revisión del trabajo y por sus observaciones, comentarios y sugerencias al mismo.

## JURADO

<b>Presidente:</b>	DRA. SILVIA GIONO CEREZO
<b>Vocal:</b>	DRA. CRISTINA ESCALANTE OCHOA
<b>Secretario:</b>	DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
<b>Primer suplente:</b>	DR. EVERARDO CURIEL QUESADA
<b>Segundo suplente:</b>	DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

## DATOS BIBLIOGRAFICOS

### **JOSE TOMAS HERNANDEZ MENDEZ**

Químico Bacteriólogo y Parasitólogo por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

**Experiencia Profesional:** Profesional L en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Instituto Nacional de Pediatría del 1-XII-1973 al 30-VII-1983.

**Experiencia docente:** Profesor de asignatura B. ENEP-IZTACALA. UNAM del 1-IX-1978 al 31-XII-1980. Ayudante de Profesor. Facultad de Medicina, UNAM del 1-II-1976 al 31-XII-1978. Profesor de Carrera de la ENCB-IPN del 1-III-1982 a la fecha participando en licenciatura y en posgrado.

**Trabajo desarrollado relacionado con el tema de la presente tesis:** Durante el tiempo transcurrido desde el término de la parte experimental del presente trabajo, se aplicó la PCR implementada a diversos grupos de población: mujeres embarazadas (frecuencia de 2.4%) para *Chlamydia trachomatis*, mujeres con antecedentes de enfermedad de transmisión sexual (30%), adolescentes (9%), meretrices (20.5%) y hombres (12.9%). Además el hallazgo en pacientes mexicanas de cepas de *C.trachomatis* que no presentan el plásmido permitió realizar el estudio de la diferenciación fenotípica de cepas de *C. trachomatis* asociada a la presencia del plásmido pCT. También se hicieron estudios sobre el citoesqueleto de células McCoy infectadas y no infectadas con la bacteria. Se implementó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que pone de manifiesto un fragmento del gen *omp1* que codifica para la proteína mayor de membrana externa (MOMP). El trabajo anterior dio lugar a la formación de seis maestros en ciencias, en donde el sustentante del presente trabajo fungió como asesor y dos direcciones de tesis de licenciatura, una publicación internacional, 13 comunicaciones a congresos o reuniones y la divulgación del trabajo por medio de invitaciones a conferencias. Por otra lado, se recibió el Premio a la Investigación en el IPN 1996-1997 en el Programa Institucional de Salud por participación en el proyecto: "Diagnóstico, caracterización citoquímica y epidemiológica de *Chlamydia trachomatis*"

## RESUMEN

*Chlamydia trachomatis* presenta un cromosoma y un plásmido llamado pCT. Es el microorganismo más frecuente como causa de enfermedades de transmisión sexual. Se estima que 90 millones de casos nuevos se presentan cada año a nivel mundial, de estos, más de 4 millones de casos se presentan en los Estados Unidos de Norteamérica. En México, aun cuando se reconoce su importancia no se conoce la magnitud real del problema. En los estudios realizados en México, se han utilizado diversas metodologías, sin embargo no se ha descrito la implementación y el desarrollo de una técnica de biología molecular para la investigación de la bacteria en muestras clínicas. El objetivo del trabajo fue investigar *C. trachomatis* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida al pCT. Para establecer las condiciones de la PCR, se obtuvo y trabajó con una transformante de *Escherichia coli* portadora del plásmido pLGV125. El diagnóstico se realizó con muestras cervicovaginales de 58 pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología y 35 que acudieron al servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud. Las muestras fueron lisadas con lisozima y con proteinasa K. La PCR se realizó con un ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C, y 30 ciclos de amplificación con desnaturalización de 1 min a 94°C, alineación de 1 min a 63°, extensión de 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. La demostración del amplificado de 200 pb del pCT se hizo en geles de agarosa al 0.8%-bromuro de etidio. Del Servicio de Ginecología se tuvo una prevalencia del 42.8%. Del Servicio de Planificación Familiar se obtuvo una prevalencia del 45.7%. Se establecieron las condiciones de la PCR para la investigación de *C. trachomatis* y se realizó el diagnóstico con esta metodología en 93 muestras clínicas.

**Palabras clave:** *Chlamydia trachomatis*, PCR, infección genital, prevalencia,

## ABSTRACT

*Chlamydia trachomatis* has a genome and a plasmid, pCT, is the most frequent cause of sexually transmitted disease in the world. Every year, an estimated 90 million new cases occurring each year worldwide, of these, about 4 million occur in the United States. In Mexico, even when is recognize its importance, isn't know the real magnitude of the problem. Studies in Mexico, have been used several methods however hasn't been reported the development of molecular diagnostic method for the investigation of the bacteria. In this study a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *C. trachomatis* was developed and evaluated. DNA of the pLGV125 plasmid was transformed en *Escherichia coli*, and DNA was purified and used for to establish the reaction conditions for the PCR and as positive control. Endocervical samples were taken for bacterial detection at 93 patients attending at the Clínica No. 6 de la Secretaría de Salud, México, 58 of the Gynecology Service and 35 of the Family Planning Service. The samples were lysed with lysozyme and proteinase K. The cycling conditions were as follows: one cycle of denaturation, 5 min at 94°C, 30 cycles of: denaturation, 1 min at 94°C; primer annealing, 1 min at 63°C; and extension, 1 min at 72°C, one cycle of extension 10 min at 72°C, each amplified sample was taken for electrophoresis on 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide. The rates of prevalence of chlamydial infection were 42.8% and 45.7%, respectively. The methodology for detection of *C. trachomatis* with PCR was developed and realized the diagnosis with this technique in 93 samples.

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*, PCR, Genital Infections, Prevalence.

## CONTENIDO

Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Jurado	v
Datos bibliográficos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Contenido	ix
Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1 Introducción	1
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 La familia <i>Chlamydiaceae</i>	1
1.3 Características de <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
1.4 Enfermedades causadas por <i>C. trachomatis</i>	14
1.5 Los métodos de laboratorio para el diagnóstico de las infecciones causadas por <i>C. trachomatis</i>	20
1.6 Antecedentes	29
1.7 Justificación	30
1.8 Hipótesis	31
2 Objetivos	32
3 Material y métodos	33
4 Resultados	53
5 Discusión	75
6 Conclusiones	85
7 Abreviaturas	86
8 Referencias	87
Anexos	99

## LISTA DE CUADROS

<b>CUADRO</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>PAGINA</b>
1	Características de las clamidias y de otros microorganismos	4
2	Diferenciación de las especies de importancia médica de la familia <i>Chlamydiaceae</i>	5
3	Características de los cuerpos elementales y de los cuerpos de inclusión de <i>Chlamydia trachomatis</i>	8
4	Enfermedades causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
5	Casos nuevos en México de tracoma durante 18 años	16
6	Casos nuevos en México de linfogranuloma venéreo durante 18 años	17
7	Métodos de laboratorio para el diagnóstico de <i>Chlamydia trachomatis</i>	23
8	Resultados obtenidos con inmunofluorescencia directa (IFD) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes que asistieron al Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	65
9	Resultados obtenidos con inmunofluorescencia directa (IFD) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes que asistieron al Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PAGINA
1	Modelo de la envoltura de <i>Chlamydia</i> spp	6
2	Cuerpo elemental de <i>Chlamydia trachomatis</i>	8
3	Inclusión con <i>Chlamydia trachomatis</i>	8
4	Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia trachomatis</i>	9
5	Representación esquemática del plásmido pLGV125 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	13
6	Casos nuevos de enfermedades de transmisión sexual de notificación obligatoria en México	19
7	Demostración por inmunofluorescencia directa de cuerpos elementales de <i>Chlamydia trachomatis</i>	24
8	Sensibilidades de las pruebas para investigar <i>Chlamydia trachomatis</i>	28
9	Purificación del plásmido pLGV125	54
10	Espectro de absorción del DNA del plásmido pLGV125	55
11	Caracterización del plásmido pLGV125 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	56
12	Producto amplificado de DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i> de 200 pb	58
13	Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el plásmido pLGV125 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	59
14	Demostración de <i>Chlamydia trachomatis</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras clínicas controles	60
15	Demostración de la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la investigación de <i>Chlamydia trachomatis</i>	61
16	Investigación de <i>Chlamydia trachomatis</i> en muestras cervicales utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
17	Pacientes positivas a <i>Chlamydia trachomatis</i> atendidas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	66
18	Pacientes positivas a <i>Chlamydia trachomatis</i> atendidas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	67
19	Diagnósticos clínicos de las pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	68
20	Diagnósticos clínicos de las pacientes que acudieron al Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	69

21	Lesiones presentadas en cérvix por las pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	70
22	Lesiones presentadas en cérvix presentadas por las pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	70
23	Tipo de secreción cervical que presentaron las pacientes del Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	71
24	Tipo de secreción cervical que presentaron las pacientes del Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	71
25	Edad de inicio de la actividad sexual de las pacientes estudiadas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud que fueron atendidas	72
26	Edad de inicio de la actividad sexual de las pacientes estudiadas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud y edad de la infección con <i>Chlamydia trachomatis</i> .	73
27	Métodos de control anticonceptivo utilizado por las pacientes del Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud y edad de la infección con <i>Chlamydia trachomatis</i>	74
28	Métodos de control anticonceptivo utilizado por las pacientes del Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

TRIC	Agentes del tracoma y de la conjuntivitis de inclusión
CE	Cuerpos elementales
CI	Cuerpos de inclusión
CDC	Centers por Disease Control (Centros para el control de enfermedades)
dATP	Desoxi adenosin trifosfato
dCTP	Desoxi citidin trifosfato
dGTP	Desoxi guanosin trifosfato
dTTP	Desoxi timidin trifosfato
dNTP's	Desoxiribonucléotidos
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Acido desoxirribonucleico)
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
IFD	Inmunofluoresencia directa
KDa	Kilodaltones
KDO	Acido -3-deoxi-D-mano-2-
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPS	Lipopolisacárido
MOMP	Mayor Outer Membran Protein (Proteína Mayor de membrana externa)
ng	Nanogramos
OMP2	Outer Membrana Protein 2 (Proteína de membrana externa 2)
OMP3	Outer Membrana Protein 3 (Proteína de membrana externa 3)
ORF	Open Read Frame (Marco de lectura abierta)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PLT	Agentes de la Psitacosis, el linfogranuloma y el tracoma
rRNA	Ribonucleic Acid (Acido ribonucleico ribosomal)
2SP	Medio de transporte 2 sacarosa fosfato

## 1 Introducción

### 1.1 Antecedentes históricos

Las enfermedades causadas por *Chlamydia trachomatis* son conocidas desde hace mucho tiempo. En el papiro de Ebers, se describen las características clínicas del **tracoma**, las civilizaciones China, Sumeria y Griega también conocían la enfermedad. El agente fue descrito en 1907 por L. Halberstaedter y S. von Prowasek al describir inclusiones intracitoplásmicas en raspados de conjuntiva de pacientes con la enfermedad. Tang *et al.*, cultivaron en 1957 en embrión de pollo al microorganismo. Gordon y Quan utilizaron en 1965 el cultivo de tejidos para aislar a la bacteria. Los bubones inguinales del **linfogranuloma venéreo**, fueron descritos desde hace doscientos años; entre los 1930's y los 1940's fueron identificadas las inclusiones que presentan las células infectadas por el agente etiológico; la bacteria fue aislada en 1930 por Rake *et al.*, utilizando saco vitelino de embrión de pollo. Jones *et al.*, describieron en 1959 el aislamiento del microorganismo a partir de la **conjuntiva** de un recién nacido con oftalmía neonatorum y del **cervix** de la madre del niño. Dunlop *et al.*, informaron en 1965 la presencia de unos microorganismos idénticos en varones con **uretritis no gonocócica** (Deleón y Hernández 2000).

### 1.2 LA FAMILIA *Chlamydiaceae*

#### 1.2.1 Nomenclatura y clasificación

A partir del aislamiento del microorganismo, se han realizado diversos estudios, inicialmente fue considerado un virus, ya que es un parásito intracelular obligado de las células eucarióticas, también se le relacionó con las bacterias en especial con el género *Rickettsia*, recibiendo diferentes denominaciones como "Magnovirus basófilos", *Chlamydozoon*, *Bedsonia*, *Mygawanella*, *Neo-Rickettsias*, para-*Rickettsias* y grupo PLT (siglas de las enfermedades Psitacosis, Linfogranuloma y Tracoma, en este grupo están considerados los agentes TRIC (TR por tracoma e IC por conjuntivitis de inclusión) (Taylor-Robinson y Thomas 1980).

Con base a estudios fenotípicos, morfológicos y genéticos realizados en 1945 por Jones, Rake y Page; en 1971 por Storz y Page y por Moulder en 1984, las clamidias se encuentran en el volumen 1 del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática en la SECCION 9, LAS RICKETTSIA Y CHLAMYDIAS, Orden II *Chlamydiales*, FAMILIA I *Chlamydiaceae*, GENERO *Chlamydia*, con dos ESPECIES *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci* (Moulder 1984). Grayston *et al.*, (1990), describe una tercer especie: *Chlamydia pneumoniae* TWAR y Fukushi y Hirai (1992) proponen a *Chlamydia pecorum* como la cuarta especie del género. Everett *et al.*, (1999) estudiando los genes que codifican para el rRNA 16S y el rRNA 23S, revisaron la taxonomía de la familia *Chlamydiaceae*, clasificándola de la siguiente manera: **Orden Chlamydiales**, **Familia Chlamydiaceae**, con dos géneros: Género **Chlamydia**, con tres especies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*. Género *Chlamydophila*, con seis especies *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum*. **Familia Simkaniaceae**, Género *Simkania*, especie *Simkania negevensis* y **Familia Parachlamydiaceae**, Género *Parachlamydia*, especie *Parachlamydia acanthamoebae*. En la segunda edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, *C. trachomatis* está clasificada de la siguiente manera (Garrity 2002):

Dominio		<b>Bacteriadam</b>
Phylum	BXVI	<b>Chlamydiae</b>
Clase	I	<b>Chlamydiae</b>
Orden	I	<b>Chlamidiales</b>
Familia	I	<b>Chlamydiaceae</b>
Género	I	<b>Chlamydia</b>
Especie		<b>Chlamydia trachomatis</b>

### 1.2.2 Características diferenciales de las clamidias con otros grupos microbianos

Debido a que las clamidias son microorganismos intracelulares obligados, inicialmente se les consideró virus; la diferencia básica entre los virus y las clamidias, es que éstas poseen ribosomas y enzimas para realizar la síntesis de

proteínas y de ácidos nucleicos; comparte características con las bacterias ya que tienen una pared celular parecida a la de las Gram negativas, presentan DNA y RNA, son susceptibles a algunos antibióticos entre otros a las tetraciclinas y a la eritromicina y se multiplican por fisión binaria. Su diferencia principal es que presentan un ciclo de desarrollo único que no se observa en otros géneros de bacterias, ni en los virus (Nichols 1984). Cuadro 1.

### **1.2.3 Características diferenciales de las especies de importancia médica de la Familia *Chlamydiaceae***

Las especies de importancia médica tienen características comunes: son intracelulares obligadas, están íntimamente relacionadas con las bacterias Gram negativas ya que poseen membrana interna y externa, aunque no tienen una pared celular típica ya que no presentan una capa de peptidoglicano, son susceptibles a la D-cicloserina; microerofílicos, susceptibles a las tetraciclinas y a los macrólidos. La diferenciación se realiza con base a su huésped natural, la morfología que presentan los cuerpos elementales y los cuerpos de inclusión, presencia de glucógeno, susceptibilidad a las sulfonamidas, homología del DNA y a la presencia de DNA plasmídico (Moulder 1984; Murray 1997). Cuadro 2.

### **1.3 Características de *C. trachomatis***

La bacteria se caracteriza por ser una bacteria intracelular obligada, tiene pared celular similar a la de las bacterias Gram negativas y tiene un ciclo de desarrollo característico (Moulder 1985, Beaty 1994). Por mucho tiempo se creyó que dependía totalmente del ATP presente en la célula huésped, en la actualidad con el conocimiento de la secuencia del genoma de *C. trachomatis* por Stephens, *et al.*, (1998) se sabe que la clamidia para iniciar su actividad metabólica requiere de energía, por lo que al entrar a la célula huésped, importa adenosin trifosfato (ATP), al realizarse la diferenciación en el interior de la célula, la clamidia es capaz de sintetizar ATP durante su ciclo de desarrollo, por lo que no es un auxótrofo estricto de ATP (Lliffe-Lee y McClarty 1999).

**Cuadro 1. Características de las clamidias y de otros microorganismos**

<b>CARACTERISTICA</b>	<b><i>Chlamydia</i></b>	<b><i>Rickettsia</i></b>	<b><i>Mycoplasma</i></b>	<b>BACTERIA<sup>+</sup></b>	<b>VIRUS</b>
Crecimiento en medios de cultivo	NO	NO*	SI	SI**	NO
Presencia de pared celular	SI	SI	NO	SI	NO
Genera energía metabólica	NO	SI	SI	SI	NO
Depende para su multiplicación del ácido nucleico de la célula huésped	NO	NO	NO	NO	SI
Realiza síntesis de proteínas con sus propias enzimas	SI	SI	SI	SI	NO
Se multiplica por fisión binaria	SI	SI	SI	SI	NO
Sensible a antibióticos	SI	SI	SI	SI	NO
Acidos nucleicos	ADN ARN	ADN ARN	ADN ARN	ADN ARN	ADN ó ARN
Multiplicación inhibida con:					
Anticuerpos	SI	SI	SI	NO	SI
Antibióticos	SI	SI	SI	SI	NO
Tamaño	0.2-0.4 $\mu\text{m}$	0.3 x 1-2 $\mu\text{m}$	0.2 – 0.8 $\mu\text{m}$	0.2–0.5 x 1 $\mu\text{m}^{\circ}$ hasta 0.2 - 0.6 x 1.0 – 10 $^{\circ\circ}$	0.018-0.026 $\mu\text{m}^1$ hasta 0.3 $\mu\text{m}^2$

+ Diferentes a *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Mycoplasma*.

\* Excepto *Rochalimaea quintana*

\*\* Excepto *Mycobacterium leprae* y *Treponema pallidum*

$^{\circ}$  *Bordetella*     $^{\circ\circ}$  *Mycobacterium* 1 *Parvovirus* 2 *Poxvirus*

ADAPTADO DE: Nichols (1984, p632) y Taylor-Robinson (1980, p206).

**Cuadro 2. Diferenciación de las especies de importancia médica de la familia *Chlamydiaceae***

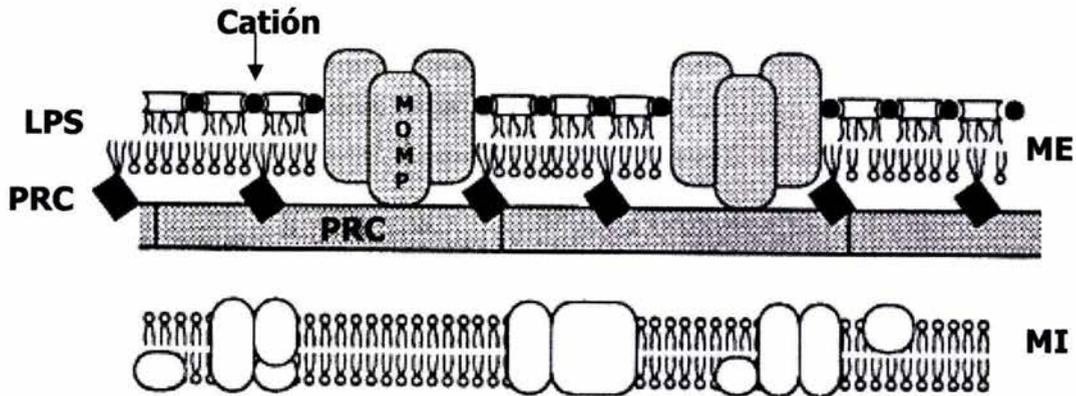
<b>CARACTERISTICA</b>	<b><i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b><i>Chlamydophila psittaci</i></b>	<b><i>Chlamydophila pneumoniae</i></b>
Huésped natural	PATOGENO PRIMARIO DEL HUMANO	PATOGENO PRIMARIO DE ANIMALES	PATOGENO PRIMARIO DEL HUMANO
Enfermedades en el humano	TRACOMA LGV* INFECCIONES GENITALES	PSITACOSIS	FARINGITIS NEUMONIA BRONQUITIS SINUSITIS ATEROSCLEROSIS
Número de serovariedades	18	2	1
Morfología del Cuerpo elemental	REDONDO	REDONDO	FORMA DE PERA
Morfología del cuerpo de inclusión	REDONDO Y VACUOLAR	VARIABLE Y DENSO	REDONDO Y DENSO
Presencia de glucógeno en las inclusiones	SI	NO	NO
Susceptibilidad a las sulfas	SI	NO	NO
% DE G + C	42-45	39-43	40
Presencia de DNA extracromosómico	SI	SI	NO

\* LGV Linfogramuloma venéreo.

ADAPTADO DE: Murray (1997, p371) y Walker (1995, p666-667).

### **1.3.1 La pared celular**

*C. trachomatis* presenta una envoltura trilaminar parecida a la que presentan las bacterias Gram negativas, presentan una membrana externa y una membrana interna (Raulston 1995), aunque carece de ácido murámico (Fox 1990). Los principales componentes de la membrana externa son un lipopolisacárido (LPS), La Proteína Principal de Membrana Externa (MOMP, por sus siglas en inglés: Mayor Outer Membrane Protein) y son específicos del género *Chlamydia*, una proteína de choque térmico (HSP-60), otras proteínas denominadas OMP2 y la OMP3, las cuales son ricas en cisteína (Figura 1) y una hemaglutinina, además



**Figura 1. Modelo de la envoltura de los cuerpos elementales de *Chlamydia* spp.** En la figura se muestran la proteína principal de membrana externa (MOMP), dos proteínas ricas en cisteína (PRC), el lipopolisacárido (LPS), la membrana externa (ME) y la membrana interna (MI).

Tomado de: Hatch (1996, p3)

por microscopía electrónica se observan unas proyecciones que se extienden desde la membrana interna y llegan hasta la superficie (Schachter 1990, Raulston 1995) (Figura 2). Las proteínas ricas en cisteína dan la rigidez estructural a las clamidias debido a las interacciones disulfuro entre estas proteínas y tienen un papel funcional equivalente al peptidoglicano que presentan otras bacterias (Hatch 1996).

**1.3.1.1** El lipopolisacárido (LPS), presenta D-glucosamina, fosfatos y el Lípido A. Este es un glicolípidido ácido 3-deoxi-D-manosa-oct-2-ulosónico (Kdo), el cual está presente en todas las especies de *Chlamydia*, constituyendo el epitopo específico de género. El LPS de clamidia tiene baja actividad endotóxica (Kosma 1999).

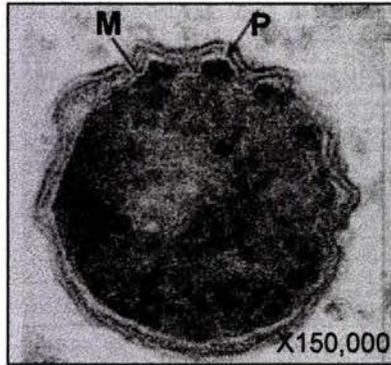
**1.3.1.2** La MOMP es una glicoproteína rica en manosa y constituye el 60 % del peso de las proteínas presentes en la membrana externa, tiene un peso molecular de aproximadamente 40,000 daltones, es el principal antígeno de la bacteria, ya que la proteína esta compuesta de 4 dominios (VDsI, VdsII, VdsIII y VdsIV) que presentan los epitopos específicos para especie, subespecie y serovariedades (Su *et al.* 1990). De estas se reconocen 19 serovariedades, las

cuales están relacionadas con la enfermedad que causan en el ser humano: serovariedades A, B, Ba, C, agentes etiológicos del tracoma, serovariedades D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K responsables de infecciones genitales y las serovariedades L1, L2, L2a, L3 relacionadas con el linfogranuloma venéreo (Grayston y Wang 1975; Wang y Grayston 1991; Ossewaarde 1994); es una molécula dimérica rica en cisteína, que al reducirse sus enlaces disulfuro en el interior de la célula huésped, actúa como porina, permitiendo el paso de nutrientes a través de la membrana. También se ha descrito que la proteína MOMP participa en la adherencia a la célula huésped y a células HeLa y células McCoy (Su 1990; Raulston 1995; Kuo 1996). Además ha sido empleada como candidato en la preparación de vacunas (Stagg 1998).

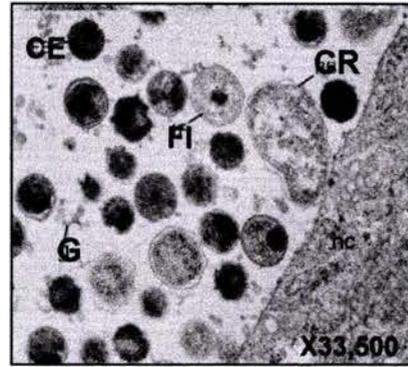
### 1.3.2 Ciclo de desarrollo

Las clamidias poseen un ciclo de desarrollo biológico exclusivo, en este se presentan dos formas, la primera denominada **cuerpo elemental** (Figura 2), la integridad estructural de éste, y como se mencionó anteriormente, esta dada por la unión de las proteínas MOMP, OMP2 y OMP3 a través de puentes disulfuro, lo que le confiere resistencia a los factores ambientales, permitiéndole sobrevivir después de la lisis de la célula huésped, así como durante el subsecuente tránsito de célula a célula, así como de huésped a huésped y la segunda, llamada **cuerpo reticular** (Figura 3). Los cuerpos de inclusión son menos rígidos que los cuerpos elementales, lo que las hace ser formas altamente lábiles que no sobreviven fuera de la célula huésped (Moulder 1984; Beaty 1994). Algunas de las características de los cuerpos elementales y de los cuerpos reticulares se describen en el Cuadro 3.

El ciclo de desarrollo de *C. trachomatis* se caracteriza por 4 fases esenciales con una duración de 48 a 72 horas. Esta duración depende de la serovariedad infectante, el tipo de célula afectada y las condiciones del medio ambiente (Moulder 1991). Figura 4.



**Figura 2. Cuerpo elemental de *Chlamydia trachomatis*.**  
Se observa la membrana interna (M) y las proyecciones (P) que presenta la bacteria.



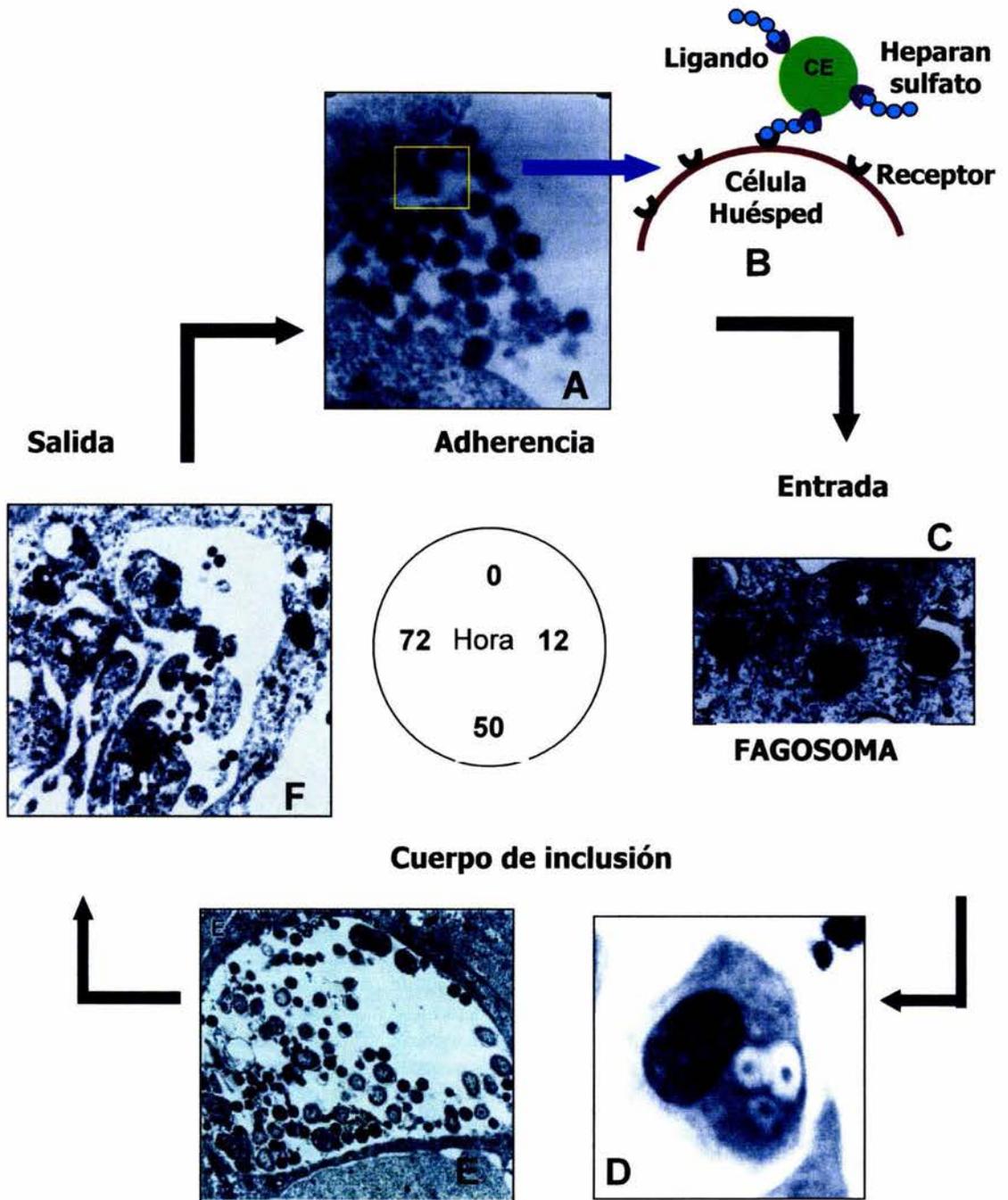
**Figura 3. Inclusión con *Chlamydia trachomatis*.**  
Dentro de la vacuola se observan cuerpos elementales (CE), Formas intermedias (FI), cuerpos reticulares (CR) y glucógeno (G).

Tomado de: Schachter (1990. p700-701).

**Cuadro 3. Características de los cuerpos elementales y de los cuerpos reticulares de *Chlamydia trachomatis***

CARACTERÍSTICAS	CUERPOS ELEMENTALES	CUERPOS RETICULARES
Diámetro (nm)	200-400	600-1500
Proliferativos	No	Si
Antigénico	Si	No
Infecioso	Si	No
Localización	Extracelular	Intracelular
Metabólicamente	Inactivos	Activos

Adaptado de Moulder (1984. p730).



**Figura 4. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia trachomatis*.**

La microfotografía A (x15,000) y dibujo B muestran la adherencia de la bacteria a células McCOy. En la microfotografía C (x28,560) y en la fotografía D (x100) se observa a la bacteria dentro de una vacuola. En la microfotografía E (x5,600) se ven cuerpos elementales, formas intermedias y cuerpos reticulares. En la microfotografía F (x75,00) se observa la salida de cuerpos elementales.

Las fotografías A y F fueron proporcionadas por López Villegas E. El dibujo B fue tomado de Stephens, 1994. p100. Las fotografías C y E fueron tomadas de Raulston, 1995. p608. La fotografía D fué proporcionada por Rendón Castañón G.

**Adherencia de los cuerpos elementales a la célula huésped.** Se han descrito al menos dos mecanismos de adherencia, en el primero, la MOMP se une al receptor de la célula huésped por medio de interacciones electrostáticas y por interacciones hidrofóbicas entre los dominios VdsII y VdsIV de la proteína MOMP (Su 1990). Recientemente se ha propuesto un segundo mecanismo de adherencia en el que un glicosaminoglucano parecido al heparan sulfato, sintetizado por *C. trachomatis* y presente en su superficie, se une a los receptores de las células, esta unión es necesaria para una subsecuente entrada e invasión de *Chlamydia*. (Figuras 4A y 4B). También se ha descrito que la adherencia puede efectuarse por dos proteínas, una de 18 kDa y otra de 32 kDa (Zhang y Stephens 1992; Chen y Stephens 1997; Stephens 1999).

**Entrada de los cuerpos elementales a la célula huésped.** Se ha propuesto que la entrada de *C. trachomatis* a la célula blanco es por fagocitosis parásito específica, por endocitosis mediada por receptor o por la fagocitosis dependiente de microfilamentos, dependiendo de la serovariedad infectante, dando lugar a un fagosoma (Figura 4C), cuando hay adherencia y entrada de más un cuerpo elemental, los fagosomas formados pueden fusionarse presentando generalmente una vacuola por célula infectada. La sobrevivencia intracelular se da por la inhibición de la unión fagosoma-lisosoma, este fenómeno es dirigido por la bacteria, ya que se ha demostrado que cuando se trabaja con bacterias muertas por calentamiento, hay adherencia y entrada y además ocurre la fusión de los lisosomas, con la consecuente destrucción de la bacteria (Ridderhof 1989, Moulder 1991).

**Reorganización.** Los cuerpos elementales sufren transformaciones metabólicas y morfológicas y en un periodo no superior a las 8 horas dan lugar a los cuerpos reticulares, esta es la forma metabólicamente activa y se divide por fisión binaria. En su interior la vacuola presenta cuerpos reticulares, formas intermedias y

cuerpos elementales, ya que el ciclo de desarrollo es asincrónico, además hay partículas de glucógeno. Este proceso dura de 18 a 48 horas. Figuras 4D y 4E.

**Salida.** Reorganización de los cuerpos de inclusión en cuerpos elementales, estos son liberados por medio de la lisis de la célula huésped o por medio de la fusión de la vacuola con la membrana de la célula sin haber lisis. Este proceso tarda de 48 a 60 horas, en cada ciclo se originan de 100 a 1,000 cuerpos elementales, los cuales al infectar otra célula dan origen a un nuevo ciclo infeccioso. (Figura 4F) (Moulder 1991; Hackstadt 1999).

### 1.3.3 EI DNA

En la actualidad se conoce la secuencia genómica completa de 143 bacterias, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/bacteria](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/bacteria)), de las cuales, 62 son de importancia médica, de estas se han obtenido seis secuencias pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae*, cuatro cepas de *Chlamydomphila pneumoniae* (la AR39, la CWL029, la JI38 y la TW183, una de *Chlamydomphila caviae* GPIC, *Chlamydia murinarum* reconocida antes como *C. trachomatis* MoPn (Read 2000) y ***C. trachomatis*** serovariedad D (Stephens 1998). La publicación de las secuencias de cepas han abierto nuevas áreas de estudio en donde se analizan diferentes aspectos de la bacteria (Subtil 2004).

El DNA de *C. trachomatis* consiste de un cromosoma y de un plásmido (Moulder 1984). El genoma es de los más pequeños que se encuentran entre las bacterias que se aíslan del ser humano (Kingsbury 1969).

El estudio de la secuencia genómica de *C. trachomatis* serovariedad D revela que el cromosoma tiene 1,024,519 (58.7% es A + T) pares de bases, presenta 894 genes que codifican para proteínas y de las cuales, solo 4% son similares a las proteínas de otros microorganismos (Stephens *et al.* 1998,

<http://www.berkeley.edu:4231//Chlamydia>, GenBank número de acceso AE001273, [whhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Lovett *et al.*, citado por Thomas (1997) describieron que *C. trachomatis* presenta un plásmido y es diferente de los plásmidos encontrados en las otras especies de *Chlamydia*. Palmer y Falkow (1986) por clonación en el vector **pBR322** y con análisis de restricción, estudiaron el plásmido **pCHL1**, que se encuentra en las serovariedades B, C, D, E, F, G, L1 y L2 de esta bacteria, encontrando que el plásmido es común de especie y se presenta en 10 copias por célula. Posteriormente se determinaron las secuencias de nucleótidos de los plásmidos **pCTT1** por Sriprakash y Macavoy en 1987, presente en la serovariedad B, **pCHL1** obtenido de la serovariedad L2 por Comanducci *et al.*, en 1988, **pLGV440** presente en la serovariedad L1 por Hatt *et al.*, en 1988) y **pCHL1** obtenido de la serovariedad D por Comanducci *et al.*, en 1990. Al realizar el análisis comparativo de estas secuencias, se encuentra que el plásmido denominado actualmente **pCT**, independientemente de la serovariedad de la que se obtenga, presenta menos de 1% de variación de la secuencia de nucleótidos, lo que indica que el plásmido es altamente conservado y similar entre las serovariedades, presenta 7,500 pb, se describen ocho marcos de lectura abierta (ORFs Open Reading Frame por sus siglas en inglés), que permite, al compararlos con las secuencias de otros ORFs, proponer su posible función: ORF 1, codifica para una proteína similar a la helicasa de *Salmonella typhimurium* y de *Bacillus*, ORF 3 codifica para una proteína de 28Kda como lo informó Comanducci *et al.*, en 1993. ORF 7, codifica para una proteína similar a la recombinasa de *Campylobacter jejuni*, ORF 8, codifica para una proteína con función de integrasa. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genome structure](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genome_structure), número de acceso 001372. (Figura 5). La función que desempeñan las restantes proteínas no está definida por lo que se le considera un plásmido críptico.

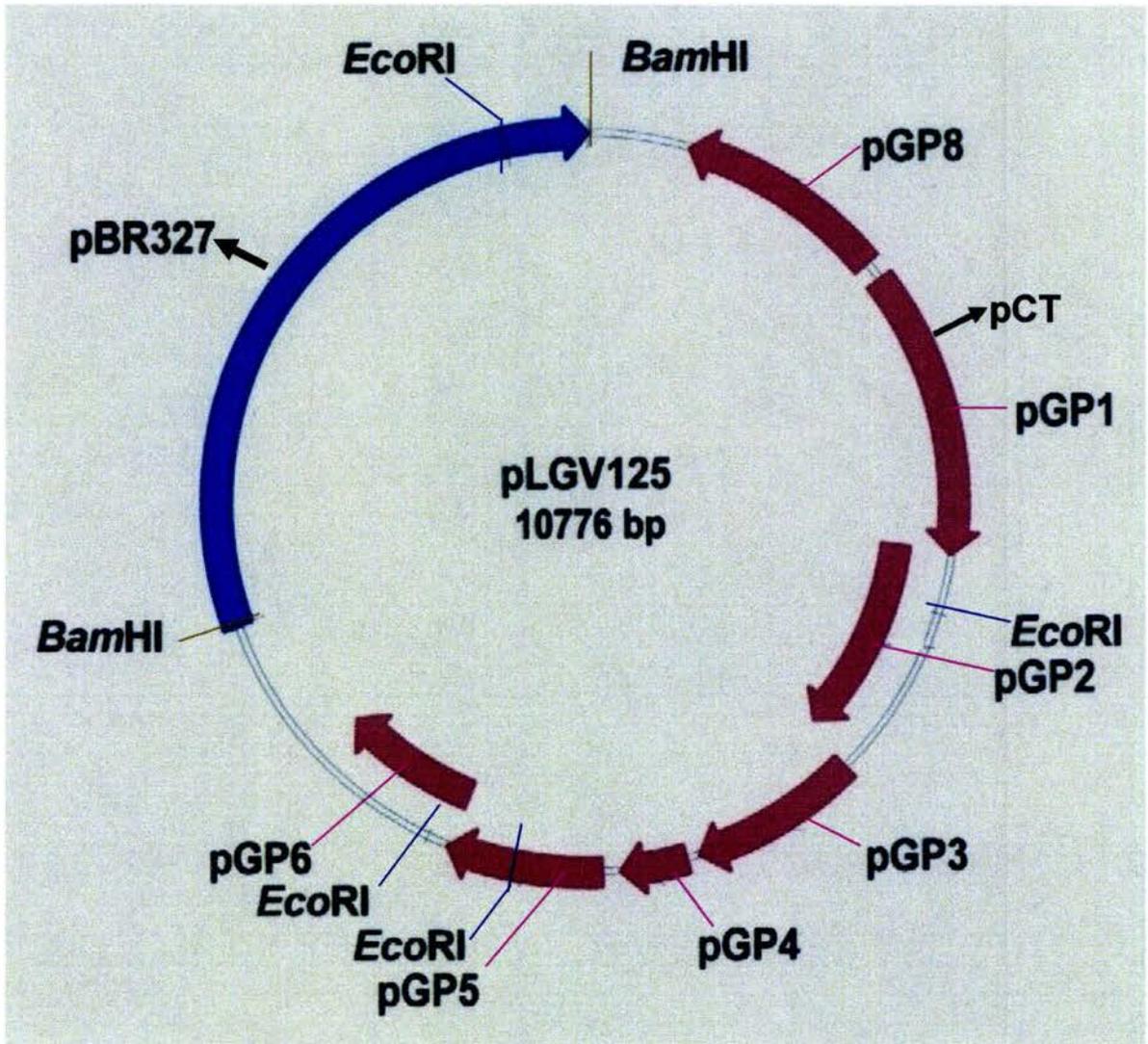


Figura 5. Representación esquemática del plásmido pLGV125 de *Chlamydia trachomatis*.

El plásmido pLGV125, tiene como vector al plásmido multicopia pBR327 (flecha azul), con inserción en el sitio *Bam*HI del plásmido pLGV440 de *C. trachomatis* serovariedad L<sub>2</sub> (flechas rojas). En esta figura se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI y 7 genes (pGP1 al 6 y 8) del pLGV440, El pBR327 se inserta en el pGP 7.

Diseñado con el programa Vector NTI, v6 por el Dr. Everardo Curiel Quesada

La bacteria se ha agrupado en 3 biovariedades con base en estudios de homología del DNA genómico y a la comparación de secuencias de DNA de genes específicos, la del tracoma y la del linfogranuloma venéreo que son esencialmente idénticas, y la biovariedad murina que tiene poca relación genética con las biovariedades anteriores y afecta solamente a ratones, causándoles neumonitis, además presenta una hibridación cruzada muy limitada con las biovariedades antes mencionadas (Stephens 1999). Como se describió en el inciso 1.3.1, el microorganismo con base a la MOMP presenta 19 serovariedades relacionadas al cuadro clínico del paciente (Wang y Grayston 1991; Ossewaarde 1994). *C.trachomatis* es un patógeno exclusivo del hombre, aunque se ha descrito el aislamiento a partir de hurones y de cerdos. Tiene afinidad por el epitelio cilíndrico y es el agente etiológico del tracoma y del linfogranuloma venereo, además es la causa más frecuente de las enfermedades transmitidas por contacto sexual, entre las que se encuentran las infecciones genitales, infecciones de recto y de conjuntiva que se infecta cuando las secreciones genitales se ponen en contacto con este sitio anatómico; así mismo es responsable de infecciones en recién nacidos, de madres sintomáticas o asintomáticas. (Cuadro 4). (Schachter 1999; Jones 2001).

#### **1.4.1.1 Tracoma**

El tracoma básicamente es una queratoconjuntivitis folicular crónica que evoluciona desde el estadio de queratoconjuntivitis discreta hasta vascularización de las corneas y la aparición de ceguera en los casos en que la infección progresa. El tracoma es endémico y es un problema de salud en África, La India, El sureste de Asia, Latinoamérica, Australia y las islas del pacífico. Se estima que hay en el mundo 500 millones de personas con tracoma, de los cuales, de 7 a 9 millones sufren ceguera (Jones 2001). En México, el tracoma se ha observado como un padecimiento antiguo en los altos de Chiapas, Durango, Sonora y Tabasco (Deleón y Hernández 2000). En México, es de notificación obligatoria y los

casos nuevos se reportan desde 1985 en el Anuario Estadístico de la SSa. Cuadro 5. ([www.epi.org.mx/infoepi](http://www.epi.org.mx/infoepi)).

**Cuadro 4. Enfermedades causadas por *Chlamydia trachomatis***

ESPECIE	BIOVARIEDAD	SEROVARIEDAD	ENFERMEDAD
<i>C. trachomatis</i>	TRACOMA	A, B, Ba, C	TRACOMA
	TRACOMA	D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K.	<b>MUJER:</b> CERVICITIS URETRITIS SALPINGITIS PROCTITIS ENDOMETRITIS PERIHEPATITIS EMBARAZO ECTOPICO INFERTILIDAD ENDOMETRITIS CONJUNTIVITIS FARINGITIS <hr/> <b>RECIÉN NACIDO:</b> CONJUNTIVITIS DE INCLUSIÓN NEUMONÍA OTITIS MEDIA <hr/> <b>HOMBRE :</b> URETRITIS EPIDIDIMITIS SÍNDROME DE REITER CONJUNTIVITIS FARINGITIS PROCTITIS.
	LINFOGRANULOMA VENEREO	L1, L2, L2a, L3	LINFOGRANULOMA VENEREO

Adaptado de Murray (1997. p373).

**Cuadro 5. Casos nuevos en México de tracoma durante 18 años**

<b>AÑO</b>	<b>CASOS</b>	<b>AÑO</b>	<b>CASOS</b>	<b>AÑO</b>	<b>CASOS</b>
1985	1	1991	144	1997	21
1986	118	1992	151	1998	16
1987	371	1993	202	1999	38
1988	324	1994	156	2000	NSRC
1989	243	1995	98	2001	NSRC
1990	241	1996	57	2002	NSRC

NSRC = No se reportaron casos

Tomado de: [www.epi.org.mx/infoepi/Anuarioestadistico](http://www.epi.org.mx/infoepi/Anuarioestadistico)

#### **1.4.1 Infecciones de la conjuntiva**

##### **1.4.1.2 Conjuntiviitis de inclusión**

En los adultos se trata de una conjuntivitis folicular generalmente benigna. El contagio de la conjuntiva suele producirse con material infectado del aparato genital de la pareja sexual o del propio paciente. Afectan al hombre, a la mujer y al recién nacido (Jones 2001). En México, se encontró en adultos con conjuntivitis folicular una incidencia del 64.5% (Gutiérrez 1997).

##### **1.4.2 Infecciones en genitales**

Las infecciones en genitales conocidas genéricamente como enfermedades de transmisión sexual (ETS) más estudiadas son el SIDA, la gonorrea, la sífilis y las infecciones causadas por *C. trachomatis*. Entre las enfermedades causadas por *C. trachomatis* se encuentra el linfogranuloma venéreo y varios síndromes que afectan a hombres, mujeres y recién nacidos de madres que presentan a la bacteria a nivel genital, en los Estados Unidos de Norteamérica, el Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta, Ga. (CDC por sus siglas en inglés, Center for Diseases Control), estima que se presentan aproximadamente 4 millones de infecciones nuevas anualmente. Se calcula que en el mundo hay 90 millones de casos nuevos cada año (Schachter 1999). En México en el Boletín de Epidemiología de la Secretaría de la salud ([www.epi.org.mx/infoepi.boletin](http://www.epi.org.mx/infoepi.boletin)) se informa el número de casos nuevos de linfogranuloma venéreo. Las otras

enfermedades causadas por *C. trachomatis*, aun cuando se reconoce su importancia (Acosta 1996), no se tiene un registro de ella y no se conoce la magnitud real del problema (Deleón y Hernández 2000).

#### 1.4.2.1 Linfogranuloma venéreo

Es una enfermedad de transmisión sexual tiene una distribución mundial, y es endémica en Africa, India, Sudeste de Asia, SudAmérica y el Caribe (Jones 2001). En México, es de notificación obligatoria y los casos nuevos se reportan desde 1988 en el Anuario Estadístico y en el Boletín de Epidemiología de la SSa (Cuadro 6) ([www.epi.org.mx/infoepi](http://www.epi.org.mx/infoepi)).

**Cuadro 6. Casos nuevos en México de linfogranuloma venéreo durante 18 años**

AÑO	CASOS	AÑO	CASOS	AÑO	CASOS
1988	365	1993	237	1998	438
1989	237	1994	265	1999	319
1990	242	1995	203	2000	241
1991	198	1996	265	2001	268
1992	243	1997	326	2002	304

Tomado de: [www.epi.org.mx/infoepi/Anuarioestadístico](http://www.epi.org.mx/infoepi/Anuarioestadístico)

#### 1.4.2.2 Infecciones genitales

Las infecciones en genitales representan dentro de las enfermedades infecciosas un problema de salud pública tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (CDC 2002, Pájaro 2001). En México, las ETS se presentan fundamentalmente entre gente joven en edad reproductiva y con vida sexual activa (Arredondo 1993; Calderón 1999). En el Boletín de Epidemiología de la Secretaría de la salud ([www.epi.org.mx/infoepi.boletín](http://www.epi.org.mx/infoepi.boletín)) las infecciones que son de notificación obligatoria son: las infecciones gonocócicas y la sífilis adquirida, ambas desde 1972, la sífilis congénita desde 1985, las ocasionadas por el virus de la inmunodeficiencia humana y por *Trichomonas vaginalis* desde 1985, el herpes

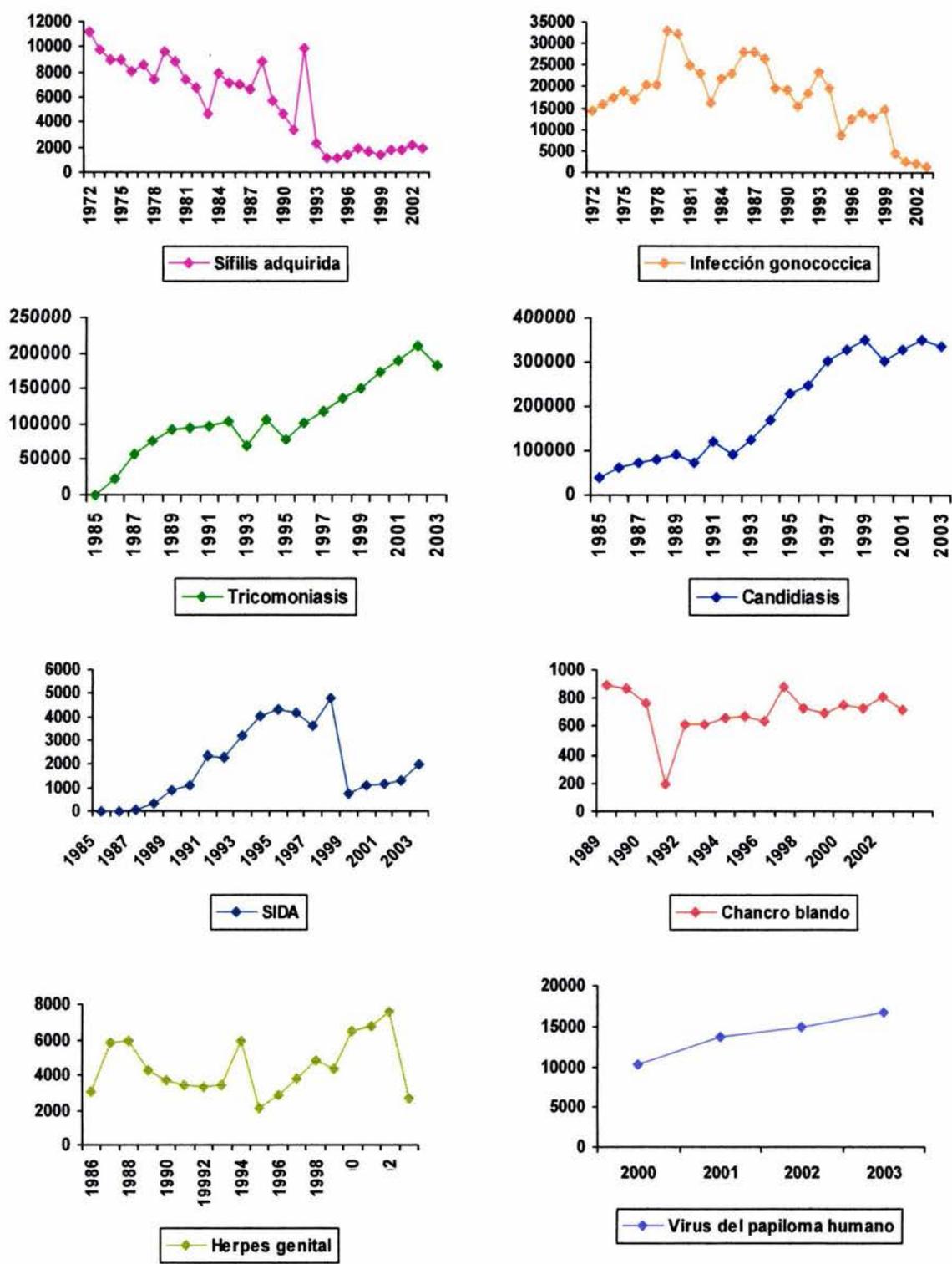
genital desde 1986. La candidiasis y el chancro blando se informan desde 1988. Las enfermedades causadas por el virus del papiloma humano son de notificación obligatoria a partir del 2000 (Figura 6). En la actualidad, la candidiasis es la enfermedad a nivel de genitales que se presenta con mayor frecuencia, seguida de los casos de tricomoniasis, en tercer lugar se presentan las infecciones gonocócicas. Las enfermedades causadas por *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* no son de notificación obligatoria y su importancia se conoce por informes de autores nacionales (Ortiz 1990, Arredondo 1993; González 1999; Cedillo 2000; Hernández 2000; Canto 2002).

#### **1.4.2.2.1 Infecciones en el hombre**

En el hombre la entidad clínica más frecuente es la uretritis no gonocócica, aunque también pueden presentarse casos como la proctitis, la epididimitis, el síndrome de Reiter, la conjuntivitis y la faringitis. De las uretritis no gonocócicas, se reporta que del 30 al 50% son causadas por *C. trachomatis* (Jones 2001). En México, Ibarra *et al.*, (1986) menciona la presencia de *C. trachomatis* en pacientes con uretritis en un porcentaje de 14% y la evaluación de la azitromicina por Jáuregui *et al.*, (1996) en 31 varones con uretritis causada por *C. trachomatis*.

#### **1.4.2.2.2 Infecciones en la mujer**

En la mujer, la diversidad de cuadros producidos por *C. trachomatis* es muy amplia: cervicitis, endometritis, salpingitis, proctitis, perihepatitis y síndrome uretral femenino. Las pacientes con cervicitis mucopurulenta presentan exudado purulento, generalmente amarillento o verdoso, ectopia, eritema, hipertrofia, dolor abdominal y sangrado. Los factores de riesgo para adquirir la infección son: tener relaciones sexuales con hombres con uretritis, edad de la paciente, número de parejas sexuales y la utilización de anticonceptivos orales. Cerca del 70% de las mujeres con infección en el aparato genital femenino son asintomáticas, constituyendo un reservorio muy importante para la transmisión de la enfermedad (Jones 2001). En México es el grupo más estudiado en la investigación de



**Figura 6. Casos nuevos de enfermedades de transmisión sexual de notificación obligatoria en México**

Tomado de: [www.epi.org.mx/](http://www.epi.org.mx/)

infecciones por *C. trachomatis*: en mujeres aparentemente sanas, Echaniz *et al.*, (1992), encontró una frecuencia del 4%, en adolescentes Arredondo *et al.*, (1993) informó una frecuencia del 4.3% y Fernández *et al.*, (1986) un 23%. En mujeres con infección genital se presenta en un 15% (Hernández 1992), un 28.4% (Rosas 1993) y un 3.3% por Reyes *et al.*, (1996), en mujeres embarazadas 9.8% (Narcio 1993), 15.5 % (Bustos 1995) y 10% (Díaz 1997). En mujeres con esterilidad, Rosas *et al.*, (1990) informan un 38%, Ibarra *et al.*, (1991) un 14% y Bustos *et al.*, (1995) un 18%.

#### **1.4.2.2.3 Infecciones en el recién nacido**

El recién nacido de madres con infección genital por *C. trachomatis* adquiere la infección al pasar por el canal del parto durante el nacimiento, del 24% al 44% pueden desarrollar conjuntivitis y del 11 al 20% pueden tener neumonía, de estos el 50% tiene antecedentes de conjuntivitis. Además la bacteria coloniza la nasofaringe, el recto, la uretra y la vagina (Jones 2001). En México se ha informado por Yescas *et al.*, (1993) que de 37 pacientes con conjuntivitis neonatal y que presentaron conjuntivitis refractaria al tratamiento tópico con antimicrobianos, 32 presentaron *C. trachomatis*. También hay casos con neumonitis (Fugura 1994), con neumonía (Ramírez 1994) y recién nacidos con dificultad respiratoria (Alvarado 1995; López 1999) en los que se ha demostrado la presencia de *C. trachomatis*.

### **1.5 Los métodos de laboratorio para el diagnóstico de las infecciones causadas por *C. trachomatis*** (Clyde 1984, Barnes 1989, Black 1997, Watson 2002).

#### **1.5.1 La toma de la muestra**

Para tener éxito en el aislamiento y/o identificación de *C. trachomatis*, se requiere de una excelente toma de la muestra, ésta se debe realizar, tomando en consideración que *C. trachomatis* es un microorganismo intracelular obligado. En las infecciones a nivel de mucosas, debe realizarse un raspado del sitio anatómico

en estudio, previa limpieza del área con el propósito de eliminar la secreción o exudado presente. Las muestras de secreción o de exudado no son adecuadas para el diagnóstico y no deben ser aceptadas para su procesamiento.

En el caso de las mujeres con infección a nivel de genitales o para la búsqueda de portadoras asintomáticas, la toma de la muestra se hace a partir del endocérvix, ya que el microorganismo coloniza el área de unión de los epitelios plano y cilíndrico del cérvix. En mujeres con actividad sexual se debe colocar un espejo vaginal antes de la toma de la muestra, en mujeres que refieran no haber tenido relaciones sexuales, la muestra debe tomarse a través del himen para tomar muestra de la pared vaginal. En mujeres que presentan complicaciones a nivel genital como enfermedad pélvica inflamatoria, el líquido peritoneal es la muestra de elección para el diagnóstico de laboratorio (Fernández 1986; Black 1997; Guerra 1994).

### **1.5.2 El transporte de la muestra**

La decisión de utilizar un medio de transporte para las muestras clínicas con sospecha de tener *C. trachomatis*, depende de la metodología que se va a emplear para el diagnóstico. Cuando la investigación de la bacteria se pretende realizar por métodos directos, la muestra se deposita en portaobjetos, se fija y se envía al laboratorio para su procesamiento, en este caso no es necesario utilizar medio de transporte a menos que se desee conservar la muestra o a que se vaya a emplear una metodología adicional. Cuando el método que se va a aplicar para realizar el diagnóstico es el aislamiento de la bacteria o una técnica de biología molecular o un inmunoensayo enzimático, es necesario utilizar un medio de transporte (Clyde 1984; Barnes 1989; Black 1997).

Si las muestras se van a procesar dentro de las primeras 24 horas después de su toma, es conveniente refrigerarlas a 4°C hasta su procesamiento, si no se procesan de inmediato, es necesario congelarlas a -70°C, cuando la muestra o los

aislamientos clínicos son conservados a – 20°C, puede presentarse disminución en la viabilidad o daño a la estructura antigénica de la bacteria por lo que no se recomienda la congelación a esta temperatura (Mahony 1985; Black 1997).

### **1.5.3 El diagnóstico de laboratorio**

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *C. trachomatis*, se realiza tomando en consideración su ciclo de vida, sus características antigénicas y el DNA presente en la bacteria. Con base a lo anterior, las metodologías que se utilizan nos sirven para: La demostración del agente etiológico; el aislamiento mediante el cultivo del agente causal; el uso de pruebas serológicas para determinar el título de anticuerpos y la utilización de técnicas de biología molecular. Cuadro 7.

#### **1.5.3.1 La demostración del agente etiológico**

Las técnicas que se utilizan para la demostración de *C. trachomatis* se basan en las formas que presenta la bacteria durante su ciclo de desarrollo.

##### **1.5.3.1.1 Las técnicas que ponen de manifiesto los cuerpos de inclusión**

Para poner de manifiesto los cuerpos de inclusión se han descrito y utilizado las siguientes tinciones: Giemsa, Papanicolaou, Gimenez, Macchiavello, y la de Hematoxilina-Eosina. Estas técnicas son de baja sensibilidad y no son específicas (Deleón 1994; Deléon y Hernández 2000).

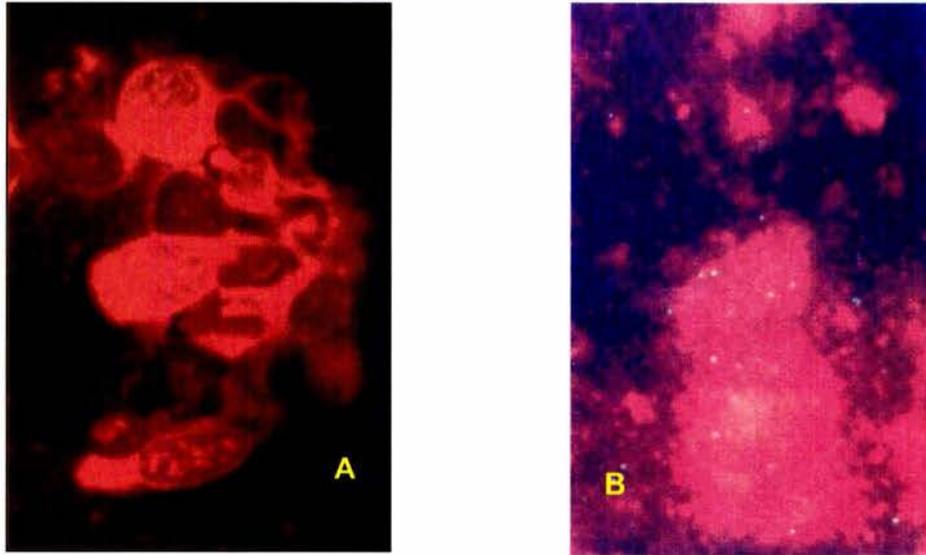
##### **1.5.3.1.2 Las Técnicas que ponen de manifiesto los cuerpos elementales**

Para efectuar el diagnóstico directo de infecciones por *C. trachomatis* para poner de manifiesto las estructuras antigénicas de la bacteria, se utiliza la inmunofluorescencia directa (IFD) (Figura 7) y el inmunoensayo enzimático. Se han desarrollado diversos equipos comerciales que emplean anticuerpos monoclonales contra la MOMP o contra el LPS (Microtrak, *Chlamydia trachomatis* Direct Specimen Test, SYVA Co. Pathfinder *Chlamydia* y DFA, Kallestad

Diagnósticos). Estos métodos son de alta sensibilidad y especificidad. También hay equipos comerciales que utilizan ensayo inmunoenzimático que ponen de manifiesto a la MOMP (Pathfinder *Chlamydia* Microplate, kallestad Diagnostics y al LPS (Farmacia *Chlamydia* EIA, Pharmacia Diagnostics; Chlamydiazime Diagnostic Kit, Abbot Laboratories; IDEIA *Chlamydia* Test, api Analytab Products). Estos métodos son de alta sensibilidad, comparados con las técnicas que usan colorantes para investigar los cuerpos de inclusión y de alta especificidad, mostrando escasa reacción cruzada con otros microorganismos (Clyde 1984; Barnes 1989; Black 1997).

**Cuadro 7. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis***

<b>DEMOSTRACION DE LA BACTERIA</b>		
<b>BÚSQUEDA DE CUERPOS DE INCLUSION</b>	<b>BÚSQUEDA DE CUERPOS ELEMENTALES</b>	<b>BÚSQUEDA DE CUERPOS ELEMENTALES Y DE CUERPOS DE INCLUSION</b>
Papanicolaou Giemsa Giménez Machiavello Yodo Hematoxilina-Eosina	Inmunofluorescencia ELISA Inmunoperoxidasa	Microscopía electrónica
<b>CULTIVO DE LA BACTERIA</b>		
<b>LINEAS CELULARES</b>	<b>CELULAS</b>	<b>ANIMALES</b>
Células McCoy Células HeLa 229 Células BHK 21 CélulasCHO	Macrófagos peritoneales	Embrión de pollo Ratón
<b>INVESTIGACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES</b>		
<b>HIBRIDACIÓN</b>		<b>AMPLIFICACIÓN</b>
PACE PACE 2		Reacción en cadena de la polimerasa Reacción en cadena de la ligasa Reacción de la QB replicasa
<b>SEROLOGIA</b>		
Fijación de complemento	Microinmunofluorescencia	ELISA



**Figura 7. Demostración por inmunofluorescencia directa de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis*.**

Las fotografías A y B son muestras cervicales teñidas con anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína dirigidos contra la proteína principal de membrana externa (MOMP). La fotografía **A** es una muestra negativa, la fotografía **B** presenta varios cuerpos elementales los cuales se observan de color verde.

La fotografía B fue tomada de Bañuelos, 1999.

### 1.5.3.2 Cultivo del agente etiológico.

El aislamiento del agente etiológico a partir de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección por *C. trachomatis* se puede realizar utilizando cultivos celulares como McCoy; HeLa 29, BHK-21, BGMK y las células de riñón de mono verde (CHO), además macrófagos peritoneales de ratón, embrión de pollo o inoculación en ratón (Black 1997; Deleón y Hernández 2000; Guerra 1992; Ibarra 1986). El método de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis* es el cultivo en células McCoy y su demostración por anticuerpos fluorescentes dirigidos contra la MOMP (CDC 1993; Black 1997).

### **1.5.3.3 Pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos**

Para el diagnóstico serológico de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, se ha descrito la fijación de complemento, la microinmunofluorescencia, la hemólisis simple radial y el ensayo inmunoenzimático, existen equipos comerciales que ponen de manifiesto anticuerpos IgG, anticuerpos IgM y anticuerpos IgA (Immucomb II, IgA e IgG, Organics ICN y Platelia *Chlamydia* IgG, Diagnostics Pasteur).

### **1.5.3.4 Investigación de *C. trachomatis* por técnicas moleculares**

El desarrollo de las técnicas de biología molecular, ha permitido que por medio del análisis de los ácidos nucleicos se efectúe el diagnóstico de laboratorio de algunas enfermedades infecciosas (Enns 1995; Tang 1997; Fredricks 1999; Aparicio, 1999).

Las técnicas que se han utilizado para la investigación de *C. trachomatis* son: La utilización de sondas genéticas para realizar pruebas de hibridación y el diagnóstico mediante métodos de amplificación (Peterson 1989; Curiel 2000).

#### **1.5.3.4.1 Pruebas de Hibridación**

Los primeros estudios sobre hibridación los realizaron Hyypiä *et al.*, (1984,1985), los cuales desarrollaron una prueba de hibridación en mancha para las serovariedades L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>. Los mismos autores hicieron la construcción de un plásmido, el cual tiene como vector al plásmido multicopia pBR327, insertándole en el sitio *Bam*H1 el plásmido pLGV440 de *C. trachomatis* serovariedad L<sub>2</sub>, llamándole pLGV125 (Figura 5). Además realizaron ensayos en muestras clínicas, en donde por medio de una técnica de hibridación pusieron de manifiesto el DNA cromosómico y el DNA plasmídico de *C.trachomatis*. La sensibilidad de estos estudios fue de 100 picogramos, equivalentes 10<sup>5</sup> moléculas ó 10 células infectadas.

Existen el comercio diversos equipos: El equipo PACE (Gen-Probe, San Diego, Cal., USA) con sensibilidad del 60% y especificidad del 95% comparado con el cultivo, con este equipo se detectan de  $10^3$  a  $10^5$  unidades formadoras de inclusión (UFI) (Peterson 1989) y el PACE-2, con sensibilidades del 75.5 al 77.2% y especificidades del 97.1 al 99.4% comparado con el cultivo (Black 1997; Blanding 1993; Kluytmans 1993; Clarke 1993).

#### **1.5.3.4.2 Pruebas de reacciones de amplificación**

Las técnicas de amplificación se basan en la utilización de fragmentos o sondas de nucleótidos conocidos como iniciadores o primers que hibridan entre dos regiones de secuencias conocidas para realizar una amplificación *in vitro* de este fragmento. Los métodos que se han descrito son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés) (Aparicio 1999; Ostergaard 1990; Vogels 1993; Welch 1990), RT-PCR, PCR utilizando transcriptasa reversa, PCR anidada (Nested PCR), PCR multiple, PCR de rango amplio y PCR en tiempo real (Tang 1997), la Reacción en Cadena de la Ligasa (Puolakkainen 1998; Schachter 1994; Schachter 1995) y la Q-beta replicasa (Shah 1994).

##### **1.5.3.4.2.1 La reacción en cadena de la polimerasa**

Los trabajos originales de la PCR fueron descritos por varios investigadores (Saiki 1985; Mullis 1986; Mullis y Fallona 1987). Las aplicaciones de esta técnica de biología molecular se han realizado en el análisis forense, en la antropología, en la arqueología, en la microbiología ambiental y prácticamente en todos los campos que tienen que ver con la salud, en especial y por el objetivo del presente trabajo, en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas (Sambrook 1989; Mathews 1998).

Para la investigación de *C. trachomatis* a partir de muestras clínicas, se han utilizado iniciadores dirigidos hacia secuencias del pCT, aprovechando el hecho

de que éste es multicopia; además como se mencionó en el inciso 1.3.3, está presente en las serovariedades de *C. trachomatis*. En el caso del genóforo bacteriano, se han usado iniciadores dirigidos contra fragmentos de diferentes genes, entre ellos, el que más se ha estudiado es el que codifica para la MOMP. También se han desarrollado reacciones de amplificación contra los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S y el gen de una proteína rica en cisteína (Curiel 2000).

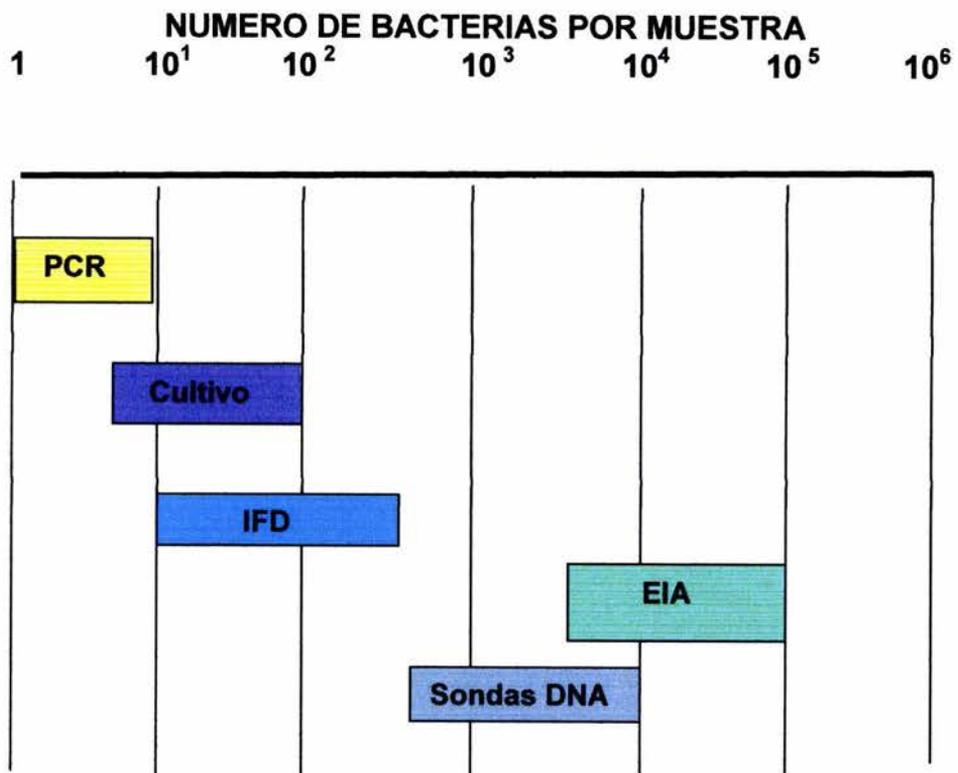
Para efectuar el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis* utilizando PCR, en la literatura se encuentran referencias que describen su desarrollo, aplicación y evaluación (Class 1991; Ostergaard 1990; Ossewaarde 1992; Vogels 1993).

Existe un equipo comercial, el de *Chlamydia* Amplicor PCR (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA), los iniciadores que se utilizan en esta prueba van dirigidos al pCT. Este equipo se ha evaluado tomando como método de referencia al cultivo celular con sensibilidades de 64 a 96 % y especificidades de 96 a 100% (Bianchi 1994; Black 1997; Loeffelholz 1992; Quinn 1996; Toye 1996).

La PCR dirigida contra el pCT ha sido evaluada ampliamente y la sensibilidad de ésta técnica es mejor que la de otros métodos, siendo capaz de detectar un cuerpo elemental (Figura 8), (Black 1997), y en la actualidad tiende a desplazar al cultivo como método de elección por su especificidad debido a que dos especies diferentes, difícilmente llegan a compartir una secuencia conocida de nucleótidos. Esta metodología no necesita el aislamiento del agente ni que el microorganismo este viable y el reporte del resultado se obtiene en un promedio de 5 horas y debería se utilizada como metodología de elección cuando no se requiere el aislamiento de la bacteria.

En el seguimiento de la PCR con la desnaturalización del DNA, la alineación y la polimerización del DNA, hasta el tercer ciclo se sintetizan dos moléculas de DNA

de 200 pb, en una PCR de 30 ciclos, se esperarían más de  $1 \times 10^6$  moléculas del producto esperado (Mathews 1998).



**Figura 8. Sensibilidades de las pruebas de laboratorio para investigar *Chlamydia trachomatis***

Tomado de: Black (1997.p173).

## 1.6 Antecedentes

En México, los métodos que se han utilizado para la búsqueda de *C. trachomatis* a partir de muestras clínicas incluyen: **1.-** El uso de frotis de material clínico al que se aplicaron técnicas que ponen de manifiesto los cuerpos elementales y los cuerpos de inclusión. Fernández *et al.*, (1986), estudiando adolescentes con infección genital utilizan la IFD. Sánchez *et al.*, (1989) tomaron muestras a mujeres que asistieron a la prueba de Papanicolaou, compararon esta técnica con la de IFD; Martínez *et al.*, (1990) evaluaron las técnicas de Giemsa y Machiavello con respecto a la IFD en pacientes con infección de conjuntiva; Hernández *et al.*, (1992) informan la investigación de la bacteria utilizando IFD, Giemsa y Papanicolaou; Deleón *et al.*, (1994) informa el valor de la técnica de Papanicolaou en el diagnóstico de la bacteria; Guerra *et al.*, (1994) evaluaron la sensibilidad y la especificidad de tres reactivos de IFD; Reyes *et al.*, (1996) informan el uso de IFD, Papanicolaou e inmunoperoxidasa en mujeres con leucorrea. **2.-** Las técnicas para el aislamiento de la bacteria, inoculando las muestras obtenidas por raspado de la zona afectada en diversos sistemas vivos, entre la utilizadas en México están el embrión de pollo por Escamilla *et al.*, (1984), Ibarra *et al.*, (1986), los macrófagos peritoneales de ratón por Guerra *et al.*, y las células McCoy por Echaniz *et al.*, (1992). Con estos estudios se conoce que el método utilizado en población mexicana más frecuentemente para la investigación de las clamidias es la IFD. En la bibliografía nacional consultada no se informa el desarrollo y uso de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de *C. trachomatis* a partir de muestras clínicas.

## 1.7 Justificación

*C. trachomatis* con 19 serovariedades es el agente etiológico de mayor incidencia en las enfermedades de transmisión sexual en muchas partes del mundo. Ocasiona un amplio espectro de entidades clínicas en hombres, mujeres y recién nacidos. En la mujer causa cervicitis y en casos complicados se puede presentar enfermedad pélvica inflamatoria, salpingitis y esterilidad. También puede haber uretritis. En el hombre produce uretritis, y cuando esta se complica puede presentarse epididimitis, prostatitis y esterilidad. Tanto en el hombre como en la mujer se pueden presentar casos de proctitis, conjuntivitis, faringitis y artritis. En recién nacidos de madres con *C. trachomatis* en genitales puede haber conjuntivitis y neumonía además de otitis, bronquiolitis, vulvitis y gastroenteritis. Algunas infecciones cursan en forma asintomática, un 25 % de hombres con infección uretral y un 76 % de mujeres con infección cervical no presentan síntoma alguno (Stephens 1999; Jones 2001).

El diagnóstico por el laboratorio se realiza utilizando metodologías que ponen de manifiesto a algunos antígenos de la bacteria, el aislamiento de la bacteria o técnicas de biología molecular que amplifican algún fragmento del genóforo bacteriano o del plásmido críptico. En México, los métodos de diagnóstico que se han utilizado más frecuentemente son la inmunofluorescencia directa (Fernández 1986; Guerra 1994; Hernández 1992; Martínez 1990 y Reyes 1996). El Papanicolaou (Deleón 1994; Reyes 1996; Sánchez 1989). Giemsa (Fernández 1986, Hernández 1992). Para el cultivo de la bacteria se ha utilizado el saco vitelino de embrión de pollo (Escamilla 1984; Ibarra 1986), el uso de macrófagos peritoneales (Guerra 1996) y la línea celular McCoy (Echaniz 1992).

Los reportes de la investigación en población mexicana de *C. trachomatis* por técnicas de biología molecular son escasos (Bañuelos 2000) por lo que es importante contar con esta metodología para identificar a esta bacteria y aplicarla a diversas poblaciones.

## 1.8 Hipótesis

Al determinar las concentraciones de los componentes de reacción, así como las condiciones de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa se podrá obtener un amplificado de un fragmento de 200 pb del plásmido pLGV125 y un fragmento de 200 pb del plásmido pCT de *Chlamydia trachomatis* cuando se encuentra presente en muestras cervicales de pacientes con infección genital.

## **2 Objetivo General**

Implementar y desarrollar la metodología para la detección de *Chlamydia trachomatis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **2.1 Objetivos particulares**

**2.1.1** Implementar y desarrollar la metodología para la detección de *C.trachomatis* por medio PCR, que ponga de manifiesto un fragmento del plásmido pCT.

**2.1.2** Determinar la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico de *C.trachomatis*.

**2.1.3** Aplicar la técnica de PCR en muestras con *C. trachomatis* y en muestras sin la bacteria.

**2.1.4** Determinar la prevalencia de *C. trachomatis* en mujeres con infección genital que acudieron al Servicio de Planificación Familiar y al Servicio de Ginecología de la Clínica # 6 de la Secretaria de la Salud.

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Material biológico

Bacterias: *Escherichia coli* K12, C600 con genotipo *supE44*, *hsdR*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1* y *tonA21*, con registro 154 del cepario del Dr. Everardo Curiel Quesada del Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Bacterias del Cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Neisseria gonorrhoeae* NRL 5001, *Gardnerella vaginalis* ENCB 188, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Salmonella typhimurium* ATCC 14208, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus sp*, *Acinetobacter calcoaceticus var anitratus* ATCC 19606, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ENCB 1280 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Las bacterias se mantienen a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Plásmido pLGV 125, construido con el plásmido pBR327 y el plásmido pCT (pLGV 440) de *C. trachomatis* proporcionado por el Dr. Timmo Hyppiä de la Universidad de Turku, Finlandia, Plásmido pLGV125 obtenido en el presente trabajo. DNA de *Chlamydomphila pneumoniae* proporcionado por la Dra. Graciela Castro Escarpulli de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. RNAsa. Enzimas de restricción *BamH1* y *EcoR1*, este material se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Muestras controles:** Células McCOY infectadas con *C. trachomatis* y demostrada por inmunofluorescencia directa (IFD), Células McCOY no infectadas. Células Hela infectadas con *C. trachomatis* demostrada por IFD. Exudado cervical No. 74 con *C. trachomatis* demostrada por IFD. Exudado cervical No. 75 con *C. trachomatis* demostrada por IFD. Exudado cervical No. 77 con *C. trachomatis* demostrada por IFD. Exudado cervical No. 78 sin *C. trachomatis* determinado por IFD. Exudado cervical No. SF sin *C. trachomatis* determinado por IFD.

**Muestras clínicas** de raspados cervicales y frotis de raspados cervicales de mujeres que asistieron a consulta a la clínica 6 de la Secretaría de la Salud, ubicado en la calle de Lucerna, Colonia Roma, Delegación Cuauhtémoc. DF, recolectadas del 1 de noviembre de 1995 al 14 de agosto de 1996. La selección de las pacientes se realizó, cuando estas al solicitar la consulta por manifestar tener leucorrea, definida ésta como una secreción transvaginal sin relación a su menstruación, se les realizó la auscultación física, se hizo el diagnóstico clínico, la toma de la muestra y el llenado de una hoja de datos sociodemográficos.

**3.2 Material diverso:** Reactivo de inmunofluorescencia contra *C. trachomatis* MicroTrak, Syva. Proteinasa K, Sigma. Lisozima, Sigma. Iniciadores dirigidos contra un fragmento del pCT proporcionados por el Dr. Miguel Castro de los Laboratorios Bio-Synthesis, Inc. Texas, USA: Iniciadores T1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3'. Iniciadores T2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. Nucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP, BioLab. Marcador de peso molecular 100 pb Ladder, Gibco BRL Taq DNA polimerasa, Promega.

**3.3 Metodología para la detección de *C. trachomatis* por medio PCR, que pone de manifiesto un fragmento de 200 pares de bases del plásmido pCT.**

Esta parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Everardo Curiel Quesada.

**3.3.1 Preparación de la bacteria transformante** (Sambrook, 1989).

La formación de una molécula de DNA recombinante consiste en la unión covalente de un vector y del inserto de DNA en estudio. El pLGV125 es una construcción con el vector de clonación pBR327, al cual se le insertó en el sitio *Bam*HI el plásmido pLGV440 de *C. trachomatis*. El pBR327 es un vector de clonación y es un plásmido no conjugativo, constituido por un origen de replicación, y dos genes marcadores, un gen de resistencia a la ampicilina y un

gen de resistencia a la tetraciclina y 27 secuencias de DNA que son reconocidas por 27 enzimas de restricción, entre éstas, la secuencia 5'GGATTC3' que reconoce la enzima *Bam*H1, y se encuentra dentro del gen de resistencia a la tetraciclina, y la secuencia 5' GAATCC 3', que es reconocida por la enzima *Eco*RI, y se encuentra fuera del origen y de los genes de resistencia, además es un plásmido que se presenta con 20 ó 30 copias cuando es introducido a *E.coli*. Debido a que el pLGV125 contiene orígenes de replicación provenientes de un plásmido de *E.coli* y de *C.trachomatis*, este vector bifuncional ("shuttle") puede replicarse en ambas bacterias.

Una bacteria transformante, se puede definir como a la bacteria que se le incorpora una molécula de DNA recombinante, la cual se amplifica por replicación, dando lugar a un gran número de copias del mismo. Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de DNA del plásmido pLGV125, se planteó el método de transformación para incorporar el pLGV125 utilizando incubación en CaCl<sub>2</sub> a y choque térmico a 42°C para obtener una cepa de *E. coli*, transformante.

### **3.3.1.1 Obtención de la bacteria**

Para la obtención de la cepa receptora del pLGV125, se trabajo con la cepa C600 de *E. coli* K12 debido a que esta cepa tiene mutado el gen de su enzima de restricción nativa, por lo que el DNA que se introduzca en ella se mantiene intacto. La cepa se tomó del ultracongelador y en condiciones de esterilidad se tomó una asada de la cepa y se depositó en una caja de Petri con gelosa L (ver apéndice), el inóculo se sembró por estría cruzada, la caja se incubó a 37°C durante 18 horas.

### **3.3.1.2 Obtención de las células competentes para hacer la transformante**

Del desarrollo bacteriano anterior se tomó una colonia y se inoculó en un matraz que contenía 100 ml de caldo L (ver apéndice), el matraz se incubó a 37°C con agitación de 300 rpm. Con el objetivo de tener a la bacteria en fase exponencial

cada 30 minutos se tomó un ml del medio de cultivo y se leyó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nm (Abs 600), este procedimiento se realizó hasta tener una densidad óptica de 0.5-0.6. Una vez obtenida la densidad óptica requerida, el desarrollo bacteriano se transfirió a una botella para centrifuga de polipropileno con tapón de rosca y de capacidad de 300 ml, la botella se colocó en hielo durante 10 minutos, transcurrido el tiempo el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 1,800 x g y a 4°C, el sobrenadante se eliminó por decantación, la botella se colocó en hielo y el sedimento se resuspendió suavemente con 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M (ver apéndice), ésto con el propósito de preparar y hacer competentes a las bacterias, las bacterias resuspendidas se centrifugaron durante 10 minutos a 1,800 x g y a 4°C, el sobrenadante se eliminó completamente. La botella se colocó en hielo y el sedimento bacteriano se suspendió con 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M. El paquete bacteriano, constituido de células competentes se distribuyó en microtubos estériles en alícuotas de 200 µl, las alícuotas se congelaron en acetona-hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **3.3.1.3 Obtención de la bacteria transformante**

El pLGV125, como se mencionó anteriormente, es una construcción con el vector de clonación pBR327, al cual se le insertó en el sitio *Bam*HI el plásmido pLGV440 de *C. trachomatis*. Al insertar el plásmido en este sitio, se interrumpe el gen de resistencia a la tetracilina, con lo que la transformante obtenida, originalmente sensible a la tetracilina y a la ampicilina, al multiplicarse, ahora presentará resistencia a la ampicilina.

Para tener la bacteria transformante, se tomó del ultracongelador un microtubo con las células competentes, el contenido se descongeló por frotación vigorosa del tubo, se tomaron 100 µl de las bacterias y se colocaron en un microtubo con capacidad de 1.5 ml, al tubo se le agregaron 50 ng del DNA del plásmido pLGV125. Para este experimento se trabajó también las células competentes sin agregar el pLGV125. Los tubos se agitaron circularmente y se dejaron reposar en

hielo durante 30 minutos, para permitir la entrada del DNA a *E.coli*; los tubos se sometieron a un choque térmico, colocándolos en un baño de agua precalentada a 42°C y se incubaron durante 90 segundos. Al término de la incubación los tubos de pasaron a un baño de hielo. Para permitir el desarrollo de las bacterias y la expresión del gen de resistencia, a los tubos se les agregó 800 µl del medio L y se incubaron a 37°C durante 45 minutos con agitación de 200 rpm. Para aislar a las bacterias transformadas, se transfirieron 200 µl de cada tubo a una caja con gelosa L, además se transfirieron 200 µl de cada tubo a una caja con gelosa L con 25 µg/ml de ampicilina (Ver apéndice). Los inóculos se distribuyeron uniformemente con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al término de la incubación se observó si hubo desarrollo de bacterias en las cajas con gelosa sin antibiótico y con antibiótico. La cepa que desarrolló en gelosa L con 25 µg/ml de ampicilina se conservó por congelación.

#### **3.3.1.4 Conservación de la cepa**

Una porción de una colonia bacteriana del crecimiento anterior se tomó con un palillo de madera estéril, este se colocó en un tubo con 5 ml de medio L con 25 µg/ml de ampicilina, el medio se incubó durante 18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm, se tomó 1 ml del crecimiento bacteriano y se depositó en un criotubo que contenía 0.5 ml de glicerol al 50% estéril, el contenido del tubo se homogeneizó y se conservó en un ultracongelador a -70°C.

#### **3.3.1.5 Aislamiento de DNA plasmídico de la cepa transformante** (Birnboim and Doly 1979, Sambrook 1989).

##### **3.3.1.5.1 Siembra y cosecha de la bacteria**

Una colonia bacteriana del crecimiento en gelosa L con 25 µg/ml de ampicilina se tomó con un palillo de madera estéril y se colocó en un tubo con 5 ml de medio L con 25 µg/ml de ampicilina. El mismo procedimiento se realizó con la cepa C600 de *E.coli* no transformada. Los tubos se incubaron durante 18 horas a 37°C con

agitación de 200 rpm, al término de la incubación se tomó 1.0 ml del cultivo y se colocó en un microtubo, el cultivo sobrante se mantuvo a 4°C. El tubo con el ml de medio se centrifugó a 15,000 x g durante un minuto y a 4°C, se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo.

#### **3.3.1.5.2 Lisis de la bacteria por el método alcalino**

Para lisar a la bacteria y liberar el DNA plasmídico, el sedimento se resuspendió con 100 µl de la solución de lisis I (glucosa 50 mM, EDTA pH 8.0 100 nM, Tris.HCl pH 8.0) (ver apéndice) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, al sobrenadante se le adicionaron 200 uL de la solución de lisis II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) (ver apéndice), se tapó el tubo y se mezclaron las soluciones, el tubo se colocó en un baño de hielo y se dejó reposar durante 5 minutos, para precipitar las proteínas presentes en la solución, al tubo se agregaron 150 µl de la solución de lisis III (acetato de potasio 5M, pH 4.8) (ver apéndice), se tapó el tubo y el contenido se mezcló durante 10 segundos por agitación con un Vortex, el tubo se colocó en hielo y se mantuvo en él durante 5 minutos, posteriormente el tubo se centrifugó a 15,000 x g durante 1 minuto, el sobrenadante se paso a un tubo limpio y el sedimento se desechó.

#### **3.3.1.5.3 Purificación del DNA plasmídico**

Para precipitar el DNA, al sobrenadante anterior se le agregaron 270 µl de isopropanol, el tubo se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 15,000 x g por 10 minutos y a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70°, el tubo se centrifugó otra vez a 15,000 x g por 10 minutos y a 4°C, se eliminó el sobrenadante, para eliminar el exceso de este, el tubo se colocó a 37°C durante 10 minutos, el sedimento se resuspendió con 50 µl de TE (pH 8.0) (ver apéndice), El DNA obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

#### **3.3.1.5.4 Demostración del DNA plasmídico pLGV125.**

La demostración del DNA se realizó tomando 5  $\mu$ l del sedimento resuspendido y colocándolo en un área de papel parafilm, en otra se puso 3  $\mu$ l de azul de bromofenol al 0.25% / sacarosa al 40% (ver apéndice) y en otra se depositó 1  $\mu$ l de bromuro de etidio en concentración de 1  $\mu$ g/ml (ver apéndice). Para la visualización del DNA se mezclaron las tres soluciones. Se colocó un gel de agarosa al 0.8% (ver apéndice) en una cámara de electroforesis, se agregó el amortiguador de corrimiento hasta cubrir el gel (ver apéndice). La mezcla se aplicó en un pozo del gel. La electroforesis se corrió a 40 V hasta que la muestra salió del pozo y se deslizó en el gel aproximadamente 1 cm, posteriormente se cambió el voltaje a 60 V y la muestra se corrió durante 45 minutos, el gel se retiró de la cámara, se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta. En caso de observar el DNA se procedió a fotografiar la imagen.

#### **3.3.2 Obtención del DNA plasmídico (Birnboim y Doly 1979, Sambrook, 1989)**

Una vez demostrada la obtención de la transformante y visualizado el DNA del pLGV125 se procedió a obtener mayor cantidad del DNA, el que se utilizó para efectuar la implementación de la PCR y para usarlo como control positivo.

#### **3.3.2.1 Siembra y cosecha de la bacteria**

Para la obtención de la cepa se tomó del ultracongelador un criotubo con la cepa transformante. Se tomó una asada de la cepa en condiciones de esterilidad y se depositó en una caja de Petri con gelosa L con gelosa L con 25  $\mu$ g/ml de ampicilina, el inóculo se aisló por estría cruzada. La caja se incubó a 37°C durante 18 horas, se tomó una porción de una colonia bacteriana del crecimiento en gelosa L con 25  $\mu$ g/ml de ampicilina con un palillo de madera estéril, este se colocó en un matraz con 60 ml de medio L con 25  $\mu$ g/ml de ampicilina, el matraz se incubó durante 18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm, el contenido del matraz se vació a un matraz con 1 litro de medio L con 25  $\mu$ g/ml de ampicilina, el matraz se incubó durante 18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm, el cultivo se

vació en partes iguales a 2 botellas de polipropileno con capacidad de 500 ml, se centrifugó a 13,000 x g durante 10 minutos a 4°C, al término de la centrifugación se eliminó sobrenadante y se trabajó con el sedimento.

### **3.3.2.2 Lisis de la bacteria transformante**

El sedimento de cada botella se resuspendió con 40 ml de la solución de lisis I, se juntaron los suspendidos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, al sobrenadante se le adicionó 80 ml de la solución de lisis II, se tapó la botella, se mezclaron las soluciones, la botella se colocó en un baño de hielo y se dejó reposar durante 5 minutos, a la botella se agregó 60 ml de la solución de lisis III, se tapó el tubo y el contenido se mezcló por agitación con un Vortex durante 10 segundos, la botella se colocó en hielo y se mantuvo en el durante 5 minutos, al término del tiempo la botella se centrifugó a 13,000 x g durante 10 minutos y a 4°C, el sobrenadante se paso a una botella limpia y el sedimento se desechó.

### **3.3.2.3 Obtención del DNA plasmídico**

Para precipitar al DNA al sobrenadante se le agregaron 108 ml de isopropanol, se agitó el contenido de la botella y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos, la botella se centrifugó a 13,000 x g durante 10 minutos y a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la botella se colocó en una posición invertida con el propósito de eliminar completamente el líquido, el sedimento obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 70°, se centrifugó a 21,000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, la botella se puso en una posición invertida con el propósito de eliminar completamente el líquido, el sedimento se lavó con 20 ml de etanol al 70°, se centrifugó a 17,000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante. La botella se puso en una posición invertida con el propósito de eliminar líquido, se dejó secar el sedimento que corresponde al DNA plasmídico, manteniéndolo a 37°C durante 10 minutos.

#### **3.3.2.4 Purificación del DNA plasmídico**

Para la purificación, el DNA, se resuspendió con 40 ml de TE (pH 8.0), con el objetivo de eliminar el RNA presente en la muestra, se agregó 50 µg de RNAsa al sobrenadante y se dejó actuar a la enzima durante 24 horas a 37°C. Al término de la incubación y para desnaturalizar a las proteínas presentes, se agregó un volumen igual de fenol saturado con tris 25 mM pH7.4 y se mezcló perfectamente. Se centrifugó a 13,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se vertió el sobrenadante a un tubo limpio, el sedimento se desechó. Al sobrenadante se agregó un volumen de alcohol isoamílico-cloroformo (ver apéndice), se agitó y se repitió el procedimiento dos veces. Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio. Para precipitar al DNA, se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y se agitó el tubo. Mantener el tubo a temperatura ambiente durante 5 minutos. El tubo se centrifugó a 21,000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el tubo se colocó en una posición invertida con el propósito de eliminar completamente el líquido, se dejó secar el sedimento que contiene el DNA plasmídico manteniéndolo a 37°C durante 10 minutos. El DNA se resuspendió con 1 ml de TE (pH 8.0). Para purificar el DNA, el mililitro se colocó en una columna de sefarosa 2B, se eluyó con TE, y se colectaron 25 fracciones de 0.5 ml, 5 µl de cada una de las fracciones se corrieron en un gel de agarosa como se indicó en el inciso 3.3.1.5.4 y después de teñirse el gel con bromuro de etidio (1µg/µl) se observó en un transiluminador, las fracciones que presentaron DNA se juntaron, se les agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó el tubo y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó a 21,000 x g rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante. Se lavó el sedimento con 20 ml de etanol de 70°. Se centrifugó a 13,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el tubo se puso en una posición invertida con el propósito de eliminar completamente el líquido, se dejó secar el sedimento que contiene el DNA plasmídico manteniéndolo a 37°C durante 10 minutos, se resuspendió el DNA con 1 ml de TE (pH 8.0), el DNA se cuantificó haciendo una dilución 1:75 con NaCl 0.15 M (ver apéndice) y se determinó la concentración de DNA en un espectrofotómetro.

### **3.3.3 Caracterización del DNA plasmídico**

El plásmido pLGV125, presenta dos sitios de restricción para la enzima *Bam*H1 y cuatro sitios de restricción para la enzima *Eco*R1. Estas características fueron utilizadas para realizar la caracterización del plásmido, ya que al ser reconocidas las secuencias sobre las que actúan las enzimas, se obtendrán con la *Bam*H1, 2 fragmentos de DNA y con la *Eco*R1 cuatro fragmentos.

Para realizar la caracterización, del DNA plasmídico cuantificado se hizo una dilución 1:10, se tomaron 10  $\mu$ l (17,700 ng) y se agregaron a 90  $\mu$ l de amortiguador Low TE (ver apéndice), se mezclaron ambas soluciones.

#### **3.3.3.1 Con la enzima de restricción *Bam*H1**

Se tomaron 3  $\mu$ l (531 ng) del DNA diluido y se colocaron en la pared de un tubo Eppendorf. El DNA restante se conservó en congelación. En otra área del tubo se agregaron 1  $\mu$ l (50 U/ $\mu$ l) de la enzima *Bam*H1. En otra parte del tubo se adicionó 1  $\mu$ l de regulador 10X de la enzima, en otra parte del tubo se colocaron 5  $\mu$ l de agua bidestilada, las soluciones se mezclaron por medio de una centrifugada rápida. El tubo se incubó a 37°C en baño de agua durante una hora.

#### **3.3.3.2 Con la enzima de restricción *Eco*R1**

Se tomaron 3  $\mu$ l (531 ng) del DNA y se colocaron en la pared de un tubo Eppendorf. El DNA restante se conservó en congelación. En otra área del tubo se agregó 1  $\mu$ l (20U/ $\mu$ l) de la enzima *Eco*R1. En otra parte del tubo se adicionó 1  $\mu$ l de regulador 10X de la enzima, en otra parte del tubo se colocaron 5  $\mu$ l de agua bidestilada, las soluciones se mezclaron por medio de una centrifugada rápida. El tubo se incubó a 37°C en baño de agua durante una hora.

La demostración de la acción de ambas enzima de restricción sobre el DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4

Además se corrieron, el fago lambda como marcador de peso molecular, pLGV125 sin cortar, sobrenadante de la lisis de la cepa 154 y sobrenadante de la lisis de la cepa 162.

### **3.4 Identificación de *C. trachomatis* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa**

La implementación del método se inició siguiendo las condiciones descritas por Vogels *et al.*, 1993. Se utilizaron estas condiciones porque las muestras trabajadas fueron de cérvix y de uretra de mujeres y muestras de uretra de hombres de pacientes que asistieron a una clínica de enfermedades de transmisión sexual, además porque la prueba de PCR se realizó directamente a las muestras clínicas previa lisis de las mismas y sin ningún tratamiento posterior.

#### **3.4.1 Mezcla de la reacción**

La mezcla de reacción así como las concentraciones que se utilizaron fueron las siguientes: 1 µl de cada una de los reactivos: Tris HCl pH 8.5 (50 mM), NaCl (50 mM), MgCl<sub>2</sub> (6 mM), Ditiotretitol 2 mM, dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP (250 mM cada uno), DNA Taq polimerasa (0.6 U), Iniciador 1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3' (0.1 µg), Iniciador 2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. (0.1 µg) y el DNA molde del plásmido pLGV125 (1 µg/µl) obtenido en el presente trabajo. Además a la mezcla de la reacción se agregó 3 µl de agua para trabajar un volumen total de 15 µl. Cada sustancia se colocó en las paredes de un tubo Eppendorf con capacidad para 0.5 ml, todos los componentes de la reacción se mezclaron por medio de una centrifugación rápida y se adicionó 20 µl de aceite mineral con el propósito de que al colocar la muestra en el termociclador y efectuar las condiciones de amplificación, el agua no se evaporara. El testigo negativo utilizado tenía todos los componentes de la reacción con excepción del DNA molde.

### **3.4.2 Condiciones de la amplificación**

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador, el cual se programó con las condiciones de reacción siguientes: 40 ciclos de amplificación de desnaturalización por 1 minuto a 94°C, alineación por 2 minutos a 52°C y extensión por 3 minutos a 74°C.

### **3.4.3 Demostración del producto de amplificación**

Del tubo sometido a amplificación se tomaron 8 µl y se colocaron en un área de papel parafilm, se tomaron 3 µl de azul de bromofenol al 0.25% / sacarosa al 40% (ver apéndice) y se mezcló con el amplificado, el cual se aplicó en un pozo de un gel de agarosa al 2% (ver apéndice). La electroforesis se corrió a 150 V durante 45 minutos, el gel se retiró de la cámara de electroforesis y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 10 minutos, se retiró el gel del bromuro, se lavó y se colocó en un transiluminador y se observó si había la presencia un producto amplificado de 200 pb.

## **3.5 Condiciones establecidas para la investigación de *C.trachomatis* por la reacción en cadena de la polimerasa**

### **3.5.1 Mezcla de la reacción**

La mezcla de la reacción así como las concentraciones que se establecieron utilizando al pLGV125 como DNA molde fueron las siguientes: 1 µl de cada una de los reactivos: Amortiguador de PCR (10X) (2mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), (dATP, dTTP, dGTP, dCTP (250 mM cada uno), DNA Taq polimerasa (0.5 U), Iniciador 1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3' (1 mM), Iniciador 2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. (1 mM) y el DNA molde del plásmido pLGV125 (4 ng/µl). Además a la mezcla de la reacción se agregaron 3 µl de agua para trabajar un volumen total de 15 µl. Cada sustancia se colocó en las paredes de un tubo Eppendorf con capacidad para 0.5 ml, todos los componentes de la reacción se mezclaron por medio de una centrifugación rápida y se adicionaron 20 µl de aceite mineral con el propósito de que al colocar la muestra en el termociclador y efectuar las condiciones de amplificación, el agua no se

evaporara. El testigo negativo utilizado lleva todos los componentes de la reacción con excepción del DNA molde.

### **3.5.2 Condiciones de la amplificación**

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador, el cual se programó con las condiciones de reacción establecidas, siendo las siguientes: un ciclo de desnaturalización por 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificación de desnaturalización por 1 minuto a 94°C, alineación por 1 minutos a 63°C y extensión por 1 minutos a 72°C y un ciclo final de extensión por 10 minutos a 72°C.

### **3.5.3 Observación del DNA amplificado**

La demostración del DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4. La observación de la presencia de un fragmento de DNA de 200 pares de bases puso de manifiesto la presencia del plásmido pCT de *C. trachomatis*.

## **3.6 Determinación de la sensibilidad del método**

Con el propósito de determinar que cantidad mínima del DNA molde se podía amplificar y visualizar se utilizaron diferentes concentraciones del DNA.

### **3.6.1 Preparación de las diluciones del plásmido**

A partir del plásmido pLGV125 (4ng/μl) se hicieron seis diluciones decimales hasta obtener una concentración de 40 fg/μl, a partir de esta concentración se realizaron tres diluciones dobles para obtener la concentración final que fue de 100 ag/uL. Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: 4 ng/μl, 400 pg/μl, 40 pg/μl, 4 pg/μl, 400 fg/μl, 40 fg/μl, 4 fg/μl, 400 ag/μl, 200 ag/μl y 100 ag/μl.

### **3.6.2 Mezcla de la reacción**

De cada una de las concentraciones preparadas se tomó un μl y se colocaron en las paredes de un tubo, a cada tubo se agregó 1 μl de cada una de los reactivos:

Amortiguador de PCR (10X) (2mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), (dATP, dTTP, dGTP, dCTP (250 mM cada uno), DNA Taq polimerasa (0.5 U), Iniciador 1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3' (1 mM), Iniciador 2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. (1 mM) y 3 µl de agua para trabajar un volumen total de 15 µl. Cada sustancia se colocó en las paredes de un tubo Eppendorf con capacidad para 0.5 ml, se mezclaron todos los componentes de la reacción por medio de una centrifugación rápida y se adicionaron 20 µl de aceite mineral. El testigo negativo utilizado tenía todos los componentes de la reacción con excepción del DNA molde.

### **3.6.3 Condiciones de la amplificación**

Las condiciones de amplificación fueron las descritas en el inciso 3.5.2.

### **3.6.4 Demostración del DNA plasmídico amplificado**

La demostración del DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4

## **3.7 Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa con las condiciones establecidas investigando *C. trachomatis* en muestras clínicas controles.**

Esta parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Con el propósito de evaluar las condiciones implementadas, se utilizaron diversas muestras clínicas controles y cuyo diagnóstico se había realizado por IFD (controles positivos: Células McCOY infectadas con *C.trachomatis*, Células Hela infectadas con *C. trachomatis*, Exudado cervical No. 74 con *C. trachomatis*, Exudado cervical No. 75 con *C. trachomatis* y Exudado cervical No. 77 Con *C.trachomatis*. Controles negativos: Células McCOY no infectadas, Exudado cervical No. 78 sin *C. trachomatis* y Exudado cervical No. SF sin *C. trachomatis*.

### **3.7.1 Lisis celular**

Para liberar el DNA de las muestras clínicas controles, las cuales se mantenían a 70°C, estas se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Cada muestra se homogeneizó con un Vortex, se tomó un mililitro de la muestra y se colocaron en microtubos, los tubos se centrifugaron a 26,000 x g durante 20 minutos, se les eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con un Vortex con un mililitro de agua destilada, los tubos se colocaron en baño de agua a ebullición durante 10 minutos, al término del calentamiento los tubos se centrifugaron a 26,000 x g durante 20 minutos, se les decantó el sobrenadante y el exceso de agua se absorbió con un papel secante, el sedimento de los tubos se resuspendió con 48 µl de agua destilada y se les adicionó 1µl de proteinasa K a una concentración de 400 µg/ml (ver apéndice), los tubos se incubaron a 56°C durante 10 minutos en baño de agua, posteriormente los tubos se pusieron en ebullición durante 10 minutos, los tubos se dejaron a temperatura ambiente y se les adicionó 1 µl de lisozima a una concentración de 400 µg/ml (ver apéndice) y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

### **3.7.2 Mezcla de la reacción**

De cada una de las muestras clínicas lisadas se tomó un µl y se colocó en las paredes de un tubo, a cada tubo se agregó 1 µl de cada una de los reactivos: Amortiguador de PCR (10X) (2mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), (dATP, dTTP, dGTP, dCTP (250 mM cada uno), DNA Taq polimerasa (0.5 U), Iniciador 1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3' (1 mM), Iniciador 2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. (1 mM) y 3 µl de agua para trabajar un volumen total de 15 µl. Cada sustancia se colocó en las paredes de un tubo Eppendorf con capacidad para 0.5 ml, se mezclaron todos los componentes de la reacción por medio de una centrifugación rápida y se adicionaron 20 µl de aceite mineral. Se puso un testigo positivo, al cual además de los componentes de la reacción se

agregó un  $\mu\text{l}$  del pLGV125, además se corrió un testigo negativo el cual tenía todos los componentes de la reacción sin DNA molde.

### **3.7.3 Las condiciones de la amplificación**

Las condiciones de amplificación fueron las descritas en el inciso 3.5.2.

### **3.7.4 Demostración del DNA plasmídico amplificado**

La demostración del DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4

## **3.8 Determinación de la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa en la investigación de *C. trachomatis* con las condiciones establecidas**

Para determinar si los iniciadores no hibridan con el DNA de otros microorganismos, y así poder determinar la especificidad de estos, se empleó el DNA de varias bacterias de importancia médica, algunas de ellas aisladas de genitales femeninos y masculinos, esto con el propósito de conocer si puede haber amplificaciones de productos de DNA de 200 pb, con lo cual podría haber falsos positivos para *C.trachomatis*.

### **3.8.1 Obtención de las cepas**

Las cepas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se trabajaron de la siguiente manera: Las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14208, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus* sp, *Acinetobacter calcoaceticus var anitratus* ATCC 19606, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ENCB 1280 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 se retiraron del congelador y en condiciones de esterilidad se sembraron por estría cruzada en gelosa soya tripticaseína y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* NRL 5001, *Gardnerella vaginalis* ENCB 188 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, se retiraron del congelador y en condiciones de esterilidad se sembraron por estría cruzada en gelosa de Casman y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Al término de la incubación se determinó si las

bacterias crecieron y si presentaron un solo morfotipo colonial. La identificación de las cepas se realizó según lo descrito en Moulder, 1984.

### **3.8.2 Lisis de las cepas** (Gussov and Clackdon, 1989).

La obtención del DNA bacteriano de las cepas se obtuvo recogiendo el desarrollo bacteriano con un hisopo estéril y resuspendiéndolo en 0.5 ml de agua, hervir las células en baño de agua por 5 min, se centrifugó a 21,000 x g durante 2 min, se congeló hasta su uso.

### **3.8.3 Mezcla de la reacción y condiciones de la amplificación**

La mezcla de la reacción y las condiciones de amplificación fueron las descritas en el inciso 3.5.1 y 3.5.2 respectivamente.

### **3.8.4 Demostración del DNA plasmídico amplificado**

La demostración del DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4

## **3.9 Investigación de *C. trachomatis* en muestras clínicas**

Las muestras clínicas de raspados cervicales se obtuvieron en la clínica 6 de la Secretaría de la Salud de pacientes con flujo vaginal que asistieron a consulta al Servicio de Ginecología y fueron valoradas clínicamente por la Dra. Zelda Fainsilver Moldawska, y de mujeres que asistieron a consulta al Servicio de Planificación Familiar y fueron valoradas clínicamente por la Dra. Soledad García.

### **3.9.1 Toma de la muestra**

A cada paciente se le aplicó un cuestionario (ver apéndice) con la finalidad de obtener información sociodemográfica y se les tomó la muestra, previo aseo genital, de la manera siguiente: Se colocó a la paciente en posición ginecológica, y a las pacientes que refirieron actividad sexual se les introdujo un espejo vaginal, se visualizó el cuello uterino y se quitó el exceso de moco con un hisopo. Otro hisopo se introdujo en el canal endocervical, se giró y se retiró evitando tocar las

paredes de la vagina. Parte de La muestra obtenida se extendió en un portaobjetos en un área de 1 cm, el hisopo con la muestra restante se colocó en un tubo con 3 ml del medio de transporte 2 Sacarosa Fosfato (2SP) (Ver apéndice). La muestra se mantuvo en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### **3.9.2 Investigación de *C. trachomatis* en muestras clínicas por inmunofluorescencia directa.**

Para la investigación de la bacteria se utilizó IFD, con un reactivo comercial (Syva-Microtrak) que contiene un frasco con 2 ml una solución amortiguadora con anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína dirigidos contra la MOMP, la cual como se mencionó en introducción es el antígeno que tiene los epítomos específicos que determinan las serovariedades y con azul de Evans como colorante de contraste y un frasco con líquido de montaje con glicerol y amortiguador de fosfatos. Para realizar la IFD, la muestra colocada en el portaobjetos se fijó con acetona fría durante 15 minutos, se dejó secar. Se observó el frote y se eligió la parte en la que se observó mayor cantidad de muestra y se marcó un círculo de aproximadamente  $0.5\text{ cm}^2$  en la parte posterior del portaobjetos. Para realizar la tinción se colocaron  $30\ \mu\text{l}$  del conjugado en el área elegida, el portaobjetos se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos, al finalizar la incubación se eliminó el reactivo y la muestra se lavó con agua corriente. La muestra se dejó secar a aire y se colocó sobre ella una gota del líquido de montaje, se colocó un cubreobjetos y el frote se observó en un microscopio con luz ultravioleta con un objetivo de 100 X. Al mismo tiempo que se trabajaron las muestras, se trabajó con un testigo positivo, que consiste de Células McCoy infectadas con *C.trachomatis* y uno negativo que tiene solamente Células McCoy.

#### **Interpretación**

Una muestra se consideró positiva cuando en el frote había más de 5 cuerpos elementales.

### **3.9.3 Investigación de *C. trachomatis* en muestras clínicas por reacción en cadena de la polimerasa**

#### **3.9.3.1 Lisis celular de las muestras clínicas**

Para liberar el DNA de las muestras clínicas, las cuales se mantenían a  $-70^{\circ}\text{C}$ , estas se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Cada muestra se homogeneizó con un Vortex, se tomó un mililitro de la muestra y se colocó en un microtubo, los microtubos se centrifugaron a  $26,000 \times g$  durante 20 minutos, se les eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con un Vortex con un mililitro de agua destilada, los tubos se colocaron en baño de agua a ebullición durante 10 minutos, al término del calentamiento los tubos se centrifugaron a  $26,000 \times g$  durante 20 minutos, se les decantó el sobrenadante y el exceso de agua se absorbió con un papel secante, el sedimento de los tubos se resuspendió con  $48 \mu\text{l}$  de agua destilada y se les adicionó  $1 \mu\text{l}$  de proteinasa K a una concentración de  $400 \mu\text{g/ml}$  (ver apéndice), los tubos se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos en baño de agua, posteriormente los tubos se pusieron en ebullición durante 10 minutos, los tubos se dejaron a temperatura ambiente y se les adicionó  $1 \mu\text{l}$  de lisozima a una concentración de  $400 \mu\text{g/ml}$  (ver apéndice) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

#### **3.9.3.2 Mezcla de la reacción**

De cada una de las muestras clínicas lisadas se tomó un  $\mu\text{l}$  y se colocó en las paredes de un tubo, a cada tubo se agregó  $1 \mu\text{l}$  de cada una de los reactivos: Amortiguador de PCR (10X) (2mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM), (dATP, dTTP, dGTP, dCTP (250 mM cada uno), DNA Taq polimerasa (0.5 U), Iniciador 1 con secuencia 5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3' (1 mM), Iniciador 2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'. (1 mM) y  $3 \mu\text{l}$  de agua para trabajar un volumen total de  $15 \mu\text{l}$ . Cada sustancia se colocó en las paredes de un tubo Eppendorf con capacidad para 0.5 ml, se mezclaron todos los componentes de la reacción por medio de una centrifugación rápida y se adicionó  $20 \mu\text{l}$  de aceite mineral. Se puso

un testigo positivo, al cual además de los componentes de la reacción se agregó un µl del pLGV125, además se corrió un testigo negativo el cual tenía todos los componentes de la reacción sin DNA molde.

### **3.9.3.3 Las condiciones de la amplificación**

Las condiciones de amplificación fueron las descritas en el inciso 3.5.2.

### **3.9.3.4 Demostración del DNA plasmídico amplificado**

La demostración del DNA se hizo como se describió en el inciso 3.3.1.5.4

En el presente trabajo se tomó como una muestra positiva cuando la IFD y la PCR demostraron la presencia de la bacteria, en la IFD, por la observación de CE y por PCR la observación de la amplificación de un fragmento de 200 pb.

**3.10 La evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa aplicada a las muestras clínicas se hizo según lo descrito por Greenberg, SR. 1998 y Fescina, R. 1985, utilizando las siguientes fórmulas:**

SENSIBILIDAD	=	[ VP / (VP + FN) ] X 100
ESPECIFICIDAD	=	[ VN / (VN + FP) ] X 100
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	=	[ VP / (VP + FP) ] X 100
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	=	[ VN / (VN + FN) ] X 100
EXACTITUD	=	VP+ VN X 100 / VP + FP + FN + VN
PREVALENCIA	=	VP + FN X100 / VP + FP + FN + VN

VP	=	Verdaderos positivos	VN	=	Verdaderos negativos
FP	=	Falsos positivos	FN	=	Falsos negativos

#### 4 Resultados

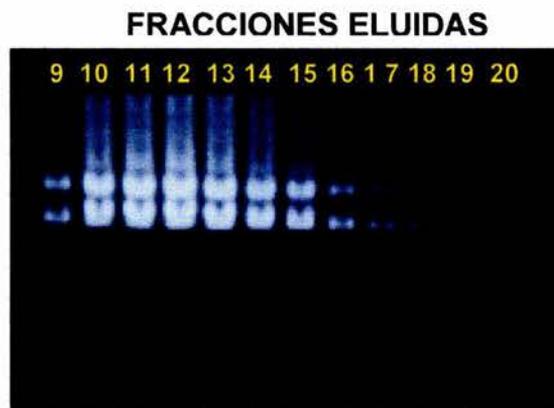
El objetivo del presente trabajo fue implementar, desarrollar y aplicar en el laboratorio la metodología de PCR para la investigación *C. trachomatis*, obteniendo los siguientes resultados:

Se obtuvo una bacteria transformante de *E. coli* K12 portadora del plásmido pLGV125 y fue incorporada al cepario del Dr. Curiel con el número 262. La transformante se conserva en congelación y se cuenta con cuatro criotubos, dos en el cepario del Dr. Curiel y dos en el cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica. Además el plásmido pLGV125 que proporcionó el Dr. Hyypiä se conserva en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La demostración de la producción del pLGV125 se puso de manifiesto al trabajar la cepa transformante en una mini preparación, obteniéndose y observándose en el gel bandas correspondientes a las diferentes isoformas del pLGV125. Una vez que se determinó que se tenía el plásmido, se procedió a obtenerlo en gran escala para, a partir de este, iniciar los estudios de implementación de la PCR. En la purificación del plásmido obtenido a partir del cultivo de la transformante, en la Figura 9 se puede observar que en las fracciones de la 9 a la 20 se observó la presencia de las bandas que corresponden a las isoformas del plásmido, de las fracciones 1 a la 8 y de la 21 a la 25 no se observó DNA.

Las fracciones 9 a la 17 se juntaron, obteniendo un total de 4.5 ml, este volumen se concentró hasta un ml, al concentrado se le determinó la cantidad de DNA, en la Figura 10 se observa el espectro de absorción, con la absorbencia a 260 nm se obtuvo una DO de 0.47, y se calculó la concentración, obteniéndose 1.7 mg de DNA / ml. El DNA se distribuyó en cantidades de 500  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorf con capacidad de 1,500  $\mu\text{l}$  y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

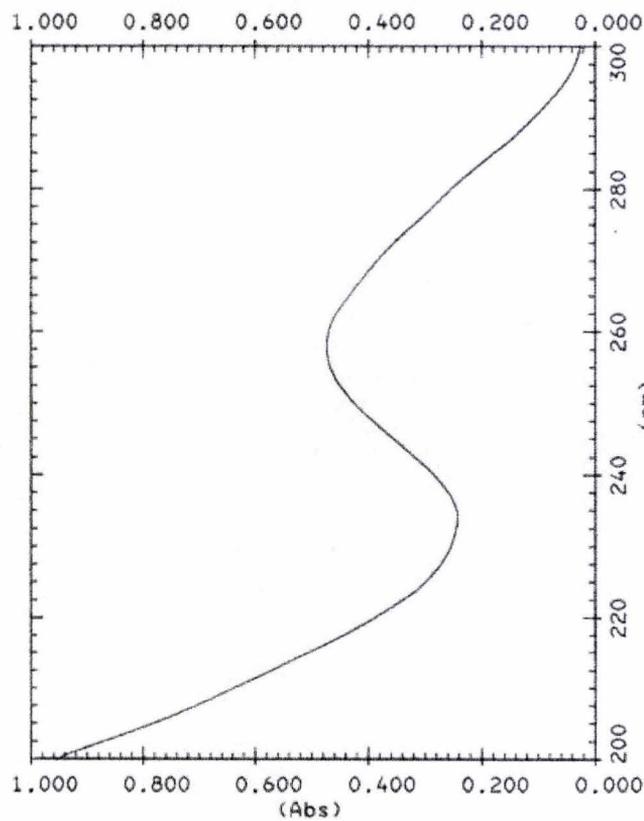
La caracterización del plásmido pLGV125 (Figura 11), obtenido de la transformante 162 se realizó utilizando la enzima de restricción *Bam*H1, la cual actúa sobre dos sitios de corte del pLGV125, obteniendo dos fragmentos de DNA, uno que pertenece al plásmido de *Chlamydia* y otro al vector pBR327, (Carril 2) y con *Eco*R1 (Carril 4), que muestra cuatro bandas debido a que el pLGV125 presenta 4 sitios de corte. En el carril 5, la cepa 154 no presenta DNA plasmídico y la cepa 262 presenta las isoformas del pLGV125. Los barridos al fondo de los carriles 5 y 6 son el RNA de las cepas trabajadas.



**Figura 9. Purificación del plásmido pLGV125.**

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%, en el que se muestran las fracciones donde se encontró el plásmido pLGV125 cuando fue eluído a través de una columna de sefarosa 2B. En cada carril se observan las isoformas del plásmido.

# ESPECTRO DE ABSORCION



[PEAK] WAVELENGTH	(ABS) VALUE	[VALLEY] WAVELENGTH	(ABS) VALUE
1: 258.2	0.472	1: 234.2	0.242

SAMPLE : PLGV125  
 CONC. : 1712.5UGML

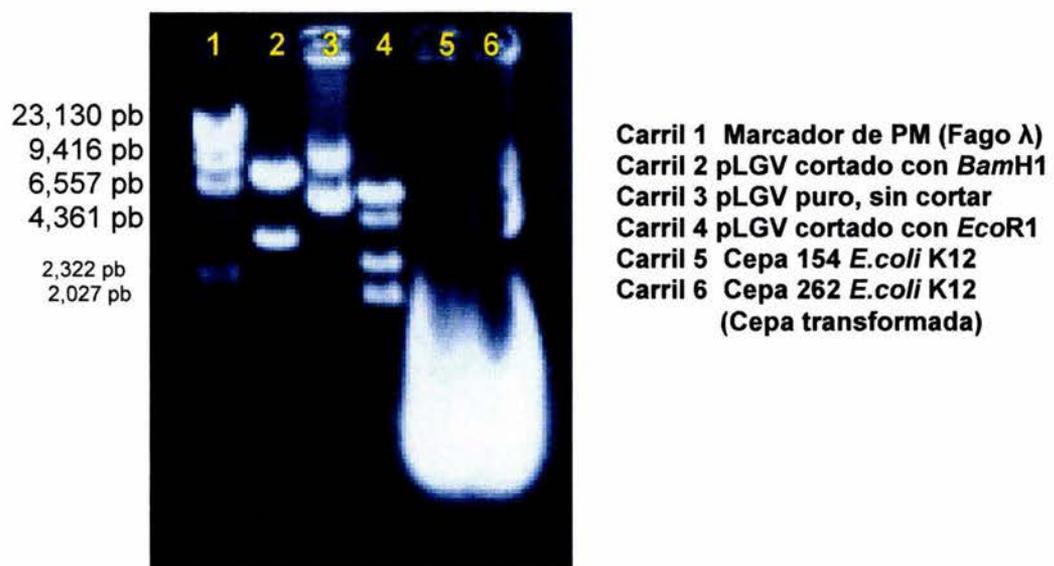
REFERENCE : NaCl 0.15M  
 PATHLENGTH : 1

SPEED : FAST  
 DATE : 042194  
 ANALYST : TOMAS

SLIT : 2.0

COMMENT : PLASMIDO pBR327 CON INSERTO EN BamHI DEL PLASMIDO DE LA SEROVARIEDAD L2 DE C.trachomatis

Figura 10. Espectro de absorción del plásmido pLGV125.



**Figura 11. Caracterización del plásmido pLGV125 de *Chlamydia trachomatis***

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%, en el que se muestra la caracterización del plásmido pLGV125. En el carril dos se observan dos productos de DNA obtenidos por el corte con la enzima de restricción *Bam*H1 del pLGV125, en la parte superior se observa una banda correspondiente al plásmido pLGV125 de *C. trachomatis*, la banda inferior corresponde al plásmido pBR327. En el carril cuatro se observan cuatro bandas que se obtienen al cortar el pLGV125 con la enzima

En la implementación de la PCR, las condiciones que se determinaron para efectuar la investigación de *C. trachomatis* por PCR utilizando como testigo al pLGV125 fueron las siguientes:

**Mezcla de la reacción**

	<b>CONCENTRACION</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>DNA MOLDE pLGV 125</b>	<b>4 ng/μl</b>	<b>1 μl</b>
<b>Iniciador 1</b>	<b>1 mM</b>	<b>1 μl</b>
<b>Iniciador 2</b>	<b>1 mM</b>	<b>1 μl</b>
<b>dNTP's</b>	<b>250 mM</b>	<b>4 μl</b>
<b>Amotiguador de PCR 10X</b>	<b>2 mM</b>	<b>1.5 μl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>5 mM</b>	<b>3 μl</b>
<b>DNA Taq polimerasa</b>	<b>0.5 U</b>	<b>1 μl</b>
<b>Agua destilada</b>		<b>2.5 μl</b>

El volumen final de la reacción fue de 15 μl

Nota: a cada tubo de reacción se le agregó 20 μl de aceite mineral

**Condiciones de la amplificación:**

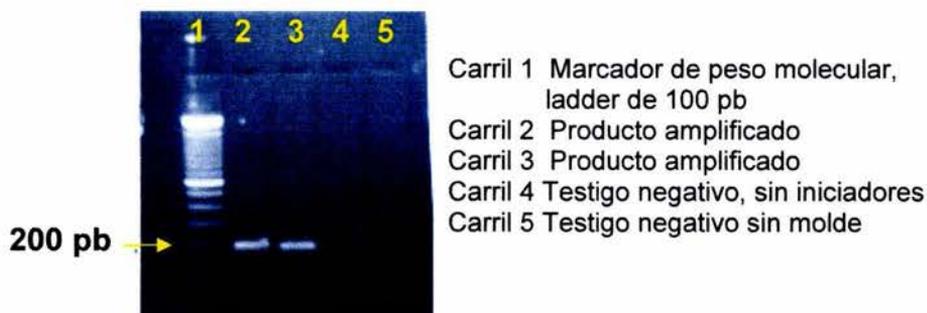
<b>DESNATURALIZACION</b>	<b>5 MINUTOS A 94°C</b>	<b>I CICLO</b>
<b>DESNATURALIZACION</b>	<b>1 MINUTO A 94°C</b>	<b>30 CICLOS</b>
<b>ALINEACION</b>	<b>1 MINUTO A 63°C</b>	
<b>EXTENCION</b>	<b>1 MINUTO A 72°C</b>	
<b>EXTENCION</b>	<b>10 MINUTOS A 72°C</b>	<b>I CICLO</b>

La demostración del DNA se realizó con geles de agarosa al 0.8%.

Aplicando las condiciones implementadas, se demostró la amplificación de un fragmento de 200 pb. (Figura 12).

Para la sensibilidad del método, se encontró que se pudo observar un amplificado de 200 pb del pLGV125, desde 4 ng/μl y hasta 40 fg (Figura 13).

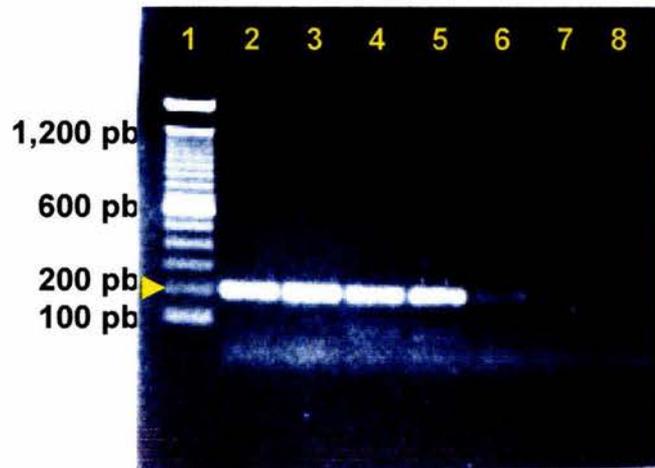
En la evaluación del método, en la Figura 14 se observa un amplificado de 200 pb en las muestras positivas por IFD, no observando dicho amplificado en las muestras que no presentaron a la bacteria.



**Figura 12. Producto amplificado de DNA de *Chlamydia trachomatis* de 200 pb.**

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%. En los carriles 2 y 3 se observan dos bandas de DNA de 200 pb obtenidas al aplicar las condiciones de reacción y amplificación implementadas y que corresponden al plásmido pLGV125 de *C. trachomatis*.

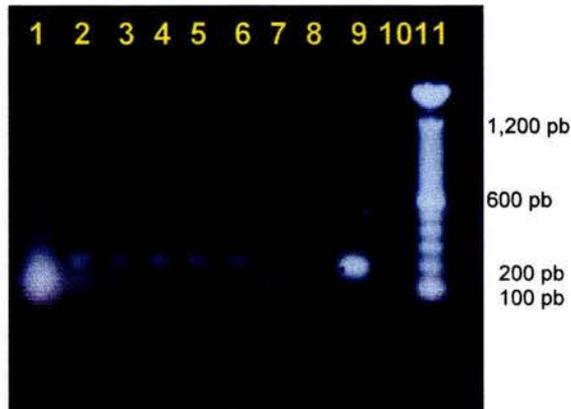
La especificidad de la PCR, con los iniciadores utilizados, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación implementadas para la investigación de *C. trachomatis* fueron probadas utilizando el DNA de 14 microorganismos. En la Figura 15, se puede ver en el carril 19 un amplificado de 200 pb, correspondiente al pLGV125, los carriles 7 y 8 con DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922 y de *Proteus sp* muestran un barrido y en el carril 14, con DNA de *Staphylococcus saprophyticus* se observa un amplificado de 900 pb.



**Carril 1** Marcador de PM (Ladder 100 pb)  
**Carril 2** como molde 4 ng de pLGV125  
**Carril 3** como molde 400 pg de pLGV125  
**Carril 4** como molde 40 pg de pLGV125  
**Carril 5** como molde 4 pg de pLGV125  
**Carril 6** como molde 400 fg de pLGV125  
**Carril 7** como molde 40 fg de pLGV125  
**Carril 8** como molde 4 fg de pLGV125

**Figura 13. Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el plásmido pLGV125 de *Chlamydia trachomatis***

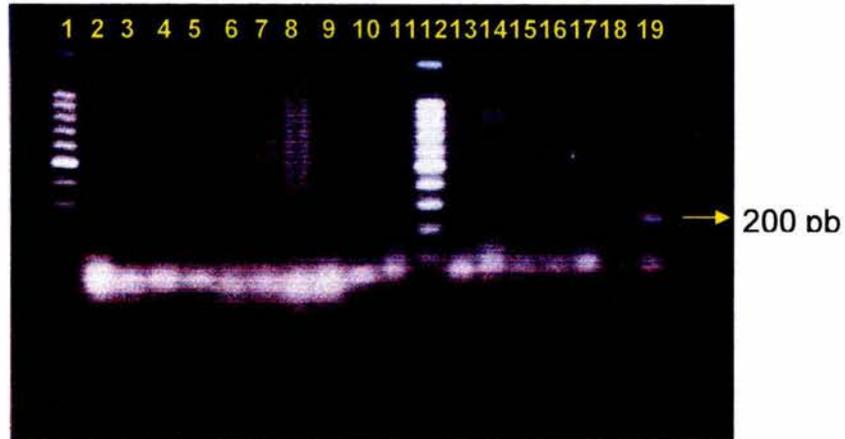
Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%. En los carriles del 2 y 7 se observa una banda de DNA de 200 pb obtenidas al realizar la PCR con diversas cantidades de molde. Se pudo detectar hasta 40 fg del pLGV125.



- Carril 1 DNA de células McCOY
- Carril 2 DNA de células McCOY con *C.trachomatis*
- Carril 3 DNA de células HeLa con *C.trachomatis*
- Carril 4 Muestra de exudado cervical No. 74 con *C.trachomatis* demostrada por IFD
- Carril 5 Muestra de exudado cervical No. 75 con *C.trachomatis* demostrada por IFD
- Carril 6 Muestra de exudado cervical No. 77 con *C.trachomatis* demostrada por IFD
- Carril 7 Muestra de exudado cervical No. 78 sin *C.trachomatis* demostrada por IFD
- Carril 8 Muestra de exudado cervical No. SF sin *C.trachomatis* determinado por IFD
- Carril 9 Control positivo con el pGLV125
- Carril 10 Control negativo
- Carril 11 Marcador de peso Molecular Ladder 100pb

**Figura 14. Demostración de *Chlamydia trachomatis* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras clínicas controles.**

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%. En los carriles del 2 y 6 se observa una banda de DNA de 200 pb obtenidas al realizar la PCR con DNA de muestras clínicas con *C. trachomatis*.



- Carril 1 Marcador de peso Molecular Ladder 100pb
- Carril 2 DNA de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Carril 3 DNA de *Neisseria gonorrhoeae* NRL 5001
- Carril 4 DNA de *Gardnerella vaginalis* ENCB 188
- Carril 5 DNA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
- Carril 6 DNA de *Salmonella typhimurium* ATCC 14208
- Carril 7 DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922
- Carril 8 DNA de *Proteus sp*
- Carril 9 DNA de *Salmonella typhi*
- Carril 10 DNA de *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606
- Carril 11 DNA de *Enterococcus faecalis* ATCC 25922
- Carril 12 Marcador de peso Molecular Ladder 100pb
- Carril 13 DNA de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Carril 14 DNA de *Staphylococcus saprophyticus*
- Carril 15 DNA de *Micrococcus luteus* ATCC 25922
- Carril 16 DNA de *Chlamydophila pneumoniae*
- Carril 17 Control negativo
- Carril 18 Control negativo
- Carril 19 Control positivo pLGV125

**Figura 15. Demostración de la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la investigación de *Chlamydia trachomatis***

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%. En el carril 19 se observa una banda de DNA de 200 pb correspondiente al pLGV125 de *C. trachomatis*. Los carriles 7 y 8 con DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922 y de *Proteus sp* muestran un barrido y en el carril 14, con DNA de *Staphylococcus saprophyticus* se observa un amplificado de 900 pb.

El análisis de los iniciadores T1 con secuencia (5'CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA3') y T2 con secuencia 5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3' en el Gene Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Blast)) indica que se ha secuenciado el plásmido de *C. trachomatis* que desarrolla en células de mamíferos, el pLGV440, el pCTT1 y el pCHL1 y que los iniciadores reconocen las secuencias de 21 y 20 nucleótidos en los cuatro plásmidos, con una especificidad del 100%, no reconocen a bacterias de la familia *Chlamydiaceae* ni a otras bacterias. La secuencia del pLGV125 con 10,776 pb al ser sometida a un análisis con el programa DNAMAN v3.0 muestra que los nucleótidos del iniciador T1 se encuentran en los sitios 603 al 623 y el complementario de los nucleótidos del iniciador T2 están en los sitios 783-802 dando un fragmento de DNA de 200 nucleótidos. Al analizar la secuencia del pLGV440 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBak](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBak), No. de acceso X06707) con 7,501 pb se observa que los nucleótidos del iniciador T1 se encuentran en los sitios 1250 al 1271 y complementario de los nucleótidos del iniciador T2 están en los sitios 1449 al 1430, dando un fragmento de DNA de 200 nucleótidos pb. En las secuencias mostradas abajo se ve los sitios en que se ubican los iniciadores T1 y T2 y el fragmento de 200 pb que se amplifica cuando se lleva a cabo la reacción.

### SECUENCIA DEL pLGV125

5'1 Nucleótidos 600

```

601 ccctaggcgt ttgtactccg tca cagcgggt tgctcgaagc acgtgcgggg ttattttaaa
661 agggattgca gcttgtagtc ctgcttgaga gaacgtgcgg gcgatttgcc ttaaccccac
721 catttttccg gacgaggtta cgaagacaaa acctcttcgt tgaccgatgt actctttag
781 aaagtgcata aacttctgag gataagttat aataatcctc ttttctgtct gacggttctt
      tcacgtat ttgaagactc ct
841 Nucleótidos 10776 3'

```

### SECUENCIA DEL pLGV440

3'1 Nucleótidos 1200

```

1201 ttgcggttg cgtgtcctgt gaccttcatt atgtcggagt ctgagcacc ctaggcggttg
1261 tactccgtca cagcgggtgc tcgaagcacg tgcgggggta tcttaaaagg gattgcagct
1321 tgtagtctcg cttgagagaa cgtgcgggcg atttgctta accccacat tttccggag
1381 cgagttacga agacaaaacc tcttcggtga ccgatgtact cttgtagaaa gtgcataaac
      t cacgtatttg
1441 ttctgaggat aagtataat aatcctcttt tctgtctgac ggttcttaag ctgggagaaa
      aagactcct
1501 Nucleótidos 7501 5'

```

### **Población estudiada**

Se trabajó con **93** mujeres, **58** que acudieron al Servicio de Ginecología, de estas, **49** refirieron vida sexual activa, **8** indicaron no haber iniciado actividad sexual y **una** sin vida sexual activa y **35** que acudieron al servicio de planificación y todas ellas con actividad sexual activa.

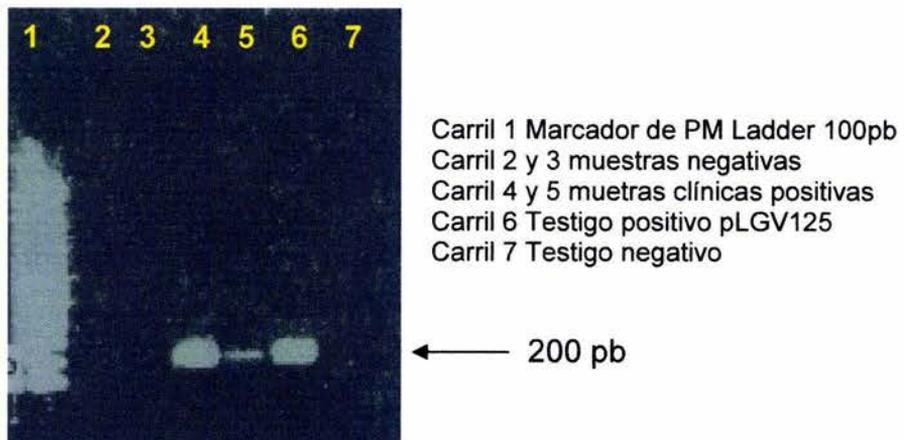
Las 8 pacientes que refirieron no iniciar actividad sexual se atendieron en el Servicio de Ginecología. El diagnóstico clínico más frecuente fue leucorrea crónica con 5 casos, vulvovaginitis con 2, cervicitis y vulvitis uno cada uno. La paciente que refirió leucorrea y no tener actividad sexual activa, de 50 años de edad, al auscultarla se le encontró una tumoración.

De las 9 pacientes que refirieron no tener actividad sexual, en una de ellas, con edad de 19 años se identificó *C. trachomatis* con las dos técnicas utilizadas.

De las 49 pacientes con actividad sexual y que fueron atendidas en el Servicio de Ginecología por presentar secreción transvaginal, 21 presentaron una infección por *C. trachomatis*, 20 dieron positivas por PCR (Figura 16) y por IFD y una paciente que se diagnóstico por IFD, la PCR dio negativa. 28 muestras dieron negativas por ambas pruebas (Cuadro 8).

Por la técnica de PCR se obtuvieron 20 verdaderos positivos, ningún falso positivo, un falso negativo, 28 verdaderos negativos.

Los resultados de las pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Ginecología y que presentaron infección por *C. trachomatis* del aparato genital presentaron para la PCR una sensibilidad de 95.2%, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 96.5%, encontrándose una exactitud de 97.9 % y una prevalencia de 42.8%.



**Figura 16. Investigación de *Chlamydia trachomatis* en muestras cervicales utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Fotografía de un gel de agarosa al 0.8%. En los carriles 4 y 5 se observa una banda de DNA de 200 pb correspondiente al pCT de *C. trachomatis* que indica que las pacientes tienen una infección causada por la bacteria. Los carriles 3 y 4 son muestras de pacientes que no presentan a la bacteria.

**Cuadro 8. Resultados obtenidos con inmunofluorescencia directa (IFD) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes que asistieron al Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud**

PCR	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	20	0	20
NEGATIVO	1	28	29
<b>TOTAL</b>	21	28	49

De las 35 pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Planificación Familiar, 16 presentaron una infección por *C. trachomatis*, 15 dieron positivas por ambas pruebas y una paciente se diagnóstico con la bacteria por IFD, la PCR dio negativa. 19 muestras dieron negativas por ambas pruebas (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Resultados obtenidos con inmunofluorescencia directa (IFD) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes que asistieron al Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud**

PCR	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	15	0	15
NEGATIVO	1	19	20
<b>TOTAL</b>	16	19	35

Por la técnica de PCR se obtuvieron 15 verdaderos positivos, ningún falso positivo, un falso negativo y 19 verdaderos negativos.

Las pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Planificación Familiar y que presentaron infección por *C. trachomatis* del aparato genital presentaron para la PCR una sensibilidad de 93.7%, una especificidad de 100%, un valor predictivo

positivo de 100%, un valor predictivo negativo de 95%, una exactitud de 97.1%, encontrándose una prevalencia de 45.7%.

Las edades que presentaron las 49 pacientes con actividad sexual que acudieron al Servicio de Ginecología (Figura 17) fueron entre los 15 y los 64 años, en el intervalo de 25 a 44 años se estudiaron 34 pacientes. De las 49 pacientes estudiadas, 21 presentaron infección con *C. trachomatis*, presentándose 13 en el grupo de 25 a 44 años, 3 casos de pacientes entre 20 y 24 años, 2 de 15 a 19 y una de 51 años.

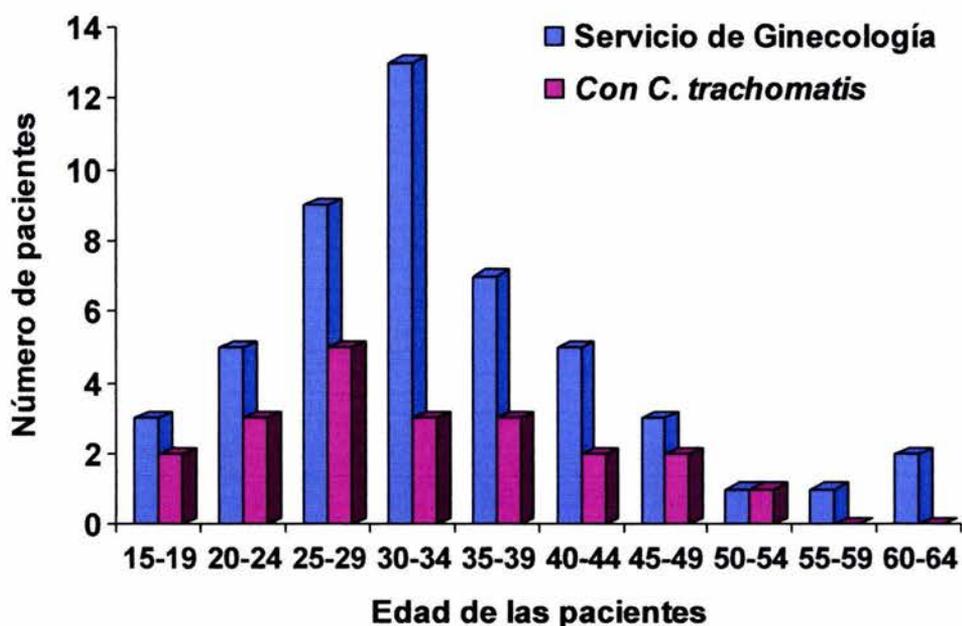


Figura 17. Pacientes positivas a *Chlamydia trachomatis* atendidas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.

Las edades que presentaron las 35 pacientes con actividad sexual que acudieron al Servicio de Planificación Familiar (Figura 18) fueron entre los 18 y los 58 años. En los intervalo de 25 a 44 años se estudiaron 20 pacientes, siete entre 20 y 24 años, siete entre 45 y 49 y una de 19 años. De las 35 pacientes estudiadas, 16 presentaron infección con *C. trachomatis*, presentándose 9 en el grupo de 25 a 44 años, 5 casos de pacientes entre 20 y 24 años y una de 19 años y otra de 55 años.

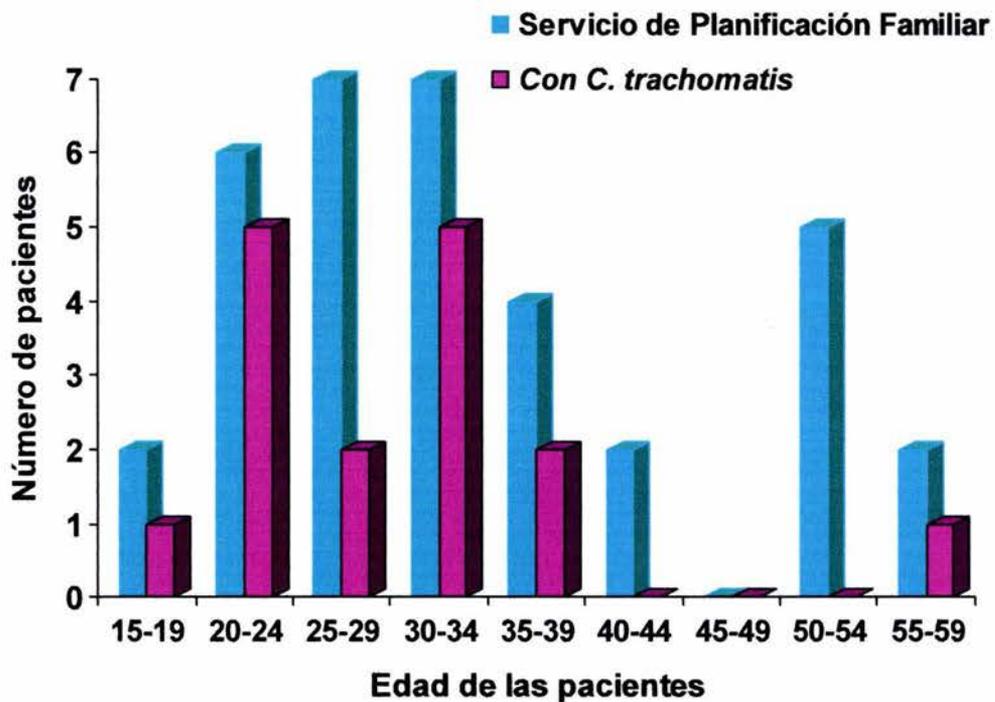
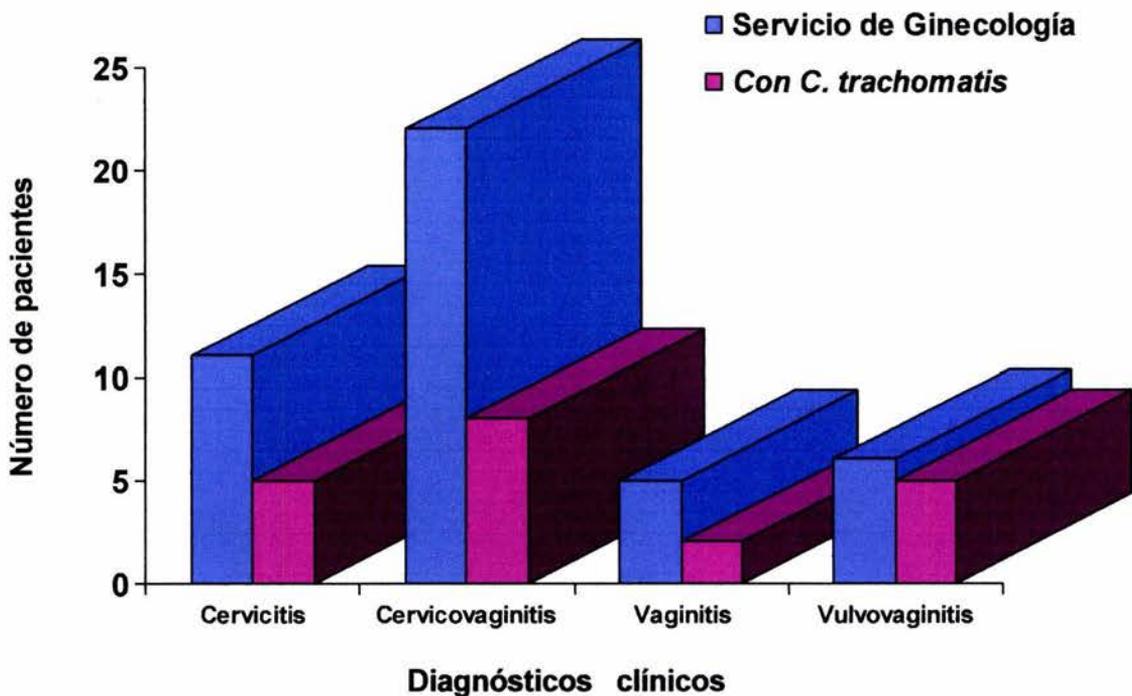


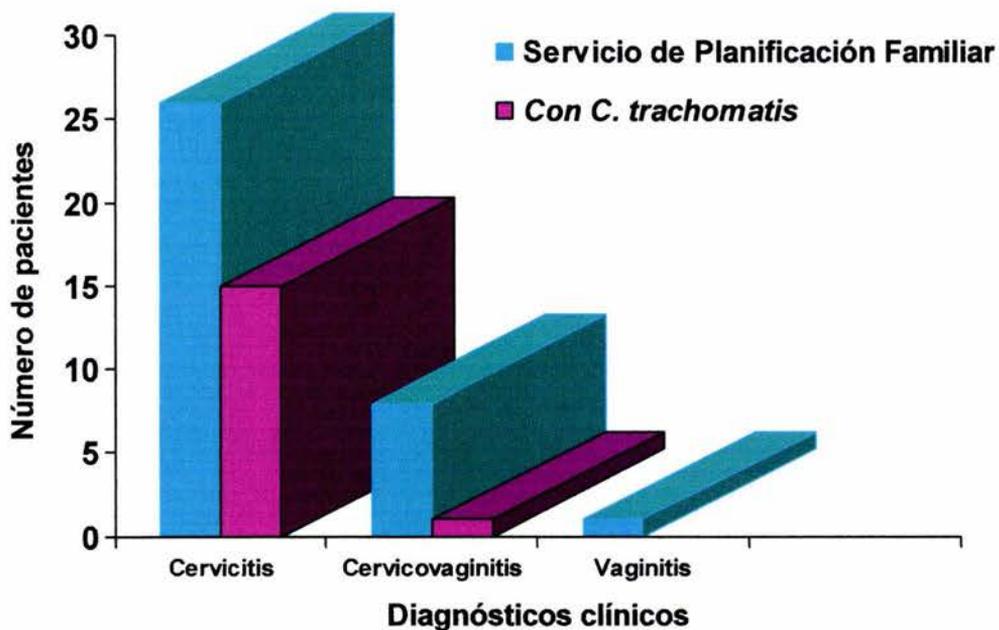
Figura 18. Pacientes positivas a *Chlamydia trachomatis* atendidas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.

Los diagnósticos clínicos de las pacientes del Servicio de Ginecología se muestran en la Figura 19, se presentaron 11 con cervicitis, 22 casos de cervico-vaginitis, 5 casos con vaginitis, 6 con vulvovaginitis y las siguientes pacientes que prefirieron leucorrea y al hacer la auscultación se encontró: 2 con quiste cervical, 1 caso con condiloma acuminado, 1 con huevo de Naboth y una paciente con polipos, estos casos no se muestran en la Figura.



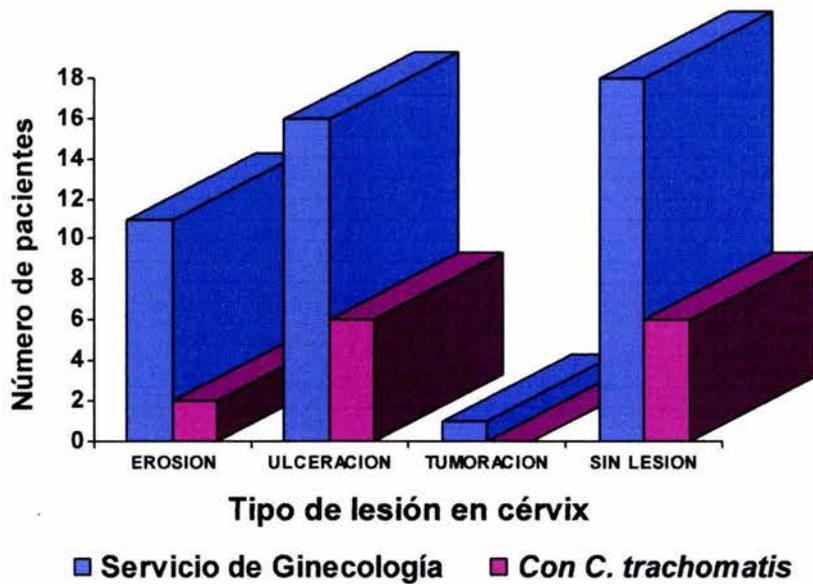
**Figura 19. Diagnósticos clínicos de las pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud**

Los diagnósticos clínicos de las pacientes del Servicio de Planificación Familiar se muestran en la Figura 20, se presentaron 26 casos con cervicitis, 8 con cervico-vaginitis y uno vaginitis.

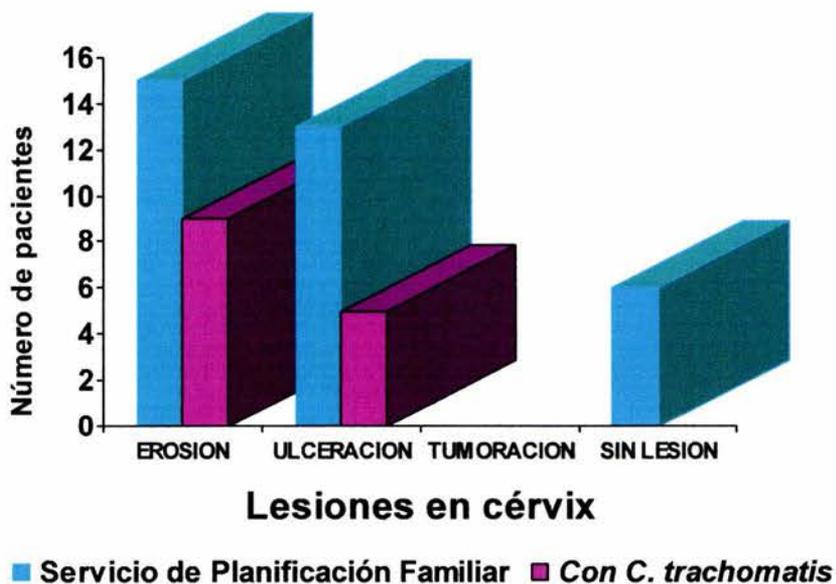


**Figura 20. Diagnósticos clínicos de las pacientes que acudieron al Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud**

Las lesiones en cérvix que presentaron las pacientes estudiadas en ambos servicios se observan en las Figuras 21 y 22. En el Servicio de Ginecología (Figura 21), 11 pacientes presentaron erosión, 16 ulceración y 18 no presentaron lesión ni en vulva, vagina o cérvix. Se presentó una paciente con cada una de las siguientes lesiones: tumoración, erosión con ulcera y erosión, ulcera y tumoración, una presentó un quiste cervical. En el Servicio de Planificación Familiar (Figura 22), 15 pacientes presentaron erosión, 13 ulceración, y una erosión con ulceración. La lesión que se presentó con más frecuencia en ambos grupos fue la erosión cervical.



**Figura 21. Lesiones presentadas en cérvix por las pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.**



**Figura 22. Lesiones presentadas en cérvix por las pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.**

El tipo de secreción que presentaron las mujeres con *C.trachomatis* se describe en las Figuras 23 y 24. La secreción amarilla fue la que se presentó más frecuentemente en los pacientes de ambos servicios.

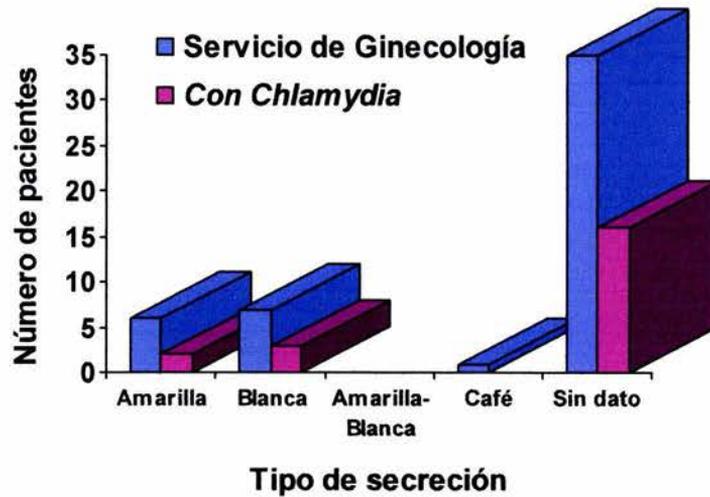


Figura 23. Tipo de secreción cervical que presentaron las pacientes del Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.

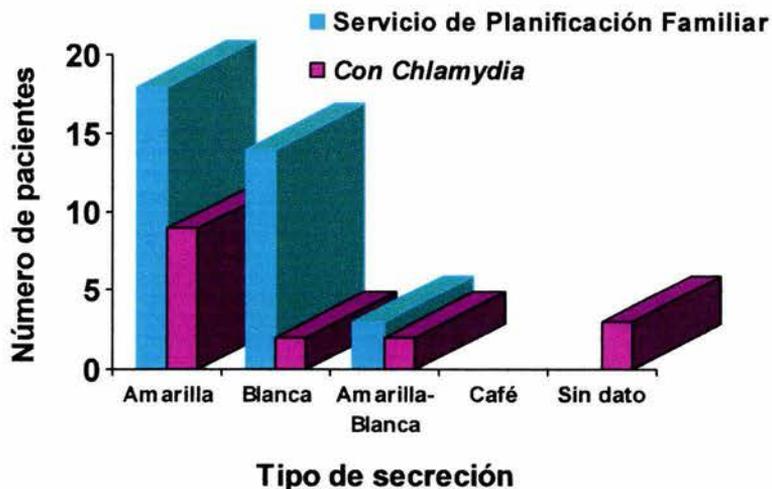
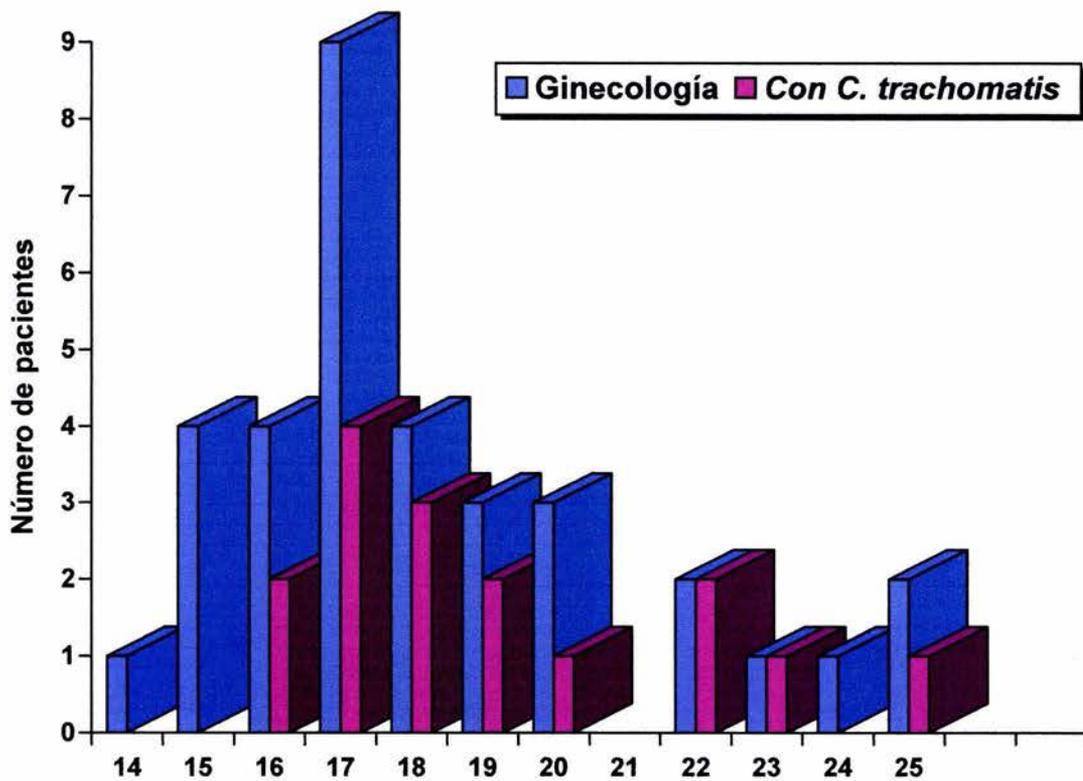
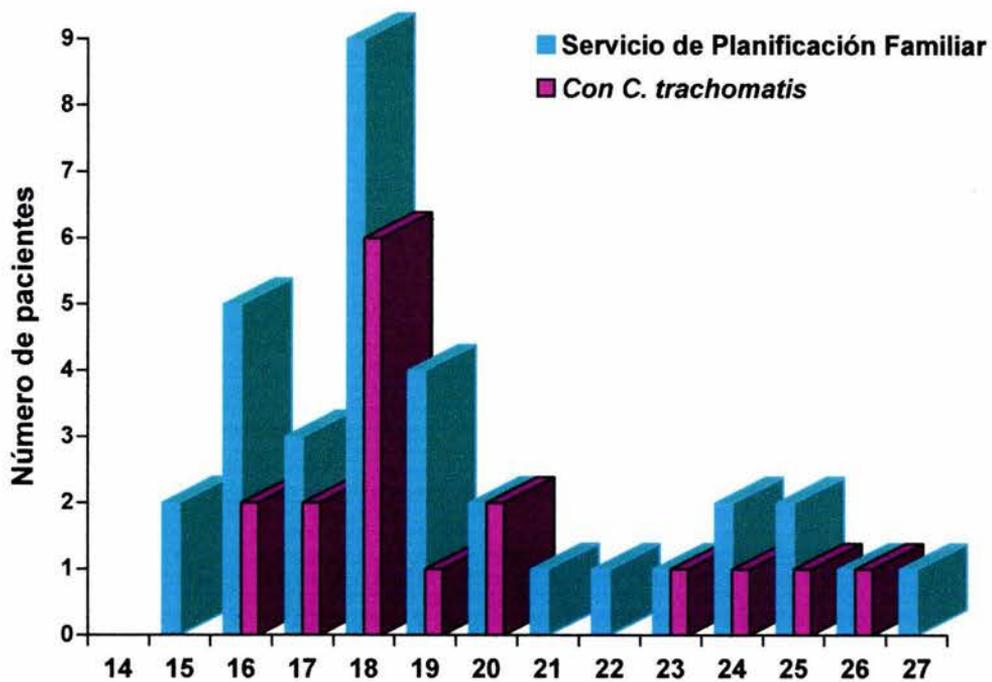


Figura 24. Tipo de secreción cervical que presentaron las pacientes del Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.

Las edades del inicio de actividad sexuales de 68 pacientes con vida sexual activa, 34 que asistieron al Servicio de Ginecología y 34 de Planificación Familiar fue de los 14 años y hasta los 27 años. 31 pacientes iniciaron su vida sexual entre los 16 y 19 años (Figuras 25 y 26). 15 pacientes del Servicio de Ginecología y una paciente del Servicio de Planificación Familiar no proporcionaron el dato.

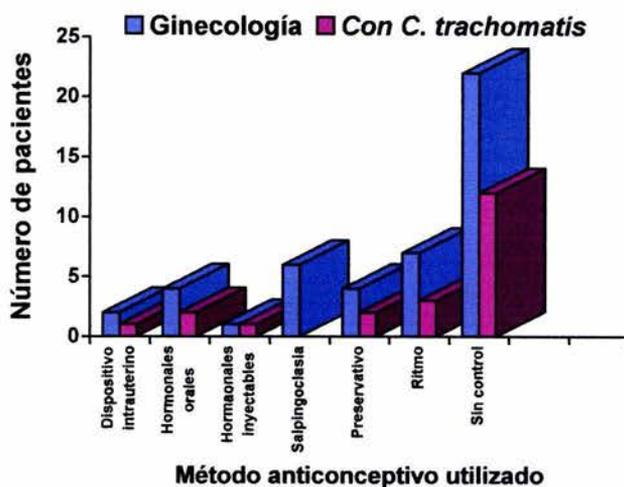


**Figura 25. Edad de inicio de la actividad sexual de las pacientes estudiadas en el Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud y edad de la infección con *Chlamydia trachomatis*.**

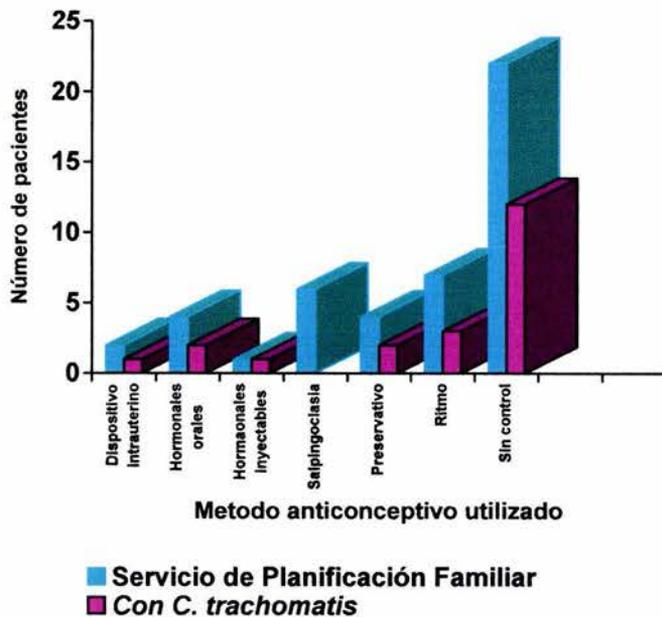


**Figura 26. Edad de inicio de la actividad sexual de las pacientes estudiadas en el Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud y edad de la infección con *Chlamydia trachomatis*.**

Los métodos anticonceptivos utilizados por las pacientes estudiadas fueron diversos. En el Servicio de Ginecología (Figura 27), el método más frecuentemente utilizado fue la salpingoclasia con 7 casos, una de las pacientes refirió que a su esposo se le había practicado la vasectomía, en dos pacientes no se obtuvo el dato. En el Servicio de Planificación Familiar (Figura 28) se presentaron 9 casos con dispositivo intrauterino, 6 con salpingoclasia y una con histerectomía. La mayoría de las pacientes de ambos grupos no utilizaban control anticonceptivo.



**Figura 27. Métodos de control anticonceptivo utilizado por las pacientes del Servicio de Ginecología de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.**



**Figura 28. Métodos de control anticonceptivo utilizado por las pacientes del Servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 6 de la Secretaría de la Salud.**

## 5 Discusión

Tradicionalmente la identificación bacteriana se realiza por medio de la determinación de la morfología microscópica, la morfología colonial y el metabolismo microbiano. Esto no siempre es posible de realizar, debido a que algunos microorganismos no crecen en los medios de cultivo utilizados actualmente debido a sus requerimientos nutricionales o que hasta la fecha no se han podido cultivar y su presencia se observa solamente utilizando alguna tinción o su identificación se hace con anticuerpos dirigidos contra alguno de sus antígenos. También es importante considerar que no todos los microorganismos se pueden aislar e identificar en el laboratorio, ya que algunos para ser aislados, requieren de un alto nivel de bioseguridad. *C. trachomatis* no es considerado como un patógeno peligroso para ser adquirido en el laboratorio, no obstante el riesgo de infección con la bacteria esta relacionado con la exposición de muestras de conjuntiva, de genitales y de abscesos de ganglios linfáticos inguinales de pacientes infectados, por lo que se recomienda trabajar con el nivel de seguridad 2 en donde se manejan los agentes infecciosos que no son transmitidos vía aerosoles (Sewell 1995).

El concepto clásico de la identificación bacteriana ha sido modificado en los últimos años a consecuencia del desarrollo de la biología molecular y a los avances en la ingeniería genética, ya que, como se mencionó anteriormente, no siempre es factible aislar al agente infeccioso, lo anterior, aunado a la búsqueda de pruebas más rápidas, ha permitido el desarrollo de métodos diagnósticos diferentes, como es el caso de la técnica de PCR, los cuales poco a poco van ganando terreno en la aplicación y aceptación en los laboratorios clínicos que pueden implementar esta metodología (Aparicio 1999).

Una de las ventajas que representa este estudio de trabajar con una transformante, es facilitar el trabajo de laboratorio, ya que como se mencionó al inicio del escrito las clamidias son microorganismos intracelulares obligados, por lo

que trabajar con esta bacteria para obtener DNA plasmídico o el genóforo, se necesitaría un abasto de cuerpos elementales, lo cual implicaría el uso de la infraestructura para cultivos celulares. Además el vector de clonación pBR327 con el cual fue construido el pLGV125 es multicopia, presentándose de 20 a 30 moléculas del plásmido por célula de *E. coli*, lo que representa para el propósito del trabajo, la obtención de una mayor cantidad de DNA molde, ya que el trabajo con cuerpos elementales, representaría la presencia de 10 copias del plásmido por cuerpo elemental.

La implementación de la PCR se inició tomando como base a las condiciones descritas por Vogels *et al.*, (1993). Las condiciones informadas en el reporte fueron probadas a partir del pLGV125. Después de varios experimentos no se obtuvo la amplificación del fragmento de 200 pb esperado, por lo que se procedió a realizar ensayos, en donde se variaron las cantidades y concentraciones de la mezcla de reacción y se modificaron las condiciones de la amplificación. Con base a estos experimentos, se determinaron las condiciones para efectuar la investigación de *C. trachomatis* por PCR utilizando como testigo al pLGV125 y aplicado a diferentes muestras, se demostró la amplificación de un fragmento de 200 pb. (Figura 12).

La PCR dirigida contra el pCT ha sido evaluada ampliamente y la sensibilidad de ésta técnica es mejor que la de otros métodos, siendo capaz de detectar desde un cuerpo elemental (Black 1997). Hyypiä *et al.*, haciendo estudios de hibridación obtienen una sensibilidad de 100 pg, equivalente a  $10^5$  moléculas de DNA, En el presente trabajo, se pudo observar el amplificado de 200 pb cuando se utilizaron 40 fg (Figura 13), considerando que 100 ag equivalen a 10 copias del plásmido (Welch 1990), en el presente trabajo la sensibilidad obtenida equivale a 40 moléculas de DNA plasmídico. Class *et al.*, (1991) al implementar una PCR utiliza como blanco 100 ng de DNA, en este estudio la amplificación se hizo a partir de 4 ng del pLGV125.

La especificidad de la PCR para la investigación de *C. trachomatis* se llevo a cabo utilizando el DNA de varios microorganismos. En la Figura 14, se puede ver en el carril 19 un amplificado de 200 pb, correspondiente al pLGV125, los carriles 7 y 8 con DNA de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922 y de *Proteus sp* muestran un barrido y en el carril 14, con DNA de *Staphylococcus saprophyticus* se observa un amplificado de 900 pb. Estos resultados indican que la PCR tiene alta especificidad para demostrar al pCT, ya que al probar por PCR el DNA de otros microorganismos que usualmente se encuentran en muestras de genitales (Hernández 2000) o de microorganismos que se ha demostrado, presentan reacción cruzada con *C.trachomatis* no presentan el amplificado de 200 pb que se presenta con *C.trachomatis*. En la literatura se encuentran informes que indican la especificidad de la PCR en *C. trachomatis* (An 1992; Hyypiä 1985; Welch 1990), cuando es probada con el DNA de otros microorganismos, informando que no hay falsos positivos.

La PCR aplicada al diagnóstico de laboratorio en la actualidad tiende a desplazar al cultivo, que se reconsidera el método de elección, aunque requiere que la muestra clínica tenga de 10 a 100 CE; en contraste con la PCR que con un CE es suficiente para realizar el diagnóstico, además con esta metodología no se necesita el aislamiento del agente ni que el microorganismo este viable y el reporte del resultado se obtiene en un promedio de 5 horas, además de que el riesgo de adquirir una infección en el laboratorio desaparece desde el momento que las muestras son sometidas a la lisis.

### **Población estudiada**

Los resultados obtenidos en la primera etapa del trabajo, indican que la sensibilidad de la prueba de PCR implementada, es a partir de la presencia de 40 moléculas de DNA plasmídico, y considerando que un cuerpo elemental presenta 10 copias del plásmido, sería necesario para realizar el diagnóstico por PCR a partir de muestras clínicas, la presencia en las mismas de 4 CE. Esto es factible

debido al hecho de que al término del ciclo de desarrollo de la bacteria se pueden obtener entre 100 y 1,000 CE por célula infectada, por lo que, con una célula del epitelio columnar presente en la muestra e infectada con la bacteria se podría realizar el diagnóstico de laboratorio (Moulder 1991).

Las condiciones implementadas, así como la sensibilidad y la especificidad demostradas son adecuadas para el diagnóstico de la bacteria, demostrando la presencia del plásmido pCT a partir de muestras clínicas para realizar con la PCR el diagnóstico de *C. trachomatis*.

La investigación de *C. trachomatis* se realizó por medio de IFD y por PCR, ambos métodos fueron aplicados a todas las muestras. En el trabajo se tomó como método de referencia la IFD, debido a que el equipo comercial de IFD que presenta anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína dirigidos contra la MOMP no presentan reacción cruzada con otros microorganismos, comparado con el equipo comercial dirigido contra el LPS de la bacteria que sí presenta reacción cruzada con otras bacterias (CDC 1993), en la literatura se menciona que presenta una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 99.8%, con valor predictivo positivo del 95% y valor predictivo negativo del 99% comparada con el cultivo celular (Black 1997) y además por tratarse de una técnica que ha sido utilizada por el grupo de trabajo del Laboratorio de Bacteriología Médica, lugar en donde se efectuó el diagnóstico (Fernández 1986; Hernández 1992).

El método de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis* a partir de muestras clínicas es su aislamiento en células McCoy y su demostración por IFD (CDC 1993, 2002), una alternativa para el diagnóstico es tomar como método de elección dos técnicas de laboratorio en los que no se utilicen cultivos celulares (Watson 2002). En el presente trabajo se tomó como una muestra positiva cuando la IFD y el PCR demostraron la presencia de la bacteria, en la IFD, por la

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

observación de CE y por PCR la observación de la amplificación de un fragmento de 200 pb.

Las pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Ginecología y que presentaron infección por *C. trachomatis* del aparato genital presentaron una prevalencia de 42.8%, la cual es superior a la reportada por Rosas *et al.*, (1993), el cual al estudiar a 30 pacientes y utilizar IFD encontró una frecuencia del 20%, por Giuliano *et al.*, (2001) utilizando sondas en 1,037 pacientes asintomáticas mexicanas obtuvo una frecuencia del 8.2% y en 1,037 pacientes anglosajonas asintomáticas el 6.7%, y a lo informado por Jiménez *et al.*, (2001), utilizando ELISA en 116 mujeres mexicanas que asistieron a consulta ginecológica para la detección oportuna de cáncer, encontró infección por *C. trachomatis* en 18%. La diferencia de frecuencia puede deberse a que las pacientes del presente estudio, en el momento de la consulta refirieron tener problemas de leucorrea, comparados con los estudios de Giuliano *et al.*, (2001) y Jiménez *et al.*, (2001) que fue de población abierta que acudía a consulta para la detección oportuna de cáncer, otro factor que influye en la frecuencia es la metodología utilizada en ambos estudios, la cual es menos sensible que la PCR implementada.

Las pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Planificación Familiar y que presentaron infección por *C. trachomatis* del aparato genital presentaron una prevalencia de 45.7%, superior a la reportada por Rosas *et al.*, (1993), con el estudio de 36 pacientes asintomáticas encontró un 25.7% de pacientes infectadas, por Gallaher (1990), que en 199 pacientes sintomáticas reportó un 11% y en pacientes asintomáticas un 8.1% de infección por *C. trachomatis* respectivamente, en ambos grupos de pacientes la identificación se hizo por IFD. Canto (2003) en un estudio de 1,100 pacientes mexicanas asintomáticas, utilizando ELISA, informó que 74 pacientes presentaron infección (6.7%). La diferencia de la frecuencia de infección por *Chlamydia* puede deberse a que las pacientes del presente estudio, en el momento de la consulta refirieron tener problemas de secreción transvaginal

y fueron diagnosticadas clínicamente y comparadas con los estudios de Gallagher (1990) y Canto (2003) fue de población asintomática que acudía a consulta y se solicitó su participación en el estudio. La prevalencia determinada en muestras endocervicales utilizando el equipo comercial de PCR que amplifica un fragmento de la MOMP, varía de un dos a un 10% (Black 1997). Los datos revisados en la literatura para muestras cervicales aplicando una PCR implementada en el laboratorio y dirigida al pCT muestran los siguiente: Ostergaard *et al.*, (1990), obtuvo una prevalencia de 17.6, una sensibilidad de 100% y especificidad del 99%, Ossewarde *et al.*, (1992), informó una prevalencia de 22.7%, una sensibilidad de 100%, una especificidad de 98%, un valor predictivo positivo de 94%, un valor predictivo negativo de 100%, Vogels *et al.*, (1993), reporta una prevalencia de 17.0 %, una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del 100% cada uno. En los estudios anteriores utilizaron el aislamiento de la bacteria en células McCoy como método de referencia y encontraron que la PCR es una técnica más sensible.

La PCR implementada en el presente estudio dio negativa para el diagnóstico de *C. trachomatis* en dos de las pacientes, una que acudió al Servicio de Ginecología y otra al Servicio de Planificación Familiar, pero dio positiva por IFD, por lo que esta técnica, y en estos casos, resultó ser más sensible para el diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*. Esto puede explicarse debido a que en la literatura se describe la presencia de cepas que no presentan el plásmido. Peterson *et al.*, (1990), realizando un estudio de secuenciación, aislaron una cepa carente del plásmido pCT, ellos encontraron que dicha cepa, perteneciente a la serovariedad LGV, es capaz de infectar y desarrollarse en cultivo celular sin ningún problema aparente, Farencena *et al.*, (1997) reportaron el aislamiento de una cepa de la serovariedad tracoma que no tiene el plásmido, y Stothard *et al.*, (1998), reporta el aislamiento de una cepa que no presenta el pCT, perteneciente a la serovariedad E, por lo anteriormente descrito, las cepas de *C. trachomatis* que no presentan el plásmido dan resultados falsos negativos y que en el caso particular de las dos

pacientes, estas presentaron una infección por la bacteria carente del plásmido pCT. Otra explicación del resultado negativo de la PCR sería la inhibición de la reacción, *Toye et al.*, (1998) informa que en exudados cervicales se puede presentar una inhibición de la PCR del 7%. La inhibición se puede dar en la utilización de la solución de lisis, con el amortiguador de la reacción o con alguna sustancia presente en la muestra clínica. *Ossewarde et al.*, (1992), demostró que el NaCl y los detergentes: dodecil sulfato de sodio, desoxicolato de sodio y sarcosil eran incompatibles con la PCR, además el etilen diamino tetra acetato de sodio y la espermidina inhiben la PCR (*Ostergaard 1990*), en el presente trabajo, para efectuar la lisis de las células presentes en la muestra clínica se utilizó el calentamiento a 94°C y la proteinasa K. La gelatina a una concentración del 0.1% presente en el amortiguador de PCR puede inhibir la reacción de PCR, para realizar la PCR se utilizó un amortiguador comercial de PCR que no contiene gelatina y aunque presenta el detergente triton X-100, este no inhibe la reacción (*Ossewarde 1992*). La presencia de sangre en las muestras o del polisacárido del moco cervical pueden inhibir la PCR, el tratamiento enzimático de la muestra puede inactivar o degradar a las sustancias inhibitoras de la PCR, además se ha mencionado que cuando los exudados cervicales son sometidos a la refrigeración de uno a 7 días a 4°C se obtiene una inactivación de los inhibidores del 86.2% de las muestras que inicialmente dieron PCR negativo y posterior son PCR positivas, en congelación a -70°C se elimina los falsos negativos hasta en un 60% (*Toye 1998*). En conclusión las sustancias que inhiben la reacción de PCR pueden ser sensibles a la temperatura, o inactivarse durante su almacenamiento o ser destruidas durante a la ebullición, las muestras del presente trabajo se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento, se calentaron a 94°C y se sometieron a tratamiento enzimático, por lo que la explicación de las muestras falsas negativas puede deberse a que las cepas realmente no presentan el pCT y no a que se inhibió la reacción de PCR, para corroborar este dato, sería necesario aplicar al lisado una PCR que ponga de manifiesto un fragmento de la MOMP o un fragmento del rRNA. El reactivo comercial de IFD, tiene anticuerpos monoclonales

contra la MOMP, estos son específicos contra *C. trachomatis*, sin embargo y como lo informó Krech (1985), en el presente estudio existe la posibilidad que las dos muestras positivas por IFD, se deba a la unión de la fracción FC del anticuerpo monoclonal a la proteína A de *Staphylococcus aureus*, que pudiera estar presente en la muestra clínica y se presente una fluorescencia inespecífica y que estos sean falsos positivos.

El grupo de edad de 25 a 44 años está conformada por pacientes que se encuentran en edad reproductiva y cuando se presenta algún proceso infeccioso a nivel de genitales, este grupo presenta en México el mayor número de casos en todas las enfermedades de transmisión sexual que son de notificación obligatoria ([www.epi.org.mx/](http://www.epi.org.mx/)). En el caso particular del presente estudio (Figuras 17 y 18) y como se mencionó en el inciso 1.4.2.2 aunque las infecciones genitales causadas por *C. trachomatis* no son de notificación obligatoria, al ser transmitidas sexualmente presentan el mismo comportamiento.

En las Figuras 19 y 20 se observan los diagnósticos clínicos de las pacientes del Servicio de Planificación Familiar, la etiología de las ETS es diversa, así mismo el sitio anatómico afectado está en relación directa con la edad de la paciente y por el agente infeccioso causante del daño. *C. trachomatis* coloniza y daña el epitelio columnar del endocervix, otros agentes etiológicos pueden dañar cervix, vagina, vulva y uretra, además se pueden presentar infecciones mixtas, lo que explicaría el daño de diversos sitios anatómicos, en el presente trabajo se presentaron 26 casos con cervicitis, 8 con cervico-vaginitis y uno vaginitis (Deleón y Hernández 2000; Hernández 2000; Pájaro 2001).

Las lesiones en cervix que presentaron las pacientes estudiadas en en el Servicio de Ginecología fueron erosión y ulceración principalmente. En el Servicio de Planificación Familiar las lesiones más frecuentes fueron erosión y ulceración. Estas lesiones se ha descrito que se presentan en cervix de las pacientes con

infección por *C.trachomatis* (Canto 2003), sin embargo ninguna de estas lesiones orienta a pensar que sea causada por la bacteria, aunque la ulceración es la que se presenta con mayor frecuencia, otro dato importante es el sangrado cuando se hace el raspado al tomar la muestra (Schachter 1999). Las lesiones presentadas a nivel de cervix en las pacientes con *Chlamydia* reafirman el hecho de que la bacteria infecta el epitelio columnar (Schachter 1999).

La infección clamidial del endocervix es frecuentemente asociada a la presencia de una descarga endocervical mucopurulenta (Schachter 1999) asociada a inflamación y congestión. Se ha descrito que en la descarga se presentan más de 10 polimorfonucleares por campo microscópico, en el caso del presente estudio no se evaluaron microscópicamente las muestras (Schachter 1999; Pájaro 2001). La infección por la bacteria no tiene una relación directa con el color de la secreción (Jones 2001), aunque la secreción amarilla fue la que se presentó más frecuentemente.

En las Figuras 25 y 26 se observa la representación gráfica correspondiente al inicio de actividad sexuales de 68 pacientes con vida sexual activa, 34 que asistieron a planificación familiar y 34 del servicio de ginecología. Una paciente del servicio de planificación familiar y 15 del servicio de ginecología no proporcionaron el dato. El inicio fue de los 14 años y hasta los 27 años. El inicio de actividad sexual a edad temprana por parte de las mujeres, conforma un grupo que pueden, si no cuentan con información y protección, desarrollar una ETS, así como sufrir sus complicaciones como la enfermedad pélvica inflamatoria, parto prematuro, rompimiento prematuro de membranas e infertilidad (Calderón 1999; Canto 2001), en el presente estudio 31 pacientes iniciaron su vida sexual entre los 16 y 19 años.

La mayoría de las pacientes de ambos grupos no utilizan control anticonceptivo. En la literatura se menciona que el uso de anticonceptivos orales son un factor predisponente para adquirir una infección a nivel de genitales, debido a que el uso

de este tipo de hormonales pueden producir ectropión cervical (Canto 2001), en el presente estudio esto no se pudo evaluar debido al escaso número de pacientes que refirió su uso.

Es necesario ampliar el número de pacientes a estudiar, con el propósito de determinar la prevalencia real de *C. trachomatis* en pacientes que acuden a los Servicios de Ginecología y de Planificación Familiar, trabajando tanto con pacientes sintomáticas como con pacientes que acuden a control natal o a toma de muestra para Papanicolaou para la prevención de cáncer. Además es importante determinar la presencia de la bacteria en personas que acuden a centros de salud o clínicas de consulta general, a clínicas de atención específica de pacientes con ETS y pacientes que se atienden en la consulta privada. Otro grupo importante a estudiar serían las poblaciones de alto riesgo como el grupo de adolescentes, las sexoservidoras y las reclusas. El conocer la prevalencia de estos grupos de pacientes permitirá saber si las infecciones por *C. trachomatis* son un problema de salud pública en México y sobre todo dar un tratamiento adecuado a las pacientes, para así evitar complicaciones futuras en las mismas y evitar la transmisión de la bacteria.

## 6 Conclusiones

Se implementó y desarrolló la metodología para la detección de *Chlamydia trachomatis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando una cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pLGV125.

Se probó, determinó y validó la sensibilidad y la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *C. trachomatis*

Las pacientes sin actividad sexual que fueron atendidas en el Servicio de de Ginecología presentaron una proporción de infección por *C. trachomatis* de 1/9, las pacientes que refirieron actividad sexual tuvieron una prevalencia del 42.8%. Las pacientes del Servicio de Planificación Familiar mostraron una prevalencia del 45.7%.

Se cuenta con la metodología para realizar el diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por *C. trachomatis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

## 7 Referencias

- Acosta-Cazares B. 1996. Surgimiento de la *Chlamydia trachomatis*. Epidemiología. **13**(9):1-2.
- Acosta-Cazares B. 1996. *Chlamydia trachomatis* como factor de riesgo de algunas complicaciones del embarazo. Enf. Inf. Microbiol. Mex. **16**(3):142-145.
- Alvarado-Diez MA, Rivera-Rebolledo JC, Serrano-López V, Troconis-Trens G, Valencia-Carranco J, Solórzano-Santos F, Márquez-Enriquez LM. 1995. Síndrome de dificultad respiratoria adquirida por *Chlamydia trachomatis*. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. **52**(10):582-585.
- An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, Weisburg WG, Klinger JD and Olive DM. 1992. Infección with a Plasmid-Free Variant *Chlamydia* related to *Chlamydia trachomatis* Identified by Multiple Assays for Nucleic Acid Detection. J. Clin. Microbiol. **30**(11):2814-2821.
- Aparicio Ozores G, Castro Escarpulli G y Hernández Méndez JT. 1999. La biología molecular aplicada a la bacteriología médica. Bioquímica. **24**(1):23-30.
- Arredondo García JL, Narcio Reyes MLE, Casanova Román G y Figueroa Damian R. 1993. Enfermedades transmitidas sexualmente (ETS) en un grupo de adolescentes que asisten a un Instituto de atención Perinatal. Gac. Med. Mex. **129**(1):75-79.
- Bañuelos Panuco CA, Deleón Rodríguez I, Hernández Méndez JT, Martínez Guzmán LA, Akle Fierro D, Miranda Murillo J and Reyes Maldonado E. 2000. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Pregnant Women by the Papanicolaou Technique, enzyme immunoassay and Polymerase Chain Reaction. Acta Cytol. **44**(2): 114-123.
- Barnes RC. 1989. Laboratory Diagnosis of Human Chlamydial Infections. J. Clin. Microbiol. **2**(2):119-136.
- Beatty WL, Morrison RP and Byrne GI: 1994. Persistent *Chlamydiae*: from Cell Culture to a Paradigm for Chlamydial Pathogenesis. Microbiol. Rev. **58**(4):686-699.
- Bianchi A, Cieux C, Brunat M, Vexiau D, Fermanach M, Pezin P, Janier M, Morel P and Lagrange PH. 1994. An Evaluation of the Polimerase Chain Reaction Amplicor *Chlamydia trachomatis* in Male urine and Female Urogenital Specimens. Sex. Transm. Dis. **21**(4):196-200.
- Birnboim, S and Doly J. 1979. A Rapid Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **1**: 1513-1523

Black CM. 1997. Current Methods of laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. Clin. Microbiol. Rev. **10**(1):160-184.

Blanding, J, Hirsch L, Stranton N, Wright T, Aarnaes S, de la Maza LM and Peterson EM. 1993. Comparison of the Clearview, The PACE 2 Assay, and the Culture for the Detection of the Detection of *Chlamydia trachomatis* from Cervical Specimens in a low-Prevalence Population. J. Clin. Microbiol. **31**(6):1622-1625.

Bustos López H H, Barrón Vallejo J, García Malvárez B, Kably Ambe A, Cáceres Zelaya H. 1995. Aplicación de un algoritmo diagnóstico prospectivo para pacientes con pérdida fetal recurrente. Ginec. Obst. Méx. **63**:96-100.

Bustos-López HG, Vázquez-Juárez MA, Arredondo-García JL, Lira-Plascencia J, Beltrán- Zúñiga M y Guerra-Infante F. 1995. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con esterilidad y embarazo no complicados. Perinatol. Reprod. Hum. **9**(4):227-234.

Calderón-Jaimes E. 1999. Tratamiento y prevención de las enfermedades de transmisión sexual. Salud Publica Mex. **41**(4):334-343.

Canto de Cetina T, Polanco Reyes L, Fernández-González y Ruíz-García S. 2003. Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. Salud Publica Méx. **45**(S5):S657-S661.

CDC. 1993. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections-1993. MMWR.1993;42(RR-12).

CDC. 2002. Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002. MMWR.2002;51(RR-15).

Chen JC and Stephens RS. 1997. *Chlamydia trachomatis* glycosaminoglycan-dependent and independent attachment to eukariotic cells. Microb. Pathog. **22**(1):23-30.

Claas HCJ, Wagenvoort JHT, Niesters HGM, Tio TT, Van Rijsoort JH and Quint WGV. 1991. Diagnostic Value of the Polimerase Chain Reaction for *Chlamydia* Detection as Determined in a Follow-UPStudy. J. Clin. Microbiol. **29**(1):42-45.

Clarke ML, Sierra FM, Daidone JB, López N, Covino MJ and McCormack MW. 1993. Comparison of the Syva Microtrak enzyme immunoassay and Gen-Probe PACE 2 with cell culture for diagnosis of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in a High-prevalence female population. J. Clin. Microbiol. **31**(6):968-971.

Clyde WA Jr. Kenny GE and Schachter J.1984. Cumitech 19. Laboratory diagnosis of Chlamydial and Mycoplasmal infections. American Society for Microbiology.

Comanducci M, Ricci S and Ratti G. 1988. The Structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. *Mol Microbiol.* **2**:531-538.

Comanducci M, Ricci S, Cevenini R and Ratti G. 1990. Diversity of the Common Plasmid in Biovars with Different Pathogenicity. *Plasmid.* **23**:149-154.

Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, Giuliani M M, Ricci S, Scarlato V and Ratti G. 1993. Expression of a plasmid gene of *Chlamydia trachomatis* encoding a novel 28 Kda antigen. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1083-1092.

Curiel Quesada E. 2000. Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* mediante técnicas de biología molecular. En: Deleón Rodríguez I y Hernández Méndez JT. *Chlamydia trachomatis: ¿Un problema de salud Pública en México?*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México.

Deleón Rodríguez I, Jiménez Escalante ZA, Jiménez Escalante ZA, Escamilla Avilés E., Fainsilber Moldawska Z, García S. 1994. El valor de la técnica de Papanicolaou en el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. *Bioquímica.* **XIX(17)**:177-181.

Deleón Rodríguez I y Hernández Méndez JT. 2000. *Chlamydia trachomatis: ¿Un Problema de Salud Pública en México?*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México.

Díaz-Barreiro G, Díaz López E, Servín-Ramírez JF. 1997. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en el cérvix de pacientes embarazadas en control prenatal. *Ginec. Obs. Méx.* **65**:48-51.

Echániz-Avilés G, Calderón-Jaimes E, Carnalla-Barajas n, Soto-Noguerón A, Cruz-Valdés A, Gatica-Marquina R. 1992. Prevalencia de infección cervico-vaginal por *Chlamydia trachomatis* en población femenina de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. *Salud Publica Mex.* **34(3)**:301-307.

Enns KR, Bromley ES, Day PS, Inderlied BC, Madej MR, Nolte SF, Nutre C, Persing HS and Tenover CF. *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline.* 1995. NCCLS.15(22).

Escamilla Avilés E, Fainsilver Moldawska Z, Ortiz SG y Paralta RE. 1984. Hallazgos bacteriológicos en pacientes con leucorrea crónica de la Clínica No. 6 de la SSA. Congreso Nacional de Microbiología. Resúmenes. p135.

Everett KDE, Bush RM and Andersen AA. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae* including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:415-440.

Farencena A, Comanducci M, Donati M, Ratti G and Cevenini R. 1997. Characterization of a New Isolate of *Chlamydia trachomatis* Which Lacks the Common Plasmid and Has Properties of Biovar trachoma. *Infect. Immun.* **65**(7):2965-2969.

Furuya-Meguro YME, Solórzano-Santos F, Rendón-Macías E, Zúñiga-Vázquez G, Guerra-Infante F y Aranda-López AR. 1994. Neumonitis por *Chlamydia trachomatis* en lactantes. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* **51**(9):597-600.

Fernández-Paredes F, Sumano-Avenidaño E, Escamilla-Avilés E y Hernández-Méndez JT. 1986. Infección genital por *Chlamydia trachomatis* en niñas y adolescentes. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* **43**(10):595-598.

Fescina, R., Simini, F., and Belitzky, R. 1985. Evaluación de los procedimientos diagnósticos. Aspectos Metodológicos. *Salud perinatal.* **5**(2):39-44.

Figueroa Damián R, Narcio Reyes L, Casanova Román G. 1994. Frecuencia de enfermedades transmitidas sexualmente en pacientes en control prenatal. **62**:93-97.

Fox A, Rogers JC, Gilbert J, Morgan S, Davis CH, Knight S and Wyrick PB. 1990. Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *C. trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect. Immun.* **58**(3):835-837.

Fredricks ND and Relman AD: 1999. Applications of Polymerase Chain Reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **29**:475-488

Fukushi H and Hirai K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**(2):306-308.

Gallaher M. 1990. Asymptomatic *Chlamydia* Infections in the New Mexico Family Planning Population. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control. USA.

Garrity MG, M Winters, AW Kuo and DB Searles. 2002. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag.

- Giuliano RA, Denman C, Guernsey de Zapien J, Navarro Henze JL, Ortega L, Djambazov, Mendez Brown de Galaz E and Hatch K. 2001. Design and results of the USA-Mexico Border Human Papillomavirus (HPV), Cervical Dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* Study. *Rev. Panam. Salud Publica.* **9**(3):172-181.
- Grayston JT and Wangs S-P. 1975. New knowledge of *Chlamydiae* and the diseases they cause. *J. Infect. Dis.* **132**(1):87-105
- Grayston JT, Campbell LA, Kuo C-C, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH and Wang SP. 1990. A New Respiratory Tract Pathogen: *Chlamydia pneumonia* Strain TWAR. *J. Infect. Dis.* **161**:618-625.
- Greenberg SR, Daniels RS, Flanders DW, Eley WJ y Boeing RJ. 1998. *Epidemiología Médica.* 2ª. Ed. Manual Moderno. 93-106.
- Guerra Infante F, García Zaragoza FJ y Arredondo García JL. 1992. Sensibilidad y especificidad de los macrófagos peritoneales de ratón en el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* **43**(7):7-10.
- Guerra Infante F, Flores Medina S López Hurtado M, Sosa González IE y Arredondo García JL. 1994. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. *Ginec. Obst. Méx.* **62**:368-373.
- Güssow D and Clackson T. 1989. Direct Clone Characterization from Plates and Colonies by Polimerase Chain Reaction. *Nucleic. Acids Res.* **17**:4000.
- Gutiérrez-Pastrana MD, Ramírez RGR, Deleón RI, Miramontes TA, Pérez-Zapata AJ y Baca OL. 1997. Investigación de la frecuencia de infecciones oculares por *Chlamydia trachomatis*. *Bioquímica,* **22**(4):770-774.
- Hackstadt, T. 1999. Cell Biology. In: Stephens RS. *Chlamydia. Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity.* ASM Press. Washington DC.
- Hatch TP. Disulfide Cross-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in *Chlamydiae* ?. 1996. *J. Bacteriol.* **178**(1):1-5.
- Hatt C, Ward ME and Clarke IN. 1988. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. *Nucleid. Acid. Res.* **16**(9):4053-4067.
- Hernández Méndez JT, Alonso Rojo H, Deleón Rodríguez I, Jiménez Escalante ZA, Escamilla Avilés E., Fainsilber Moldawska Z, García S. 1992. Investigación de *Chlamydia trachomatis* utilizando tres técnicas. *Bioquímica.* **XVII**(66)28-32.

Hernández-Méndez JT, Alonso-Rojo H, Escamilla-Avilés E, Aquino-Santiago C, Deleón- Rodríguez I, Jiménez Escalante ZA, Fainsilber-Moldawska Z, García S. 2000. Microorganismos asociados con *Chlamydia trachomatis* aislados de pacientes con leucorrea. An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx. **46**(1):53-61.

Hyypia T, Larsen SH, Stahlberg T and Terho P. 1984. Analysis and detection of chlamydial DNA. J. Gen. Microbiol. **130**:3159-3 164

Hyypia T, Jalava A, Larsen SH, Terho P and Hukkanen V. 1985. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Clinical Specimens by Nucleic Acid Spot Hibridization. J. Gen. Microbiol. **131**:975-978.

Ibarra-Camacho A, López Ojeda G y Lugo-de la Fuente G. 1986. Un ensayo para el aislamiento y demostración de *Chlamydia trachomatis* en exudados uretrales. Rev. Lat-Amer. Microbiol. **28**:95-98.

Ibarra-Camacho A, Sosa-Ceja R y Lugo-de la Fuente G. 1991. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres estériles. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. **35**:153-159.

Jauregui A e Hirata C. 1996. Tratamiento de la uretritis por *Chlamydia trachomatis* con dosis única de azitromicina. Enf. Inf. Microbiol. **16**(1):19-22.

Jiménez Pirrón TA, Trujillo Olivera LE, Robledo Ochoa SR, Domínguez López RA, Montoya Maza. 2001. Prevalencia de en mujeres usuarias de un hospital general en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Enf. Infec. Microbiol. **21**(4):123-125.

Jones RB and Batteiger BE. 2001. *Chlamydia trachomatis*. (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma venereum, and Other Genital Infections). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. F<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone. pp1989-2004.

Kinsbury, D.T. 1969. Estimate of the genome size of various microorganisms. J Bacteriol. **98**(3):1400-1401.

Kluytmans LAJW, Niesters HGM, Mouton JW, Quint WGV, Ijpelaar AJ, van Rijsoort JH, Habbema L, Stolz E, Michel MF and Wagenoort JHT. 1991. Performans of a Nonisotopic DNA Probe for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urogenital Specimens. J. Clin. Microbiol. **29**(12):2685-2689.

Kluytmans LAJW, Goessens WHK, Mouton JW, van Rijsoort-Vos JH, Niesters GHM, Quint, WGV, Habbema L, Stolz, E and Wagenoort JHT. 1993. Evaluation of clearview and magic lite tests, Polymerase Chain Reaction, and cell Culture for Detection of *C.trachomatis* in urogenital specimens. J. Clin. Microbiol. **31**(12):3204-3210.

- Kosma P. 1999. Chlamydial lipopolysaccharide. *Bioch. Biophys. Acta.* **1455**:387-402.
- Krech T, Gerhard-Fsadni D, Hofmann N and Miller SM. 1985. Interference of *Staphylococcus aureus* in the detection of *Chlamydia trachomatis* by monoclonal antibodies. *The Lancet.* May 18. 1161-1662.
- Kuo C-C, Takahashi N, Swanson AF, Ozeki Y and Hakomori S. 1996. An N-linked High-mannose Type Oligosaccharide, Expressed at the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis*, Mediates Attachment and Infectivity of the Microorganism in HeLa Cells. *J. Clin. Invest.* **98**(12):2813-2818.
- Lan J, Walboomers JMM, Roosendaal R, van Doornum GJJ, MacClaren DM, Meijer CJLM and Van Den Brule AJC. 1993. Direct Detection and Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in Cervical Scrapes by Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**(5):1060-1065.
- Lefebvre JH and Laperriere H. 1988. Comparison of three techniques for detection of *C. trachomatis* in endocervical specimens from asymptomatic woman. *J. Clin. Microbiol.* **26**:726-731.
- Liffe-Lee RE and McClarty G. 1999. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: the 'energy parasite' hypothesis revisited. *Mol. Microbiol.* **33**(1):177-187.
- Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA and Dragon EA. 1992. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Specimens by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**(11):2847-2841.
- López-Hurtado M, Zamora-Ruiz A, Flores-Medina S y Guerra-Infante FM. 1999. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en recién nacidos con dificultad respiratoria. *Rev. Lat-Am. Microbiol.* **41**:267-272.
- Mahony JB and Chernesky MA. 1985. Effect of Swab type and Storage Temperature on the Isolation of *Chlamydia trachomatis* from Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **22**(5):865-867.
- Mahony JB, Luinstra KE, Seller JM and Chernesky MA. 1993. Comparison of Plasmid- and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting *Chlamydia trachomatis*. *Nucleic Acids J. Clin. Microbiol.* **3**(7):1753-1758.
- Mathews, CK y van Holde KE. 1998. *Bioquímica.* 2<sup>nda</sup> ed. McGraw-Hill. Interamericana. p1001-1003.

Martínez Sánchez M, López Alvarez MR y Basulado Sigales MC. 1990. Evaluación de las técnicas de coloración para cuerpos elementales y reticulares respecto a la técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes en el diagnóstico de infección conjuntival por *Chlamydia*. Lab-acta. **2**(4):31-34.

Moulder JW. 1984. Order II *Chlamydiales*. In: Holt GJ and Krieg NR eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. USA. pp729-739.

Moulder JW. 1991. Interaction of *Chlamydiae* and Host Cells In Vitro. *Microbiol. Rev.* **49**(3):298-337.

Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA y Rosenthal KS. 1997. *Microbiología Médica*, 2<sup>nda</sup> Edición. Harcourt Brace de España, S.A.

Narcio Reyes ML, Solorzano SF, Arredondo García JL, Calderón Jaimes E y Beltrán ZM. 1989. Etiología de la infección cervicovaginal en pacientes embarazadas y no embarazadas. *Chlamydia trachomatis*. *Ginec. Obst. Mex.* **57**:41-46.

Narcio Reyes ML, Casanova RG y Arredondo García JL. 1993. Eficacia y seguridad de Azitromicina en el tratamiento de la infección genital femenina por *Chlamydia trachomatis*. *Ginec. Obst. Mex.* **61**:261-264.

Nichols LR y Manire GP. 1984. *Chlamydia*. En: Davis BR, Dulbecco R, Eisen HN y Ginsberg HS. *Tratado de Microbiología*. 3<sup>era</sup> Ed. Salvat Editores de México. 632-639

Ortiz Zaragoza MC, González Pedraza A, Morales Espinosa MR, Camorlinga Ponce M y Giono Cerezo Silvia. 1990. Frecuencia de aislamiento de *Gardnerella vaginalis* y su relación con probables factores de riesgo en vaginosis bacteriana. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* **32**:1-5

Ostergaard L, Birkelund S and Cbristiansen G. 1990. Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatts*. *J. Clin. Microbiol.* **28**(6):1254-1260.

Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg MA, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP and van Loon AM. 1992. Development and Clinical Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Test for Detection of *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.* **30**(8):2122-2128.

Ossewaarde JM, Rieffe M, de Vries A, Derksen-Nawrocki RP, Hooft HJ, van Doornum GJJ and van Loon AM. 1994. Comparison of two panels of Monoclonal Antibodies for Determination of *Chlamydia trachomatis* serovars. J. Clin. Microbiol. **32**(12):2968-2974.

Pájaro MC, Barberis IL, Godino S, Pascual L and Agüero M. 2001. Epidemiology of sexually transmitted diseases in Rio Cuatro, Argentina. Rev. Lat-Amer. Microbiol. **43**(4):157-160.

Palmer L and Falkow S. 1986. A Common Plasmid of *C. trachomatis*. Plasmid. **16**:52-62.

Peterson EM, Markoff BA, Schachter J and de la Maza LM. 1990. The 7.5-Kb Plasmid Present in *Chlamydia trachomatis* is Not Essential for the Growth of This Microorganism. Plasmid. **23**:144-148.

Peterson ME, Oda R, Alexander R, Greenwood JR and de la Maza LM. 1989. Molecular Techniques for the Detection of *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. **27**(10):2359-2363.

Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, Suhonen S, Lahteenmaki P, Lehtinen M and Paavonen J. 1998. Comparison of performance of two commercially available tests, a PCR assay and a Ligase Chain Reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. J. Clin. Microbiol. **36**(6):1489-1493.

Quinn TC, Welsh L, Lentz A, Crotchfelt K, Zenilman J, Newhall J and Gaydos C. 1996. Diagnosis by AMPLICOR PCR from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. J. Clin. Microbiol. **34**(6):1401-1406.

Ramírez-Figueroa JL, Bueso-Engelhardt A, Cuevas-Schacht FJ, Marín-Santana JC y Pérez-Fernández LF. 1994. Neumonía por *Chlamydia trachomatis*. revisión de la literatura. A propósito de un caso. Acta Pediatr. Mex. **15**(2):95-100.

Raulston J. E. 1995. Chlamidial envelope components and pathogen-host cell interactions. Mol. Microbiol. **15**(4): 607-616.

Read TJ, Brunham RC, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J and Fraser CM. 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. Nucleic Acids Res. **28**(6):1397-1406.

Reyes-Maldonado E, Díaz-Fuente LA, González-Bonilla CV, Esquer-Mendiivi M, Jiménez EZ y Deleón RI. 1996. Detection of *Chlamydia trachomatis* by immunofluorescence, Papanicolaou and immunoperoxidase in women with leucorrhea. Rev. Lat-Amer. Microbiol. **38**:65-73.

Ridderhof JC and Barnes RC. 1989. Fusion of Inclusions following Superinfection of HeLa Cells by two Serovars of *Chlamydia trachomatis*. Infect. Immun. **57**(10):3189-3193

Rosas Arceo J, Toca Porras L, Nava Flores J, Cano Peña JJ, Quiñones Treviño E. 1990. Identificación de *Chlamydia trachomatis* por medio de anticuerpos monoclonales en pacientes estériles. Ginec. Obst. Méx. **58**:39-42.

Rosas Arceo J, Toca Porras L, Díaz Esponda C, Nava Flores J. 1993. Infección por *Chlamydia trachomatis* en cervix uterino. Ginec. Obst. Méx. **61**:326-328.

Sambrook J, Fritsch E. F and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez Mejía, RM, Echaniz Avilés G, Olvera Salinas J, Hernández Nevares P, Calderón Jaimes E y Mejía Gómez C. 1989. Detección de infección endocervical por clamidia comparando la tinción de Papanicolaou con inmunofluorescencia directa. Ginec. Obst. Méx. **57**:29-36.

Schachter J. 1990. *Chlamydia*. In: Davis BR, Dulbecco R, Eisen HN and Ginsberg HS. Microbiology. 7<sup>th</sup> Ed. JB Lippincott Company. p699-706.

Schachter J. 1999. Infection and Disease Epidemiology. In: Stephens RS. *Chlamydia*. Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. ASM Press. Washington DC.

Schachter J, Stamm WE, Quinn TC, Andrews WW, Burzak JD and Lee HL. 1994. Ligase Chain Reaction to Detect *Chlamydia trachomatis* Infection of the Cervix. J. Clin. Microbiol. **32**(10):2540-2543.

Sewell LD. 1995. Laboratory-Associated Infections and Biosafety. Clin. Microbiol. Rev. **8**(3):389-405.

Shah SS, Liu J, Smith J, Popof S, Radcliffe G, O'Brien WJ, Serpe G, Olive DM and King W. 1994. Novel Ultrasensitive, Q-Beta Replicase-Amplified Hybridization Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. **32**(11):2718-2724.

Sriprakash KS and Macavoy ES. 1987. Characterization and Sequence of Plasmid from the Trachoma Biovar of *Chlamydia trachomatis*. Plasmid. **18**:205-214.

Stagg JA. 1998. Vaccines against *Chlamydia*: approaches and progress. *Molecular Medicine Today*. April. 166-173.

Stephens RS, Kuo Ch, and Tam MR. 1982. Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of *Chlamydia trachomatis* inclusion in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* **16**(1):7-15.

Stephens RS. 1992. Challenge of *Chlamydia* research. *Infectious Agents and Disease*. **1**(6): 279-293.

Stephens RS. 1994. Molecular mimicry and *Chlamydia trachomatis* infection of eukariotic cells. *Trends Microbiol.* **2**(3):99-101

Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV and Davis RW. 1998. Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*. **282**:754-759.

Stephens RS. 1999. *Chlamydia*. Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. ASM Press. Washington DC.

Stothard DR, Wihiams JA, Van Der Pol B and Jones RB. 1998. Identification of *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. *Infect. Immun.* **66**(12):6010-6013.

Su H, Watkins NG, Zhang YX and Caldwell HD. 1990. *Chlamydia trachomatis*. Host cell interactions: role of the Chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect. Immun.* **58**(4):1017-1025.

Subtil A, Dautry-Varsat A. 2004. *Chlamydia*: five years A.G. (after genome). *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:85-92.

Swanon AF and Kou Ch. 1995. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect. Imm.* **62**(1):24-28.

Tang Y-W, Procop WG and Persing HD. 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin. Chem.* **43**(11):2021-2038.

Taylor-Robinson D and BJ Thomas. 1980. The role of *Chlamydia trachomatis* in genital-tract and associated diseases. *J. Clin. Pathol.* **33**:205-233

Thomas NS, Lusher M, Storey CC and Clarke IN. 1997. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiol.* **143**:1847-1854.

Toye B, Peeling RW, Jessamine P, Claman P and Gemmill I. 1996. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men and women by PCR assay. J. Clin. Microbiol. **34**(6):1396-1400.

Toye B, Woods W, Bobrowska M and Ramotar K. 1998. Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for *Chlamydia trachomatis* Testing. J. Clin. Microbiol. **36**(8):2356-2358.

Vogels WHM, van Voorst PC and Schroder FP. 1993. *Chlamydia trachomatis* infection in a High-Risk Population: Comparison of Polymerase Chain Reaction and Cell Culture for Diagnosis and Follow-up. J. Clin. Microbiol. **31**(5):1103-1107.

Walker DH and Dash GA. 1995. Classification and Identification of *Chlamydia*, *Rickettsia* and Related Bacteria. IN: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 6<sup>th</sup> Ed. ASM Press. Washington, DC.

Wang SP. and Grayston JT. 1991. Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia and L<sub>2a</sub>. J. Infect. Dis. **163**:403-405.

Welch DCH and Larsen SH. 1990. Detection of Plasmid DNA from all *Chlamydia trachomatis* serovars with a two-step Polymerase Chain Reaction. Appl. Environment. Microbiol. **56**(8):2494-2498

Wu CH. 1992. Comparison of polymerase chain, monoclonal antibody based enzyme immunoassay and culture for detection of *C. trachomatis* in genital specimens. Sex. Transm. Dis. **19**(4):193-197.

[www.berkeley.edu:4231//chlamydia](http://www.berkeley.edu:4231//chlamydia), GenBank, número de acceso AE001273).

[www.epi.org.mx/Anuarioestadístico](http://www.epi.org.mx/Anuarioestadístico)

[www.epi.org.mx/Boletín de epidemiología](http://www.epi.org.mx/Boletín de epidemiología)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/psiblast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/psiblast.cgi)

Yescas-Buendía G, Udaeta-Mora E, Arredondo-García JL, Guerra-Infante F, Chávez-González C y Joachim-Roy H. 1993. Conjuntivitis neonatal por *Chlamydia trachomatis*. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. **50**(8):570-576.

Zhang JP and Stephens RS. 1992. Mechanism of attachment of *Chlamydia trachomatis* to eukaryotic host cells. Cell. **69**(5):861-969.

## Anexo 1

### Material utilizado.

**Medios de cultivo:** Gelosa L. Gelosa L con ampicilina. Caldo L. Caldo L con ampicilina. **Equipo:** Balanza analítica, Fisher Scientific A-250. Incubadora Lab-line. Microscopio óptico Carl Zeiss. Microscopio óptico Carl Zeiss con lámpara de luz ultravioleta. Congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$ , Baxter Scientific Products. Refrigerador, Nieto. Congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ , Nieto. Cámaras de electroforesis. Fuente de poder, Life Technologies 500. Termociclador, Perkin Elmer. Baño Maria, Lab-line. Horno de Microondas, Mabe. Espectrofotómetro Quantum II, Abbot. Microcentrifuga, Beckman. Baño metabólico. Horno de microondas, Mabe. Centrifuga, Sorvall RC5B. Transiluminador U.V. Sigma TI 201. Cámara fotográfica Polaroid. **Sustancias y reactivos:** Aceite mineral, Sigma. Amortiguador PCR 10X, Promega. Bromuro de etidio, Sigma. Cloruro de calcio, Baker. Cloruro de magnesio 25 mM, Promega. EDTA, Sigma. TrisHCL y Tris base, Sigma. Agarosa, Bioxon. Acetona, Merck. Acido acético glacial, merck. Alcohol etílico absoluto y del 96 Merck. **Material diverso:** Micropipetas Gilson para puntas con capacidad de 20, 200 y 1000 ul. Espátula metálica. Tubos Eppendorf con capacidad de 0.5 y 1.5 ml. Puntas para micropipetas con capacidad de 20, 200 y 1000 ul. Olla de presión. Papel parafilm. Guantes de látex. Gradillas metálicas para tubos de ensayo. Gradillas de plástico para tubos Eppendorf. Hisopos estériles. Tubos con medio de transporte 2 Sacarosa Fosfato. Nistatina, vancomicina, estreptomina. Marcador con tinta. Termómetro de  $-10$  a  $260^{\circ}\text{C}$ . **Material de vidrio:** Embudos de vidrio de talle largo de 10 cm. Frascos de vidrio color ámbar de 1000 ml. Canastillas de coloración para 10 preparaciones. Matraces Erlenmeyer de fondo plano con capacidad de 500 y 1000 ml. Matraces volumétricos con capacidad de 5, 10, 50 y 100 ml. Pipetas de vidrio con capacidad de 5 y 10 ml. Probetas de plástico con capacidad 100 y 1000 ml. Vasos de precipitados de vidrio con capacidad de 50, 100 y 250 ml. Cajas de petri de 10x100 mm estériles. Cajas de petri de vidrio de 10x150 mm. Porta objetos de 76x26 mm. Cubreobjetos de 24x60 mm.

## ANEXO 2

### MATERIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LA TRANSFORMANTE

#### Preparación de medios, reactivos y soluciones.

##### **GELOSA L**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Agua bidestilada para	1 L

Mezclar los ingredientes, disolver el agar por ebullición y esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Dejar enfriar a 50°C y distribuir en cantidades de 15 ml en cajas de Petri estériles, dejar solidificar. Hacer prueba de esterilidad incubando los cajas a 37°C durante 24 horas.

##### **CALDO L**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua bidestilada para	1 L

Mezclar los ingredientes, disolver y distribuir en cantidades de 5 ml en tubos de 16x150 con tapón de aluminio. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Hacer prueba de esterilidad incubando los tubos a 37°C durante 24 horas.

##### **CaCl<sub>2</sub> 0.1 M**

CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4.37 g
Agua destilada	200.0 ml

Agregar la sal a una parte del agua, disolver y aforar a 200 ml con el agua. Esterilizar a través de un filtro con membrana de 0.22 µ de diámetro, distribuir en frascos ambar en cantidades de 20 ml y mantener a -20°C.

##### **GELOSA L + AMPICILINA.**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Agua bidestilada para	1 L

Mezclar los ingredientes, disolver el agar por ebullición y esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Dejar enfriar a 50°C.

Agregar 6.2 ml de una solución de ampicilina de 50 mg/ml para tener una concentración final de 25 ug/ml de medio. Homogeneizar y distribuir en cantidades de 15 ml en cajas de Petri estériles, dejar solidificar. Hacer prueba de esterilidad incubando las cajas a 37°C durante 24 horas.

### **CALDO L + AMPICILINA.**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua bidestilada para	1 L

Mezclar los ingredientes, disolver y distribuir en cantidades de 5 ml en tubos de 16X150 con tapón de aluminio. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Hacer prueba de esterilidad incubando los tubos a 37°C durante 24 horas.

Al momento de su uso agregar 6.2 ml de una solución de ampicilina de 4 g/ml para tener una concentración final de 25 ug/ml de medio.

### **AMPICILINA (50 mg/ml)**

Ampicilina	1 g
Agua destilada	20 ml

Disolver el antibiótico en agua, aforar a 20 ml y esterilizar a través de un filtro con membrana de 0.22  $\mu$  de diámetro de poro, distribuir en frascos ambar y mantener a -20°C.

### **GLICEROL AL 50%**

Glicerol	1 volumen
Agua destilada	1 volumen

Agregar el agua al glicerol, mezclar, distribuir en tubos de 13x100 con tapón de rosca en cantidades de 3 ml. Esterilizar a 121°C durante 10 min y conservar a -20°C.

## **MATERIAL PARA LA OBTENCIÓN Y DEMOSTRACION DEL pLGV125 DE LA TRANSFORMANTE**

**Preparación de las soluciones para el trabajo de lisis alcalina de la transformante.**

### **Solución I**

#### **GTE (GLUCOSA-TRIS-EDTA)**

Glucosa	50.0 mM
EDTÁ (pH 8.0)	100.0 mM
Tris.HCl (pH 8.0)	25.0 mM

Agregar la glucosa y el EDTA a una parte del Tris, disolver y aforar a 100 ml con el Tris. Distribuir en frascos ambar en cantidades de 5 ml, esterilizar a 10 libras por 15 minutos, enfriar y mantener a 4°C.

### **Solución II**

#### **NaOH – SDS (0.2N-1%)**

Preparar al momento de su uso, utilizando NaOH 10 N y SDS al 1%.

**NaOH 10 N**

NaOH	40.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Agregar lentamente el hidróxido a 80 ml de agua, disolver y aforar a 100 ML.  
Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

**SDS 1%.**

SDS	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Agregar el SDS a una parte del agua, disolver a 68°C, mezclando lentamente y aforar a 100 ml con al agua, guardar en frasco ambar y mantener a temperatura ambiente.

**NAOH-SDS (0.2N-1%).**

NaOH 10N	2.0 ml
SDS (1.0 %)	98.0 ml

Agregar el hidróxido al SDS, mezclar.

**Solución III****ACETATO DE POTASIO 5M pH 4.8.**

Acido acético glacial	11.5 ml
Acetato de potasio 5 M	60.0 ml
Agua destilada	28.5 ml

**Preparación del material para purificación y cuantificación del pLGV125.****TE (SOLUCION TRIS-EDTA)**

Tris.HCl (pH 8.0)	10.0 mM
EDTÁ (pH 8.0)	1.0 mM

**Low TE**

Tris.HCl (pH 8.0)	10.0 mM
EDTÁ (pH 8.0)	0.1 mM

**ALCOHOL ISOAMILICO-CLOROFORMO**

Alcohol isoamílico	1 V
Cloroformo	24 V

**NaCl 0.15 M**

NaCl	0.88 g
Agua destilada	100.0 ml

## **MATERIAL PARA LA OBSERVACION DEL pLGV125**

### **COLORANTE DE CORRIMIENTO AZUL DE BROMOFENOL (0.25%)**

Azul de bromofenol 62.5 mg

Solución de sacarosa al 40% 25.0 ml

Disolver el colorante y distribuir en tubos Eppendorf en cantidades de 1 ml, conservar en refrigeración a 4°C.

### **GEL DE AGAROSA AL 0.8 %.**

a.- Pesar 0.8 g de agarosa, colocarla en un frasco.

b.- Agregar 100 ml de amortiguador de corrimiento (TAE)

c.- Fundir la agarosa. Dejar enfriar a 50°C.

d.- Agregar 5 µl de una solución de bromuro de etidio con 10 mg/ml. Homogeneizar. Vaciar en un recipiente al que previamente se le han colocado el peine con los pozos que se desean correr, el grosor del gel debe ser de 4 mm. Dejar solidificar, retirar el peine y colocar el gel en una cámara horizontal de electroforesis que contiene el regulador de corrimiento.

### **GEL DE AGAROSA AL 2.0 %.**

a.- Pesar 2.0 g de agarosa, colocarla en un frasco.

b.- Agregar 100 ml de amortiguador de corrimiento (TAE)

c.- Fundir la agarosa. Dejar enfriar a 50°C.

d.- Agregar 5 µl de una solución de bromuro de etidio con 10 mg/ml. Homogeneizar. Vaciar en un recipiente al que previamente se le han colocado el peine con los pozos que se desean correr, el grosor del gel debe ser de 4 mm. Dejar solidificar, retirar el peine y colocar el gel en una cámara horizontal de electroforesis que contiene el regulador de corrimiento.

### **AMORTIGUADOR TAE (Tris-acetato) PARA LA ELECTROFORESIS.**

#### **SOLUCION CONCENTRADA 50X**

Tris-base 242.0 g

Ácido acético glacial 57.1 ml

EDTA (0.5 M) pH 8.0 100.0 ml

Mezclar todos los componentes en un matraz y aforar a 1,000 ml con agua desionizada.

#### **SOLUCION DE TRABAJO 1X**

Solución concentrada 20 ml

Agua desionizada 980 ml

Esta solución se utiliza para preparar el gel de agarosa y para el corrimiento.

### Para el cálculo de la cuantificación del pLGV125

Para hacer la cuantificación del DNA, se consideró que 1 una As 260 nm (1DO) equivale a 50 µg/ml de DNA.

DO obtenida 0.47, como el DNA se diluyó 1:75, se obtuvo un total de 35.32 DO

$$\begin{array}{r} 50 \mu\text{g/ml} \text{ ----- } 1\text{As}260 \text{ nm (1 DO)} \\ X \quad \text{-----} \quad 35.32 \text{ DO} \end{array}$$

$$X = 1712.5 \mu\text{g/ml}$$

### MATERIAL PARA IMPLEMENTAR LA PCR

#### **Reactivos**

#### **DNA MOLDE (PLÁSMIDO pLGV125)**

Concentración requerida: 4 ng/µl

a.- Diluir 1:10 el pLGV125 (1.7 µg/µl)

b.- Tomar 1µl de la concentración 1:10 y colocarlo en la pared de un tubo Eppendorf. Guardar el DNA sobrante a -20°C

c.- En otra parte de la pared del tubo agregar 41 µl de agua destilada. Mezclar.

#### **INICIADORES.**

Los oligonucleótidos (iniciadores) vienen liofilizados, de tal modo que es necesario hidratarlos, esto se hace tomando en consideración la absorbancia total, el número de bases de cada iniciador, así como la concentración molar a la cual se desea tener. Para disolver los iniciadores a la concentración requerida se utiliza la fórmula siguiente:

$$\frac{A_{260} \text{ total}}{[(EM) \times \text{Concentración molar requerida}]} = \text{Mililitros de Agua para disolver los oligonucleótidos}$$

EM: Es el Coeficiente de extinción molar, el cual se obtiene con la fórmula siguiente:

$$EM = \text{No. de A (16,000)} + \text{No. de G (12,000)} + \text{No. de C (7,000)} + \text{No. de T (9,600)}.$$

#### **SOLUCIÓN DE INICIADORES:**

##### **INICIADOR TI:**

##### **SOLUCION CONCENTRADA (100.0 µM)**

Secuencia: **5'-CTA GGC GTT TGT ACT CCG TCA-3'**

Absorbancia: **8.2**

$$EM = 3A(16,000) + 5G(12,000) + 6C(7,000) + 7T(9,600) = 213,000.$$

8.2

$$\frac{\text{-----}}{[(213,000) \times 100 \times 10^{-6}]} = 384 \mu\text{l de Agua}$$

Hidratar el iniciador liofilizado con 384  $\mu\text{l}$  de agua desionizada. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu\text{l}$  y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **SOLUCION DE TRABAJO (1.0 $\mu\text{M}$ )**

Solución concentrada (100  $\mu\text{M}$ )      10  $\mu\text{l}$

Agua desionizada                              990  $\mu\text{l}$

Descongelar un tubo eppendorf, Colocar 10  $\mu\text{l}$  de la solución concentrada en la pared de un tubo eppendorf, colocar 990  $\mu\text{l}$  de agua en la pared de un tubo eppendorf. Mezclar. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu\text{l}$  y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### **INICIADOR T2:**

#### **SOLUCIÓN DE INICIADORES:**

#### **SOLUCION CONCENTRADA (100.0 $\mu\text{M}$ )**

Secuencia:                              **5'-TCC TCA GAA GTT TAT GCA CT-3'**

Absorbancia:                              11.7

$$\text{EM} = 5\text{A}(16,000) + 3\text{G}(12,000) + 5\text{C}(7,000) + 7\text{T}(9,600) = 214,000.$$

11.7

$$\frac{\text{-----}}{[(214,000) \times 100 \times 10^{-6}]} = 547 \mu\text{l de Agua}$$

Hidratar el iniciador liofilizado con 547  $\mu\text{l}$  de agua desionizada. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu\text{l}$  y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **SOLUCION DE TRABAJO (1.0 $\mu\text{M}$ )**

Solución concentrada (100  $\mu\text{M}$ )      10  $\mu\text{l}$

Agua desionizada                              990  $\mu\text{l}$

Descongelar un tubo eppendorf, Colocar 10  $\mu\text{l}$  de la solución concentrada en la pared de un tubo eppendorf, colocar 990  $\mu\text{l}$  de agua en la pared de un tubo eppendorf. Mezclar. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu\text{l}$  y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### **Taq DNA POLIMERASA (0.5 U/ $\mu\text{l}$ )**

Enzima    1  $\mu\text{l}$

Regulador de la enzima                      1  $\mu\text{l}$

Agua desionizada estéril                      8  $\mu\text{l}$

Colocar la enzima en la pared de un tubo eppendorf, En otra parte de la pared del tubo colocar el regulador, En otra parte de la pared del tubo colocar el agua, mezclar.

## **DESOXIRIBONUCLEOTIDOS TRIFOSFATADOS (dNTP's)**

### **dATP**

Concentración requerida: 10 mM

dATP 5.3 mg

Amortiguador TE pH 7.5 1.0 ml

Colocar el dATP en un tubo eppendorf, Agregar 1 ml de agua y disolver. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu$ l y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **dCTP**

Concentración requerida: 10 mM

dCTP 4.7 mg

Amortiguador TE pH 7.5 1.0 ml

Colocar el dATP en un tubo eppendorf, Agregar 1 ml de agua y disolver. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu$ l y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **dGTP**

Concentración requerida: 10 mM

dGTP 5.7 mg

Amortiguador TE pH 7.5 1.0 ml

Colocar el dATP en un tubo eppendorf, Agregar 1 ml de agua y disolver. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu$ l y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **dTTP**

Concentración: 100 mM

Concentración requerida: 10 mM

DTTP(100 mM) 100  $\mu$ l

Amortiguador TE pH 7.5 900 ml

Colocar el dTTP en la pared de un tubo eppendorf, Agregar los 9000  $\mu$ l de agua. Distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 50  $\mu$ l y mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **SOLUCION DE TRABAJO DE dNTP's**

### **CONCENTRACION REQUERIDA: 250 $\mu$ M**

dATP (10 mM) 5  $\mu$ l

dCTP(10 mM) 5  $\mu$ l

dGTP(10 mM) 5  $\mu$ l

dTTP(10 mM) 5  $\mu$ l

Colocar cada una de las soluciones en diferentes partes de la pared de un tubo eppendorf, Mezclar.

### **Taq DNA polimerasa 0.5 Unidades**

Taq DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ l 1  $\mu$ l

Regulador de la enzima 1  $\mu$ l

Agua desionizada estéril 8  $\mu$ l

**Cloruro de magnesio**                      **25 mM**

**AMORTIGUADOR DE PCR 10X**

Tris-HCl 1 M (pH a 8.3)	100 µl
KCl            IM	500 µl
Gelatina al 1%.	10 µl
Agua desionizada estéril	390 µl

Mezlar los ingredientes y distribuir en tubos eppendorf en cantidades de 100 µl.  
Conservar a -20°C.

**ANEXO 3**

**MATERIAL PARA EL TRABAJO CON MUESTRAS CLINICAS**

Para el transporte de la muestra.

**MEDIO DE TRANSPORTE 2 SACAROSA-FOSFATO (2SP).**

Sacarosa	6.846	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2088	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1088	g
Agua destilada estéril	50.0	ml

Disolver, ajustar el pH a 7.0: Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Dejar enfriar y agregar:

Suero fetal bovino	5.0	ml
Estreptomicina (5,000 µg/ml)	1.0	ml
Vancomicina (10,000 µg/ml)	1.0	ml
Nistatina 10,000 U/ml)	0.25	ml

Aforar a 100 ml con agua destilada estéril. Distribuir en cantidades de 2 ml en tubos de 13x100 estériles. Mantener en refrigeración a 4°C.

Concentración final de los antibióticos:

Estreptomicina	(50 µg/ml)
Vancomicina	(100 µg/ml)
Nistatina	(25 U/ml)

**ANTIBIÓTICOS:**

**ESTREPTOMICINA:(5,000 µg/ml)**

Estreptomicina en polvo	0.5	g
Agua destilada	100.0	ml

Disolver el antibiótico en agua, aforar a 100 ml y esterilizar a través de un filtro con membrana de 0.22 µ de diámetro de poro, distribuir en frascos ambar y mantener a -20°C

**VANCOMICINA: (10,000 µg/ml)**

Vancomicina en polvo                    1.0 g  
Agua destilada                            100.0 ml

Disolver el antibiótico en agua, aforar a 100 ml y esterilizar a través de un filtro con membrana de 0.22 µ de diámetro de poro, distribuir en frascos ambar y mantener a -20°C

**NISTATINA:**

Nistatina (10,000 U/ml)                    0.25 ml  
Agua destilada                            100.0 ml

Mezclar las dos soluciones, esterilizar a través de un filtro con membrana de 0.22 µ de diámetro de poro, distribuir en frascos ambar y mantener a -20°C

**Para la lisis de las células presentes en las muestras clínicas****PROTEINASA K (400 µg/ml)**

Proteinasa K                                    0.0004 g  
Agua desionizada estéril                    1.0 ml.

Disolver la proteinasa K con el agua y distribuir en cantidades de 100 µl en tubos eppendorf, almacenar -20 °C.

**LISOZIMA (400µg/ml)**

Lisozima                                        0.0004 g  
Agua desionizada estéril                    1.0 ml.

Disolver la lisozima con el agua y distribuir en cantidades de 100 µl en tubos eppendorf, almacenar -20 °C.

**Para analizar las muestras por PCR**

Los mismos reactivos y concentraciones descritos anteriormente.

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MÉDICA

**SOLICITUD DE EXAMEN MICROBIOLÓGICO**

0 FECHA : \_\_\_\_\_

I SERVICIO SOLICITANTE

\_\_\_ GINECOLOGIA \_\_\_ PLANIFICACION FAMILIAR. OTRO \_\_\_

II DATOS DEL PACIENTE

NUMERO DE EXPEDIENTE : \_\_\_\_\_ 1ª. VEZ \_\_\_ SUBSECUENTE \_\_\_

\_\_\_\_\_ EDAD : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRE

\_\_\_\_\_ FECHA DE NACIMIENTO

ESTADO CIVIL : SOLTERA (O) \_\_\_ CASADA (O) \_\_\_ OTRO \_\_\_\_\_

VIDA SEXUAL : INACTIVA \_\_\_ ACTIVA \_\_\_ EDAD DE INICIO \_\_\_

CICLO : REGULAR \_\_\_ IRREGULAR \_\_\_

EMBARAZOS: NORMALES \_\_\_ ANORMALES \_\_\_ ABORTOS: NO \_\_\_ SI \_\_\_

PARTOS PREMATUROS: SI \_\_\_ NO \_\_\_ ESTERILIDAD: SI \_\_\_ NO \_\_\_

CONTROL ANTICONCEPTIVO: NO \_\_\_ SI \_\_\_ TIPO: \_\_\_\_\_

III MANIFESTACIONES CLÍNICAS

LEUCORREA: NO \_\_\_ SI \_\_\_ CARACTERÍSTICAS: \_\_\_\_\_

FLUJO SANGUINOLENTO \_\_\_ METRORRAGIA \_\_\_ DOLOR AL COITO \_\_\_

SANGARDO AL COITO \_\_\_ OTRO: \_\_\_\_\_

SITIO DE LA LESION

ENDOCERVICAL \_\_\_ VAGINAL \_\_\_ EROSION \_\_\_ ULCERACION \_\_\_

EXOCERVICAL \_\_\_ URETRAL \_\_\_ POLIPOS \_\_\_ TUMORACION \_\_\_

OTRO \_\_\_\_\_ OTRO \_\_\_\_\_

TIPO DE LA LESION

IV DIAGNOSTICO CLINICO: \_\_\_\_\_

V MUESTRA CLINICA \_\_\_ EXUDADO VAGINAL \_\_\_ EXUDADO CERVICAL

\_\_\_ EXUDADO CERVICOVAGINAL

\_\_\_ EXUDADO VULVAR \_\_\_ EXUDADO URETRAL

OTRO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
SOLICITANTE

RESULTADO DEL ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

MUESTRA No. \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

**OBSERVACION DIRECTA**

PREPARACION EN FRESCO:

\_\_\_ LEVADURAS

\_\_\_ *Trichomonas vaginalis*

\_\_\_ CELULAS EPITELIALES POR CAMPO

OTRO: \_\_\_\_\_

\_\_\_ LEVADURAS CON PSEUDOMICELIO

\_\_\_ CELULAS CLAVE

\_\_\_ LEUCOCITOS POR ACMPPO

TINCION DE GRAM

\_\_\_ BACILOS GRAM POSITIVOS

\_\_\_ COCOS GRAM POSITIVOS

\_\_\_ BACILOS CURVOS GRAM POSITIVOS

\_\_\_ LEUCOCITOS POR CAMPO

\_\_\_ LEUCOCITOS CON DIPLOCOCOS INTRACELULARES

OTRO : \_\_\_\_\_

\_\_\_ BACILOS GRAM NEGATIVOS

\_\_\_ COCOS GRAM NEGATIVOS

\_\_\_ CELULAS CLAVE

**CULTIVO:**

\_\_\_ BACILOS DE DODERLEIN (*Lactobacillus* sp)

\_\_\_ *Gardnerella vaginalis*

\_\_\_ *Staphylococcus saprophyticus*

\_\_\_ *Neisseria gonorrhoeae*

\_\_\_ *Candida albicans*

OTRO : \_\_\_\_\_

\_\_\_ *Corynebacterium*

\_\_\_ *Mobiluncus* sp

\_\_\_ *Staphylococcus*

\_\_\_ *Acinetobacter* sp

\_\_\_ *Candida* sp

**ANTIBIOGRAMA**

SENSIBLE A:

RESISTENTE A:

**INVESTIGACION DE *Chlamydia trachomatis* POR:**

TINCION DE GIEMSA

TINCION DE PAPANICOLAOU

INMUNOFLOURESCENCIA

AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_

REALIZO EL EXAMEN

LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MEDICA