



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“Utilidad de la técnica de reacción en cadena de la  
polimerasa (PCR) en la detección de *Chlamydia trachomatis*  
en muestras uretrales masculinas”**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A  
**NORMA L. RENDÓN GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”**

Nombre: **RENDON GARCIA NORMA LEOBARDA**

Número de cuenta: 8516006-8

Folio: 19146

Año en que terminó la carrera: 2000

Orientación de la carrera: Bioquímica Clínica

Título del proyecto: **“Utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras uretrales masculinas”**

Area específica del proyecto: Médico-Biológicas

Nombre del director: Dr. Fernando Martín Guerra Infante

Nombre del asesor: QBP. Gustavo Miranda Contreras

Lugar donde se desarrolló el trabajo experimental: Laboratorio de virología del Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología S.Sa.

## AGRADECIMIENTOS

◆ *A DIOS, TODA LA FELICIDAD Y LOS BENEFICIOS QUE HE RECIBIDO EN MI VIDA TE LOS DEBO SIN DUDA ALGUNA A TI DIOS. NO HA HABIDO OCASIÓN EN QUE NO ESTES CONMIGO.*

◆ *GRACIAS DIOS POR ESTAR CONMIGO SIEMPRE.*

◆ *A MIS PADRES, FELICIANO RENDON RAMIREZ Y NIEVES GARCIA CRUZ GRACIAS POR TODO EL APOYO, POR TODOS LOS VALORES QUE ME INCULCARON Y ME IMPULSARON A LLEVAR A TERMINO ESTE IMPORTANTE PROYECTO*

◆ *A MIS HERMANOS, BERTHA, PABLO, LUCILA, JOSE Y MARINA RENDON GARCIA POR SU APOYO INCONDICIONAL*

◆ *A TODAS LAS PERSONAS QUE ME APOYARON PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS Y DE ESTA TESIS A MI DIRECTOR EL Dr. FERNANDO GUERRA INFANTE, Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS, ASI COMO A MIS ASESORES Dr. RUBEN MARROQUIN SEGURA, Q.F.B. FRANCISCO J. PARADA GARCIA Y M. en C. SAUL FLORES MEDINA A TODOS ELLOS GRACIAS POR TODO EL APOYO Y ENSEÑANZAS*

◆ *GRACIAS A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE EN ALGUN MOMENTO ME APOYARON Y COLABORARON EN ESTE TRABAJO A MIS FAMILIARES, A LA FAMILIA GUTIERREZ JUÁREZ, AMIGOS Y COMPAÑEROS*

# INDICE GENERAL

	PAG
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. MARCO TEORICO	3
II.1. EPIDEMIOLOGIA	3
II.2. ETIOLOGIA Y PATOLOGIA	4
II.2.a. CICLO DE REPLICACION	7
II.3. FACTORES DE RIESGO	9
II.4. DIAGNOSTICO	9
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. OBJETIVO GENERAL	14
IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES	14
V. HIPOTESIS	15
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
VI.1. POBLACION DE ESTUDIO	16
VI.2. a. CRITERIOS DE INCLUSION Y b. EXCLUSION	16
VI.3. a. VARIABLE INDEPENDIENTE Y b. DEPENDIENTE	17
VII. MATERIALES Y METODOS	18
VII.1. DETECCION DE <i>Chlamydia trachomatis</i> MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA (HFL)	18
VII.2. EXTRACCION Y PURIFICACION DE DNA	22
VII.3. DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	23
VII.4. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI- <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA (MIF)	27
VIII. DISEÑO ESTADISTICO	31

<b>IX. RESULTADOS</b>	32
<b>IX.1. EVALUACION DE MUESTRAS URETRALES MASCULINAS POR HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA Y REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA</b>	32
<b>IX.2. DETECCION DE <i>Chlamydia trachomatis</i> POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA</b>	33
<b>IX.3. DETECCION DE ANTICUERPOS IgG CONTRA <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	34
<b>IX.4. RESULTADOS DE LOS DIFERENTES METODOS DE DIAGNOSTICO</b>	35
<b>IX.5. EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA CON RESPECTO A LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA</b>	36
<b>IX.6. EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA MICROINMUNOFLUORESCENCIA CON RESPECTO A LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA</b>	37
<b>IX.7. EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA CON RESPECTO A LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA</b>	38
<b>IX.8. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCION POR <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	39
<b>X. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	47
<b>XI. CONCLUSIONES</b>	52
<b>XII. ANEXO REACTIVOS</b>	53
<b>XIII. REFERENCIAS</b>	55

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL Y SUS AGENTES CAUSALES	1
<b>TABLA 2.</b> ESPECTRO CLINICO DE LAS INFECCIONES POR <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
<b>TABLA 3.</b> PRUEBAS DIAGNOSTICAS DE LAS INFECCIONES POR <i>Chlamydia trachomatis</i>	12
<b>TABLA 4.</b> NUMERO DE MUESTRAS POSITIVAS POR LOS DIFERENTES METODOS DE DIAGNOSTICO	35
<b>TABLA 5.</b> SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA PARA EL DIAGNOSTICO DE <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
<b>TABLA 6.</b> SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DE <i>Chlamydia trachomatis</i>	37
<b>TABLA 7.</b> SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR <i>Chlamydia trachomatis</i> CON RESPECTO A LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA	38
<b>TABLA 8.</b> DATOS GENERALES DE VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	41

<b>TABLA 9.</b> DATOS ESPERMATOBIOSCOPICOS DE VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	42
<b>TABLA 10.</b> DATOS DE ANORMALIDADES SEMINALES E INFECCIONES DE VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	43
<b>TABLA 11.</b> DATOS GENERALES DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	44
<b>TABLA 12.</b> DATOS GINECOLOGICOS DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	45
<b>TABLA 13.</b> DATOS MICROBIOLÓGICOS DE MUESTRAS CERVICOVAGINALES DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO <i>C. trachomatis</i> POR PCR	46

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> CLASIFICACION TAXONOMICA DE LAS CLAMIDIAS	6
<b>FIGURA 2.</b> CICLO DE REPLICACION DE <i>C. trachomatis</i>	8
<b>FIGURA 3.</b> DIAGRAMA DE FLUJO. DIAGNOSTICO DE <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA (HFL)	20
<b>FIGURA 4.</b> DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA (HFL)	21
<b>FIGURA 5.</b> DIAGRAMA DE FLUJO. DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	24
<b>FIGURA 6.</b> EXTRACCION Y PURIFICACION DE DNA	25
<b>FIGURA 7.</b> TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	26
<b>FIGURA 8.</b> DIAGRAMA DE FLUJO. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI- <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE MICROINMUNOFLUORESCENCIA (MIF)	29
<b>FIGURA 9.</b> DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI- <i>C. trachomatis</i> MEDIANTE MICROINMUNOFLUORESCENCIA (MIF)	30

<b>FIGURA 10.</b> DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES RELATIVAS DE LUZ DE LAS MUESTRAS URETRALES MASCULINAS	32
<b>FIGURA 11.</b> VALORES EN UNIDADES RELATIVAS DE LUZ CON RESPECTO A LAS MUESTRAS POSITIVAS POR PCR	33
<b>FIGURA 12.</b> INTEGRIDAD DEL DNA DE LAS MUESTRAS URETRALES MASCULINAS	34
<b>FIGURA 13.</b> DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> , EN MUESTRAS URETRALES POR LA TECNICA DE PCR	34
<b>FIGURA 14.</b> DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> , EMPLEANDO MUESTRAS DE SUERO NEGATIVOS POR LA TECNICA DE MIF	34
<b>FIGURA 15.</b> DETECCION DE <i>C. trachomatis</i> EMPLEANDO MUESTRAS DE SUERO POSITIVOS POR LA TECNICA DE MIF	34

## RESUMEN

***Chlamydia trachomatis*** es uno de los patógenos más frecuentes en las infecciones de transmisión sexual; es causante de una serie de patologías tanto en varones como en mujeres, por lo que se considera un problema de salud mundial. Este tipo de infección es de importancia epidemiológica ya que al no ser detectada ni tratada puede ocasionar infertilidad en la pareja. En varones su detección es difícil debido a que en la mayoría de las infecciones llevan un curso asintomático y se convierte en una fuente de infección para sus compañeras sexuales.

Debido a que los métodos de diagnóstico son de baja sensibilidad y al tipo de muestra utilizada; es necesario emplear técnicas más sensibles para conocer la frecuencia de la infección por ***C. trachomatis*** en varones, de ahí que el objetivo de este trabajo, fue el de evidenciar la prevalencia de ***C. trachomatis*** mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras uretrales masculinas que fueron negativas por una técnica de hibridación en fase líquida. Se estudiaron 50 muestras uretrales y 50 sueros de varones cuyas parejas sexuales femeninas asistieron a la clínica de reproducción asistida del Instituto Nacional de Perinatología. A cada muestra se le realizó la búsqueda de ***C. trachomatis*** por la técnica de PCR, así como la presencia de anticuerpos IgG anti- ***C. trachomatis*** mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF). Los resultados mostraron que 21 muestras fueron positivas por PCR con una frecuencia del 42% y de estas 20 fueron positivas por la técnica de MIF con una frecuencia del 42%.

Así mismo, se encontró una asociación estadísticamente significativa y una dependencia entre las muestras positivas por PCR y la presencia de anticuerpos anti- ***C. trachomatis***; (P= 0.001); así como con la procedencia de los pacientes (P= 0.009); en el análisis laparoscópico de las compañeras sexuales se encontró una significancia en las que presentaron adherencia (P= 0.02), endometriosis (P= 0.05) y miomatosis (P= 0.009). Con base a los resultados obtenidos se propone la técnica de reacción en cadena de la polimerasa como una prueba útil en el diagnóstico de ***C. trachomatis*** en muestras uretrales masculinas.

## I. INTRODUCCION

Dos aspectos importantes que preocupan a la Organización Mundial de la Salud y a la Panamericana de Salud son: 1) Incremento en el número de casos de Infecciones de Transmisión Sexual y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (ITS/SIDA) y 2) El aumento en el número de infecciones en adolescentes sexualmente activos, usuarios de drogas<sup>(1)</sup>. Los agentes causales de las infecciones de transmisión sexual son muy variados, como se muestra en la tabla 1<sup>(2,3)</sup>.

**TABLA 1. INFECCIONES DE TRANSMISION SEXUAL Y SUS AGENTES CAUSALES**

INFECCIONES	AGENTE CAUSAL
Uretritis, Epididimitis, Proctitis, Salpingitis, Cervicitis, Conjuntivitis, etc.	<i>Chlamydia trachomatis</i> (Todos los biotipos excepto los L )
Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Herpes genital	Virus herpes simple I y II
Verrugas, Cáncer anogenital	Papilomavirus humanos
Tricomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i>
SIDA	VIH
Chancro	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>
Linfogranuloma venéreo (LGV)	<i>Chlamydia trachomatis</i> (Serotipo L )
Candidiasis	<i>Candida albicans</i>
Vaginosis bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i>

FUENTE: tomado de Hitchcock P.J.<sup>(3)</sup>

En el manejo adecuado de pacientes que han contraído una ITS, se deben considerar varios aspectos tanto médicos, sociales, epidemiológicos como de

conducta, sobre todo aquellos relacionados a educación en salud y sexualidad que permitan prevenir este tipo de infecciones<sup>(1)</sup>.

En adolescentes el riesgo de adquirir una ITS es mayor, no sólo por su actividad sexual sino porque, a diferencia de los adultos, es menos probable que forme una relación monogámica o que tomen medidas adecuadas de protección. Los jóvenes infectados tardan en buscar la atención médica; esto ocurre por su falta de información acerca de los síntomas, sus consecuencias y el medicamento apropiado. Para el tratamiento de pacientes que tienen alguna ITS influyen tanto factores socioeconómicos, psicológicos como culturales; estos pacientes al desconfiar del personal médico y tener temor de que su confidencialidad sea violada y/o también su falta de recursos económicos no toman ningún tipo de tratamiento, lo que provoca que aumente el riesgo de infección y la tasa de prevalencia<sup>(1-3)</sup>.

La infección por ***Chlamydia trachomatis*** es el causante más común de las infecciones de transmisión sexual y representa un problema de salud pública mundial<sup>(1)</sup>. Cada año se considera que se producen 90 millones de casos de infección por ***C. trachomatis*** en el mundo. En Estados Unidos es la infección bacteriana más comúnmente reportada, con 4 a 5 millones de casos anuales. Las consecuencias que puede traer esta infección son de las más graves y costosas de todas las infecciones de transmisión sexual; Además de que algunos estudios han demostrado que la infección por ***C. trachomatis*** puede facilitar la transmisión sexual de SIDA y gonorrea<sup>(1,2,4)</sup>.

## II. MARCO TEORICO

### II.1. Epidemiología

Una característica importante de ***C. trachomatis*** es que aproximadamente del 50% al 80% de las infecciones cursan de manera asintomática<sup>(2,4)</sup>. Los índices de incidencia varían de acuerdo con la localización geográfica, la población específica y las muestras en estudio. Las infecciones genitales por este patógeno, en sus variaciones serológicas D a K se producen con frecuencia entre la etapa de adolescente y la de adulto joven, sexualmente activos<sup>(3)</sup>.

La infección por ***C. trachomatis*** es una de las enfermedades infecciosas más comunes entre mujeres y hombres. En Estados Unidos la incidencia de infección genital en mujeres estudiantes asintomáticas es del 5%, las que reciben atención en las clínicas de planificación familiar es mayor del 10% y aquellas que se atienden en clínicas de enfermedades transmitidas sexualmente es mayor del 20%<sup>(2,5-7)</sup>.

La incidencia de infección uretral en varones jóvenes es menor del 10%, mientras que en soldados asintomáticos que se sujetan a cuidados médicos regulares es del 10 al 15% y en varones heterosexuales que se atienden en clínicas de enfermedades transmitidas sexualmente es del 15 al 20% o más<sup>(2,5,6,8,9)</sup>. En países Europeos la infección en población masculina es diversa y se tienen reportes de un 3% al 30%, a partir de muestras de orina, semen y uretra<sup>(10-14)</sup>; además es importante señalar que la prevalencia de ***C. trachomatis*** en estos países es mayor que la de ***Neisseria gonorrhoeae***.

En México, no se tienen muchos datos de la frecuencia de ***C. trachomatis*** en población masculina sin embargo, en mujeres que asistieron al Instituto Nacional de Perinatología, la prevalencia de infección por ***C. trachomatis*** fue del 24.9%, las cuales presentaban diferentes patologías ginecológicas como enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), obstrucción tubaria bilateral (OTB) y embarazos ectópicos<sup>(7)</sup>. En la literatura se describe que del 75% al 85% de los

casos de infertilidad, OTB, EPI y endometriosis, el agente etiológico de estos padecimientos es ***C. trachomatis***<sup>(1-3)</sup>.

En un estudio realizado por Valdespino y col<sup>(15)</sup>, en hombres con prácticas homosexuales y bisexuales reportaron una frecuencia del 4.3% por la técnica de inmunofluorescencia<sup>(15)</sup>. Así mismo Guerra-Infante reportó que a partir de muestras uretrales la frecuencia de infección fue del 1.7% empleando la prueba de hibridación en fase líquida<sup>(7)</sup>.

Debido a que en nuestro país se conoce poco sobre la prevalencia de ***C. trachomatis*** en población masculina es importante realizar estudios al respecto, por lo que este trabajo se enfocó en conocer si las muestras uretrales de varones que fueron negativos por una técnica de hibridación en fase líquida realmente son negativas a la infección por ***C. trachomatis***, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## II.2. Etiología y Patología

El género ***Chlamydia*** se caracteriza por ser una bacteria intracelular obligada, no móvil, Gram negativa, contiene ribosomas, RNA y DNA (se encuentra en el nuclóide del cuerpo elemental); sintetiza sus propias proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Presenta una membrana externa compuesta de fosfolípidos, proteínas (70-75%) y lipopolisacáridos (antígeno específico de grupo); no tiene colesterol en su membrana celular, pero tiene lípidos y carbohidratos<sup>(7)</sup>.

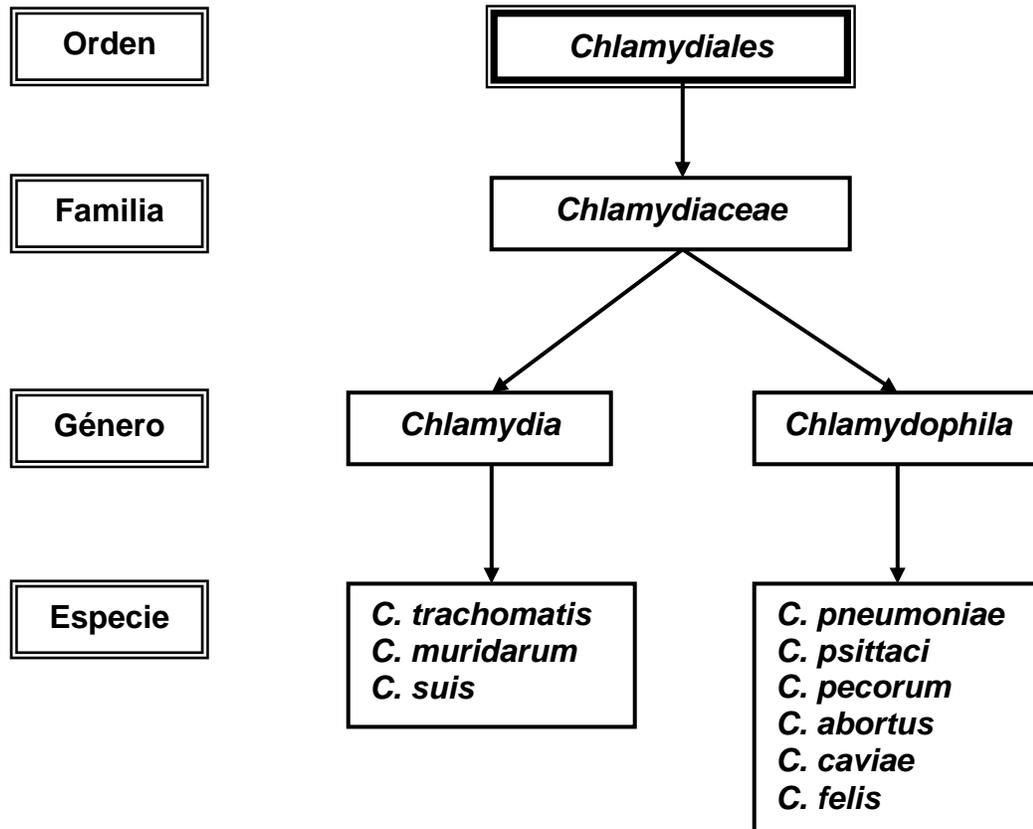
Los principales antígenos de clamidia están localizados en su membrana externa. Tiene el lipopolisacárido LPS (antígeno específico de género) y la proteína principal de membrana externa (MOMP) en donde están presentes los epítomos que son género, especie y subespecie específicos<sup>(4,7)</sup>.

Tiene un ciclo de vida con dos formas distintas, especialmente adaptadas a la supervivencia extracelular y a la transferencia de célula a célula, así como para el crecimiento intracelular. La forma infectante (extracelular) llamada cuerpo elemental (CE), con un tamaño aproximado de 0.2-0.4  $\mu\text{m}$  tiene una pared rígida que carece de ácido murámico, una membrana externa con proteínas, entre ellas

la proteína principal de membrana externa (MOMP) que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa y dos proteínas de envoltura, una de 60 kDa y otra de 12 kDa, ambas ricas en cisteína y que se encuentran solo en los cuerpos elementales. La integridad estructural le confiere resistencia a los factores ambientales, permitiéndoles sobrevivir después de la lisis de la célula huésped, así como el tránsito de célula a célula y de huésped a huésped<sup>(7)</sup>.

La forma metabólicamente activa (intracelular y reproductiva) llamado cuerpo inicial o reticulado (CR), mide de 0.6-1.0  $\mu\text{m}$ , sintetiza DNA, RNA y proteínas; son menos rígidos en comparación con el CE, no sobreviven fuera de la célula huésped; después de un tiempo empieza a dividirse por fisión binaria, se convierte en CE y es liberado para iniciar otro ciclo de infección<sup>(7)</sup>.

La familia ***Chlamydiaceae***, comprende un único género; ***Chlamydia***, sin embargo ahora se ha propuesto la división en dos géneros; ***Chlamydia*** y ***Chlamydophila***; y se han añadido nuevas especies. Dentro del género ***Chlamydia*** se encuentran, ***C. trachomatis*** parásito estricto del hombre; ***C. muridarum*** patógeno de ratones y hamsters y ***C. suis*** de cerdos. El género ***Chlamydophila*** incluye a las especies; ***C. pneumoniae***, agente que causa neumonía en humanos; ***C. psittaci*** patógeno de aves; ***C. pecorum*** patógeno de ovinos y bovinos; ***C. abortus*** patógeno de rumiantes; ***C. caviae*** patógeno de cerdos y ***C. felis*** patógeno de gatos. (figura 1).



FUENTE: tomado de Everett KD <sup>(16)</sup>.

**Figura 1. Clasificación taxonómica de las clamidias.**

Por otro lado *Chlamydia trachomatis* presenta 19 serotipos caracterizados por el tipo de infección que producen (Tabla 2)<sup>(8,10,11,17-25)</sup>.

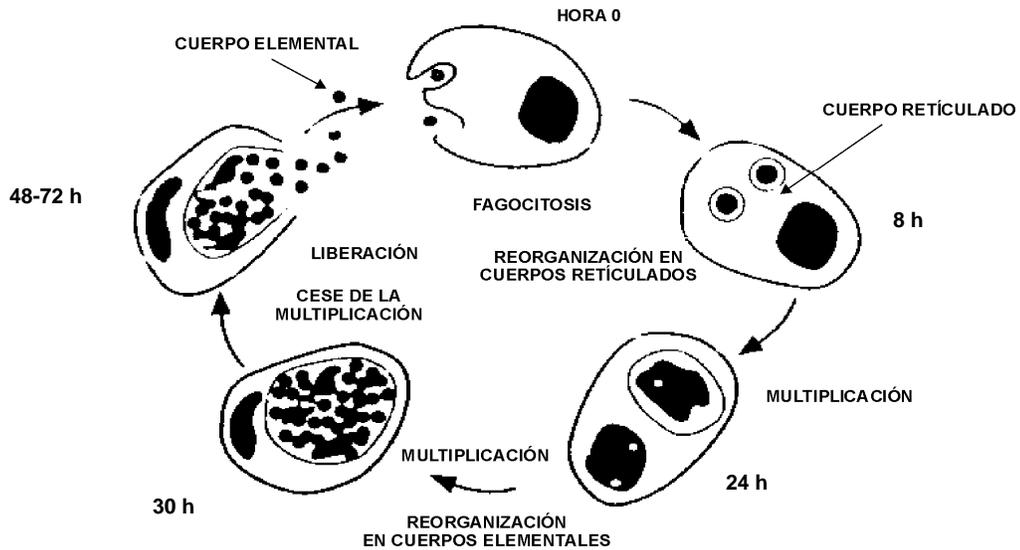
**TABLA 2. ESPECTRO CLINICO DE LAS INFECCIONES POR *Chlamydia trachomatis***

SEROTIPOS	HUESPED	INFECCION	COMPLICACIONES
A, B, Ba, C	Mujer, Varón, Niños	Tracoma	Ceguera
B, D-K D <sub>a</sub> , I <sub>a</sub> J <sub>a</sub>	Mujer	Cervicitis, Uretritis, Proctitis, Conjuntivitis	Salpingitis, Endometriosis, Embarazo ectópico, Esterilidad, etc.
B, D-K	Varón	Uretritis, Uretritis posgonocócica, Proctitis, Conjuntivitis	Epididimitis, Síndrome de Reiter
B, D-K	Lactante	Conjuntivitis, Neumonía	Tracoma
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> , L <sub>2a</sub> L <sub>3</sub>	Mujer, Varón	Linfogranuloma venéreo	Obstrucción linfática

### II.2.a. Ciclo de replicación

La replicación de ***C. trachomatis*** se lleva a cabo a través de un ciclo de crecimiento único (figura 2), el ciclo comienza con la unión del CE a las microvellosidades de las células de las diferentes mucosas (vaginal, respiratoria o conjuntival), una vez que penetra ***C. trachomatis*** permanece dentro del fagosoma citoplásmico y permanece en el interior de esta vesícula fagocítica durante todo el ciclo; de 6-8 horas se reorganizan en CR, los cuales se dividen repetidamente por fisión binaria (durante la fase de replicación en el fagosoma recibe el nombre de cuerpo de inclusión [CI] ) en un lapso de 24 horas. A continuación, los CR se reorganizan convirtiéndose en CE y al cabo de 48-72 horas rompen la célula y se liberan para posteriormente infectar otras células<sup>(7)</sup>.

**Figura 2. Ciclo de replicación de *C. trachomatis***



FUENTE: tomado de Woods LM<sup>(17)</sup>

***C. trachomatis*** afecta a los órganos genitourinarios y su único huésped es el hombre. El fracaso de controlar la infección de esta bacteria es debido a que en muchos de los casos esta lleva un curso asintomático lo que provoca infertilidad como consecuencia de las secuelas crónicas que produce esta bacteria. El estado de portador en hombres y mujeres al prolongarse aumenta el potencial para la transmisión; hombres con infecciones en la uretra y recto por este microorganismo no muestran síntomas de infección por lo que se convierten en una fuente importante de infección y en mujeres la infección asintomática en la uretra y el recto puede estar acompañada de una infección en el cérvix. Una temprana identificación y la aplicación de un tratamiento adecuado es la mejor manera de controlar esta infección<sup>(1,7)</sup>.

### II.3. Factores de Riesgo

Existe una gran variedad de factores de riesgo que influyen en la infección por **C. trachomatis** y de otras infecciones de transmisión sexual<sup>(26,27)</sup>, algunos de estos factores son:

- La edad de inicio de la vida sexual; a menor edad (menor de 20 años) más posibilidad de tener un mayor número de compañeros sexuales a lo largo de la vida.
- Cambios frecuentes y repetidos de compañeros sexuales, así como algunas prácticas sexuales que favorecen el intercambio del microorganismo.
- El sexo comercial, que se encuentra asociado a otros factores de riesgo como son la migración, uso de drogas y practicas sexuales diversas.
- La presencia de algunas infecciones que actúen como factores de riesgo para la aparición de otras, por ejemplo: la gonorrea puede reactivar la infección por **C. trachomatis**, esta a su vez favorece la infección con el virus del papiloma humano e incrementa la susceptibilidad a infecciones bacterianas.
- La falta de medidas preventivas como el empleo del condón y de anticonceptivos.
- El ambiente húmedo y caliente puede facilitar la infección; los climas tropicales y subtropicales son favorables a la propagación de la infección.
- Otro de los factores que pueden contribuir en adquirir esta infección son los malos hábitos higiénicos, así como, la no precaución del personal que atiende a los pacientes en los hospitales y clínicas (médicos, laboratoristas, enfermeras).

### II.4. Diagnóstico

Uno de los principales problemas para evidenciar las implicaciones que tiene **C. trachomatis** en las diversas patologías, son las pruebas de detección y la expresión de la enfermedad que en la mayoría de los casos es asintomática. Las infecciones genitales causadas por esta bacteria deben diferenciarse de la infección por **N. gonorrhoeae** y otras infecciones purulentas, porque los fármacos de elección son diferentes para cada enfermedad; debido a lo anterior se han desarrollado cierto número de pruebas de detección<sup>(28,29)</sup> (Tabla 3).

Dado que las clamidias no pueden crecer fuera de las células huésped, el **cultivo celular** fue en los años 70's y actualmente una de las pruebas más utilizadas en los programas de salud pública; sin embargo, la sensibilidad de la prueba es de 60%-80% y su especificidad de 90%-95%. Aunque, el aislamiento de este patógeno en cultivo celular con células de Mc Coy tratadas con cicloheximida produce un número elevado de cuerpos de inclusión, se conocen algunos problemas que pueden modificar los resultados, como es la contaminación bacteriana que es consecuencia de un mal manejo del cultivo celular, el tipo de muestra y el tipo de laboratorio el cual deberá contar con las condiciones de equipo y reactivos necesarios para el cultivo celular<sup>(30)</sup>.

En los años 80's, se desarrollaron cierto número de pruebas para la detección de antígenos de **C. trachomatis**, incluyendo la demostración microscópica del microorganismo. La prueba de **microinmunofluorescencia (MIF)**, es otra de las técnicas utilizada en los laboratorios, su sensibilidad es del 85%-90% y la especificidad del 90%-95%. La prueba de MIF se basa en la detección de anticuerpos IgG o IgM contra cuerpos elementales (CE) de **C. trachomatis**, para ello se emplean anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína. Se debe tener presente que en las pruebas de diagnóstico por serología existe la posibilidad de la presencia de anticuerpos de reacción cruzada contra microorganismos tales como **C. pneumoniae**, **C. psittaci**, **Salmonella**, **Acinetobacter** y **Bartonella**. Este último presenta un interés particular en la posibilidad de casos de infección con **Bartonella** en individuos que presentan

endocarditis, en donde se reconoce un diagnóstico erróneo por infección de ***Chlamydia*** o viceversa<sup>(28,30,31)</sup>.

En la década de los 90's las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se convirtieron en el uso clínico de rutina para programas de prevención de salud pública; existen tres características importantes de estas pruebas: (1) su alta sensibilidad; (2) la capacidad de utilizar diferentes tipos de muestras como orina, muestras uretrales, semen, etc. y (3) capacidad para detectar simultáneamente diferentes patógenos; algunas de estas pruebas son: la prueba de **hibridación en fase líquida** (PACE-2), la cual se basa en el reconocimiento del RNA ribosomal de ***C. trachomatis*** mediante una sonda de DNA marcada con éster de acridina. La sensibilidad de la prueba es de un 70% al 95%, mientras que la especificidad es del 90% al 100%<sup>(30,32,33)</sup>. Otra prueba es la **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR) que permite amplificar de manera exponencial fragmentos definidos de DNA, mediante iniciadores de DNA sintéticos (oligonucleótidos o iniciadores) que reconocen una secuencia conservada de la bacteria mediante una serie de ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA, alineamiento de las cadenas (oligonucleótidos con respecto al DNA blanco) y extensión. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se ha reportado en un 100% respectivamente; sin embargo, puede contaminarse fácilmente y la prueba puede causar falsos positivos<sup>(14,19,30,34-36)</sup>.

**TABLA 3. PRUEBAS DIAGNOSTICAS DE LAS INFECCIONES POR *Chlamydia trachomatis***

	INFECCION	SIGNOS / SINTOMAS SUGESTIVOS	MUESTRAS	PRUEBAS PARA EL DIAGNOSTICO
<b>VARONES</b>				
	Uretritis no gonocócica	Secreción, disuria	Uretral, Orina	Tinción de GRAM, Cultivo uretral, PCR, LCR, EGO
	Epididimitis	Hinchazón, Dolor e hipersensibilidad intraescrotal unilateral (testicular), fiebre, inflamación epididimaria unilateral	Uretral, Orina	Tinción de GRAM, Cultivo uretral, PCR, LCR
<b>MUJERES</b>				
	Cervicitis	Secreción cervical mucopurulenta, hemorragia y edema de la zona cervical	Cervical, Orina	Tinción de GRAM, Cultivo cervical, PCR, LCR
	Salpingitis	Dolor abdominal bajo, dolor cervical con la movilización, dolor con la palpación en anexos	Cervical, Orina	Cultivo cervical, PCR, LCR, Proteína C reactiva
	Uretritis	Disuria, cervicitis mucopurulenta, piuria estéril, urocultivo sistemático estéril	Cervical, Uretral, Orina	Tinción de GRAM, Cultivo cervical o uretral PCR, LCR
<b>AMBOS SEXOS</b>				
	Proctitis	Dolor, secreción y hemorragia rectal; antecedentes de relaciones sexuales anorrectales	Rectal, Suero	Tinción de GRAM, Cultivo rectal, Inmunofluorescencia
	Síndrome de Reiter	Uretritis no gonocócica, artritis, conjuntivitis, lesiones mucocutáneas	Uretral	Tinción de GRAM, Cultivo uretral
	LGV	Adenopatía regional, lesión primaria, proctitis, síntomas generales	Ganglio linfático, Recto, Uretral o Cuello uterino, Suero	Fijación de complemento, Inmunofluorescencia
<b>RECIEN NACIDOS</b>				
	Conjuntivitis	Secreción conjuntival purulenta de 6-8 días del alumbramiento	Conjuntiva	Tinción de GRAM, Cultivo conjuntival, Tinción de Giemsa
	Neumonía	Apirexia, tos entrecortada	Espujo, Faringe, Ojo, Recto, Suero	Cultivo (Espujo, Faringe, Ojo, Recto), Inmunofluorescencia

LGV= Linfgranuloma venéreo; PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa; LCR= Reacción en Cadena de la Ligasa; EGO= Examen General de Orina.

Fuente: tomado de Stamm EW<sup>(28)</sup>, Dyck EV<sup>(29)</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

***Chlamydia trachomatis*** es causante de infecciones de transmisión sexual tanto en varones como en mujeres y esto representa un problema de salud a nivel mundial; y por lo tanto, la prevalencia es diversa dependiendo de la población bajo estudio y de la técnica de diagnóstico empleada. En México no existen datos reales de la frecuencia de infección por este microorganismo en población masculina, debido principalmente a que los métodos empleados de diagnóstico son de baja sensibilidad y al tipo de muestra utilizada. Debido a lo anterior es necesario conocer la frecuencia de la infección en varones que acuden a una clínica de reproducción asistida con métodos más sensibles como es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR.

#### IV. OBJETIVO GENERAL

Evidenciar la presencia de *Chlamydia trachomatis* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en muestras uretrales masculinas que fueron negativas por la técnica de hibridación en fase líquida

##### IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar el valor promedio de las Unidades Relativas de Luz (URL) de las muestras uretrales masculinas negativas por la técnica de hibridación en fase líquida
- ❖ Conocer la frecuencia real de infección por *Chlamydia trachomatis* en muestras uretrales masculinas empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa
- ❖ Correlacionar los niveles de las URL con los resultados obtenidos en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa
- ❖ Determinar el título de anticuerpos *anti-C. trachomatis* mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF) y compararlo con los resultados de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- ❖ Conocer los factores de riesgo de los varones infectados por *C. trachomatis* con respecto a los no infectados por esta bacteria

## V. HIPOTESIS

Ha: La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica capaz de detectar a ***C. trachomatis*** en muestras donde han sido negativas por la técnica de hibridación en fase líquida

Ho: La reacción en cadena de la polimerasa no es una técnica capaz de detectar a ***C. trachomatis*** en muestras donde han sido negativas por la técnicas de hibridación en fase líquida.

Ha: El valor de corte de las URL mediante la técnica de hibridación en fase líquida para detectar a ***C. trachomatis*** no es el resultado más adecuado para determinar su presencia

Ho: El valor de corte de las URL mediante la técnica de hibridación en fase líquida para detectar a ***C. trachomatis*** es el resultado más adecuado para determinar su presencia

Ha: Existen factores de riesgo que afectan a los varones infectados por ***C. trachomatis*** y los no infectados por esta bacteria

Ho: No existen factores de riesgo que afectan a los varones infectados por ***C. trachomatis*** y los no infectados por esta bacteria

Ha: Los anticuerpos *anti-C. trachomatis* son indicativos de que existe una infección activa por ***C. trachomatis***

Ho: Los anticuerpos *anti-C. trachomatis* no son indicativos de que existe una infección activa por ***C. trachomatis***

## **VI. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **VI.1. POBLACION DE ESTUDIO.**

Se estudiaron 50 muestras uretrales y 50 sueros de varones cuyas parejas sexuales asistieron a la clínica de reproducción asistida del Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

#### **VI.2.a. CRITERIOS DE INCLUSION**

- ❖ Todos aquellos varones de parejas sexuales que no hayan logrado embarazo durante un período mínimo de dos años
- ❖ Todos aquellos varones que se les haya realizado el diagnóstico por hibridación en fase líquida
- ❖ Todos aquellos varones que se les extrajo sangre periférica
- ❖ Todos aquellos varones que no estén recibiendo antibióticos, inmunosupresores o antidepresivos

#### **VI.2.b. CRITERIOS DE EXCLUSION**

- ❖ Todos aquellos varones a los cuales no se les realizó el diagnóstico por hibridación en fase líquida
- ❖ Todos aquellos varones a los cuales no se les extrajo sangre periférica
- ❖ Todos aquellos varones que estén recibiendo algún antibiótico, inmunosupresor o antidepresivo

### **VI.3.a. VARIABLE INDEPENDIENTE:**

- ❖ Técnica de Hibridación en Fase Líquida (PACE-2)
- ❖ Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
- ❖ Técnica de Microinmunofluorescencia (MIF)

### **VI.3.b. VARIABLE DEPENDIENTE:**

- ❖ Muestras uretrales y sueros de individuos sin signos o síntomas de proctitis y uretritis no gonocócica

## VII. MATERIALES Y METODOS

### VII.1. DETECCION DE *Chlamydia trachomatis* MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA (HFL)

#### MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

- ❖ Equipo para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* (PACE-2 Gen-Probe, San Diego CA, USA)
- ❖ Tubos de reacción de poliestireno
- ❖ Micropipetas de 100 µL
- ❖ Micropipetas de repetición de 100-1000 µL
- ❖ Puntas de 100-1000 µL
- ❖ Guantes de látex
- ❖ Tarjetas autoadheribles
- ❖ Cronómetro
- ❖ Termómetro
- ❖ Papel absorbente y gasa estéril
- ❖ Gradilla y base de separación magnética
- ❖ Baño María a 60° C
- ❖ Mezclador vortex
- ❖ Luminómetro (Leader I, Gen-Probe)

#### Fundamento

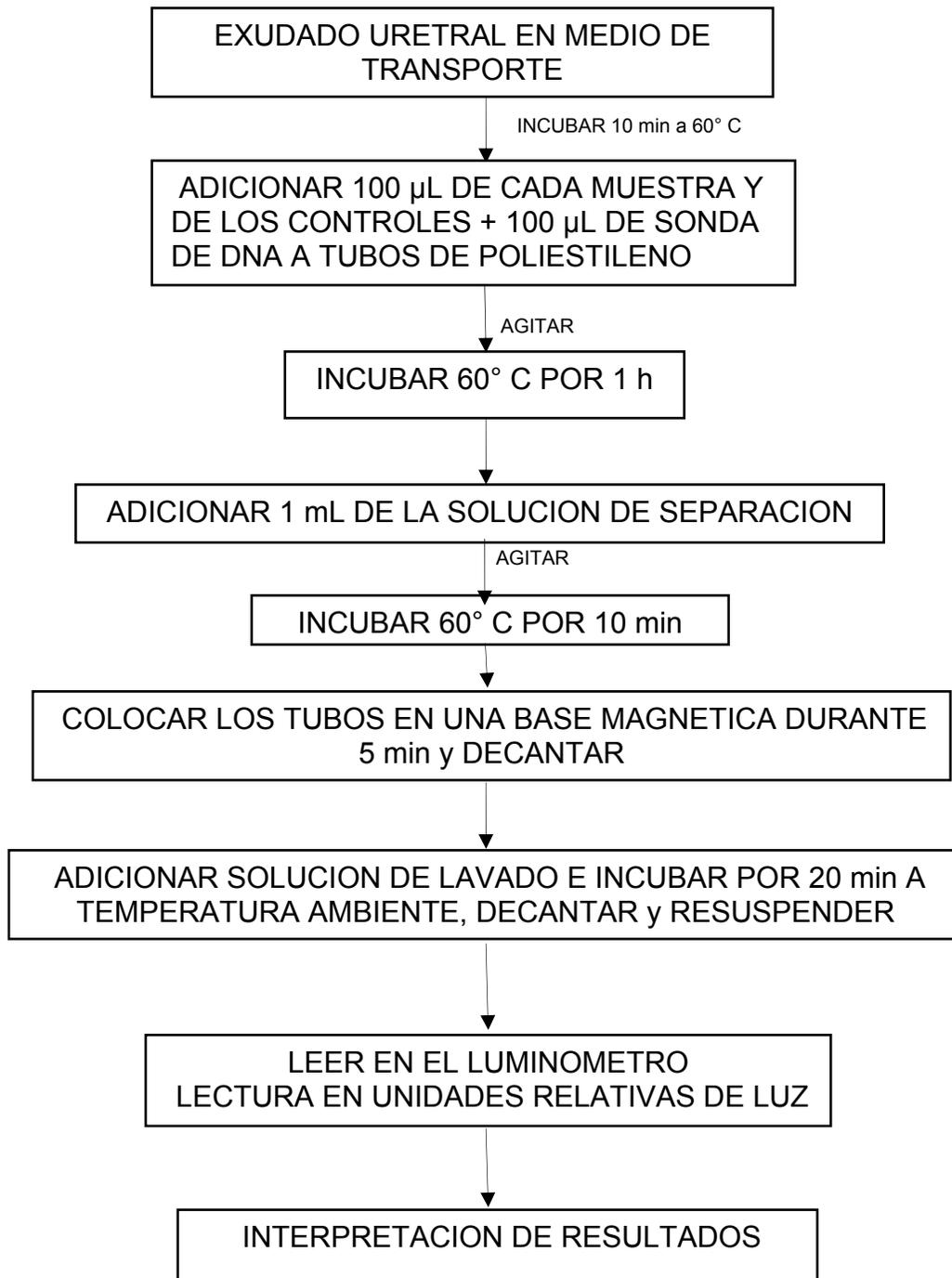
La técnica se basa en el reconocimiento de una secuencia genética del RNA ribosomal 16S de *C. trachomatis* mediante una sonda de DNA marcada con éster de acridina (secuencia conservada) formando de esta manera un híbrido DNA: RNA, el cual se detecta en un luminómetro como unidades relativas de luz (URL).

#### Procedimiento

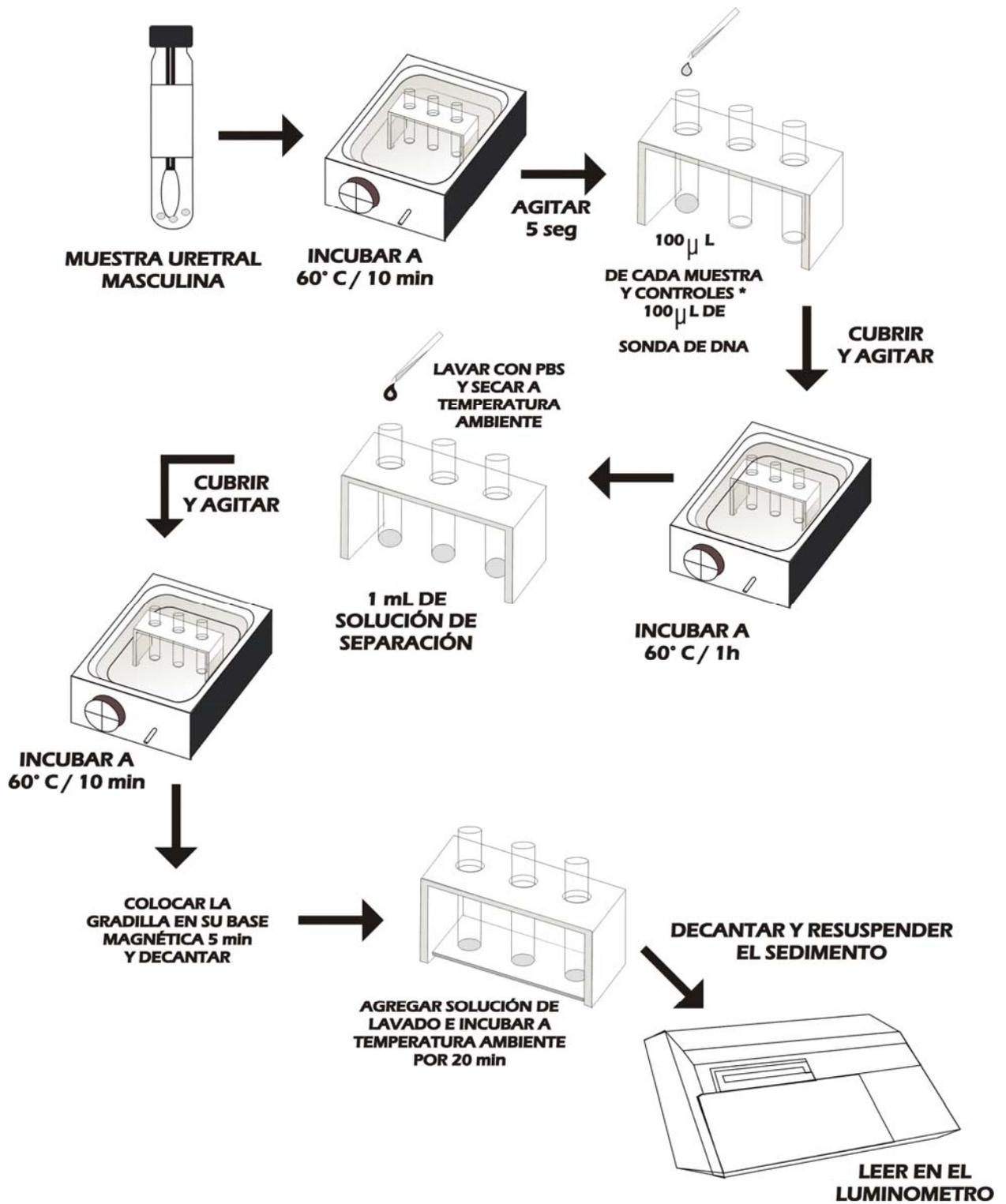
Las muestras uretrales masculinas contenidas en tubos con medio de transporte, se incubaron a 60° C durante 10 min y se agitaron en vortex 5 seg. Los

tubos de poliestireno se colocaron en una gradilla especial y a cada tubo se le agregaron 100  $\mu$ L de la muestra uretral, incluyendo tres controles negativos y un control positivo; enseguida, a cada tubo se le adicionó 100  $\mu$ L de la sonda de DNA marcada con éster de acridina; los tubos se cubrieron, se agitaron y se incubaron a 60° C durante 1 h; después de la incubación, a cada tubo se le adicionó 1 mL de solución de separación; nuevamente se cubrieron, agitaron e incubaron a 60° C durante 10 min; terminando la incubación la gradilla conteniendo los tubos se colocó sobre una base magnética durante 5 min a temperatura ambiente y mediante inversión se decantó el sobrenadante (antes de revertir los tubos se colocaron por 5 seg en papel absorbente). Sin quitar la gradilla de la base, los tubos se llenaron con solución de lavado y se incubaron 20 min a temperatura ambiente; terminado el tiempo de incubación se decantó el sobrenadante. La gradilla se separó de la base magnética y los botones del sedimento se resuspendieron. La base de los tubos se limpiaron con una gasa húmeda y cada tubo se insertó en el luminómetro en el siguiente orden: controles negativos, control positivo y muestras (figura 3 y 4). Los resultados se calcularon con base en la diferencia entre los controles negativos y el control positivo. Las muestras se consideraron:

- ❖ Positivas, cuando los valores de las URL fueron  $\geq 439$
- ❖ Negativas, cuando los valores de las URL fueron  $< 439$



**Figura 3:** Diagrama de flujo. Diagnóstico de *C. trachomatis* mediante la técnica de hibridación en fase líquida (HFL)



**Figura 4:** Detección de *C. trachomatis* mediante la técnica de hibridación en fase líquida (PACE-2).

## VII.2. EXTRACCION Y PURIFICACION DE DNA

### MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

- ❖ Tubos Eppendorf de 2 mL
- ❖ Micropipetas de 0.5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L
- ❖ Puntas de 0.5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L
- ❖ Gradilla
- ❖ Tubos para PCR de 200  $\mu$ L
- ❖ Guantes de latex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Agitador automático
- ❖ Baño María a 55° C
- ❖ Microcentrifuga refrigerada (Eppendorf 5417R)
- ❖ Mezclador vortex
- ❖ Termociclador (PCT-100, MJ Research, Inc)
- ❖ Cámara para electroforesis (Fotodyne, Inc)
- ❖ Analizador de geles (Multimage light Cabinet. Alpha Innotech Co.)

### Procedimiento

En tubos Eppendorf de 2 mL se adicionaron 100  $\mu$ L de cada muestra uretral masculina y 400  $\mu$ L de solución de lisis (ver apéndice), se agitaron 1 min y se incubaron a 55° C por 1 h (los tubos se agitaron cada 15 min por inversión); terminando la incubación, a cada tubo se le agregaron 200  $\mu$ L de fenol ( ver apéndice) y 200  $\mu$ L de cloroformo (1:1) (ver apéndice), se agitaron por 1 min y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. En tubos Eppendorf nuevos de 2 mL se transfirió la capa superior y a cada tubo se le agregó 400  $\mu$ L de cloroformo; después se agitaron durante 10 min y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Nuevamente en tubos Eppendorf de 2 mL se transfirió la capa superior y a cada tubo se le

adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio 1 M y 1,000  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto ( $-20^\circ\text{C}$ ), se mezclaron por inversión y centrifugaron a 12,500 rpm durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ ; el sobrenadante se decantó y se les realizaron dos lavados con etanol al 75%. El botón de DNA de cada tubo se dejó secar y se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de solución reguladora Tris-EDTA (TE) (ver apéndice). Finalmente a cada muestra se les verificó la integridad del DNA en gel de agarosa al 0.8% en solución reguladora Tris-Borato (TBE) (ver apéndice), el cual se reveló con bromuro de etidio al 1% y utilizando un analizador de geles se visualizó la integridad del DNA (figura 5 y 6).

### VII.3. DETECCION DE *Chlamydia trachomatis* MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

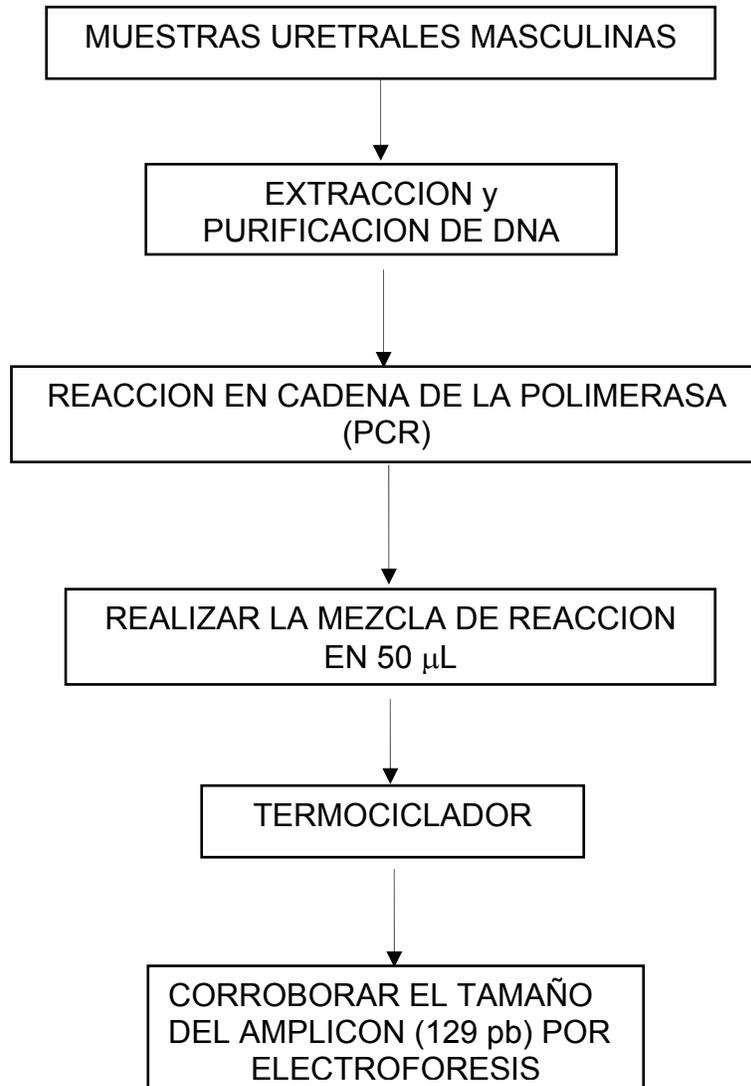
La reacción se llevó a cabo en 50  $\mu\text{L}$  de volumen final; a cada tubo se agregaron 22.5  $\mu\text{L}$  de mezcla (Agua estéril, Oligonucleótidos 20 pM/ $\mu\text{L}$ ; Cloruro de magnesio 25 Mm) + 2.5  $\mu\text{L}$  de DNA de la muestra + 25  $\mu\text{L}$  de solución Master mix ( Buffer 10X 1.5 mM; dNTPs 10 mM; Taq 1.5 U/ $\mu\text{L}$ ) después los tubos se colocaron en el termociclador y se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

<b>95° C</b>	<b>5 min.</b>	<b>35 ciclos</b>
<b>95° C</b>	<b>50 seg.</b>	
<b>62° C</b>	<b>1 min.</b>	
<b>72° C</b>	<b>1min.</b>	
<b>72° C</b>	<b>10 min.</b>	

Una vez que se llevó a cabo la amplificación, el amplicón de 129 pares de bases se verificó en gel de agarosa al 2.5% en solución reguladora Tris-Borato (TBE) incluyendo un marcador de tamaño molecular en escalera de 50 pares de bases, se reveló con bromuro de etidio al 1% y en un analizador de geles se verificó (figura 7); los resultados se anotaron, considerandolas:

- ❖ Positivas cuando se presenta una banda de un producto de 129 pb

- ❖ Negativas cuando no se presenta una banda de un producto de 129 pb



**Figura 5:** Diagrama de flujo. Detección de *C. trachomatis* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

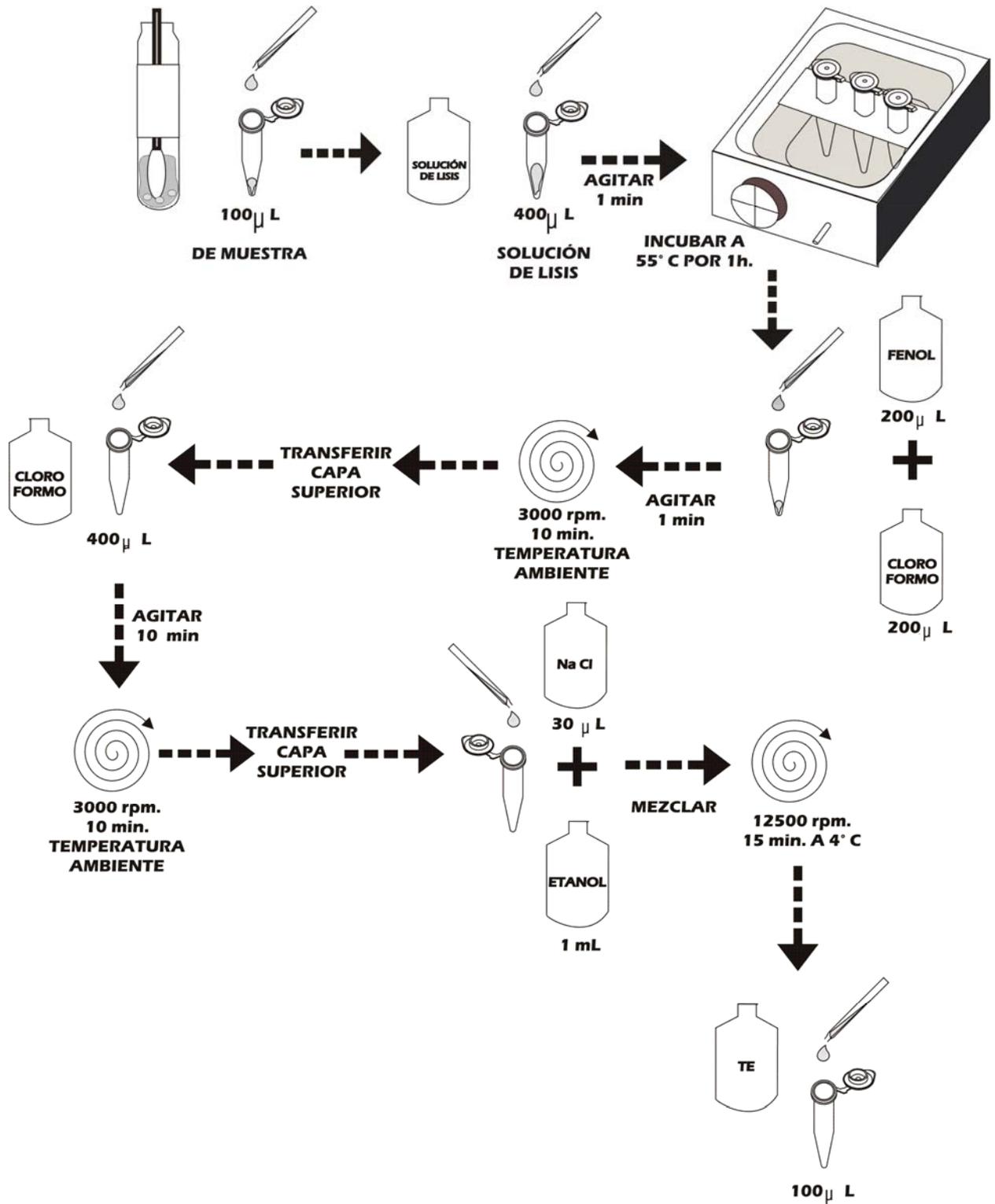


Figura 6: Extracción y purificación de DNA.

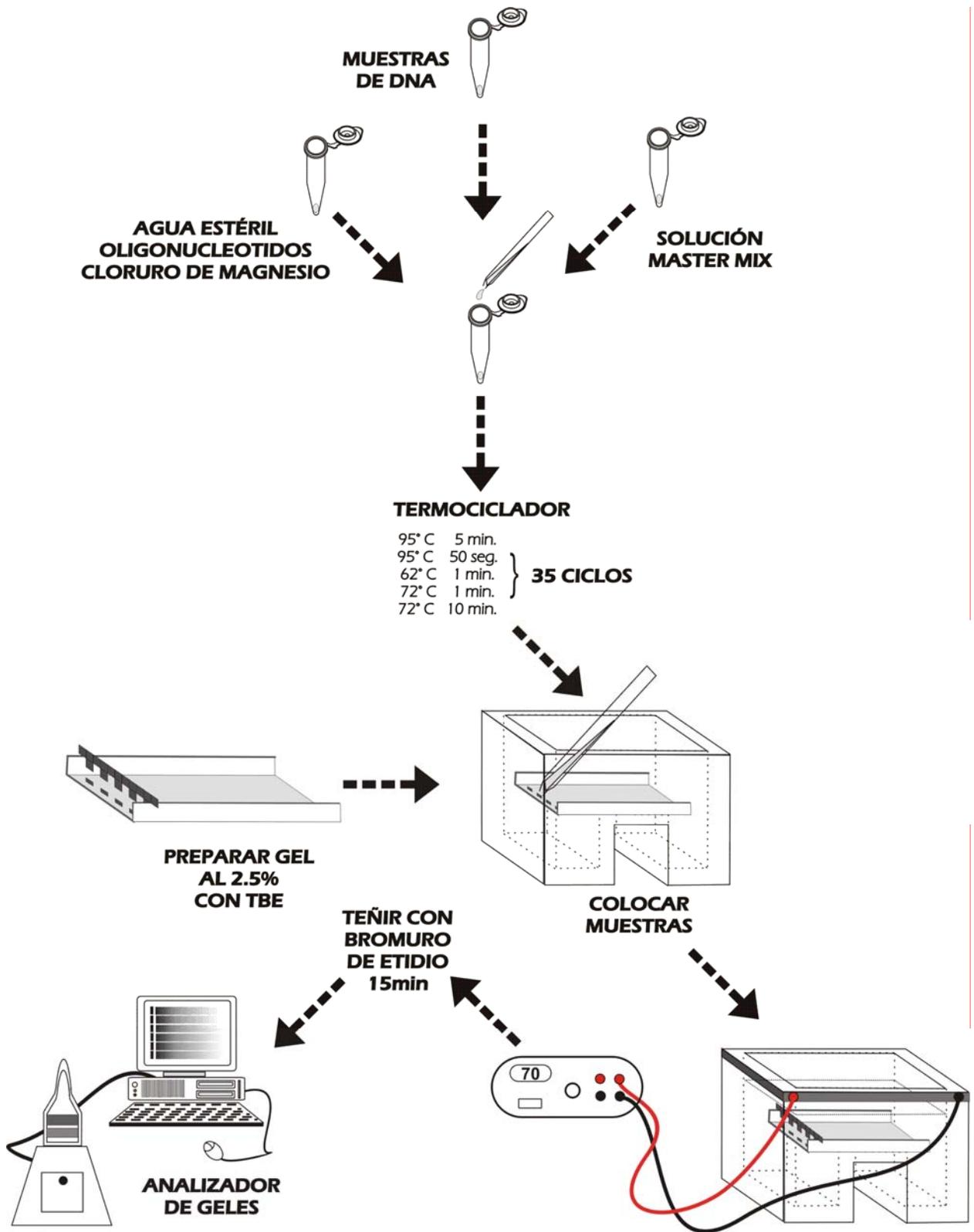


Figura 7: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## VII.4. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*C. trachomatis* MEDIANTE LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA (MIF)

### MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

- ❖ Laminillas con cuerpos elementales de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydomphila psittaci*
- ❖ Microplacas de poliestireno de 96 pozos
- ❖ Micropipetas de 0.5-10 µL, 10-100 µL
- ❖ Puntas de 0.5-10 µL, 10-100 µL
- ❖ Cronómetro
- ❖ Cubreobjetos
- ❖ Papel absorbente
- ❖ Cámara húmeda
- ❖ Microscopio de Inmunofluorescencia

### Fundamento.

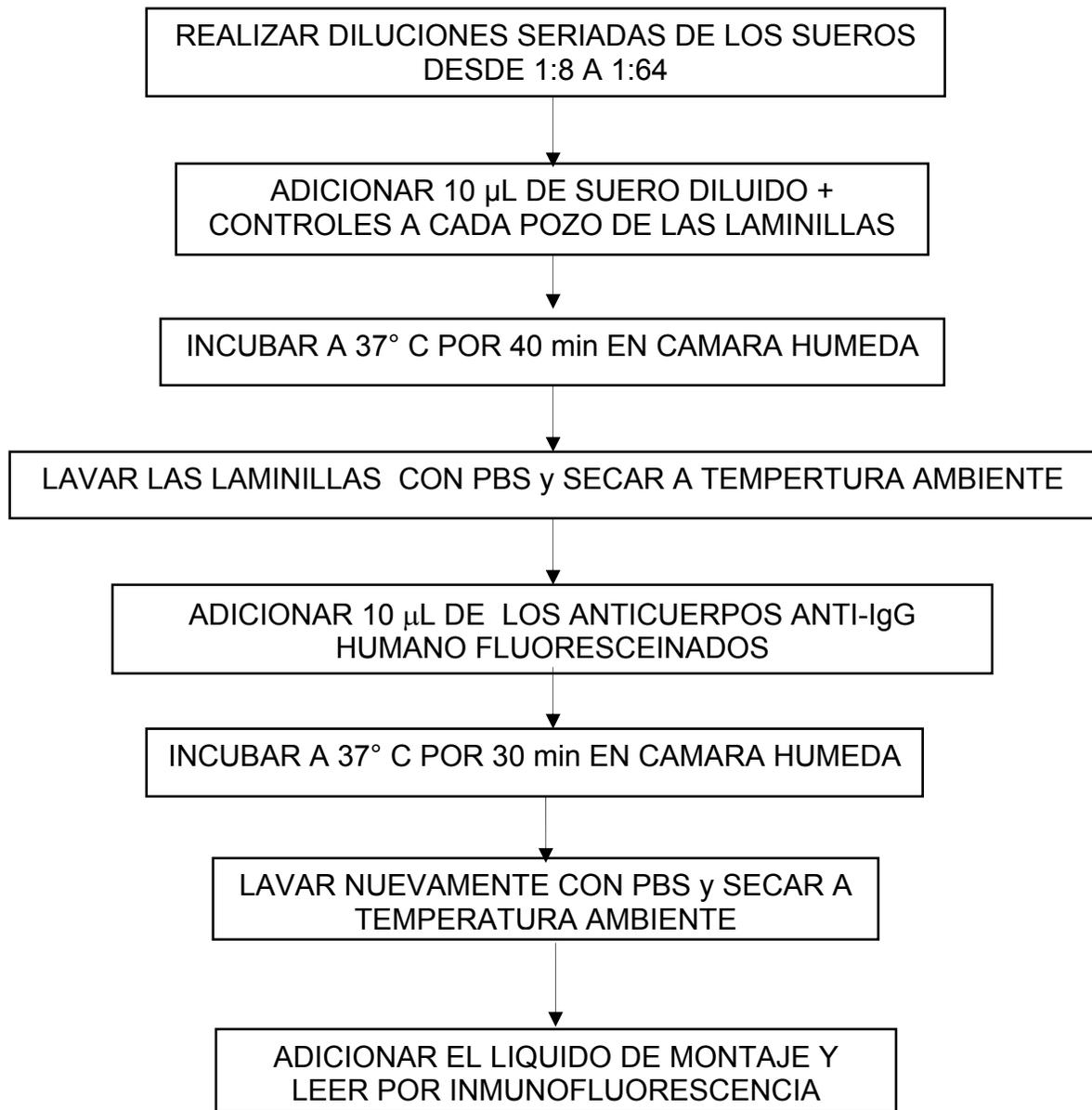
Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos IgG contra cuerpos elementales (CE) de *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci* mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti- IgG humano fluoresceínados.

### Procedimiento

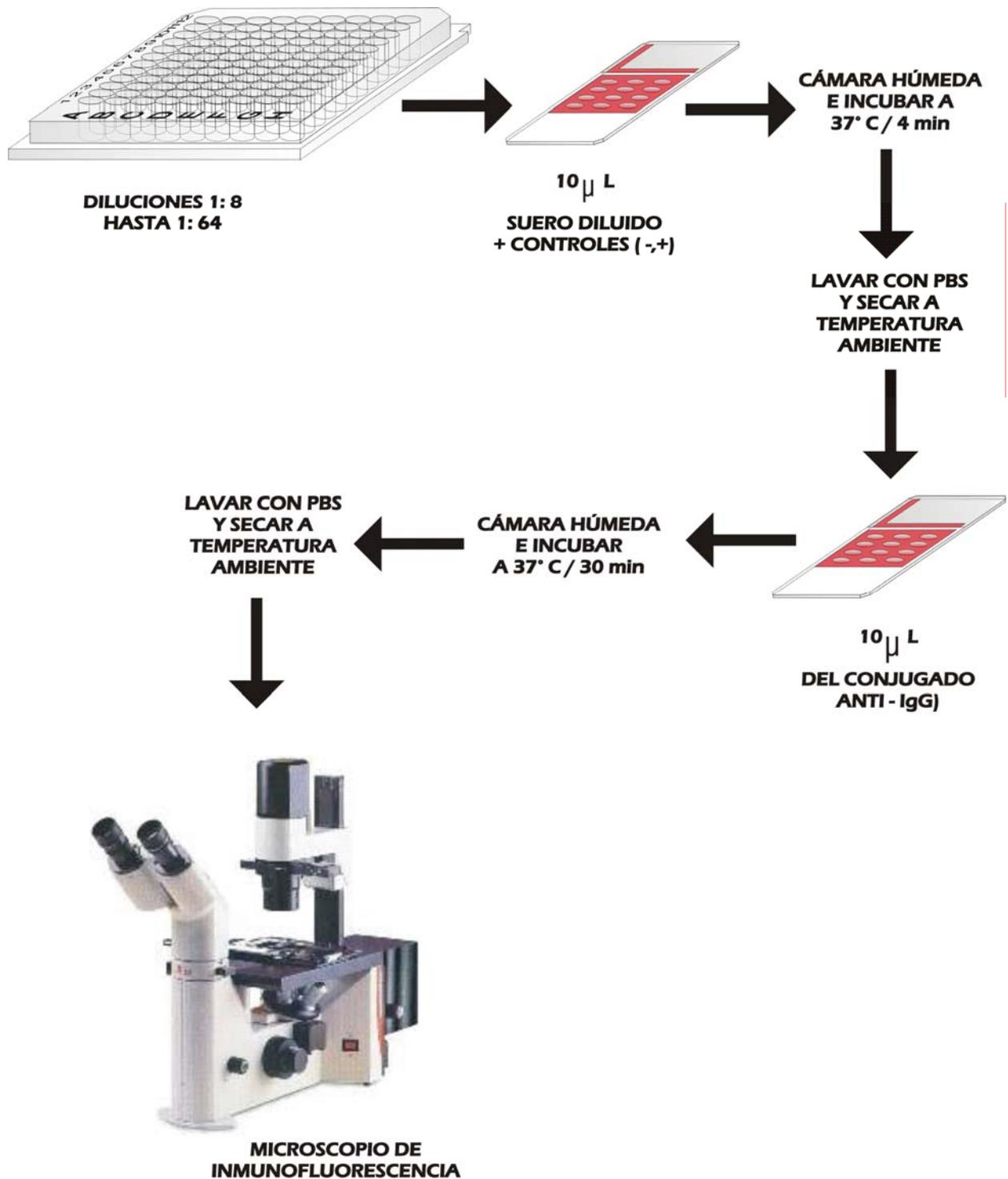
Se emplearon laminillas divididas en 12 pozos, cada una de las muestras de suero se les realizaron diluciones seriadas desde 1:8 hasta 1:64. A cada pozo (contienen células infectadas con *Chlamydia*) se les adicionaron 10 µL de los sueros diluidos, incluyendo controles positivo y negativo; las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37° C por 40 min, posteriormente se lavaron con solución reguladora de fosfatos (PBS) (ver apéndice) y se secaron a temperatura ambiente; después a cada pozo se les agregó 10 µL de conjugado anti-IgG humano fluoresceinado; nuevamente las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 37° C por 30 min, se lavaron con PBS y se dejaron secar a temperatura

ambiente. Finalmente a cada laminilla se les adicionó líquido de montaje y se les colocó el cubreobjetos. Las laminillas se observaron en el microscopio de inmunofluorescencia (figura 8 y 9) y los resultados se consideraron como:

- ❖ Positivas si se observaron CE teñidos de color verde fluorescente a un titulo  $\geq 1:32$
- ❖ Negativo si no se observaron CE teñidos de color verde fluorescente a un titulo  $< 1:32$



**Figura 8:** Diagrama de flujo. Detección de anticuerpos anti-*C. trachomatis* mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF).



**Figura 9:** Detección de anticuerpos anti-*C. trachomatis* mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF).

## VIII. DISEÑO ESTADISTICO

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico empleando el Teorema de Bayes, el cual nos permitió calcular la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, así como la prevalencia de la enfermedad y valorar la utilidad clínica de la prueba diagnóstica.

**TABLA DE CONTINGENCIA ESTADISTICA (TEOREMA DE BAYES)**

PRUEBA DE DIAGNOSTICO	PRUEBA DE REFERENCIA		
	ENFERMEDAD	SANOS	TOTAL
POSITIVO	A	B	A+B
NEGATIVO	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	A+B+C+D

**A=** Número de casos verdaderos positivos

**C=** Número de casos falsos negativos

**B=** Número de casos falsos positivos  
negativos

**D=** Número de casos verdaderos

### FORMULAS ESTADISTICAS

**SENSIBILIDAD S=**  $A / A+C$

**ESPECIFICIDAD E=**  $D / B+D$

**VALOR PREDICTIVO POSITIVO VPP=**  $A / A+B$

**VALOR PREDICTIVO NEGATIVO VPN=**  $D / C+D$

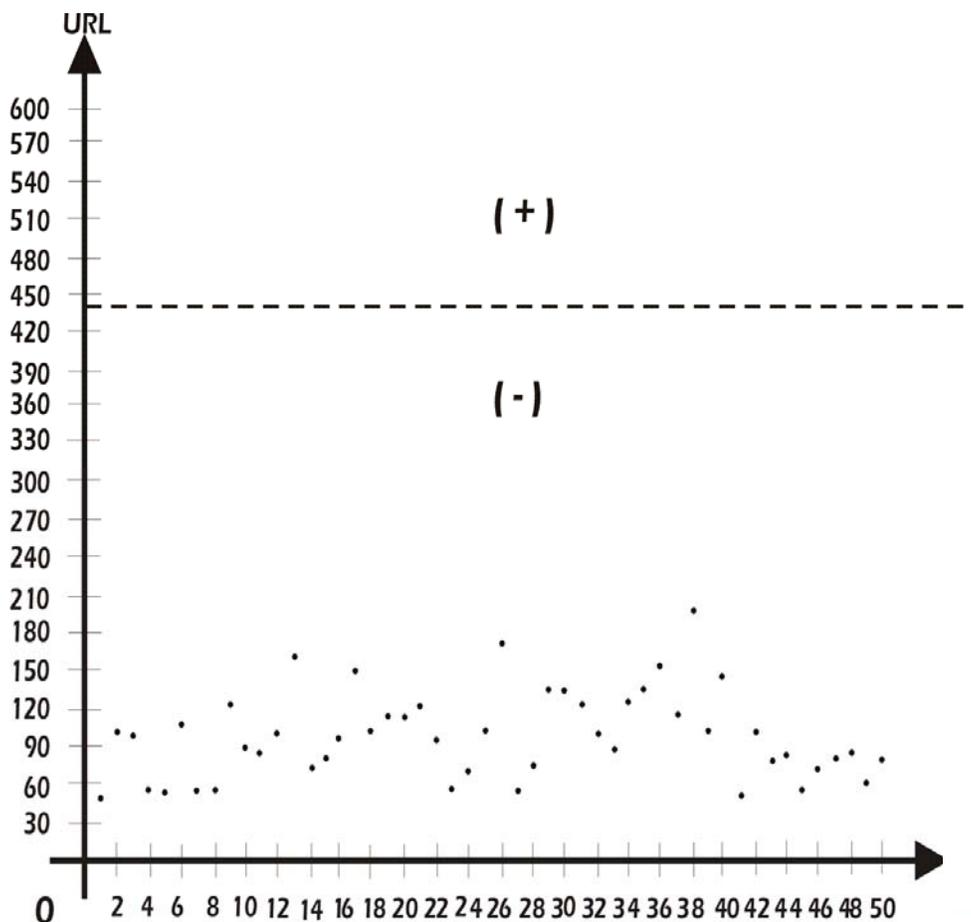
**PREVALENCIA=**  $A+C / A+B+C+D$

Así mismo para determinar los factores de riesgo asociado a una infección positiva a ***C trachomatis*** se realizaron las pruebas de Ji cuadrada ( $X^2$ ) y riesgo relativo en un intervalo de confianza del 95%, estas se consideraron significativas cuando la prueba fue menor a 0.05.

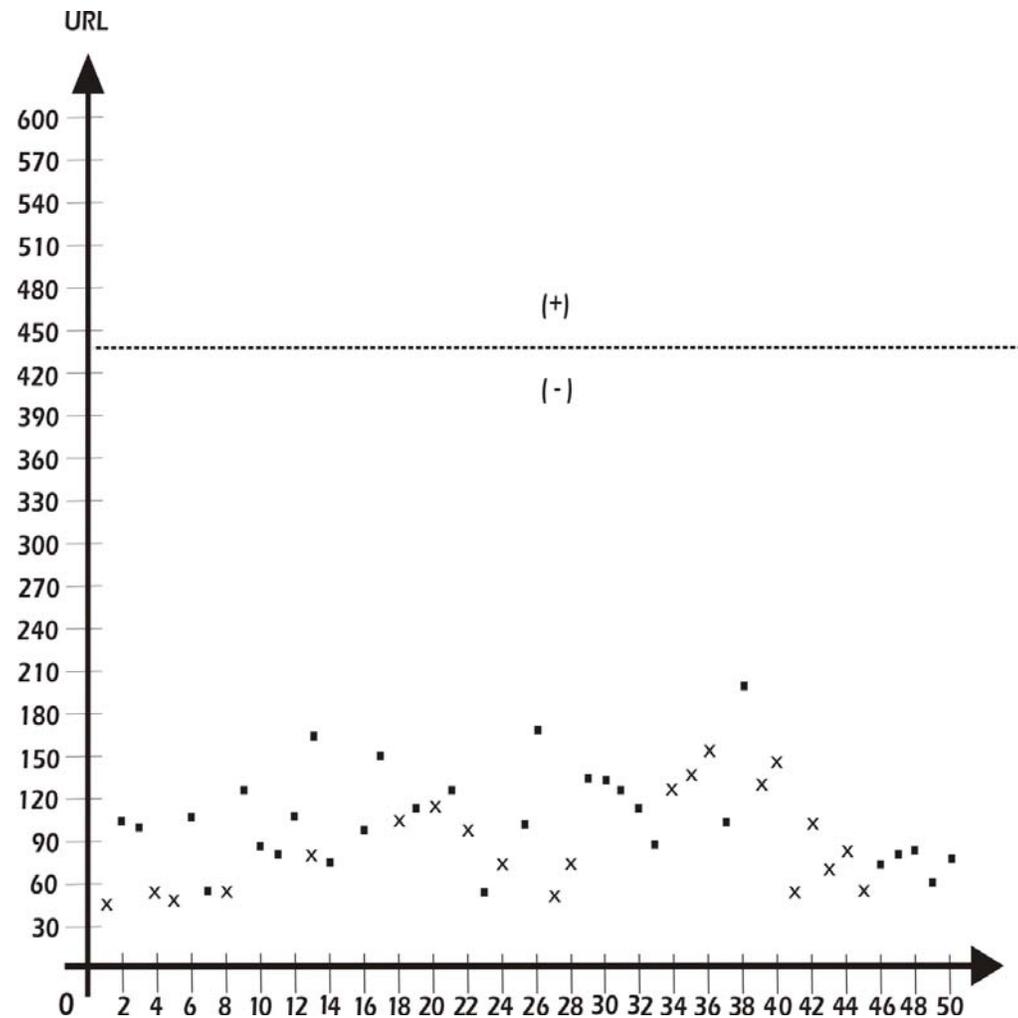
## IX. RESULTADOS

### IX.1. Evaluación de muestras uretrales masculinas por PACE-2 y PCR

En la figura 10 se observa la distribución de las URL que se obtuvieron de cada una de las 50 muestras, en ningún caso los valores se aproximaron al valor de corte de 439 URL. El valor promedio en Unidades Relativas de Luz (URL) de las 50 muestras uretrales masculinas fue 99.34, (con una desviación estándar de 34.94) este valor se consideró como muestra negativa a la infección por *C. trachomatis* mediante la técnica de hibridación en fase líquida (HFL). El análisis de las 50 muestras mediante la prueba de PCR se muestra en la figura 11, en donde 21 muestras fueron positivas por esta técnica; el valor medio de URL en estas muestras fue de 87.85 y una desviación estándar de 33.10.



**FIGURA 10.** Distribución de las Unidades Relativas de Luz de las muestras uretrales masculinas analizadas por la técnica de Hibridación en Fase Líquida



**FIGURA 11:** Valores en URL con respecto a las muestras positivas por PCR. Muestras positivas por la técnica de PCR (X) y muestras negativas por la técnica de PCR (•)

### IX.2. Detección de *C. trachomatis* por PCR

La integridad del DNA de las 50 muestras uretrales se muestra en la figura 12. En la figura 13 se observa la presencia del amplicón de 129 pb que es característico de *C. trachomatis* el cual fue obtenido mediante la técnica de PCR.

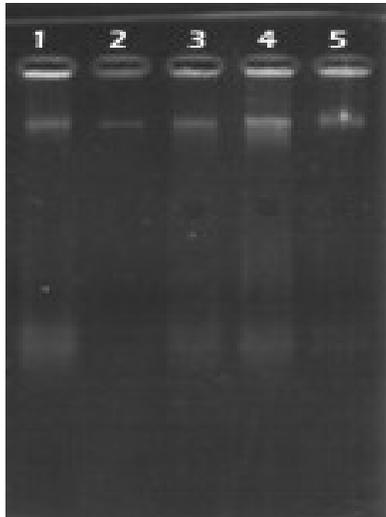


FIGURA 12. Integridad del DNA de muestras uretrales masculinas; empleando gel de agarosa al 0.8%.



FIGURA 13. Detección de *C. trachomatis*, en muestras uretrales por la técnica de PCR. En 1 y 5 se muestran los controles (-) y (+) respectivamente. En 2, 3 y 4 muestras problema y 6 es el marcador de tamaño molecular (MTM 50 pb).

### IX.3. Detección de anticuerpos IgG contra *C. trachomatis*

También se analizó la presencia de anticuerpos IgG séricos anti-*C. trachomatis* mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF) (figura 14,15 y tabla 4). En la figura 14 se observa la fluorescencia de algunos cuerpos elementales de *C. trachomatis* de una muestra negativa por la técnica de MIF. La presencia de abundantes cuerpos elementales de *C. trachomatis* de una muestra positiva obtenida mediante la técnica de MIF se muestra en la figura 15.

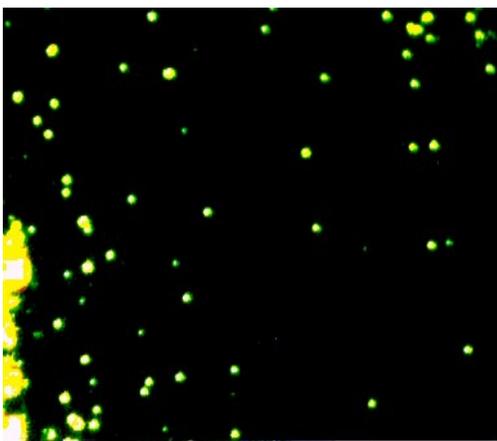


FIGURA 14. Detección de *C. trachomatis*, empleando muestras de suero negativos por la técnica de MIF.

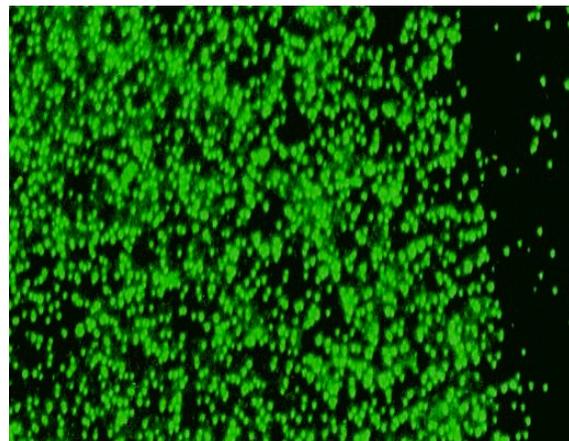


FIGURA 15. Detección de *C. trachomatis* empleando muestras de suero positivos por la técnica de MIF.

#### IX.4. Resultados de los diferentes métodos de diagnóstico

De las 50 muestras uretrales masculinas que fueron negativas para la técnica de HFL, 21 fueron positivas para PCR y de estas, 20 fueron positivas para la técnica de MIF (tabla 4).

**TABLA 4. NUMERO DE MUESTRAS POSITIVAS POR LOS DIFERENTES METODOS DE DIAGNOSTICO**

	HFL	PCR	MIF
POSITIVOS	0	21	20
NEGATIVOS	50	29	30

HFL= hibridación en fase líquida; PCR= reacción en cadena de la polimerasa; MIF= microinmunofluorescencia.

Mediante el teorema de Bayes se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la prevalencia de las técnicas de HFL Y MIF con respecto a la prueba de PCR.

**IX.5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de hibridación en fase líquida con respecto a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa**

De las 21 muestras positivas por PCR, 17 fueron mayores a 55 URL de la prueba de HFL; dando una sensibilidad de 80%. De las 29 muestras negativas por PCR, 2 fueron menores de 55 URL para la prueba de HFL lo que dio una especificidad del 6%. De las 44 muestras mayores de 55 URL por HFL, 17 lo fueron para PCR dando un valor predictivo positivo de 38% y de las 6 muestras menores de 55 URL por HFL, 2 fueron negativas para PCR, dando un valor predictivo negativo de 33%; Además de tener una prevalencia del 42% (Tabla 5)

**TABLA 5. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACIÓN EN FASE LIQUIDA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR *C. trachomatis***

HFL (URL)	PCR			
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	
≥ 55	17	27	44	<b>SENSIBILIDAD= 80%</b>
< 55	4	2	6	<b>ESPECIFICIDAD= 6%</b>
<b>TOTAL</b>	21	29	50	<b>V P P= 38%</b>
				<b>V P N= 33%</b>
				<b>PREVALENCIA= 42%</b>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; HFL: hibridación en fase líquida ; URL: unidades relativas de luz.

**IX.6. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de microinmunofluorescencia con respecto a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa**

Por la técnica de MIF se observó que de las 21 muestras positivas por PCR, 18 lo fueron para la prueba de MIF lo que dio una sensibilidad del 85%. De las 29 muestras negativas por PCR, 27 fueron negativas para la prueba de MIF dando una especificidad del 93%. De las 20 muestras positivas por MIF, 18 lo fueron para PCR dando un valor predictivo positivo de 90% y de las 30 muestras negativas por MIF, 27 fueron negativas para PCR dando un valor predictivo negativo de 90% y una prevalencia del 42% (Tabla 6)

**TABLA 6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR *C. trachomatis***

MIF	PCR			
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	
POSITIVO	18	2	20	<b>SENSIBILIDAD= 85%</b>
NEGATIVO	3	27	30	<b>ESPECIFICIDAD= 93%</b>
TOTAL	21	29	50	<b>V P P= 90%</b>
				<b>V P N= 90%</b>
				<b>PREVALENCIA= 42%</b>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; MIF: microinmunofluorescencia.

**IX.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de hibridación en fase líquida con respecto a la técnica de microinmunofluorescencia**

Finalmente se analizó la sensibilidad y especificidad de la técnica de HFL con respecto a la técnica de MIF, de las 20 muestras positivas por MIF, 16 fueron mayores a 55 URL para la prueba de HFL, dando una sensibilidad de 80%. De las 30 muestras negativas por MIF, 2 fueron menores de 55 URL para la prueba de HFL lo que da una especificidad de 6%. De las 44 muestras mayores a 55 URL por HFL 16 lo fueron para MIF dando un valor predictivo positivo de 36 % y de las 6 muestras menores de 55 URL por HFL, 2 fueron negativas para MIF, dando un valor predictivo negativo de 33%, con una prevalencia de 40% (Tabla 7)

**TABLA 7. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION EN FASE LIQUIDA PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR *C. trachomatis* CON RESPECTO A LA TECNICA DE MICROINMUNOFLUORESCENCIA**

HFL (URL)	MIF			
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL	
≥ 55	16	28	44	<b>SENSIBILIDAD= 80%</b> <b>ESPECIFICIDAD= 6%</b> <b>V P P= 36%</b>
< 55	4	2	6	<b>V P N= 33%</b>
<b>TOTAL</b>	20	30	50	<b>PREVALENCIA= 40%</b>

MIF: microinmunofluorescencia; HFL: hibridación en fase líquida; URL: unidades relativas de luz.

## IX.8. Factores de riesgo asociados a la infección por *C. trachomatis*

Se realizó el análisis estadístico  $X^2$  y tablas de contingencia para establecer los factores de riesgo asociados a la infección por *C. trachomatis*. De acuerdo a los resultados de PCR los pacientes se clasificaron en positivos y negativos a la infección por *C. trachomatis*.

De los 21 varones que se les diagnóstico infección por *C. trachomatis* mediante PCR (tabla 8), la mayor frecuencia de muestras positivas (18/21) se encontró que eran varones mayores de 30 años de edad; 10/21 tuvieron un nivel de estudios medio y superior (preparatoria y licenciatura) y 17/21 la ocupación más común fue la de no profesionista (empleado, operador, etc.).

La tabla 9 muestra los valores obtenidos de la espermatobioscopía que se les realizó a los varones que participaron en el estudio. Los varones que mostraron infección por *C. trachomatis* no presentaron alteraciones en sus valores de volumen, densidad, cuenta total, movilidad, viabilidad, formas normales y presencia de leucocitos, eritrocitos y bacterias; en comparación con los individuos negativos a la infección por *C. trachomatis*.

Las anomalías seminales en los individuos con infección (tabla 10) fue similar a la de individuos sin infección; la búsqueda de anticuerpos séricos contra *C. trachomatis* muestra ser un factor de riesgo significativo ya que 18/21 presentaron estos anticuerpos (RR= 9.0, IC 95% 2.404-33.697; P= 0.001).

Los datos generales de las compañeras sexuales de varones positivos a *C. trachomatis*, (tabla 11) mostraron que 17/21 fueron en mayores de 30 años; 14/21 eran casadas; 18/21 eran católicas; 15/21 su ocupación principal fue el hogar y 12/21 el grado de escolaridad fue básico (primaria y secundaria). La mayoría de los individuos infectados procedían de estados diferentes al Distrito Federal (13/21) mostrando un factor de riesgo significativo (RR= 2.171, IC 95% 1.149-4.104; P= 0.009).

Además, se analizaron los datos ginecológicos de las compañeras sexuales de los individuos infectados con *C. trachomatis* (tabla 12), y se observó una idéntica proporción entre la infertilidad primaria (10/21) y secundaria (11/21); 13/21

tuvieron un tiempo de infertilidad mayor de 6 años; 16/21 reportaron tener una sola pareja sexual; 9/21 han tenido más de una gestación; 2/21 han tenido más de un abortos; 4/21 informaron haber tenido más de un embarazo ectópico; 18/21 no tuvieron hijos. El análisis laparoscópico identificó la presencia de Adherencias en 12/21, Endometriosis en 13/21 y Miomas en 5/21 mostrando ser factores de riesgo significativos. Adherencia (RR= 0.455, IC 95% 0.196-1.061; P= 0.02), Endometriosis (RR= 1.619; IC 95% 0.956-2.740; P= 0.05) y Miomatosis (RR= 0.356; IC 95% 0.240-0.527; P= 0.009).

Por último se revisaron los datos microbiológicos de las muestras cervicovaginales de las compañeras sexuales cuyos varones se les diagnóstico infección por **C. trachomatis** (tabla 13), la búsqueda de **G. vaginalis**, **C. albicans** y **C. trachomatis** mostró un número menor de muestras positivas para los tres patógenos analizados.

**DE VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO  
C. trachomatis POR PCR.**

VARIABLES	No. PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		$\alpha$	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b>EDAD (AÑOS)</b>							
≤ 30	7	3	6	4	8	NS	1.024 (0.406-2.582)
> 30	43	18	36	25	50		
<b>ESCOLARIDAD</b>							
MEDIA Y SUPERIOR	24	10	20	14	28	NS	1.012 (0.483-2.120)
BASICA	17	7	14	10	20		
<b>OCUPACION</b>							
PROFESIONAL	12	4	8	8	16	NS	0.706 (0.295-1.687)
NO PROFESIONAL	36	17	34	19	38		

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

**TABLA 9. DATOS ESPERMATOBIOSCOPICOS DE VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO  
C. trachomatis POR PCR.**

VARIABLES	No. PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		α	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b>VOLUMEN (mL)</b>							
> 1	41	17	34	24	48	NS	1.809 (0.923-3.544)
≤ 1	4	3	6	1	2		
<b>*DENSIDAD (X10<sup>6</sup> /mL)</b>							
> 100	22	8	16	14	28	NS	1.435 (0.729-2.824)
≤ 100	23	12	24	11	23		
<b>*CUENTA TOTAL (X10<sup>6</sup>)</b>							
> 100	36	16	32	20	40	NS	1.125 (0.395-3.201)
≤ 100	4	2	4	2	4		
<b>*MOVILIDAD (%)</b>							
> 50	40	18	36	22	44	NS	0.889 (0.288-2.743)
≤ 50	5	2	4	3	6		
<b>*VIABILIDAD (%)</b>							
> 60	35	17	34	18	36	NS	0.658 (0.226-1.689)
≤ 60	10	3	6	7	14		
<b>*FORMAS NORMALES (%)</b>							
> 30	40	17	34	23	46	NS	1.412 (0.634-3.146)
≤ 30	5	3	6	2	4		
<b>*LEUCOCITOS (XC)</b>							
≤ 6	40	17	34	23	46	NS	0.708 (0.318-1.579)
> 6	5	3	6	2	4		
<b>ERITROCITOS (XC)</b>							
≤ 6	36	15	30	21	42	NS	0.750 (0.372-1.511)
> 6	9	5	10	4	8		
<b>BACTERIAS</b>							
PRESENTES	34	16	32	18	36	NS	0.773 (0.327-1.825)
AUSENTES	11	4	8	7	14		

Valores espermatozoides normales, fuente: *Normas y Procedimientos de Obstetricia y Ginecología* 1998

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

**TABLA 10. DATOS DE ANORMALIDADES SEMINALES E INFECCIONES EN VARONES CON DIAGNOSTICO DE *C. trachomatis* POR PCR.**

VARIABLES	No PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		α	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b>ASTENOZOOSP.</b>							
POSITIVO	33	14	28	19	38	NS	1.179 (0.590-2.354)
NEGATIVO	12	6	12	6	12		
<b>TERATOZOOSP.</b>							
POSITIVO	36	15	30	21	42	NS	1.333 (0.862-2.687)
NEGATIVO	9	5	10	4	8		
<b>ANTICUERPOS SERICOS Anti-<i>C. trachomatis</i></b>							
POSITIVO	20	18	36	2	4	P=0.001	9.0 (2.404-33.697)
NEGATIVO	30	3	6	27	54		
<b>EPIDIDIMITIS</b>							
POSITIVO	15	6	12	9	18	NS	1.071 (0.517-2.220)
NEGATIVO	35	15	30	20	40		
<b>OTROS (VARICOCELE)</b>							
CON	14	5	10	9	18	NS	1.244 (0.564-2.748)
SIN	36	16	32	20	40		

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

**TABLA 11. DATOS GENERALES DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICO *C. trachomatis* POR PCR.**

VARIABLES	No. PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		$\alpha$	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b>EDAD (AÑOS)</b>							
≤ 30	11	4	8	7	14	NS	0.834 (0.353-1.970)
> 30	39	17	34	22	44		
<b>ESTADO CIVIL</b>							
UNION LIBRE	10	6	12	4	8	NS	0.707 (0.372-1.346)
CASADA	33	14	28	19	38		
<b>RELIGION</b>							
CATOLICA	43	18	36	25	50	NS	0.628 (0.262-1.505)
OTRAS	3	2	4	1	2		
<b>OCUPACION</b>							
PROFESIONAL	9	6	12	3	6	NS	1.733 (0.943-3.187)
HOGAR	39	15	30	24	48		
<b>ESCOLARIDAD</b>							
MEDIA Y SUPERIOR	20	9	18	11	22	NS	0.975 (0.515-1.845)
BASICA	26	12	24	14	28		
<b>PROCEDENCIA</b>							
D.F.	25	6	12	19	38	P=0.009	2.171 (1.149-4.104)
OTROS ESTADOS	20	13	26	7	14		

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

**TABLA 12. DATOS GINECOLOGICOS DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES  
DIAGNOSTICO *C. trachomatis* POR PCR.**

VARIABLES	No. PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		α	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b>TIPO DE INFERTILIDAD</b>							
PRIMARIA	24	10	20	14	28	NS	0.985
SECUNDARIA	26	11	22	15	30		(0.513-1.891)
<b>TIEMPO DE INFERTILIDAD (AÑOS)</b>							
1-6	19	7	14	12	24	NS	0.765
>6	27	13	26	14	28		(0.377-1.552)
<b>PAREJAS SEXUALES</b>							
1	31	16	32	15	30	NS	2.237
≥ 2	13	3	6	10	20		(0.784-6.387)
<b>GESTACIONES</b>							
0 - 1	32	12	24	20	40	NS	0.750
>1	18	9	18	9	18		(0.394-1.427)
<b>ABORTOS</b>							
0 - 1	44	19	38	25	50	NS	1.295
>1	6	2	4	4	8		(0.398-4.221)
<b>EMBARAZO ECTOPICO</b>							
0 - 1	43	17	34	26	52	NS	0.692
>1	7	4	8	3	6		(0.330-1.451)
<b>VIVOS</b>							
0	41	18	36	23	46	NS	1.317
1	9	3	6	6	12		(0.491-3.533)
<b>SALPINGITIS</b>							
POSITIVO	21	9	18	12	24	NS	0.966
NEGATIVO	29	12	24	17	34		(0.501-1.862)
<b>ADHERENCIA</b>							
POSITIVO	37	12	24	25	50	P=0.02	0.455
NEGATIVO	13	9	18	4	8		(0.196-1.061)
<b>ENDOMETRIOSIS</b>							
POSITIVO	23	13	26	10	20	P=0.05	1.619
NEGATIVO	27	8	16	19	38		(0.956-2.740)
<b>HIPERPLASIA</b>							
POSITIVO	2	2	4	0	0	NS	0.396
NEGATIVO	48	19	38	29	58		(0.279-.561)
<b>MIOMATOSIS</b>							
POSITIVO	5	5	10	0	0	P=0.009	0.356
NEGATIVO	45	16	32	29	58		(0.240-0.527)

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

**TABLA 13. DATOS MICROBIOLÓGICOS DE MUESTRAS CERVICOVAGINALES DE LAS COMPAÑERAS DE LOS VARONES QUE SE LES DIAGNOSTICÓ *C.trachomatis* POR PCR.**

VARIABLES	No. PACIENTES	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		α	R.R (IC95%)
		FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%		
<b><i>G. vaginalis</i></b>							
POSITIVO	19	8	16	11	22	NS	0.996 (0.509-1.947)
NEGATIVO	31	13	26	18	36		
<b><i>C. albicans</i></b>							
POSITIVO	10	3	6	7	14	NS	1.500 (0.548-4.105)
NEGATIVO	40	18	36	22	44		
<b><i>C. trachomatis</i></b>							
POSITIVO	6	2	4	4	8	NS	1.295 (0.398-4.221)
NEGATIVO	44	19	38	25	50		

R.R= Riesgo relativo; NS= No significativo

## X. DISCUSION DE RESULTADOS

Las infecciones de transmisión sexual constituyen un problema de salud en México y a nivel mundial; uno de los más importantes son los producidos por ***Chlamydia trachomatis***; este tipo de infección es de importancia epidemiológica ya que al no ser detectada ni tratada oportunamente puede ocasionar múltiples patologías en el humano. En los varones su detección es difícil debido a que en la mayoría las infecciones llevan un curso asintomático y se convierte en una fuente de infección para sus compañeras sexuales. En hombres la uretritis no gonocócica es la manifestación clínica más común siendo ***C. trachomatis*** el patógeno responsable en la mayoría de los casos<sup>(1,7)</sup>.

Datos epidemiológicos en países como Estados Unidos la infección por ***C. trachomatis*** en varones es del 10-20%<sup>(2,5,6,8,9)</sup> y en países Europeos se encuentra reportado de un 3-30%<sup>(10-14)</sup>. En México la infección en varones por esta bacteria tanto en población abierta como los que asisten a las clínicas de infecciones de transmisión sexual y de infertilidad son totalmente desconocidos, pocos son los estudios que reportan la frecuencia en varones, un estudio realizado por Valdespino y col<sup>(15)</sup> en hombres con prácticas homosexuales y bisexuales reportaron un porcentaje del 4.3% en muestras uretrales; y recientemente Cortés y Martínez describen una incidencia del 11.7% en muestras uretrales de pacientes que asistieron a la clínica de Urología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”<sup>(39)</sup>. En este estudio se obtuvo una frecuencia de 42% mediante PCR en muestras uretrales masculinas.

Hoy en día se están usando diferentes técnicas y diversas muestras para diagnosticar la infección por este microorganismo por lo que han surgido controversias acerca de la confiabilidad de estas pruebas. Gonzáles GF y col<sup>(2)</sup> en una recopilación de trabajos describe que el método Gen Probe PACE 2 tiene una especificidad de 70-95% y una sensibilidad de 95% usando cualquier clase de muestra. Para la técnica de PCR se tiene una sensibilidad de 90% y una especificidad de 99-100% en orina y muestras genitourinarias masculinas. Para la técnica de microinmunofluorescencia (MIF) la sensibilidad es del 80-90% y la especificidad de 98-99%. A pesar de que la prueba de PACE 2 es aceptada por la FDA, se ha reportado que este método de diagnóstico tiene

una baja sensibilidad hasta del 70%. En este estudio de las 50 muestras analizadas por la misma técnica todas fueron negativas y se investigó si eran realmente negativas, para ellos se comparó con la prueba de PCR que ha sido considerada como el método de diagnóstico de mayor sensibilidad y especificidad para la detección de una infección por ***C. trachomatis***.

Por otro lado, de las 50 muestras uretrales masculinas analizadas por HFL, se observó que las unidades relativas de luz (URL) de las muestras que fueron positivas por PCR mostraron un valor promedio de  $88 \pm 33$  el cual es cinco o seis veces menor al valor de corte para considerar una muestra positiva que es de 439 URL; este valor bajo se debe posiblemente al número pequeño de cuerpos elementales en la muestra que interfieren en la determinación; se tomó un valor de corte de 55 unidades relativas de luz (URL); debido a que es el valor bajo del promedio para verificar que muestras eran realmente negativas a la infección por el microorganismo y se obtuvo una sensibilidad de 80% y especificidad de 6% con una prevalencia de 42% con respecto a la prueba de PCR; sin embargo otros autores como Darwin L. H. y col<sup>(33)</sup>, de un total de 1,202 muestras uretrales obtuvo 69% de sensibilidad y 98.3% de especificidad utilizando esta misma técnica. Estas 50 muestras uretrales se analizaron también por la técnica de reacción en cadena de la polimera para detectar la presencia de ***C. trachomatis***, amplificando fragmentos de DNA de este microorganismo y se obtuvo una prevalencia de 42%, esta prevalencia es muy cercana a la descrita en otros estudios como los informados por Sugunendran H y col<sup>(38)</sup> que de 80 pacientes masculinos que asistieron a una clínica genitourinaria obtuvieron una prevalencia de 43.8% en muestras uretrales y de orina por la técnica de PCR; o el reportado por Gdouna R<sup>(41)</sup> y col, que de 92 varones de parejas infértiles se obtuvo una prevalencia de 35.9% en muestras uretrales y de semen.

La técnica por PCR y aquellos que usan una técnica de amplificación de ácidos nucleicos, tienen una alta sensibilidad y especificidad que los otros métodos de diagnóstico.

Tratando de demostrar que los individuos negativos por PACE-2 pero positivos por PCR realmente eran positivos se realizó la prueba de microinmunofluorescencia, los

resultados mostraron una sensibilidad de 85% y una especificidad de 93%, con una prevalencia de 42%.

Todavía está en conflicto si **C. trachomatis** es el causante de la infertilidad masculina. Algunos trabajos o estudios sugieren que las infecciones por **Chamydia** no contribuyen a la infertilidad masculina; sin embargo, otros estudios encontraron que las infecciones por esta bacteria están relacionadas directamente con la infertilidad masculina, afectando el epidídimo, vesícula o próstata<sup>(2)</sup>.

Uno de los factores de riesgo importantes para adquirir una infección de transmisión sexual por **C. trachomatis** es la edad, en adolescentes es mayor el riesgo por el número de compañeros sexuales a lo largo de la vida. En este estudio la mayoría de los individuos infectados por este microorganismo (18/21) fueron mayores de 30 años; mientras que en otros estudios como el de Marrazo JM y col<sup>(18)</sup> probaron que los hombres asintomáticos menores de 30 años son más susceptibles para adquirir la infección; también Rietmeijer CA y col<sup>(6)</sup> indicaron que la incidencia de infección más alta se encontraba entre jóvenes  $\leq 25$  años que entre los mayores de 30 años.

La infección por **C. trachomatis** en el hombre es difícil detectarla por su curso asintomático aunque puede ocasionar o no anormalidades seminales<sup>(5,23)</sup>, sin embargo estas alteraciones pueden ser poco probables. Se ha descrito que los individuos muestran valores normales o ligeramente alterados en su cuenta total, movilidad y morfología de los espermatozoides. Virgil P y col<sup>(23)</sup> sugirieron que las alteraciones de los espermatozoides no contribuyen a la infertilidad masculina, pero sí a la transmisión de la infección a sus compañeras sexuales, a los procesos inflamatorios y a la inducción de la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides. Por su parte, Gduora R y col<sup>(40)</sup> mostraron que **C. trachomatis** puede afectar los parámetros seminales y contribuir a la infertilidad masculina.

González GF y col<sup>(2)</sup> en una recopilación de estudios nos dicen que la infección bacteriana puede dar lugar a procesos inflamatorios y se refleja con la aparición de un número creciente de células blancas en el semen y que se asocia al análisis anormal del semen. En este estudio, los pacientes positivos no presentaron anormalidades espermáticas<sup>(23)</sup>; de los 20 varones que presentan infección por **C. trachomatis**, 15 mostraron teratozoospermia y 14 astenozoospermia, pero no se observaron

alteraciones morfológicas; una infección asintomático puede ser capaz de inducir una respuesta inmune en contra de este patógeno produciendo anticuerpos anti-**C. trachomatis**; en este estudio se detectaron 18/21 muestras séricas que presentaron anticuerpos *anti-Chlamydia trachomatis* ( $P < 0.001$ ), además la presencia de bacterias y leucocitos sugiere un proceso inflamatorio.

La incidencia de infección por **C. trachomatis** y otros microorganismos en el mundo, orienta a cada país a establecer medidas preventivas para el control de las infecciones de transmisión sexual y su tratamiento. En algunos países, el tratamiento esta basado en la detección de la infección en determinado grupo poblacional, con la aplicación de tratamientos en hombres y mujeres. Pero la falta de información acerca de los síntomas, sus consecuencias y el tratamiento adecuado; además de influir factores socioeconómicos, psicológicos y culturales hace que se incremente año con año la incidencia poblacional<sup>(1,2)</sup>. En este estudio la mayoría de los individuos infectados por esta bacteria (13/21) proceden de estados diferentes al Distrito Federal; lo que sugiere que posiblemente en los Estados de la Republica Mexicana existe poca información acerca de las complicaciones y secuelas causadas por este microorganismo provocando que aumente el riesgo de infección.

El estado de portador del hombre se convierte en una fuente importante de infección, los espermatozoides pueden funcionar como reservorios y vectores de **C. trachomatis**, infectando el útero y las trompas de Falopio de su compañera sexual<sup>(41)</sup>; por lo que se investigó si las mujeres cuyo compañero sexual fue positivo a **C. trachomatis** presentaban alguna alteración ginecológica de importancia en comparación con las mujeres cuyos compañeros sexuales fueron negativos a este patógeno. Se encontró que 13/20 tienen más de 6 años de infertilidad, también de que han presentado embarazo ectópico y que además se encontraron alteraciones ginecológicas en donde la mujer cuyo compañero sexual es positivo a **C. trachomatis** desarrollaron adherencias ( $P < 0.02$ ), endometriosis ( $P < 0.05$ ) y miomatosis ( $P < 0.009$ ) que en aquellas mujeres en donde sus parejas son negativos a esta bacteria, esto es posiblemente por una respuesta inmunológica mayor contra este patógeno debido al constante estímulo antigénico.

Se ha informado que cuadros repetidos de enfermedad pélvica inflamatoria hay mayor probabilidad del desarrollo de obstrucción tubárica y adherencias pélvicas lo que conduce a la infertilidad<sup>(42)</sup>. González GF y col<sup>(2)</sup>, han señalado que la manifestación clínica de infecciones genitourinarias agudas y crónicas causadas por **C. trachomatis** causa complicaciones importantes como obstrucción tubárica bilateral, embarazo ectópico e infertilidad; además, este microorganismo puede contribuir a las complicaciones del embarazo con excepción del embarazo ectópico como nacimientos prematuros o mortinatos.

Se ha informado que las mujeres con infección por **C. trachomatis** muestran un alto porcentaje de coinfección por **Candida albicans**, lo que podría sugerir una asociación entre los dos patógenos. Los estudios al respecto en modelo de ratón han demostrado que la infección por **C. trachomatis** no evita la infección por **Candida albicans** o viceversa, además los porcentajes de linfocitos T CD4+ de los órganos superiores (trompa y útero) e inferiores (vagina) del aparato genitourinario durante una coinfección se ven disminuidos en comparación con los porcentajes de linfocitos T CD4+ obtenido de ratonas infectadas exclusivamente con **C. trachomatis**, lo que sugiere que **Candida albicans** puede colonizar y persistir. En este estudio se encontraron otros patógenos diferentes a **C. trachomatis** tales como **G. vaginalis**, **C. albicans** involucrados en las compañeras sexuales.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que además de realizar un diagnóstico de infección por **C. trachomatis** a las mujeres que asisten a la clínica de infertilidad, es necesario realizar un diagnóstico de infección por este patógeno a su compañero sexual debido a que éste actuaría como reservorio y vector asintomático, provocando alteraciones ginecológicas a su compañera sexual.

## XI. CONCLUSIONES

Se demostró que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es capaz de detectar a ***C. trachomatis*** en muestras uretrales masculinas que han sido negativas por una técnica de hibridación en fase líquida.

La prevalencia de infección por ***C. trachomatis*** en varones cuyas parejas sexuales asisten a la clínica de reproducción asistida (INPer) fue del 42% por la técnica de PCR.

Existe una significancia estadística entre la infección detectada por PCR y la presencia de anticuerpos anti- ***C. trachomatis*** (P= 0.001).

Existe una significancia estadística entre la infección por ***C. trachomatis*** en varones y las alteraciones ginecológicas de las compañeras sexuales, como adherencias (P= 0.02), endometriosis (P= 0.05) y miomatosis (P= 0.009).

Existe una asociación estadística significativa entre la infección por ***C. trachomatis*** y en aquellos pacientes que radican fuera del Distrito Federal (P= 0.009).

En este estudio se ha demostrado que la técnica de hibridación en fase líquida (HFL) no es la técnica más adecuada para detectar a ***C. trachomatis*** en muestras uretrales masculinas y el valor de corte de 439 URL, no es el valor adecuado para determinar la presencia de esta bacteria.

## XII. ANEXO REACTIVOS

1) Equipo comercial GEN-PROBE (PACE 2) para detección de *Chlamydia trachomatis* utilizando la técnica de hibridación en fase líquida. El kit contiene los siguientes reactivos:

- Reactivo liofilizado de DNA marcado con ester de acridina
- Buffer de hibridación PACE 2
- Reactivo de separación PACE 2
- Solución de Lavado PACE 2
- Control positivo
- Control negativo PACE 2

2) Solución de lisis

- Tris base pH= 7.6 10 mM
  - EDTA pH= 8.0 10 mM
  - Cloruro de Sodio 50 mM
  - SDS 0.2%
  - Proteinasa K 200µg/mL
- Aforar a 100 mL con agua desionizada  
-Filtrar en membrana millipore (0.22 µm)

3) Solución Tris-EDTA (TE)

- Tris-Cl pH= 7.6 10 mM
  - EDTA pH=8.0 1 mM
- Aforar a 100 mL con agua desionizada

4) Solución Tris-Borato (TBE)

- Tris base 54 g
  - Ácido. Bórico 27.5 g
  - EDTA pH= 8.0 0.5M 20 mL
- Aforar a 1000 mL con agua desionizada

5) Buffer de carga para electroforesis

- Azul de bromofenol 0.25%
- Sacarosa p/v 40%

-Disolver en 100 mL de agua la sacarosa y en seguida el azul de bromofenol

6) Solución salina de fosfatos (PBS) 0.1M pH= 7.4 (10X)

- Cloruro de sodio 8.0 g
- Fosfato Dibásico de potasio 0.2 g
- Fosfato básico de sodio x 12 H<sub>2</sub>O 2.9 g
- Cloruro de potasio 0.2 g

-Disolver en 100 mL de agua y ajustar a pH= 7.4, aforar a 1000 mL con agua

7) Reactivos para la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Buffer 10 X 1.5 mM
- DNTPs 10 mM de cada uno
- Oligos 20 pM/μL
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- Taq 1.5 U/μL

9) Kit para determinar anticuerpos IgG contra ***C. trachomatis*** mediante la técnica de microinmunofluorescencia (MIF). El kit contiene los siguientes reactivos:

- Laminillas con cuerpos elementales de ***Chlamydomphila pneumoniae***, ***Chlamydia trachomatis*** y ***Chlamydomphila psittaci***.
- Diluyente de la muestra (solución salina de fosfatos pH= 7.4)
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Conjugado FITC anti-IgG humano (cabra)
- Fluido de montaje con azul de Evan's
- Cubiertas

### XIII. REFERENCIAS

1. Arredondo GJL, Narcio RLE, Casanova RG, Figueroa DR. Enfermedades transmitidas sexualmente y SIDA: un problema de actualidad. *Rev de Perinatol* 1991; 6: 17-21
2. González GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Ávila G, Díaz-Gutiérrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregón E. Update on the impact of ***Chlamydia trachomatis*** infection on male fertility. *Andrologia* 2004; 36: 1-23
3. Hitchcock PJ. Enfermedades de transmisión sexual. En: Microbiología; mecanismos de las enfermedades infecciosas. Schaechter M (Ed), 2ª (ed). Panamericana, Argentina. 834-847 pag
4. Kumate J, Muñoz O, Gutiérrez G, Preciado SJ. (Ed). Enfermedades de transmisión sexual. En: Manual de infectología clínica. Kumate J, Muñoz O, Gutiérrez G, Preciado SJ (Ed), 16ª (ed). Méndez editores, México. 339-353 pag
5. Levy R, Layani-Milon M, D'estaing SG, Najioullah F, Lornage J, Aymard M, Lina B. Screening for ***Chlamydia trachomatis*** and ***Ureaplasma urealyticum*** infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to in vitro fertilization. *Int J Androl* 1999; 22: 113-118
6. Rietmeijer CA, Van Bemmelen R, Judson FN, Douglas JM. Incidence and repeat infection rate of ***Chlamydia trachomatis*** among male and female patients in an STD clinic: implications for screening and rescreening. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 65-72
7. Guerra-Infante FM, López-Hurtado M. Mecanismos inespecíficos en la eliminación de ***Chlamydia trachomatis***. Aspectos microbiológicos y fagocitosis. *Perinatol Reprod Hum* 1999; 13: 205-213
8. Montoya JG. Chlamydia. En: Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Wilson WR, Drew LW, Hery KN, Relman AD, Sade AM, Gerberding LJ (Ed). Manual Moderno, México. 803-811 pag
9. Sutton TL, Martinko T, Hale S, Fairchok MP. Prevalence and high rate of asymptomatic infection of ***Chlamydia trachomatis*** in male college reserve officer training corps cadets. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 901-904

10. Zdrodwska-Stefanow B, Darewicz B, Badyda J, Bulhak V, Szczurzewski M. Role of ***Chlamydia trachomatis*** in epididymitis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1113-8
11. Sylvan SPE, Von Krogh G, Tiveljung A, Siwerth BM, Henriksson L, Noren L, Grillner L. Screening and genotyping of genital ***Chlamydia trachomatis*** in urine specimens from male and female clients of Youth-Health Centers in Stockholm County. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 379-86
12. Templeton K, Roberts J, Jeffries D, Forster G, Ritken C. The detection of ***Chlamydia trachomatis*** by DNA amplification methods in urine sample from men with urethritis. *Int J STD AIDS* 2001; 12: 793-6
13. Bollmann R, Engel S, Petzoldt R, Gobel UB. ***Chlamydia trachomatis*** in andrologic patients-direct and indirect detection. *Infection* 2001; 29: 113-8
14. Johnson RE, Green TA, Schachter J, Jones RB, Hook III EW, Black CM, Martin DH, Louis ME, Stamm WE. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for ***Chlamydia trachomatis*** infections in asymptomatic men. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4382-4386
15. Valdespino GJL, García GL, Río ChC, Cruz PC, Loo ME. Las enfermedades de transmisión sexual y la epidemia de VIH/SIDA. *Salud Pública de México* 1995; 37: 549-555
16. Everett KD. ***Chlamydia*** and ***Chlamydiales***: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 2000; 75: 109-126
17. Woods LM, Robinson EN, McGee ZA, Hitchcock JP. Clamidas: patógenos genitales y respiratorios. En: Microbiología; mecanismos de las enfermedades infecciosas. Schaechter M (Ed), 2ª (ed). Panamericana, Argentina. 371-378 pag
18. Marrazzo JM, Whittington WL, Celum CL, Handsfield HH, Clark A, Krekeler B, Stamm WE. Urine-Based screening for ***Chlamydia trachomatis*** in men attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 219-25
19. Pannekoek Y, Westenberg SM, Vries J, Repping S, Spanjaard L, Eijk PP, Dankert J. PCR assessment of ***Chlamydia trachomatis*** infection of semen specimens processed for artificial insemination. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3763-3767

20. Morency P, Dubois MJ, Gresenguet G, Frost E, Deslandes S, Somsé P, Samory A, Pepin J. Aetiology of urethral discharge in Bangui, Central African Republic. *Sex Transm Inf* 2001; 77: 125-129

21. Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, Lindberg M, Olcen P, Anderson S, Persson K, Backman A. Characterization of ***Chlamydia trachomatis*** omp-1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3915-3919

22. Winter AJ, Taylor S, Workman J, White D, Ross JDC, Sawn AV, Pillay D. Asymptomatic urethritis and detection of HIV-1 RNA in seminal plasma. *Sex Transm Inf* 1999; 75: 261-263

23. Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. ***Chlamydia trachomatis*** infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002; 34: 155-161

24. Mardh P, Novukova N, ***Chlamydia trachomatis*** infections a major concern for reproductive health. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2001; 6: 115-26

25. Atiza T, Schober P, Bloor UN, Kuncewicz I, Ogilvy J, Henry C, Mears J. Evidence-based guidelines for the management of genital ***Chlamydia*** infection in general practice. *Fam Pract* 1999; 16: 269-77

26. Bernal AB, Hernández TG. Las enfermedades de transmisión sexual (ETS): otro reto para la prevención y control de la epidemia del VIH/SIDA. *Revista SIDA-ETS* 1997; 3: 63-67

27. Guerra-Infante F, Flores-Medina S, Arteaga-Troncoso G, Zamora-Ruiz A, López-Hurtado M, Ortiz-Ibarra FJ. Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociados a la infección por ***Chlamydia trachomatis*** en mujeres infértiles. *Salud Pública de México* 2003; 45 (supl 5) S672-S680

28. Stamm EW. Infecciones por ***Chlamydia***. En: Principios de medicina interna. Braunwald E, Fauci SA, Kasper LD, Hauser SL, Longo LD, Jamenson LJ (Ed), 15<sup>a</sup> (ed). McGraw-Hill interamericana editores, México. 1268-1278 pag

29. Dyck EV, Meheus AZ, Piot P (Ed). Infecciones por ***Chlamydia trachomatis***. En: Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades de transmisión sexual. Dyck EV, Meheus AZ, Piot P (Ed). Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 22-37 pag

30. Stamm WE. ***Chlamydia trachomatis***-the persistent pathogen. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 684-89
31. López-Hurtado M, Guerra-Infante FM. Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por ***Chlamydia trachomatis*** y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatol Reprod Hum* 2002; 16: 139-149
32. Modarress KJ, Cullen AP, Jaffurs WJ, Troutman GL, Hubbard RA, Henderson S, Lörincz AT. Detection of ***Chlamydia trachomatis*** and ***Neisseria gonorrhoeae*** in swab specimens by the hybrid capture II and PACE 2 nucleic acid probe tests. *Sex Transm Dis* 1999; 26: 303-8
33. Darwin LH, Cullen PA, Crowe SR, Modarress KJ, Willis DE, Payne WJ. Evaluation of the hybrid capture 2 CT/GC DNA tests and the Gen Probe PACE 2 tests from the same male urethral swab specimens. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 576-80
34. Arredondo-Peter R. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular. *Boletín de Educación Bioquímica BEB* 1993; 12: 3-14
35. Cerrone GE, Morelli L. Metodologías básicas en biología molecular. Técnicas de hibridización y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En: Inmunología e Inmunoquímica, fundamentos. Marjni RA, Abdón LP, Alvarez E (Ed), 5ª (ed). Panamericana, Argentina. 852-866 pag
36. Masatoshi T, Hiroshi N, Kazuyuki S, Masashi H, Hiroshi Y, Toshikatsu H, Kohei A, Seiji N. Evaluation of a new amplified enzyme immunoassay (EIA) for the detection of ***Chlamydia trachomatis*** in male urine, female endocervical swab, and patient obtained vaginal swab specimens. *J Clin Pathol* 2000; 53: 350-354
37. Joyner JL, Douglas JM, Foster M, Judson FN. Persistence of ***Chlamydia trachomatis*** infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 196-200
38. Sugunendran H, Birley HDL, Mallinson H, Abbott M, Tong CYW. Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital ***Chlamydia trachomatis*** infection in male patients. *Sex Transm Inf* 2001; 77: 423-426

39. Cortés CAE, Martínez HN. Frecuencia de infección por virus del papiloma humano y **Chlamydia** en uretra en hombres en el Hospital General "Dr Manuel Gea González". *Rev Hosp. Gral Dr M Gea González* 2001; 4: 118-222
40. Gduora R, Keskes-Ammar L, Bouzid F, Eb F, Hammami UN. **Chlamydia trachomatis** and male infertility in Tunisia. *Eur J Contracept Reprod Health care* 2001; 6: 102-7
41. Villegas-Castrejon H, Villanueva-Díaz CA, Solórzano-Santos F, Karchmer KJ. Esterilidad conyugal por **Chlamydia trachomatis** estudio ultraestructural. *Perinatol Reprod Hum* 1989; 3: 70-77
42. Wolf H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting CH, Meure M. **Chlamydia trachomatis** induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. *Fertil Steril* 1991; 55: 1017-1019