



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DE ESPECIALIDAD MÉDICA

Identificación por secuenciación automatizada de serotipos de *Chlamydia trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión

Graduación Oportuna
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALIDAD MÉDICA EN OFTALMOLOGÍA

PRESENTA:
Sergio Ulises González Pliego Nava

TUTOR: M.C. Herlinda Mejía López
Asesor: Dr. Víctor Bautista de Lucio
MÉXICO, D. F. AGOSTO DE 2014



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.

Generalidades

La conjuntivitis producida por *Chlamydia trachomatis* debe considerarse al momento de hacer diagnóstico, debido a la forma variada de presentación clínica. *C. trachomatis* es conocido como agente etiológico de tracoma, conjuntivitis de inclusión y enfermedades inflamatorias como faringitis, cervicitis, uretritis y linfogranuloma venéreo. Esta bacteria es considerada la causa más frecuente de enfermedad de transmisión sexual en países desarrollados y es responsable del 15% de conjuntivitis aguda, 20% de conjuntivitis crónica y el 50% de conjuntivitis en los recién nacidos.¹

La conjuntivitis de inclusión producida por *C. trachomatis* se transmite por contacto directo o indirecto con secreciones genitales infectadas.²

Es una infección que afecta de manera unilateral o bilateral en la conjuntiva tarsal, influenciada por el estado inmunológico del paciente,³ por lo general ocurre en personas jóvenes con vida sexual activa. En la actualidad se reconoce la asociación entre la infección ginecológica y contaminación ocular a partir del foco genital que determina la aparición de conjuntivitis y/o neumonía atípica.⁴ El periodo de incubación se estima de 2 a 19 días en el adulto, provoca una conjuntivitis folicular de inicio subagudo, que puede hacerse crónico de 3 a 12 meses de no ser tratada. La infección se caracteriza por cuadros recurrentes de hiperemia ocular, secreción mucopurulenta, fotofobia, lagrimeo y ocasionalmente edema palpebral. Con lámpara de hendidura se observa presencia de folículos mayores de 2 mm de diámetro en un número superior a 5 y de predominio en conjuntiva inferior, además, puede haber queratitis epitelial en casos de larga evolución. La cronicidad puede generar cicatrización conjuntival leve y micropannus corneal.⁵

Patogenicidad. Las infecciones por *C. trachomatis* afectan exclusivamente a humanos y están entre las infecciones bacterianas más comunes en el mundo. Los 18 serotipos descritos se distribuyen en tres biovars, responsables cada uno de un cuadro infeccioso: a) tracoma (serovares A, B/Ba, C), b) linfogranuloma venéreo, LGV (serovares L1, L2, L2a, L3) y c) enfermedad óculo-genital no invasiva (serovares D/Da, E, F, G, H, I/Ia, J, K). Estas patologías tienen una distribución geográfica diferente y afectan a distintos grupos poblacionales. La infección óculo-genital no invasora es la principal causa infecciosa de transmisión sexual en el mundo y el número de casos nuevos crece cada año, especialmente desde 2008, pero no está claro si este incremento está directamente relacionado con mayores tasas de transmisión o se debe al establecimiento de técnicas de diagnóstico molecular, más sensibles y específicas. Esta infección afecta

fundamentalmente a mujeres entre 15-24 años, aunque el 60% de los casos son asintomáticos. Este desequilibrio hacia las mujeres podría no ser real, ya que muchos de los casos se detectan en los cribados de controles periódicos rutinarios a los que las mujeres acuden con mayor frecuencia. Por el contrario, entre el 10-20% de las infecciones de cérvix evolucionan hacia enfermedad inflamatoria pélvica, embarazos ectópicos e infertilidad. Los cuadros de conjuntivitis están asociados a niños menores de 2 años que se infectan en el canal de parto de madres portadoras de los serovares D-K de *C. trachomatis*.⁶

Se ha observado que los casos tienden a resolverse de forma espontánea en un período de 6 a 18 meses. Por otro lado, los tratamientos de elección son: Doxiciclina 100 mg/12h durante 3 semanas; o Eritromicina 500 mg/6h durante 3 semanas; o Una dosis única de Azitromicina 1g. Existen tratamientos tópicos: Tetraciclinas o ciprofloxacino y/o eritromicina en colirio o pomada.

La secuenciación automatizada es el método recomendado para la identificación de los genotipos de *C. trachomatis*. La proteína de membrana externa principal (MOMP) de *C. trachomatis* es uno de los principales componentes de la pared celular y es responsable de la patogenicidad del cuerpo elemental infeccioso extracelular y la conversión del desarrollo del cuerpo intracelular reticulado.^{7,8} La MOMP se codifica en el gen ompA y muestra variaciones extensivas de secuencia de ADN que se localizan principalmente en cuatro regiones discretas denominadas dominios variables (DV1 a -4).^{9,10} Tres de los DVs están expuestos en la superficie y contienen péptidos antigénicos.^{11,12} La secuenciación del gen ompA es el método de elección para la diferenciación de cepas debido a que es el que permite la discriminación de genotipos.¹³⁻¹⁵

Justificación

En un estudio retrospectivo realizado en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, (IOCV), en el año 2009 se observó un aumento paulatino de las conjuntivitis foliculares atendidas, de acuerdo a registros anteriores desde el año 2007, 5 de 9 casos de conjuntivitis folicular crónica dieron resultado positivo para *Chlamydia* spp por técnicas moleculares (por la identificación por PCR de un antígeno genérico), mientras que en el 2010 aumentó a 57 casos de los cuales se confirmaron 45. Cuarenta de ellos se detectaron en el primer semestre de ese año, estos pacientes presentaban infección crónica multitratada.

Por otro lado, los pacientes con conjuntivitis clamidial confirmada por laboratorio y sus contactos sexuales, deben ser estudiados con la finalidad de descartar coinfección por otras enfermedades de transmisión sexual, como sífilis o gonorrea, antes de iniciar el tratamiento.

La caracterización de cepas de *C. trachomatis* puede proporcionar importantes conocimientos epidemiológicos y contribuir a mejorar las medidas de control. En este estudio planteamos caracterizar los genotipos de *C. trachomatis* por el análisis de secuenciación del gen ompA de los casos descritos clínicamente como conjuntivitis de inclusión y positivos para *C. trachomatis* genérico, en pacientes del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

Objetivo General

Identificar mediante secuenciación automatizada los serotipos de *C. tracomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión.

Objetivos particulares

- Identificar la frecuencia de nuevos casos de conjuntivitis de inclusión en el primer semestre del 2014.
- Obtener de las secuencias específicas de serotipos de *Chlamydia* spp mediante PCR punto final, de los nuevos casos.
- Identificar los genotipos de *Chlamydia* spp mediante secuenciación automatizada.
- Comparar las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el GeneBank para identificar los genotipos de cada muestra obtenida.

HIPOTESIS

Los serotipos de *Chlamydia* spp son los reportados a nivel internacional como responsables de conjuntivitis de inclusión.

Materiales y Métodos

Se realizan dos tipos de estudio:

1. un estudio de casos y controles para la determinación de nuevos casos de conjuntivitis de inclusión.

Criterios de Inclusión

Pacientes con conjuntivitis folicular aguda, crónica multitratada y pacientes con conjuntivitis alérgica con presencia de folículos y/o papilas tarsales.

Criterios de exclusión

Pacientes inmunocomprometidos, diabéticos, embarazadas, pacientes con nódulos palpebrales por molusco contagioso, o por reacciones tóxicas a las gotas oftálmicas administradas a largo plazo y la infección estafilocócica crónica del borde del párpado, así como pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado y pacientes que no cumplan con el esquema completo de tratamiento.

Para este estudio se realizará un muestreo dirigido del total de los casos de conjuntivitis folicular crónica en los meses de enero a junio del 2014.

2. El segundo será un estudio retrospectivo que pretende identificar los serotipos de una muestra histórica de casos positivos a una PCR genérica para *C. trachomatis*.

Extracción de ADN. Esta se realizará con el mini Kit de QIAamp, según el protocolo de QIAGEN (QIAGEN, Sciences. Maryland, USA). El material genético será almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Diagnóstico molecular por PCR genérico tiempo real. Para la identificación de *Chlamydia* sp se usará el método de amplificación de segmentos específicos por tiempo real debido a su alta sensibilidad en la detección. Brevemente: Se utilizará la solución Master mix Hot Start de Qiagen que contiene dNTP la enzima, el Mg⁺⁺ y el KCl₂, los oligonucleótidos (tabla 2), que amplifican un segmento del gen 16S común a las especies de Clamidia. Se usarán los olinonucleótidos (tala 1) a 10nM, Syto9 como agente intercalante y 10 nM de ADN en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación serán: 95°C/10 min, seguido de 38 ciclos a 95°C/10seg y 47°C/15seg y 72°C/20 seg. Las reacciones se realizaran por triplicado en un termociclador Corbett (Life Science RG-6000. Sydney, Australia).

Amplificación del gen ompA. Las condiciones de amplificación consistieron de polimerasa inicial activación a 95°C/15 min; 40 ciclos de 94°C/30 s, 55°C/30 s, y 72°C/90 s, y un paso de elongación final a 72°C/7 min. Se incluirá un control negativo con agua en lugar de ADN en cada corrida. Se realizará una PCR anidadas con 3 µL de producto de la primera PCR, en volumen final de 25 µL. Las condiciones de PCR se realizarán como se describe anterior, excepto que la temperatura de hibridación será de 60°C. Los productos amplificados se evaluarán en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Las bandas del gen de interés serán cortadas y purificadas por el método de purificación de gel de agarosa con MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado y ponerlo en tubo eppendorf de 1.5 mL. Añadir 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen de gel (arox 100 mg), Incubar a 50 ° C durante 10 minutos (o hasta que la rebanada de gel se haya disuelto completamente). Después de que el gel se haya disuelto por completo, compruebe que el color de la mezcla es amarillo (similar a Buffer QG sin agarosa disuelta). Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar invirtiendo el tubo varias veces. Coloque una columna MinElute en un tubo de 2 ml provisto en un ADN 7. Aplicar la muestra a la columna de la MinElute, y centrifugar durante 1 min. Deseche el filtrado y coloque la columna de la MinElute de nuevo en el mismo tubo. Añadir 500 µL de buffer QG a la columna de centrifugación y centrifugar durante 1 min. Deseche el filtrado y coloque la columna de la MinElute de nuevo en el mismo tubo. Para lavar, añadir 750 µL de buffer PE a la columna de la MinElute y centrifugar durante 1 min. Deseche el filtrado y centrifugar la columna de la MinElute durante 1 min a $\geq 10.000 \times g$ (~ 13.000 rpm). Colocar la columna de MinElute en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio. Para eluir el ADN, añadir 10 µL de buffer EB (Tris 10 mM • Cl, pH 8,5) o H₂O para el centro de la membrana, se deja reposar la columna durante 1 min y centrifugar durante 1 min.

Secuenciación del ADN. El fragmento de ompA obtenido se purificó mediante el uso de un QIAquickKit de purificación de PCR (Qiagen), y ambas cadenas de un segmento de 1035 pb serán secuenciado mediante el uso de un kit de reacción BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA) . Se cargarán las mezclas de reacción en un 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para la secuenciación serán RVS1059 y 191S (5'-GCTYTSTGGGARTGTTGTGGRGC-3'; Nt 598-620). Para la completa secuenciación (aprox 1135 pb) se utilizarán tanto el oligonucleótido forward como el reversa. La secuenciación será también realizado con los

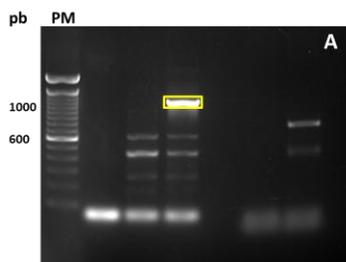
cebadores MOMP87 y C214 (5'-TCTTCGAYTTTGGTTTGGATTGA – 3'; Nt 671-648), lo que resultará en la secuencia de casi todo el gen ompA.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en el estudio.

NOMBRE	OLIGONUCLEÓTIDO 5' – 3'	Tamaño del Amplificado (pb)
Clamy F (genérica)	GTG GAT GAG GCA TGC GAG TCG A	266 (PCR tiempo real)
Clamy R	CTC TCA ATC CGC CTA GAC GTC	
P1 F	ATG AAA AAA CTG TTG AAA TCG G	990 (1-22)
Omp2 R	ACT GTA ACT GCG TAT TTG TCT G	(1124-1103)
MOMP87-R	TTG AGT TCT GC TTCC TCC T	87-111

RESULTADOS preliminares

- 1- Se han analizado 7 muestras procedentes de Oaxaca y 1 muestras de la consulta externa del “Conde de Valenciana”, de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y que firmaron el consentimiento informado.
Estas muestras fueron procesadas por PCR genérico en tiempo real y resultaron negativas para esta prueba.
- 2- También se han evaluado 51 muestras históricas positivas para el género *Chlamydia*, que fueron analizadas por PCR en tiempo real. De ellas sólo 11 fueron amplificadas utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen OmpA (FIGURA 1A, 1B y 1C).



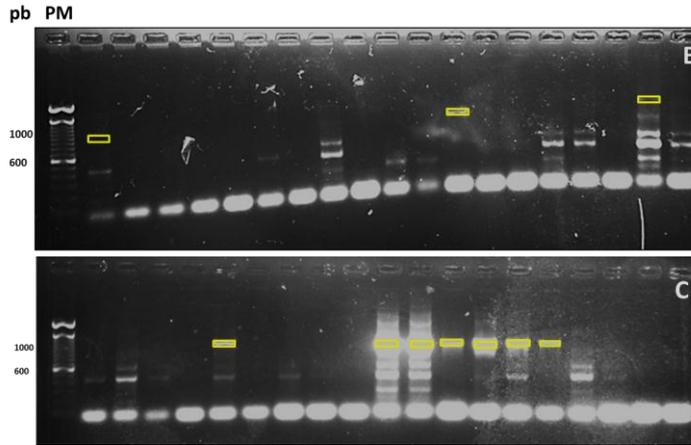


FIGURA 1. Gel de agarosa al 1.5% con el intercalador de bromuro de etidio. Las Bandas para el gen OmpA amplificado de las figuras A, B y C, están indicadas en el carril correspondiente.

Las bandas del gen de interés fueron cortadas y purificadas por el método de purificación de gel de agarosa con MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN. (se describe en material y

Se cuantificaron los DNA correspondientes por comparación con un marcador de pesos moleculares y concentración (figura 4).

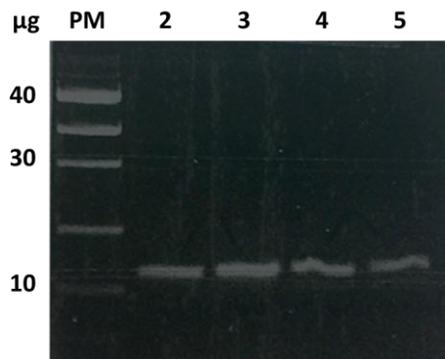


Figura 4. El gel de agarosa al 1.5 % muestra la intensidad de la banda con el peso molecular en relación con la concentración de DNA. El carril numero 1 presenta 4 µL el marcador de pesos moleculares la intensidad representa la concentración (100 pb). La intensidad de las bandas en los carriles 2-5 (4 µL) se comparan con el marcador. Pude observarse en las 4 muestras hay una intensidad aproximada a la banda de 40 µg.

Se realizó el PCR para la secuenciación utilizando el kit BigDye terminator con los oligonucleótidos forward y reverse para cada muestra debido a que el peso molecular del amplificado es de 1135 pb.

Las muestras se encuentran en el proceso de secuenciación con los oligonucleótidos P1 F y Omp2 R (forward y reverse) para posteriormente realizar el análisis de las mismas y evaluar si se requiere el oligonucleótido interno para la secuenciación completa del amplificado de interés.

Tiempo para concluir la tesis

Se pretende analizar 30 muestras más para tener una idea aproximada de los serovares responsables de conjuntivitis de inclusión que afectan a pacientes que son atendidos en el “Conde de Valenciana”.

Referencias

1. Ozanne G. Infection chlamydiale persistente non apparente dans des cellules de McCoy. *Rv Car Biol* 1981; 40: 195-201.
2. Dawson CR, Schachter J. TRIC agent infection of the eye and genital tract. *Am J Ophthalmol* 1967; 63: 1288-1296.
3. Wilhelmus KR, Robinson NM, Tredici LL, Jones DB. Conjunctival cytology of adult chlamydial conjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 691-3.

4. Rackstraw S, Viswalingam N D, and Goh B T. Can chlamydial conjunctivitis result from direct ejaculation into the eye? *Int J STD AIDS* 2006; 17:639-41.
5. Dawson CR. Eye disease with chlamydial infections. In: Oriel D, Ridway G, Schachter J, Taylor-Robinson D, Ward M (eds). *Chlamydial infection*. Cambridge, Cambridge: University Press; 1986. p. 135-44.
6. Alonso R, Galán JC, Gutiérrez-Fernández J, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu-Gámez S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas, en: *Procedimientos Microbiológicos: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Ed. Cap. 44, pp 3-29. <https://www.seimc.org/.../seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf>
7. Caldwell H D, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1981;31:1161–1176.
8. Hatch T P, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol* 1984; 157:13-20.
9. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 1987; 169:3879-3885.
10. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell DH. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun* 1989; 57:1040-49.
11. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett KD, Caldwell H D. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:4000–4004.
12. Stephens RS, Wagar EA, Schoolnik GK. High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med*. 1988; 167: 817–831.
13. Morre SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJ, Walboomers JM, MacLaren DM, Meijer JG, van den Brule AJ. Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G, and J

as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. J. Clin Microbiol. 1998; 36:345–351.

14. Pedersen LN, Kjaer HO, Moller jK, Orntoft TF, Ostergaard f. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* from recurrent urogenital infections. J Clin Microbiol. 2000; 38:3068–3071.
15. Yang CL, Maclean I, Brunham RC. DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis omp1* gene. J Infect Dis. 1993; 168:1225-1230.