



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
TESIS DE ESPECIALIDAD MÉDICA

**Variantes genotípicas de *Chlamydia trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión**

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

PRESENTA:  
Ethel Beatriz Guinto Arcos  
TUTOR: M. en C. Herlinda Mejía López  
Asesor: Dr. Víctor Bautista de Lucio

MÉXICO, D. F.... 2015 □



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.

# ÍNDICE

CONTENIDO	NÚMERO DE PÁGINA
Resumen	4
Introducción	6
Generalidades	6
- Clasificación de <i>chlamydia</i>	7
- Patogenicidad	8
Antecedentes	11
Justificación	12
Objetivo General	13
Objetivos Particulares	13
Hipótesis	13
Materiales y Métodos	13
- Criterios de inclusión	14
- Criterios de exclusión	14
- Muestra	14
- Obtención de muestra	14
- Bioseguridad	15
- Extracción de DNA	15
- Diagnóstico molecular por PCR	15
- Amplificación del gen omp A por PCR	15
- Secuenciación del DNA	16
Análisis estadísticos	17
Aspectos éticos	17
Declaración de conflictos de interés	17
Resultados	18
Discusión	25
Conclusiones	26
Referencias bibliográficas	28



**Instituto de Oftalmología**

“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”

**“Variantes genotípicas de *Chlamydia trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión”**

**Investigador responsable**

Dra. Ethel Beatriz Guinto Arcos

Tutora: M. en C. Herlinda Mejía López

Asesor: Dr. Víctor Bautista de Lucio

**Departamento**

Microbiología y Proteómica

**Institución participante**

“Instituto de Oftalmología Fundación Conde Valenciana IAP”

## Resumen Estructurado

### *Antecedentes*

En años recientes se ha detectado un número creciente de casos de conjuntivitis de inclusión en la población que acude al Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Esta patología altamente infecciosa de carácter crónico, que afecta a grandes grupos de la población, suele ser subdiagnosticada lo que resulta en un diagnóstico específico tardío, sintomatología continua con diseminación de las cepas en la población, y un costo elevado por los tratamientos inespecíficos. La caracterización de cepas de *C. trachomatis* puede proporcionar importantes conocimientos epidemiológicos y contribuir a mejorar las medidas de control.

### *Justificación*

La importancia de conocer las variantes genóticas prevalentes en la población que acude a un centro de referencia de enfermedades oftalmológicas, reside en que nos dará una primera aproximación de la magnitud epidemiológica del problema en relación a la población mexicana afectada y permitirá sentar las bases para futuros estudios que pretendan conocer la dinámica de transmisión y persistencia de esta infección. Se pretende que contribuya a difundir información específica al especialista para la toma de medidas tendientes a la profilaxis de la enfermedad, desde el manejo adecuado de los factores de riesgo para la conjuntivitis de inclusión hasta la aplicación de terapéuticas tempranas, específicas y accesibles. Los resultados obtenidos podrían facilitar la propuesta de elaboración de vacunas que se ajusten al genotipo o genotipos prevalentes circulante en nuestra población.

### *Hipótesis*

Las variantes genéticas de *Chlamydia trachomatis* en nuestra población no se corresponden con las reportadas a nivel internacional como responsables de conjuntivitis de inclusión.

### *Objetivo general*

Identificar las variantes genóticas de *C. trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión.

### *Material y Métodos*

En el presente trabajo se realizó un estudio de casos y controles para la determinación de nuevos casos de conjuntivitis de inclusión. Se realizó un muestreo dirigido del total de los casos de conjuntivitis folicular crónica en los meses de marzo a noviembre del 2015. Se incluyeron los

pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y aceptaron formar parte del estudio por medio de una carta de consentimiento informado. Se tomaron muestras conjuntivales de fondo de saco con un barrido con hisopo. Las muestras fueron procesadas para análisis genético. Se realizó diagnóstico molecular por PCR genérico tiempo real para la identificación de *Chlamydia* spp, mediante la amplificación de un segmento del gen 16S común a las especies de *Chlamydia*. Posteriormente se realizó una PCR punto final para la identificación del gen ompA. La caracterización de genotipos se realizó por la amplificación del gen ompA el cual fue secuenciado mediante el uso de un kit de reacción Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas en el GenBank.

### *Resultados*

Fueron evaluadas 80 muestras sospechosas a *Chlamydia* spp durante el 2015 se pudo amplificar el gen OmpA en 7 de ellas, mientras que de las muestras históricas de 80 se amplificaron 3 y de una muestra histórica para adenovirus 1 resultó positiva para el gen mencionado, dando un total de 160 muestras. La secuenciación parcial del Gen OmpA facilitó la identificación del serotipo D en una muestra, el serotipo E en 3 muestras y el serotipo F en 4 muestras. Las secuenciaciones obtenidas fueron comparadas y alineadas con aquellas encontradas en el GenBank y correspondieron a los números de acceso: FJ261926.1, U78536.1 y JX564244.1 respectivamente y con 99% de similitud.

### *Conclusiones*

La secuenciación del gen OmpA facilita identificar 3 serotipos o serovares causantes de conjuntivitis e infección urogenital, semejante a la encontrada a nivel mundial, siendo los serotipos prevalentes el D, E y F, mismos serotipos que fueron identificados en nuestro estudio. Por otro lado, debería de investigarse la distribución temporal y geográfica de serotipos de *C. trachomatis*, en nuestro país.

## Introducción

La infección por *Chlamydia* spp es la enfermedad bacteriana de transmisión sexual más común en el mundo.<sup>1</sup> Se estima que en Estados Unidos la tasa de transmisión anual es de 4 millones aproximadamente y que es la segunda enfermedad de transmisión sexual más prevalente en la población.<sup>2</sup> La infección por *Chlamydia* spp puede tener manifestaciones oculares principalmente en las formas de conjuntivitis de inclusión y tracoma, cada una involucrada a un subtipo diferente de la bacteria. La conjuntivitis de inclusión suele presentarse típicamente en países desarrollados en contraste con el tracoma que está restringido a zonas de alta pobreza. A pesar de corresponder a diferentes serotipos, ambas enfermedades son causadas por la misma especie de *Chlamydia*, demostrando de ésta manera el gran impacto en las enfermedades oculares principalmente de *C. trachomatis*.

## Generalidades

El género *Chlamydia* está compuesto por bacterias intracelulares obligadas de tamaño relativamente pequeño (2µm) que se replican por inclusiones citoplasmáticas de células hospederas eucariontes. Son organismos procariontes que contienen DNA y RNA, se dividen por fisión binaria, contienen ribosomas 70S, poseen actividades enzimáticas y capacidad de síntesis macromolecular y plásmidos. Estas bacterias son susceptibles a la acción de antibióticos incluyendo tetraciclinas y macrólidos. Contienen una pared celular rígida que a diferencia de las bacterias de vida libre no contiene ácido murámico sino proteínas de membrana externa entrelazadas por puentes disulfuro.<sup>3</sup>

Se encuentran agrupadas en el Orden Chlamydiales y la familia *Chlamydiaeaceae*, de donde se desprenden 2 tipos, *Chlamydia* y *Chlamydophila* las cuales a su vez comprenden 9 especies que se subdividen en grupos dependiendo de su potencial patógeno en seres humanos. El grupo de patógenos que infecta a humanos incluye con mayor frecuencia las especies *Chlamydia trachomatis* y las menos frecuentes *Chlamydophila pneumoniae* (antes *Chlamydia pneumoniae*), *Chlamydophila psittaci* (antes *Chlamydia psittaci*), que causa enfermedad también en aves, *Chlamydophila abortus* (antes *Chlamydia abortus*) causante de abortos, y *Chlamydophila felis* que causa neumonía en gatos. Las especies que nunca se han encontrado como causantes de infección en seres humanos incluyen: *Chlamydophila caviae* (antes *Chlamydia caviae*) que causa conjuntivitis en cobayas, *Chlamydophila pecorum* (antes *Chlamydia pecorum*), *Chlamydia suis* (antes *Chlamydia trachomatis*) que causa la enfermedad

en cerdos, *Chlamydophila pecorum* (antes *Chlamydia pecorum*), y *Chlamydia suis* (antes *Chlamydia trachomatis*), que causa la enfermedad en ratones.<sup>4</sup>

Todos los miembros del género *Chlamydia* comparten la misma morfología y un antígeno lipopolisacárido común puesto de manifiesto mediante pruebas de fijación de complemento, anticuerpos fluorescentes o anticuerpos monoclonales por prueba de ELISA, por lo que se le conocieren como métodos de identificación de serovares.<sup>5,6</sup> La clasificación moderna se basa en métodos genéticos de estimación de homologías DNA-DNA y rRNA-DNA la cual identifica variantes genéticas (genotipificación). Actualmente los métodos de identificación más específicos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las pruebas de amplificación por este método son altamente sensibles y específicas para *C. trachomatis* en conjuntiva y tracto genital tanto en adultos como en neonatos.<sup>7</sup>

La secuenciación automatizada es el método recomendado para la genotipificación de *C. trachomatis* utilizando la proteína de membrana externa principal (MOMP), uno de los principales componentes de la pared celular responsable de su patogenicidad. La MOMP se codifica en el gen *ompA*, en él se encuentran variaciones extensivas de secuencia de DNA que se localizan principalmente en cuatro regiones discretas denominadas dominios variables (DV-1 a DV-4).<sup>8</sup> Tres de los DVs están expuestos en la superficie y contienen péptidos antigénicos. La secuenciación de los dominios variables DV permite la discriminación de genotipos.<sup>9</sup>

El gen *ompA* de *C. trachomatis* codifica para la proteína principal de membrana externa (MOMP), que es la proteína de mayor proporción (60%) de todas las proteínas de superficie y la que define el genotipo. El análisis genómico del gen *ompA* es el método de elección para la diferenciación de las cepas ya que se logra mayor discriminación que por medio de genotipificación con polimorfismos de fragmentos de restricción y ha establecido las bases para la identificación de nuevas genovariantes.<sup>22, 23</sup>

La MOMP de *C. trachomatis* tiene las funciones de porina y adhesina. El cambio en la secuencia de aminoácidos puede aumentar o disminuir estas funciones. La MOMP ha sido el candidato más importante para el desarrollo de una vacuna.<sup>31</sup> Las vacunas preparadas con la MOMP en su forma nativa han demostrado tener un efecto protector contra la infección. Mientras que las vacunas experimentales basadas en proteína desnaturalizada o con proteína recombinante sólo han dado una protección parcial, lo que indica que la estructura nativa de la MOMP es importante

para desarrollar una vacuna y para entender las bases moleculares de la patogénesis de *Chlamydia* spp.<sup>24,26</sup>

En un estudio realizado en población eslava en muestras urogenitales el serovar predominante es el E seguido por el F, G, K, D, H, J, Ia y Ja. Mientras que en muestras conjuntivales la distribución de serovares fue la siguiente: E, D, F, K y G.<sup>25</sup> Otro estudio realizado en Japón en conjuntivitis de inclusión identificó como serovares predominantes: D, G, E, H, F y K.<sup>27</sup>

En otras instituciones en México se ha buscado realizar el análisis genómico y aminoacídico del gen *ompA* de genotipos específicos de *C. trachomatis*, a partir de muestras cervicovaginales, por medio de alineación con secuencias nucleotídicas de 16 cepas prototipo, se identificó el genotipo F reportadas en el GenBank mediante el programa Clustal W y Bioedit.<sup>28</sup> Otro estudio realizado en México en muestras endocervicales de mujeres con infertilidad, evidenció por medio de secuenciación automatizada del gen *ompA* mostró el mismo genotipo como predominante.<sup>29</sup> Estos resultados difieren de lo encontrado en otras poblaciones en donde también se han analizado muestras urogenitales y en las que el predominio corresponde a los genotipos D y E; ninguno de los reportes indican variantes genotípicas puntuales.<sup>30</sup>

### *Patogenicidad*

Las infecciones por *C. trachomatis* ocurren en forma natural únicamente en el humano. *Chlamydia trachomatis* está asociada con enfermedades de transmisión sexual, enfermedades oculares y respiratorias. Las cepas de *C. trachomatis* que afectan al hombre, han sido clasificadas convencionalmente en serotipos o serovares por inmunotipificación, utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales para identificar específicamente la proteína principal de membrana externa (MOMP).<sup>10</sup> Los 19 serovares descritos reconocidos mediante inmunofluorescencia (A-K y L1-L3), se distribuyen en tres grupos, 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, Ga H, I, Ia, J, K) a la que se corresponde la conjuntivitis de inclusión.<sup>11</sup> 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.<sup>12</sup>

A menudo estas infecciones son leves, aunque algunas veces están asociadas a importante invasión local o sistémica y puede tener importantes secuelas. Así como en otras enfermedades infecciosas, el grado de daño tisular y las complicaciones son en parte el resultado de la respuesta inmune contra el agente etiológico, más que el daño ocasionado directamente por el agente. Los síndromes oculares causados por *C. trachomatis* son tres: tracoma, oftalmia neonatorum y conjuntivitis de inclusión.<sup>13</sup>

El tracoma ha sido definido como una queratoconjuntivitis crónica, caracterizada por folículos, hiperplasia papilar y formación de cicatrices ocasionada por la variabilidad de los serotipos A, B, Ba y C de *C. trachomatis*. Ocurre principalmente en personas que viven en condiciones de pobreza, malas condiciones sanitarias y pobre higiene. Es una enfermedad que generalmente se inicia en la infancia durante los primeros meses de vida. La intensidad se incrementa en niños de entre 6 y 8 años de edad. La cicatrización del párpado, se presenta en personas que no han recibido tratamiento o que han sufrido infecciones repetidas a lo largo de su vida. Las cicatrices notables de la conjuntiva causan alteraciones palpebrales como triquiasis y entropión, que a su vez ocasionan abrasión crónica de la córnea, deterioro visual y ceguera en la vida adulta. El tracoma se distribuye mundialmente, se ha estimado que alrededor de 500 millones de personas están infectadas y de estas 7 a 9 millones están ciegas por esta causa. En el Sureste de México, se reconocen zonas endémicas para las infecciones ocasionadas por *Chlamydia trachomatis*. Algunos estudios epidemiológicos y experimentales, han demostrado que el tracoma y la conjuntivitis de inclusión podrían representar un amplio espectro de respuesta clínica a las diferentes biovars de *C. trachomatis*.<sup>14</sup>

La Oftalmia Neonatorum es transmitida por la madre al momento del nacimiento, se presenta como conjuntivitis mucopurulenta, sin tratamiento puede persistir por más de un año, aunque normalmente es auto limitada. Como consecuencia de infecciones bacterianas secundarias puede ocasionar ceguera.<sup>15</sup>

La conjuntivitis de inclusión, también llamada paratracoma, inicia como una conjuntivitis folicular aguda en niños y adultos que si no es tratada persiste en el tiempo sin llegar a la ceguera. Se transmite por contacto directo o indirecto con secreciones genitales infectadas. Es una infección

que afecta de manera unilateral o bilateral en la conjuntiva tarsal, influenciada por el estado inmunológico del paciente, 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. La asociación ha demostrado ser fuerte ya que del 40 al 90% de la población adulta con conjuntivitis de inclusión es también positiva para infección genital por *Chlamydia* spp.<sup>13,16</sup> 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. Las infecciones de repetición son infrecuentes pero pueden resultar en cicatrización corneal.<sup>1</sup> El cuadro clínico se presenta en forma de cuadros recurrentes de hiperemia ocular, secreción mucopurulenta, irritación, fotofobia, lagrimeo, edema palpebral, sensación de cuerpo extraño y ocasionalmente linfadenopatía preauricular. Clínicamente se caracteriza por la presencia de folículos mayores de 2 mm de diámetro en un número superior a 5 mm y de predominio en conjuntiva inferior. Puede presentarse queratitis epitelial punteada e infiltrados subepiteliales en casos de larga evolución. La cronicidad puede generar cicatrización conjuntival leve y micropannus corneal.<sup>17</sup> Los biovars D-K de *Chlamydia trachomatis* son los agentes etiológicos involucrados con mayor frecuencia en esta conjuntivitis.

En el recién nacido, es una enfermedad aguda o subaguda transmitida por la madre durante el parto que se presenta con abundante exudado purulento, enrojecimiento, edema palpebral y conjuntivitis papilar difusa. En el neonato no se presenta la forma folicular. Suele identificarse de 5 a 12 días después del nacimiento.<sup>18</sup> La etapa aguda por lo común se autolimita espontáneamente en unas cuantas semanas, pero sin tratamiento la inflamación puede persistir incluso durante un año o más y dejar micropannus y cicatrices leves en córnea periférica, conjuntiva y párpados. La infección no tratada puede diseminarse a la nasofaringe y tracto respiratorio bajo dando lugar a neumonía.<sup>19</sup> La conjuntivitis por *C. trachomatis* es detectable por pruebas citológicas del tejido afectado. Puede utilizarse la tinción de Giemsa para muestras conjuntivales que a su vez permite la identificación de cuerpos de inclusión. Sin embargo, ésta herramienta no es útil en la identificación de conjuntivitis en el adulto.

El tratamiento recomendado para la conjuntivitis de inclusión incluye el uso de antibióticos sistémicos y tópicos. Un régimen de dos a tres semanas de eritromicina o tetraciclinas en ungüento asociado a tetraciclina, doxiciclina o eritromicina sistémica es el tratamiento más utilizado para la infección en el adulto. Una dosis única de azitromicina ha demostrado ser

efectiva en el control del enrojecimiento y las secreciones purulentas.<sup>20</sup> La azitromicina ha demostrado también ser tan efectiva como la doxiciclina en un periodo de 10 días en la erradicación de *C. trachomatis*. La infección en neonatos es usualmente tratada con eritromicina en ungüento oftálmico por una semana y eritromicina o azitromicina vía oral durante dos o tres semanas.<sup>21</sup>

## **Antecedentes**

En un estudio retrospectivo realizado en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” 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 trachomatis* por técnicas moleculares (identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un segmento del gen 16S común a las especies de *Chlamydia*), 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.

En un estudio previo realizado en el departamento de microbiología y proteómica, se estudiaron pacientes con conjuntivitis por adenovirus y se incluyeron 12 diagnosticados clínicamente como conjuntivitis alérgica, de estos últimos el 8% resultó positiva para *Chlamydia* spp.<sup>32</sup> Existen reportes que demuestran que pacientes con antecedente de atopia son susceptibles a infecciones intracelulares debido a que tienen una respuesta inmune predominantemente de tipo Th2<sup>33</sup>.

La búsqueda intencionada de *Chlamydia* ssp, es poco frecuente debido a que produce un cuadro clínico semejante a otras conjuntivitis infecciosas, como las producidas por Adenovirus quien es el agente etiológico responsable de faringoconjuntivitis y conjuntivitis epidémica, en diferentes estaciones del año dependiendo del genotipo. Herpes (HSV), es otro patógeno que puede ocasionar cuadros semejantes y algunos no son infecciosos como la Conjuntivitis Alérgica.<sup>34</sup>

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

Se han reportado recombinaciones entre serovares diferentes en una misma población, comparadas con cepas de referencia y se ha calculado que se producen menos de 1 por kilobase. Las recombinaciones más frecuentes se encuentran en el gen ompA.<sup>35</sup> La redistribución genética entre serovares de *C. trachomatis*, podría explicar porque es común que serovares o determinadas cepas, en ocasiones no correlacionan con los fenotipos clínicos. Gomes JP., y colaboradores, en un estudio de reconstrucción filogenética encuentran una agrupación cercana entre los serovares E y F, y éstos, distantes de los serovares responsables de infección urogenital, lo que habla de una posible ventaja en la transmisión de la infección con preferencia a tejido (tropismo). Los autores también encuentran una agrupación diferente del serovar Da que es común en infecciones oculares, por lo que se infiere que su preferencia de infección podría afectar a una mayor diversidad de tejidos.<sup>36</sup> Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) son los más reportados en las recombinaciones, esto que podrían ser predictivos de un cambio en las manifestaciones clínicas.

A partir de lo anterior surge la interrogante sobre si los genotipos en la población estudiada presentan cambios en relación a las secuencias de cepas prototipo encontrados.

## **Justificación**

En años recientes se ha detectado un número creciente de casos de conjuntivitis de inclusión en la población que acude al Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Esta patología altamente infecciosa de carácter crónico, que afecta a grandes grupos de la población, suele ser subdiagnosticada lo que resulta en un diagnóstico específico tardío, sintomatología continua con diseminación de las cepas en la población, y un costo elevado por los tratamientos inespecíficos.

El incremento en el número de casos en años recientes de conjuntivitis de inclusión por *Chlamydia trachomatis* se relaciona a una mayor posibilidad de intercambio genético entre serovares ya que dos serovares o más pueden encontrarse en el mismo individuo por lo que es más factible encontrar variantes.

La importancia de conocer las variantes genotípicas prevalentes en la población que acude a un centro de referencia de enfermedades oftalmológicas, reside en que nos dará información específica sobre las variantes genéticas en una muestra representativa de la población que acude a nuestra institución. Dará una primera aproximación de la magnitud epidemiológica del

problema en relación a la población mexicana afectada y permitirá sentar las bases para futuros estudios que pretendan conocer la dinámica de transmisión y persistencia de esta infección. Además se pretende que contribuya a difundir información específica al especialista para la toma de medidas tendientes a la profilaxis de la enfermedad, desde el manejo adecuado de los factores de riesgo para la conjuntivitis de inclusión hasta la aplicación de terapéuticas tempranas, específicas y accesibles.

Otro punto a resaltar consiste en que las posibles variantes genéticas encontradas en el estudio facilitarán la propuesta de elaboración de vacunas que se ajusten al genotipo o genotipos prevalentes circulante en nuestra población. <sup>31</sup>

### **Objetivo General**

Identificar las variantes genóticas de *C. trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión.

### **Objetivos particulares**

- Determinar las muestras positivas a *Chlamydia trachomatis* por PCR tiempo real.
- Amplificar el gen ompA a partir de las muestras positivas por PCR punto final.
- Identificar las variantes genéticas de *Chlamydia trachomatis* por secuenciación automatizada.
- Determinar la frecuencia de conjuntivitis de inclusión por genotipos.

### **Hipótesis**

Las variantes genéticas de *Chlamydia trachomatis* en nuestra población no se corresponden con las reportadas a nivel internacional como responsables de conjuntivitis de inclusión.

### **Materiales y Métodos**

Se realizó un estudio transversal, descriptivo de frecuencia de conjuntivitis de inclusión por genotipos específicos de *Chlamydia trachomatis* en nuestra institución.

#### *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 (ANEXO1), y pacientes que no cumplan con el esquema completo de tratamiento.

### *Muestra*

El tamaño de la muestra fue calculado para ser representativo de la población que acude al Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana a partir del número de casos de conjuntivitis folicular presentados en el año 2014. El total de casos presentados durante este periodo fue de 1964. A partir de ésta cifra se calculó una muestra de 160 casos que se incluyen en el estudio para darle un valor estadísticamente significativo. Se realizó un muestreo intencionado del total de los casos de conjuntivitis folicular en los meses de **marzo a noviembre de 2015** para alcanzar el número de muestra propuesto. A partir del total de casos de conjuntivitis foliculares se seleccionaron aquellos casos que cumplieran con los criterios de inclusión. Dichos casos fueron estudiados como sospechosos portadores de *C. trachomatis*.

El presente estudio complementa el trabajo previo de identificación de serotipos de *Chlamydia trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión realizado por el especialista en oftalmología Sergio Ulises González Pliego Nava que incluyó 80 muestras del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana bajo los mismos criterios de inclusión, por lo que en el presente estudios se incluirán 80 para cubrir la  $n = a$  160 casos, que cumplan con los criterios y que se encuentren en el período marzo-noviembre de 2015.

### *Obtención de muestras*

Previo consentimiento informado, se realizó un raspado de los sacos conjuntivales en ambos ojos, con un hisopo de rayón el cual fue introducido en un tubo BD Vacutainer (tubo rojo), con 200  $\mu$ L buffer salino de fosfatos (PBS). El mango restante del hisopo fué eliminado en bolsa de basura municipal.

### *Bioseguridad*

Para el procesamiento de las muestras, se trabajó con guantes, se tomaron directamente 200 µL que contenían la muestra conjuntival en PBS. El tubo fue cerrado y eliminado con el hisopo dentro, en la bolsa roja de desechos biológicos. En caso de tener restos de la muestra en solución, fueron depositados en el frasco rojo de desechos biológicos.

### *Extracción de DNA*

Se utilizaron guantes y siempre se trabajó dentro de la campana de bioseguridad. La extracción se realizó con el mini Kit de QIAamp, según el protocolo del fabricante (QIAGEN, Sciences. Maryland, USA). El material genético se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento.

### *Diagnóstico molecular por PCR genérico tiempo real*

Para la identificación de *Chlamydia* spp se usó el método de amplificación de segmentos específicos por tiempo real debido a su alta sensibilidad en la detección. Brevemente: se utilizó la solución Master mix Hot Start de Qiagen (QIAGEN, Sciences. Maryland, USA), que contiene dNTP's, enzima, Mg<sup>+2</sup> y KCl<sub>2</sub> a una concentración de 2.5 mM, se usarán los oligonucleótidos (50 nM de cada uno) que delimitan un segmento del gen 16S común a las especies de *Chlamydia* (Tabla 1), Syto9 y 10 - 25 ng de DNA 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 realizaron por triplicado en un termociclador Corbett (Life Science RG-6000. Sydney, Australia).

### *Amplificación del gen ompA por PCR punto final*

Para estas reacciones se usaron los reactivos arriba mencionados en las mismas concentraciones, utilizando para ello los oligonucleótidos OmpAF y OmpAR (tabla 1) Las condiciones de la PCR inicial fueron activación a 95°C/15 min; 40 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/ 1 min, y 72°C/ 1 min, y un paso de elongación final a 72°C/ 10 min. Se incluyó un control negativo con agua en lugar de DNA en cada corrida. Los productos amplificados se evaluaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Las bandas del gen de interés fueron cortadas y purificadas con MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN. Brevemente: La banda amplificada de interés, se colocó en tubo eppendorf de 1.5 mL. Se extrajo el DNA del gel con el buffer QG a 1 volumen de gel (aprox 100 mg), hasta que el gel

se haya disuelto completamente. Se precipitó con isopropanol. Se colocó el volumen en una columna MinElute en un tubo de 2 mL, lavar con 500 µL de buffer QG y posteriormente con 750 µL de buffer PE. Se eluyó el ADN con buffer EB (Tris 10 mM • Cl, pH 8,5) o H<sub>2</sub>O bidestilada, y fue valorada la concentración de DNA/µL.

### *Secuenciación del DNA*

El fragmento de ompA obtenido se purificó mediante el uso de un QIAquickKit de purificación de PCR (Qiagen, Sciences. Maryland, USA), y ambas cadenas de un segmento de ~1091 pb, para todas las muestras, se amplificó el fragmento interno con el fin de realizar la secuenciación completa del gen. La secuenciación se realizó mediante el uso de un kit de reacción BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se cargaron las mezclas de reacción en un 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación se indican en la tabla 1.

<b>TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO</b>			
<b>NOMBRE</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDO 5' – 3'</b>	<b>TAMAÑO (pb)</b>	<b>GEN CORRESPONDIENTE</b>
<b>Clamy F (genérica)</b>	<b>GTGGATGAGGCATGCGAGTCGA</b>	<b>254</b>	<b>16S</b>
<b>Clamy R (genérica)</b>	<b>CTCTCAATCCGCCTAGACGTC</b>		<b>16S</b>
<b>OmpA F</b>	<b>TTGAGTTCTGCTTCCTCCT</b>	<b>1091</b>	<b>Proteína de membrana</b>
<b>OmpA R</b>	<b>CAGACAAATACGCAGTTACAGT</b>		<b>Proteína de membrana</b>
<b>Int-R</b>	<b>GCTTACATGGCATTAAATATCTGG</b>	<b>87-111</b>	<b>Proteína de membrane (interno)</b>

## **Análisis estadísticos**

Se determinó la frecuencia de *C. trachomatis* en la población diagnosticada clínicamente como conjuntivitis folicular. Las secuencias obtenidas se analizaron manualmente y fueron comparadas con secuencias de cepas prototipo reportadas en el GenBank (número de acceso: DQ116393–DQ116402 para ompA) por alineamiento utilizando el programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Cualquier cambio fue considerado una variante genotípica y será publicada en esa base de datos. A partir de los cambios encontrados en relación a las secuencias de referencia, se determinó su significancia en la expresión de aminoácidos, así como la frecuencia genotípica utilizando X<sup>2</sup>.

## **Aspectos Éticos**

Se realizaron una carta de consentimiento informado previo al estudio con referencia completa de acuerdo al formato del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). (Ver anexo1).

## **Declaración de conflictos de intereses de los investigadores**

No existe ningún conflicto de interés por parte de ninguno de los investigadores, para la realización de este estudio clínico

Financiación para reuniones y congresos, asistencia a cursos	NO
Honorarios como ponente	NO
Financiación de programas educativos o cursos	NO
Financiación por participar en una investigación	NO
Consultoría para una compañía farmacéutica/otras tecnologías	NO
Accionista o con intereses comerciales en una compañía	NO
Intereses económicos en una empresa privada relacionada con la salud que puede ser significativo en relación a la autoría de la guía	NO
Conflictos de intereses de índole no económico que pueden ser significativos en relación a la autoría en la guía	NO
Financiación o ayudas económicas para la creación de la unidad o servicio	NO
Dotación significativa de material a la unidad o servicio	NO
Contratación o ayudas económicas para contratar personal en la unidad o servicio	NO
Ayuda económica para la financiación de una investigación	NO

Financiación de programas educativos o cursos para la unidad	NO
Financiamiento de insumos para terminar el proyecto (50%)	SI

## Resultados

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar las variantes genotípicas de *Chlamydia trachomatis* de muestras de pacientes diagnosticados clínicamente con conjuntivitis folicular aguda o crónica, que acuden al servicio de Oftalmología Integral del nuestro instituto y que cumplieron con los criterios de inclusión.

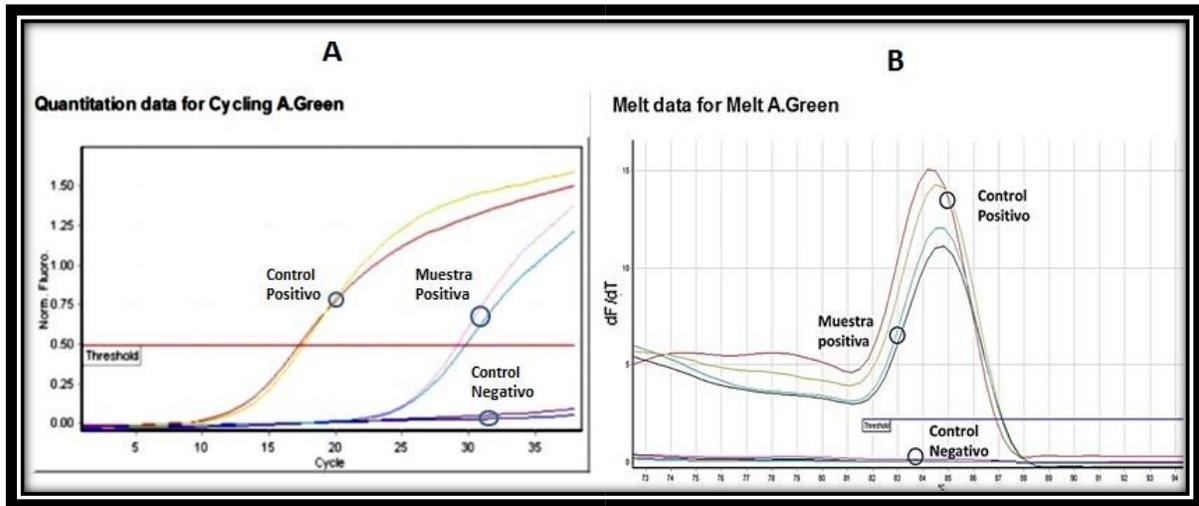
Se realizó la valoración de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión dentro de los departamentos de Consulta Externa y Córnea del instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Se les informó a los pacientes sobre el estudio en curso y fueron firmados consentimientos informados por aquellos pacientes que acordaron participar en el mismo. Se tomaron 80 muestras conjuntivales a las cuales se les realizó una PCR genérica para *Chlamydia spp.* Se realizó un gel de agarosa para el procesamiento de las muestras positivas para el gen ompA. En la figura 1 se muestran las bandas del gen posterior a la amplificación.

La caracterización clínica de la población del estudio de casos y controles incluidos en este estudio se refirieron en la consulta oftalmológica con síntomas tales como: ardor, prurito de leve a moderado, ojo seco, sensación de cuerpo extraño, fotofobia, ocasionalmente lagrimeo y secreción. A la exploración bajo lámpara de hendidura se encontraron signos como: hiperemia de conjuntivas de leve a moderada, foliculos en conjuntivas tarsales, secreción mucoacuosa escasa en fondos de saco, ocasionalmente queratopatía punteada superficial de leve a moderada y tiempo de ruptura lagrimal cortado (Figura 1).



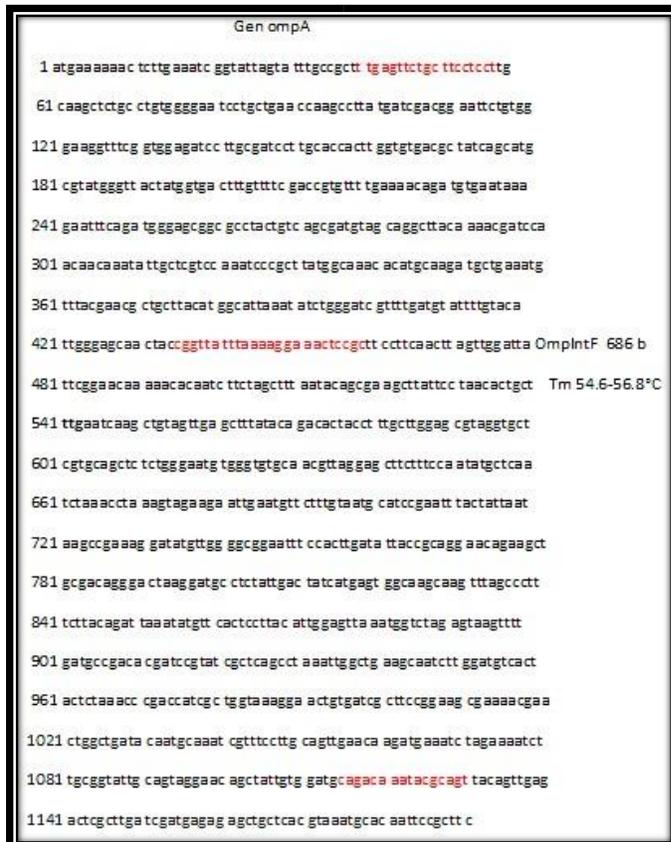
**FIGURA 1.** Paciente con conjuntivitis folicular donde se observa: **a)** infiltración inflamatoria, engrosamiento de la conjuntiva tarsal inferior; **b)** presencia de foliculos, característica de conjuntivitis de inclusión.

Para todas las muestras estudiadas, la determinación de positividad a *Chlamydia* spp., se evaluó mediante la reacción de PCR tiempo real. La figura 2 muestra una curva de amplificación correspondiente al gen 16S ribosomal de *Chlamydia* spp, de una muestra positiva y los respectivos controles positivo y negativo.



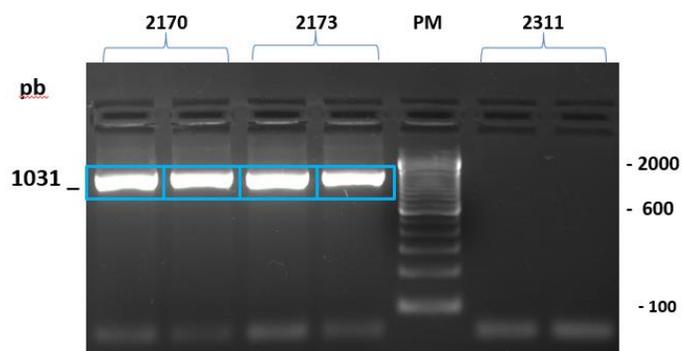
**FIGURA 2. PCR Tiempo Real de *Chlamydia* spp.** A) Curva de amplificación correspondiente a un segmento del gen 16S ribosomal de *Chlamydia* spp. B) muestra la temperatura melting que identifica el control positivo y una muestra positiva para esta bacteria. La reacción se realizó por duplicado.

Las muestras positivas por PCR para *Chlamydia* genérica fueron procesadas para amplificar el gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* por el método de secuenciación automatizada. La figura 3 representa la secuencia del gen tomada del GenBank.



**FIGURA 3. Gen *ompA*.** Esta secuencia fue obtenida del GenBank y pertenece a la secuencia completa reportada con el número de acceso **DQ116396**. Las secuencias en rojo corresponden a los oligonucleótidos OmpF y OmpR utilizados para la secuenciación de las muestras estudiadas.

De las 80 muestras del 2015 se pudo amplificar el gen *ompA* en 8 de ellas, mientras que de las 80 muestras históricas se amplificaron 3 para el gen mencionado (Figura 4). La tabla 1 indica el número de muestras amplificadas para *ompA* de las muestras clínicamente sospechosas para *Chlamydia* spp en el periodo marzo junio 2015 y la tabla 2 el total de muestras estudiadas.



**FIGURA 4. Muestras positivas para el gen *OmpA*.** Gel de agarosa al 2% con el intercalador de bromuro de etidio. Las Bandas de aproximadamente 1031 pares de bases (pb) para el gen *ompA* amplificado están indicadas con un rectángulo amarillo. Esas bandas fueron cortadas y extraídas para la secuenciación.

Tabla 1. Total de muestras evaluadas marzo- junio 2015		
Sospechoso de conjuntivitis por <i>Chlamydia</i> spp	<i>Chlamydia</i> spp Positivas	Gen <i>ompA</i> positivas
80	29	8

**TABLA 2. TOTAL DE MUESTRAS ESTUDIADAS**

MUESTRAS	Sospechoso de conjuntivitis por <i>Chlamydia</i> spp	<i>Chlamydia</i> spp +	Gen <i>ompA</i> positivas
Casos enero- septiembre 2014	80	33	3
Casos marzo-junio 2015	80	29	8

La secuenciación parcial del Gen *ompA* facilitó la identificación del serotipo D en una muestra, el serotipo E en 3 muestras y el serotipo F en 4 muestras. Las secuenciaciones obtenidas fueron comparadas y alineadas con aquellas encontradas en el GenBank y correspondieron a los números de acceso: FJ261926.1, U78536.1 y JX564244.1 respectivamente y con 99% de similitud. La figura 5 muestra un electroferograma representativo de un genotipo, mientras que

la figura 6 indica el alineamiento de las secuencias obtenidas con las respectivas referencias del GenBank.

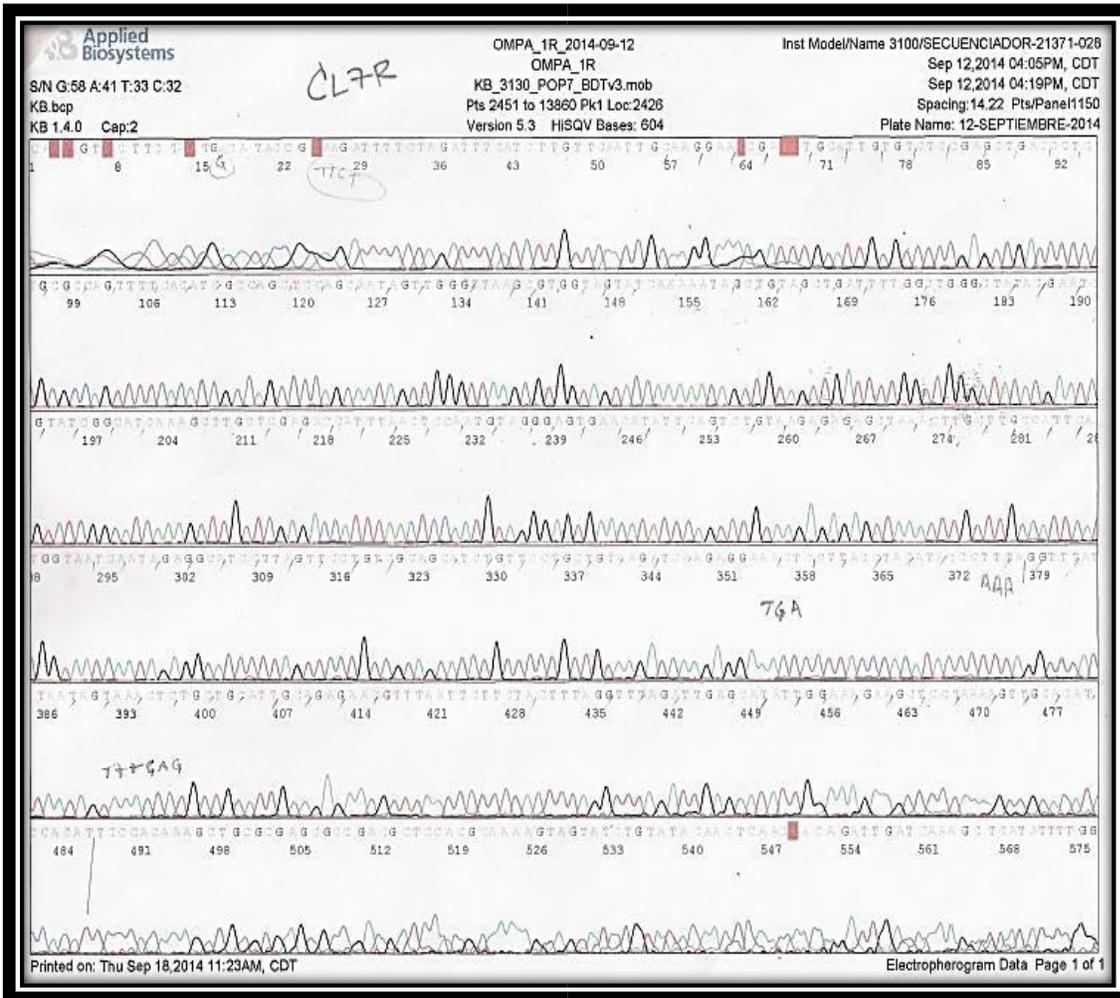


FIGURA 5. Electroferograma de la muestra CL7 utilizando el primer ompA

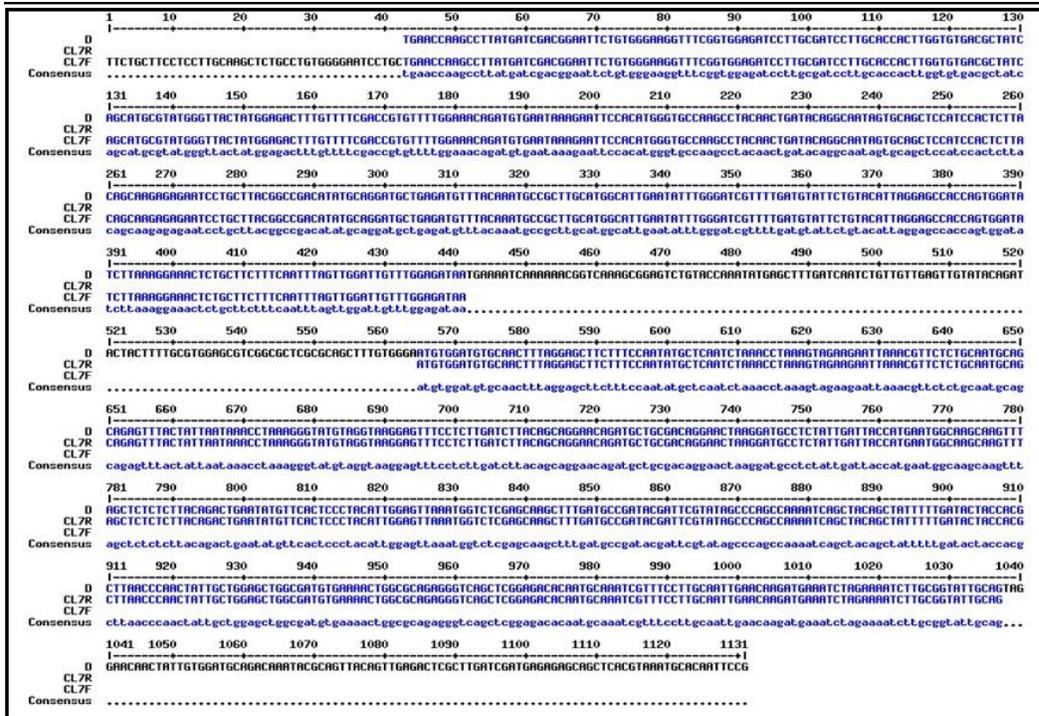


FIGURA 6. Alineamiento realizado con el programa Multalin

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), entre la secuencia de CL7 y la encontrada en el Genbank con el número de acceso FJ261926.1, correspondiente al serotipo D con quien tiene una identidad del 99%.

TABLA 3. GENOTIPOS IDENTIFICADOS Y PROCEDENCIA GEOGRÁFICA

MUESTRAS	NÚMERO DE ACCESO GENBANK	GENOTIPO	PROCEDENCIA
2002 1842 1141	U78536.1	E	Estado de México Estado de México Distrito Federal
1949 2150 2129 694	JX564244.1	F	Distrito Federal Estado de México Estado de México No se Conoce
CL7	FJ261926.1	D	Distrito Federal

La tabla 3 indica que los genotipos identificados están ubicados fundamentalmente en el Distrito Federal y en el Estado de México, lugares que geográficamente son muy cercanos.

Los resultados expuestos en el presente trabajo muestran que los serotipos F y E son los prevalente. El serotipo D también identificado, resultó el menos frecuente en la muestra estudiada.

Es importante destacar que una muestra tan pequeña como la estudiada en este trabajo, haya permitido detectar al menos 3 genotipos, de lo cual se infiere que en México existe una diversidad genética importante de *Chlamydia trachomatis* que puede producir conjuntivitis de inclusión

Un hallazgo sobresaliente se encontró en las secuencias para el serotipo E el cual presento 5 cambios de bases en el gen ompA: en la posición 49 cambió T/C, en la posición 908 cambió G/A, en la posición 996 cambió C/T, en la posición 1010 A/C y en la 1015 A/G para todas las muestras que resultaron ser ese serotipo.

## DISCUSIÓN

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria responsable de infecciones en el sistema urogenital, de neumonía infantil, linfogranuloma venéreo, tracoma y conjuntivitis de inclusión<sup>20</sup> es el agente infeccioso que con mayor frecuencia genera conjuntivitis crónica. El diagnóstico de este microorganismo generalmente es tardío debido al propio curso de la infección y la dificultad para obtener suficientes células infectadas del raspado conjuntival y que permita realizar el diagnóstico confirmativo, estos inconvenientes ocasionan un curso crónico con posible cicatrización debido a la inflamación crónica. La Infección oculogenital es causada por los serotipos D-K, esta infección también se conoce como paratracoma. Es una enfermedad recurrente en el 90% de los casos, debido a que las parejas sexuales no son tratadas apropiadamente.<sup>21, 22</sup>

En el presente trabajo, las características de los cuadros clínicos de los casos estudiados, así como el análisis de sus historias clínicas, se encuentran principalmente relacionados con la patología conocida como Conjuntivitis de Inclusión, arriba descrita. Para confirmar el diagnóstico, evaluamos la presencia de *Chlamydia* spp por la técnica de PCR tiempo real (genérico), y se identificaron por secuenciación automatizada los genotipos F (4 muestras). E (3 muestras) y D (en una muestra), a partir de las muestras positivas al PCR genérico mediante la amplificación del gen ompA.

Por otro lado, la búsqueda intencionada de conjuntivitis por *Chlamydia* spp, es poco frecuente debido a que produce un cuadro clínico semejante a otras conjuntivitis infecciosas, como la producida por Adenovirus quien es el agente etiológico responsable de conjuntivitis epidémica, en diferentes estaciones del año. Además, Herpes (HSV) es otro patógeno que puede ocasionar cuadros semejantes, en turno, algunos cuadros clínicos no infecciosos como la Conjuntivitis Alérgica también puede generar una conjuntivitis crónica.<sup>23, 24</sup>

Existen pocos reportes relacionados con conjuntivitis de inclusión relacionada a *chlamydia trachomatis* y genotipos específicos, probablemente esto se deba a que esa infección se encuentra relacionada con una enfermedad de transmisión sexual, la que requiere una mayor atención debido a las complicaciones que ocasiona y genera un problema de Salud Pública.<sup>26</sup>

En México no han sido reportados los genotipos que producen conjuntivitis de inclusión, sin embargo, se publicó un trabajo en donde fueron secuenciadas muestras de pacientes con infecciones endocervicales. En ese trabajo se destaca que el serotipo F es el agente etiológico más frecuente para especímenes endocervicales.<sup>27</sup> Nuestros hallazgos concuerdan en la frecuencia elevada del serotipo F para muestras de pacientes con conjuntivitis de inclusión.

Ya ha sido mencionado que la secuenciación del gen *ompA* facilita identificar los 19 genotipos o serovares causantes de conjuntivitis e infección urogenital (ver antecedentes) se ha demostrado que su distribución es muy similar a nivel mundial,<sup>28, 29</sup> siendo los serotipos prevalentes el D, E y F,<sup>30, 31</sup> mismos serotipos que fueron identificados en nuestro estudio.

Un hallazgo de importancia epidemiológico en el presente trabajo, es la presencia de una posible variante genotípica en el serotipo E. La secuenciación en todas las muestras correspondientes mostró 5 cambios respecto a la reportada en el GenBank con el número de acceso U78536.1. Estos datos deben ser cuidadosamente alineados con todas las secuencias del gen *ompA* reportadas, con la finalidad de verificar si se trata de una variante genotípica no reportada anteriormente. Las variantes genotípicas sugieren variantes biológicamente diferentes que pudieran afectar la infectividad y la trasmisión.<sup>32</sup>

## CONCLUSIONES

Este trabajo es el primer reporte en México que muestra la diversidad genotípica de conjuntivitis folicular de inclusión por *chlamydia trachomatis*, realizado además, en un centro de referencia como lo es el instituto de oftalmología “Conde de Valenciana”.

La tipificación de las cepas de *C. trachomatis* son un objetivo importante en la epidemiología, así como en la comprensión de la patogenicidad y las tasas de transmisión, con trascendencia tanto en la clínica como de la investigación básica en infecciones por esta bacteria. Por otro lado,

debería de investigarse la distribución temporal y geográfica de serotipos de *C. trachomatis*, inclusive para el desarrollo de vacunas a partir de las regiones variables.

La identificación de serotipo de *C. tracomatis* por métodos inmunológicos están siendo reemplazados por métodos de secuenciación automatizada del gen Omp1 o del gen que codifica la proteína principales externa de membrana debido a que son más sensibles y precisas para la identificación de variantes genotípicas de *C. trachomatis*.<sup>32</sup>

## Referencias

1. Kalayoglu MV. Ocular chlamydial infections: Pathogenesis and emerging treatment strategies. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2:1:85-91.
2. Center for Disease Control and Prevention. Nationally representative CDC study finds 1 in 4 teenage girls has a sexually transmitted disease. CDC press release. March 11, 2008.
3. Hatch, T.P., Allan, I. and Pearce, J.H.: Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J. Bacteriol.* 157-1320, 1984.
4. Karaulov A, Aleshkin V, Slobodenyuk V. Identification of phylogenetic position in the Chlamydiaceae family for *Chlamydia* strains released from monkeys and humans with chlamydial pathology. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010;2010:130760.
5. Dean. D., Ferrero. D., McCarthy. M. Comparison of Performance And Cost-Effectiveness Of Direct Fluorescent. Antibody, Ligase Chain Reaction, and PCR Assays for Verification of Chlamydial Enzyme Immunoassay Results for Populations with a Low to Moderate Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Infection. *J. of Clin. Microbiol.* 1999. 36: 94-99.
6. Rodríguez-Domínguez M, Sanbonmatsu S, Salinas J, Alonso R, Gutiérrez J. Galán JC. Microbiological diagnosis of infections due to *Chlamydia* spp. and related species. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(6):380-385.
7. C. Hartley, S. Kaye, S. Stevenson, J. Bennett, and G. Ridgway, "PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 9, pp. 3072–3079, 2001
8. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 1987; 169(9):3879-3885.

9. 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(3): 817–831.
10. Ngandjio A, Clerc M, Fonkoua MC, et al. Restriction endonuclease patterns of the omp1 gene of reference *Chlamydia trachomatis* strains and characterization of isolates from Cameroonian students. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 1):47-50
11. Thomas JM, Heggie AD, Lass JH. Chlamydial Disease. In: Albert DM, Jakobiec FA, eds. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2013:114-28.
12. Shah AP, Smolensky MH, Burau KD, et al. Recent change in the annual pattern of sexually transmitted diseases in the United States. *Chronobiol Int* 2009; 24:5:947-60
13. Raos K, Madhavan HN, Padmanabhan P, Lakshmi GS, Natarajan K, Gary D. Ocular Chlamydial infections. clinicomicrobiological correlation. *Cornea* 2006;15(1): 62-65
14. Domínguez, E. A., Asociación de *Chlamydia trachomatis* con cuadro clínico de tracoma en comunidades endémicas en la región Altos de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. 2000. 1-50.
15. Armstrong, J. Zacarias , F, and Rein , M. Ophthalmia Neonatorum: A Chart Review. *Pediatrics*. 2001: 6: 884- 892.
16. Stenberg K, Mardh PA. Genital infection with *Chlamydia trachomatis* in patients with chlamydial conjunctivitis. *Sex Transm Dis* 1991;18:1:1-4.
17. Tabbara KF, Hyndiuk R. A, *Chlamydia*: trachoma and conjunctivitis of inclusions. *Infections of the eye*. 1996:433-51.
18. Bobo, L. D., Novak, N. Muñoz, B., Hsieh , Y. Quinn, T. and West, S. Severe disease in children with Conjunctivitis is associated with persistent *Chlamydia trachomatis* infection. *The journal of infect. dis*. 2001. 176:1524-30.
19. Schachter J, Grossman M, Holt J, et al. Prospective study of chlamydial infection in neonates. *Lancet* 1979;2:8139:377-8.
20. Salopek-Rabatic J. Chlamydial conjunctivitis in contact lens wearers: Successful treatment with single dose azithromycin. *Clao J* 2001;27:4:209-11.
21. Katusic D, Petricek I, Mandic Z, et al. Azithromycin vs. doxycycline in the treatment of inclusion conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2003; 135:4:447-5.
22. J. H. Carlson, S. F. Porcella, G. McClarty, and H. D. Caldwell, “Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains,” *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 10, pp. 6407–6418, 2005.

23. Maria Lysen, Anders Österlund, Carl-Johan Rubin, Tina Persson, Ingrid Persson, Björn Herrmann, Characterization of ompA Genotypes by Sequence Analysis of DNA from All Detected Cases of Chlamydia trachomatis Infections during 1 Year of Contact Tracing in a Swedish County; *Journal of clinical Microbiology*, Vol4, No 4, Apr. 2004, p. 1641-1647
24. Wang Y, Skilton RJ, Cutcliffe LT, Andrews E, Clarke IN, Marsh P. Evaluation of a high resolution genotyping method for Chlamydia trachomatis using routine clinical samples. *PLoS One* 2011
25. Kese D, Potocnik M, Maticic M, Kogoj R. Genotyping of Chlamydia trachomatis directly from urogenital and conjunctiva samples using an ompA gene pyrosequencing-based assay. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Nov;63(2):210-6
26. Wood DO, Wood RR, Tucker AM. Genetic systems for studying obligate intracellular pathogens: an update. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Feb;17:11-6.
27. Isobe K, Aoki K, Itoh N, Ohno S, Takashima I, Hashimoto N. Serotyping of Chlamydia trachomatis from inclusion conjunctivitis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. - *Jpn. J. Ophthalmol.* - January 1, 1996; 40 (2); 279-85.
28. Fernando M. Guerra-Infante, Marisol Basurto-Tranquilino, María J. de Haro-Cruz, Marcela López-Hurtado; Análisis genómico y aminoacídico del gen ompA del serotipo F de Chlamydia trachomatis aislado en México; *Revista de Investigación Clínica*, Vol. 63, Núm. 5, Sept-Oct 2011, pp 544-546.
29. De Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, Guerra-Infante FM. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infantile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(2):102-108
30. Verweij SP, Lanjouw E, Bax CJ, Quint KD, Oostvogel PM, Dörr PJ, Pleijster J, de Vries HJ, Peters RP, Ouburg S, Morré SA. Serovar D and E of serogroup B induce highest serological responses in urogenital Chlamydia trachomatis infections. *BMC Infect Dis* 2014;14:3.
31. Mabey DC, Hu V, Bailey RL, Burton MJ, Holland MJ. Towards a safe and effective chlamydial vaccine: lessons from the eye. *Vaccine.* 2014 Mar 20;32(14):1572-8.
32. Trabajo de servicio social de la pasante en Medicina Brenda Guadalupe Herrera León: "Determinación de una probable reemergencia de tracoma, en pacientes atendidos en el instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana en los años 2008 a 2011".

Director General de Calidad y Educación en Salud. Universidad Autónoma de Pachuca. Febrero de 2012.

33. Kurata A. Hygiene hypothesis: why south/north geographical differences in prevalence of asthma and sarcoidosis? *Med Hypotheses*. 2012;79(3):363-364.
34. Jin Y, Hong J [Detection of adenovirus and herpes simplex virus in the tears of chronic conjunctivitis]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2010 May;46(5):419-22. Uchio E, Takeuchi S, Itoh N, Matsuura N, Ohno S, Aoki K. Clinical and epidemiological features of acute follicular conjunctivitis with special reference to that caused by herpes simplex virus type 1. *Br J Ophthalmol*. 2000 Sep; 84 (9):968-72.
35. Millman KL, Tavaré S, Dean D. Recombination in the ompA gene but not the omcB gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. *J Bacteriol*. 2001 Oct; 183 (20):5997-6008.
36. Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, Borrego MJ, Florindo C, Dean D. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol*. 2006 Jan;188 (1):275-86.

(ANEXO 1)



## Instituto de Oftalmología

“Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”

### CARTA DE CONSENTIMIENTO E INFORMACIÓN

**Título del protocolo: “Variantes genotípicas de *Chlamydia trachomatis* responsables de conjuntivitis de inclusión”**

Investigador principal: Dra. Ethel Beatriz Guinto Arcos

Lugar donde se realizará el estudio: Departamento de Microbiología y Proteómica

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Originario de \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

- 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.** La importancia de conocer las variantes genotípicas prevalentes en la población que acude a un centro de referencia de enfermedades oftalmológicas nos dará una primera aproximación de la magnitud epidemiológica del problema en relación a la población mexicana afectada y permitirá sentar las bases para futuros estudios que pretendan conocer la dinámica de transmisión y persistencia de esta infección. Se pretende que contribuya a difundir información específica al especialista para la toma de medidas tendientes a la profilaxis de la enfermedad, desde el manejo adecuado de los factores de riesgo para la conjuntivitis de inclusión hasta la aplicación de terapéuticas tempranas, específicas y accesibles.
- 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO.** Conocer las variantes de *Chlamydia* que causan conjuntivitis de inclusión circulante en México que afectan la conjuntiva.
- 3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**  
En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes médicos, tratamientos recibidos y sintomatología actual. Se procederá a la toma de una muestra conjuntival por medio de un barrido del fondo de saco con un hisopo. La muestra será procesada y sometida a análisis genético para identificación de genes específicos. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de conjuntiva será utilizado exclusivamente para investigar la presencia de una especie de *Chlamydia* que de resultar positiva se notificará al área médica para el manejo terapéutico.

**4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

La toma de la muestra y el resto de los procesos involucrados en el estudio no representan riesgo alguno para mi salud más allá de una posible molestia transitoria en forma de sensación de cuerpo extraño.

**5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO**

Este estudio le permitirá conocer si es portador de alguna especie de *Chlamydia* para ser tratado eficientemente en tiempo y forma. Los resultados obtenidos del mismo permitirán que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento adquirido ya que tendremos información muy específica sobre los serotipos prevalentes dentro del país.

**6. ACLARACIONES:**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

**7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante o del padre o tutor**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

**Testigo 1**

\_\_\_\_\_  
**Nombre**

\_\_\_\_\_  
**Parentesco**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

Domicilio \_\_\_\_\_

**Testigo 2**

---

Nombre	Parentesco	Fecha
--------	------------	-------

Domicilio \_\_\_\_\_

**Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

Firma del investigador	Fecha
------------------------	-------

**\* Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.**