

Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas

Olga Lucía Ostos Ortiz¹ y Ruth Mélida Sánchez^{1*}

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D. C. Colombia.

Recibido: 05-07-03; Aceptado: 01-12-03

La Chlamydia es una bacteria Gram negativa, no móvil, de vida parasitaria intracelular obligada porque carece de habilidad para sintetizar ATP, son parásitos energéticos, no tienen vida libre y colonizan el citoplasma de las células susceptibles (1).

Hasta el 2002 la familia Chlamydiaceae se consideraba con cuatro especies reconocidas: *Chlamydia trachomatis*, *C. Psittaccci*, *C. Pneumoniae* y *C. Pecorum*. Esta familia incluye los agentes del tracoma, linfogranuloma venéreo, enfermedades del tracto urogenital y conjuntivitis (1). En el cuarto encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones de Chlamydia en Helsinki, Finlandia, en agosto del 2002, Karin Everret, Bush y Anderson presentaron una nueva clasificación de orden Chlamydia (Tabla 1).

Presentan una morfología esférica u ovalada y se observan como cocos Gram negativos o Gram variables,

son inmóviles no ciliadas, poseen una membrana interna y otra externa, la cual se asemeja a la pared celular de las Gram negativas. Al parecer su pared carece del ácido n-acetilmurámico. Se dividen por fisión binaria y contienen ribosomas similares a los de otras bacterias.

Los cuerpos elementales (CE) son estructuras redondeadas diminutas infecciosas, rígidas, resistentes a la ruptura como consecuencia de los puentes disulfuro de las proteínas de la capa externa de la membrana, se liberan cuando se lisa la célula hospedera infectada, tienen un tamaño de 200 a 400 nm, con coloración de Giemsa se tiñen de púrpura y de rojo con la tinción de Macchiavello, en contraste con la coloración que toma el citoplasma de la célula huésped (3).

En los CE se encuentra DNA y RNA. La mayor parte de DNA se encuentra en el nucleóide central electrodenso y la mayor parte del RNA está en los ribosomas. Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos, que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar y son infectivos (Figura 1).

Los cuerpos reticulados (CR) son el resultado de la diferenciación de los CE al ser fagocitados, tienen una morfología bacilar, están desprovistos del nucleóide denso y su mayor tamaño es de 600 a 1000 nm, no son infecciosos. Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse, tienen actividad metabólica y el ADN está disperso (Figura 2) (4).

ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	RESERVOIRIO
Chlamydiales	Chlamydiaceae	Chlamydia	<i>C. abortus</i> <i>C. psittaci</i> <i>C. felis</i> <i>C. neybaei</i> <i>C. pecorum</i> <i>C. pneumoniae</i>	Aves, Suidos, Carnívoros, gusano
		Chlamydia	<i>C. haemorrhagiae</i> <i>C. suis</i> <i>C. muridarum</i>	Hamsters, Carnívoros, Ratones, Morcegos
	Parachlamydiaceae			
	Simuliaceae			
	Simuliaceae			

Tabla 1: Clasificación orden Chlamydia presentada el cuarto encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones de Chlamydia en Helsinki Finlandia en agosto de 2002.

* Correspondencia: Olga Lucía Ostos Ortiz: olgalostoso@hotmail.com; Ruth Mélida Sánchez: ruthmsanchez2003@hotmail.com.

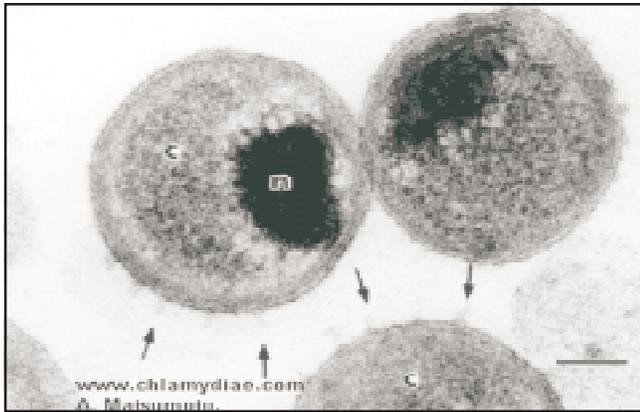


Figura 1. Cuerpo elemental de *C. trachomatis*.

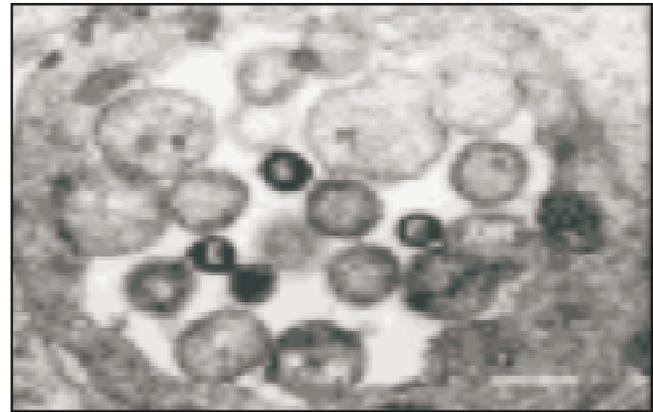


Figura 2. Cuerpos reticulados.

La Membrana Chlamydial propuesta por microscopía electrónica muestra dos membranas celulares trilaminares caracterizadas por la ausencia de peptidoglicanos (Figura 3), pero con proteínas de unión a las penicilinas. Se han realizado estudios en donde se ha demostrado que en el tratamiento con penicilina en células infectadas muestran inhibición de la división celular pero no del crecimiento del CR con la aparición de formas Chlamidiales morfológicamente anormales y agrandadas (1).

La membrana presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los CE para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Los CR son frágiles en comparación con los CE (5).

Las proteínas de la envoltura Chlamydial ricas en cisteína incluyen:

1. MOMP (Proteína mayor de membrana externa), expresada en la envoltura del cuerpo elemental, pesa 40 Kda, constituye casi el 60% del total de las proteínas de la membrana externa y está codificada por el gen *omp 1*; muestra una función de porina, se glicosila post-traducción; actualmente, se ha visto que juega un rol en la adherencia electrostática y contiene epitopes antigénicos de superficie (5,6).

2. Proteína de 60 Kda: esta proteína está codificada por el gen *omp2*. Se encuentra en el espacio

periplásmico, dando a las Chlamidias una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Los CR no contienen la proteína de 60 Kda (5,6).

3. Proteína de 12-15 Kda: codificada por el gen *omp 3*, es una lipoproteína hidrofílica. Los CR no contienen esta proteína.

Recientemente se ha confirmado la presencia de dos proteínas de shock térmico (*hsp*) en la envoltura Chlamydial: la *hsp 60* y la *hsp 70* en mujeres con enfermedad pélvica asociada a *C. trachomatis*. En estudios realizados sobre infertilidad y embarazos ectópicos se han observado altos títulos de anticuerpos anti-*hsp 60* Chlamydial, en contraste con la presencia de anticuerpos anti *hsp 70* Chlamydial reportados en mujeres con inmunidad protectora (5,6).

Chlamydia posee proyecciones hemisféricas especializadas de superficie, cuyo diámetro es de aproximadamente 40 nm, su altura de 30 nm y la distancia entre cada una de ellas de 25 nm. Las proyecciones están separadas por pequeñas depresiones con bases planas, se cree que éstas se encuentran en la adhesión de los CE a las células huésped (5, 6,7).

También existen proyecciones puntiagudas que son formas intermedias entre CE y CR, se originan debajo de las depresiones de la membrana plasmática y se extienden a través del espacio periplásmico y la membrana externa, su longitud total es de aproximadamente 90 nm, de los cuales 25 a 35 nm se

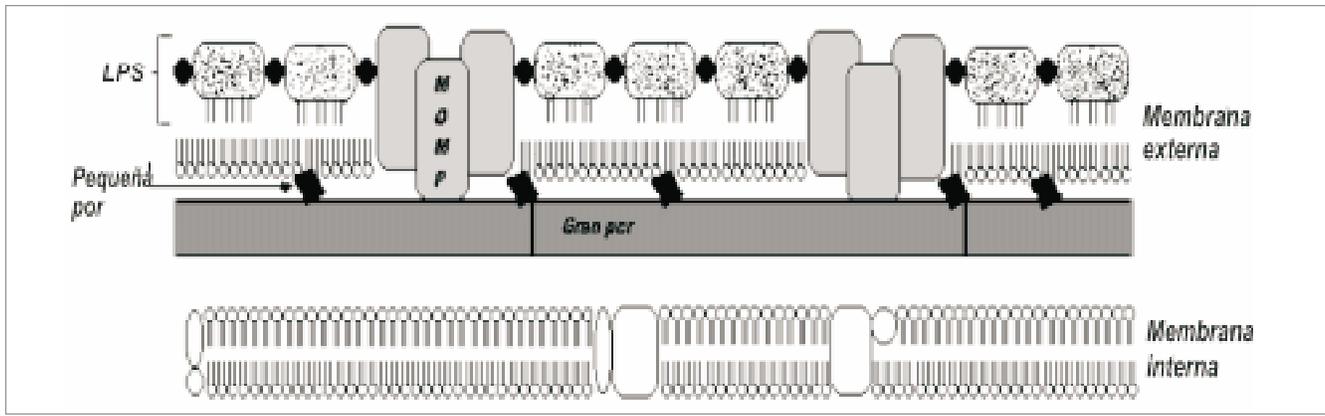


Figura 3: Estructura propuesta para la membrana de la Chlamydia. Se observan dos membranas celulares trilaminares. En la membrana externa se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) y la proteína MOMP (se 40 Kda).

proyectan más allá de la superficie de la Chlamydia; esto sugiere que estas «púas» podrían ser conexiones entre la célula huésped y la Chlamydia, al igual que otros componentes importantes de la envoltura Chlamydia son los lipopolisacáridos (lps) (5, 6).

Ciclo de Vida

Las Chlamydias tienen un ciclo reproductivo común. La partícula infectante estable en el ambiente, es una célula pequeña, cuerpo elemental (Figura 4). Para adherirse a las células huésped se requiere un sulfato de heparina parecido a la glucosamina glucano sobre la superficie de la Chlamydia. Después de la adhesión, el cuerpo elemental se introduce por fagocitosis a la célula huésped dentro de una vacuola derivada de la membrana superficial.

Este corpúsculo elemental se reorganiza en uno más grande (cuerpo reticulado). Dentro de la vacuola rodeada por una membrana, el cuerpo reticulado aumenta de tamaño y se divide varias veces por la fisión binaria. Con el tiempo toda la vacuola se encuentra llena de cuerpos elementales derivados por la fisión binaria de los cuerpos reticulados para formar una inclusión en el citoplasma de la célula huésped. Los cuerpos elementales recién formados pueden liberarse de la célula huésped para infectar nuevas células. El ciclo de reproducción dura de 24 a 48 horas (1,8).

Antígenos

Las Chlamydias poseen antígenos específicos lipopolisacáridos termoestables con el ácido 2-ceto 3-desoxioctónico. Se pueden detectar anticuerpos a estos antígenos específicos mediante fijación de complemento o inmunofluorescencia. Los antígenos específicos de especie o específicos de variedad serológica son principalmente proteínas de membrana externa (1,8).

Genoma de la *C. trachomatis*

El genoma de un considerable número de Chlamydias ha sido ampliamente estudiado desde 1998 (9-14).

La Chlamydia tiene un genoma bacteriano pequeño comparado con el micoplasma. El genoma cromosómico de la Chlamydia tiene 1.042.519 pb, (58.7% de A-T) (10). *C. trachomatis* tiene un plásmido críptico de 7,493 pb que no posee la *C. pneumoniae*.

Análisis del genoma Chlamydia ha mostrado que codifica para 875 proteínas aproximadamente, que nos son necesariamente expresadas, 70 de las cuales son exclusivas de *C. trachomatis*.

Es importante anotar que en la región cercana al origen de la replicación del cromosoma Chlamydia es donde existe mayor diversidad genética. Esta región incluye genes que controlan la síntesis del triptófano y su utilización, se ha relacionado con la

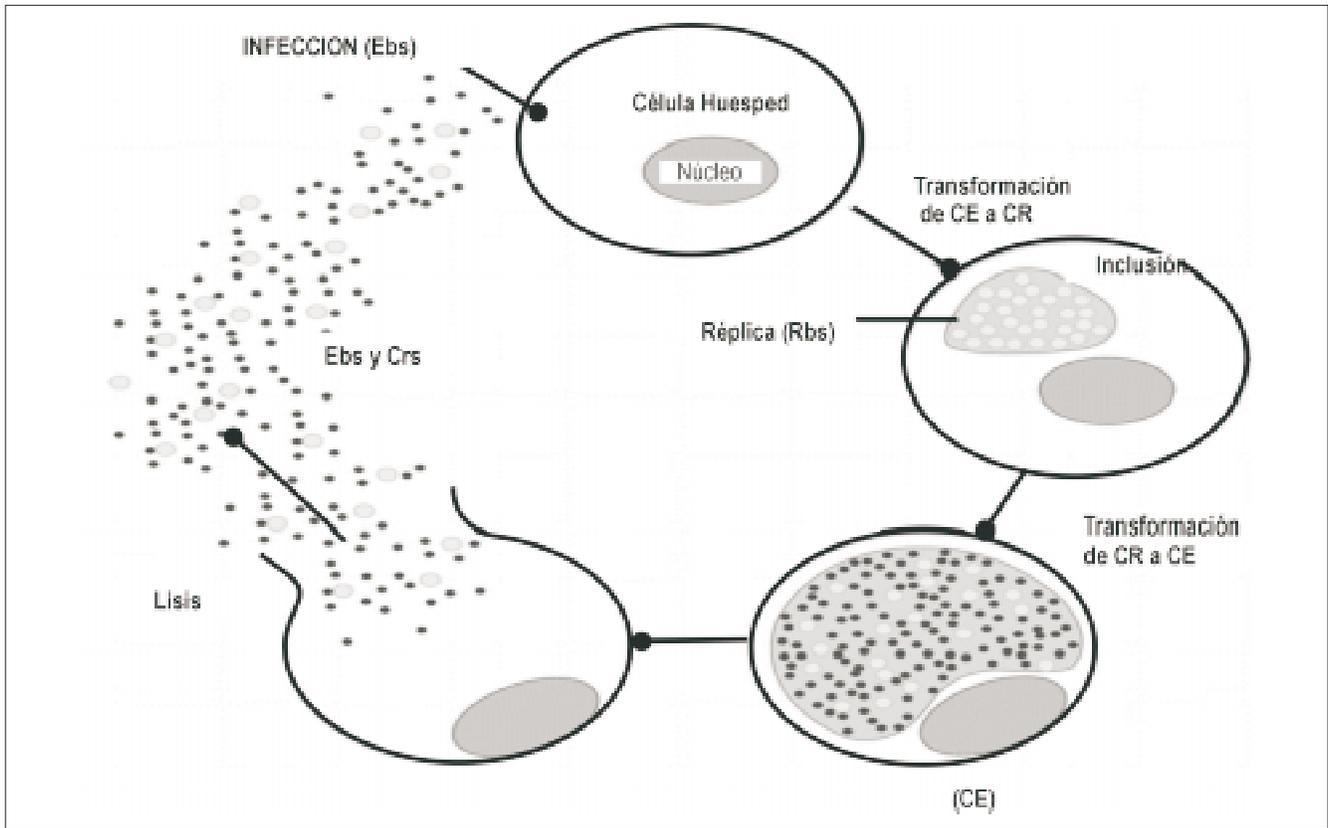


Figura 4: Ciclo de vida de *C. trachomatis*. El cuerpo elemental se introduce por fagocitosis a la célula huésped dentro de una vacuola.

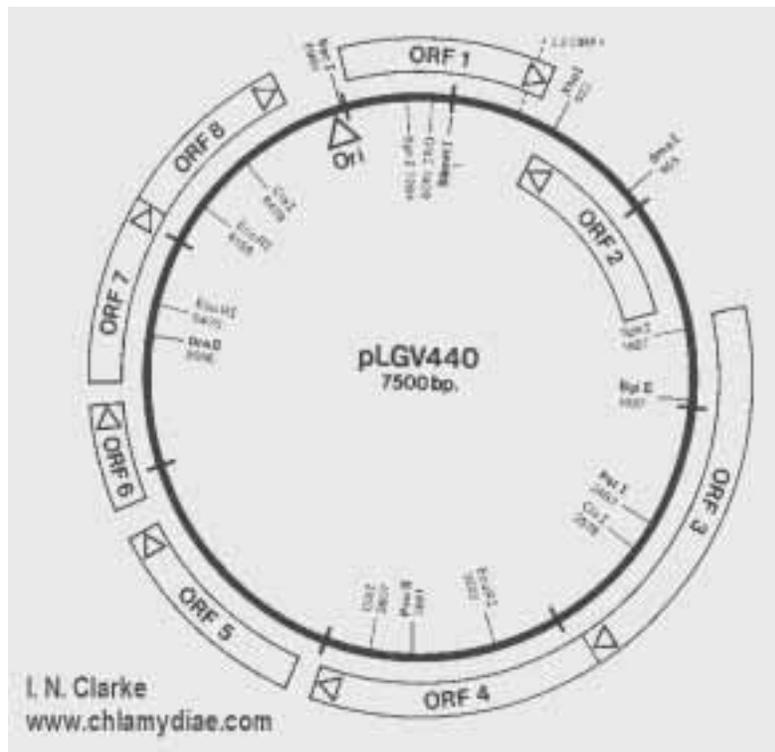


Figura 5: Plásmido Chlamidial descrito inicialmente por Lovett et al., (1980) Se indican los sitios de corte con enzimas de restricción, los marcos abiertos de lectura y el origen de la réplica.

mediación de interferón gamma en el desarrollo de la infección persistente. Las Chlamydias que se han hallado en el tracto genital humano poseen en esta región un gen homólogo de citotoxinas reportadas en *E. Coli* enterohemorrágica 0157 y *Clostridium*(10).

Chlamydia es un organismo aeróbico que utiliza el glutamato como fuente primaria de carbono, complementada por glucosa y 2 oxoglutarato, cada uno tiene diferentes papeles dependiendo de la fase del desarrollo chlamydial. Se cree que Chlamydia es un parásito energético porque importa ATP de la célula huésped; sin embargo, en el análisis de la secuencia de su genoma se encontraron genes que codifican ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares probablemente involucradas en la síntesis de ATP (15). La presencia y expresión de genes involucrados en las vías metabólicas para la generación de ATP sugiere que Chlamydia no es un estricto auxótrofo de ATP (16). El análisis de la transcripción de genes en la infección activa versus la infección persistente sugiere que en la primera fase de la infección activa la energía requerida para el metabolismo es derivada del ATP de la célula huésped. A diferencia de lo que sucede en la infección persistente en donde la fuente primaria de energía no es producida por el huésped (17).

La figura 5 muestra el plásmido, con la posición de los 8 marcos abiertos de lectura, conjuntamente con la posición de los sitios de corte para endonucleasas de restricción. Las bases de nucleótidos están numeradas desde el inicio con 22 bases púricas repetidas en tandem.

Todos los plásmidos de *C. trachomatis* aislados de humanos son extremadamente similares con menos de un 1% de variaciones en la secuencia de nucleótidos, todos tienen alrededor de 7.500 nucleótidos, con 8 marcos abiertos de lectura (10, 18).

Todos los plásmidos Chlamydiales tienen 22 pares de bases repetidas en tandem en la región intergénica entre ORF1 y ORF8; este grado de conservación

sugiere que esta región es extremadamente importante, por ser análogo con el origen de replicación de algunos plásmidos de *E. coli*, la secuencia de iniciación del codon para ORF es también conservado para cada plásmido; ATG para los ORFs 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y GTG para los ORFs 7 y 8. Todos los ORFs son transcritos de la misma hebra, con excepción de ORF 2, el cual es transcrito de la hebra complementaria en la dirección indicada en la Figura 5.

Interacción Huésped – Parásito

La característica más notable de la infección por *Chlamydia trachomatis* es el equilibrio que con frecuencia se alcanza entre el huésped y el parásito, y que resulta en una infección prolongada persistente. La propagación de una especie a otra conduce con frecuencia a la enfermedad. El huésped infectado regularmente produce anticuerpos a varios antígenos de *Chlamydia* que tienen escaso efecto protector contra la reinfección. Por lo general, el agente infectante persiste en presencia de títulos aumentados de anticuerpo (1).

Factores de Virulencia

Chlamydia trachomatis se ha clasificado en 18 serotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3, L3a. Esta clasificación está basada en el análisis de la proteína principal de la membrana externa (MOMP). La MOMP contiene cuatro dominios variables (DVs) que son flanqueados e interespaciados por cinco dominios constantes. Tres de los cuatro DV (DV1, DV2 y DV4) se encuentran en la superficie y contienen epítopes antigénicos que son sitios blanco para la serotipificación.

Epidemiología

La infección causada por *Chlamydia* es una de las enfermedades de transmisión sexual más prevalente. La Organización Mundial de la Salud estimó que en 1995 ocurrieron 89 millones de casos en el mundo y

se calcula que el costo por morbilidad y secuelas de esta infección es de \$2.4 billones por año (19). En los Estados Unidos, las infecciones bacterianas por *Chlamydia trachomatis* son las más comúnmente reportadas con 4.5 millones de casos anualmente (20-22). En Colombia, no se conocen datos reales de la prevalencia de la enfermedad.

Las infecciones por *C. trachomatis* se dan en todas las sociedades. En países en desarrollo la enfermedad es más común entre minorías, grupos socioeconómicos bajos y gente que vive en áreas urbanas. Las mujeres tienen mayor riesgo de ser asintomáticas que los hombres.

En países industrializados, la mayor transmisión de infecciones Chlamidiales es sexual. En los Estados Unidos, aproximadamente 4 millones de casos de infección chlamydial se divulgan por año, con un predominio de 5% en los grupos de alto riesgo como lo son las mujeres adolescentes y adultas con vida sexual activa con una incidencia del 10%.

Otro problema causado por la infección con *C. trachomatis* especialmente por el serotipo G es el riesgo de desarrollar cáncer cervical y en los continentes africano y asiático es la principal causa de ceguera. El Linfogramuloma Venéreo es una infección transmitida sexualmente que ocurre con baja frecuencia en Norteamérica y Europa pero es común en África, Asia y Sudamérica.

Cada año millones de personas padecen una infección genital causada por *Chlamydia trachomatis*. Aproximadamente entre un 5% y un 9% de mujeres sexualmente activas son portadoras asintomáticas del microorganismo. Esta prevalencia aumenta aun cuando la población estudiada pertenece al grupo de adolescentes.

La detección de *C. trachomatis* en mujeres es importante, ya que éstas pueden transmitir la enfermedad a su pareja y, si está embarazada, al recién nacido; además, si no reciben tratamiento, pueden sufrir complicaciones como embarazo ectópico e

infertilidad. El estudio de la población con riesgo de infectarse, así como la administración de tratamientos eficaces, son medidas necesarias para lograr una disminución de la transmisión, el control de la enfermedad y la prevención de las complicaciones.

Actualmente se propone realizar programas de screening, que han logrado un impacto favorable en la salud de la población en varios países, al disminuir en forma significativa la tasa de infección, con sus complicaciones y los costos ocasionados.

Con el fin de prevenir la transmisión de la infección por *Chlamydia trachomatis*, se recomienda realizar el test en los siguientes casos:

Cuadros Clínicos: Las *Chlamydias* pueden producir cuadros clínicos diversos. En los últimos años, las investigaciones efectuadas en *C. trachomatis* han demostrado que además de producir el linfogranuloma venéreo, son la causa de infecciones oculares, neumonías en el niño y, sobre todo, infecciones genitales en el hombre y la mujer (Tabla 1) (23).

Algunos de los síndromes relacionados con *chlamydia trachomatis* son: uretritis, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria, epididimitis y proctitis.

Mujeres no embarazadas o menores de 20 años sexualmente activas:	Con cervicitis mucopurulenta evidenciada en el examen pélvico de rutina.
Mujeres entre 20 y 24 años:	Si no utilizan métodos anticonceptivos de barrera o si tienen una nueva pareja o múltiples parejas en los últimos tres meses.
Mayores de 24 años:	Que cumplen con los dos criterios anteriores.
Menores de 25 años:	Con nueva pareja sexual. Con más de un compañero sexual. Con parejas sexuales que a su vez tienen múltiples parejas.
Embarazadas o en el tercer trimestre:	Con riesgo de infección

Tabla 1 : Situaciones en las que se recomienda presentar un examen para el diagnóstico de *C. trachomatis*.

En la Tabla 2 se relacionan algunas enfermedades causadas por Chlamydia.

Infección en la Mujer: La cervicitis es la manifestación clínica más frecuente de la infección por *C. trachomatis* en la mujer. Sin embargo, el 70% de las mujeres infectadas no tienen síntomas, mientras que en el tercio restante las evidencias clínicas son poco específicas de infección como flujo genital, dolor abdominal o pélvico, sangrado y/o disuria.

La presencia de disuria puede indicar una uretritis acompañante, lo que sucede en el 35% de los casos; en otros casos, solo la uretra está comprometida, y la infección uretral se manifiesta como piuria o disuria con cultivo negativo (23% de los casos).

Las manifestaciones clínicas incluyen cervicitis, uretritis, endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria o abscesos en las glándulas de Bartholini, que pueden dar lugar a oclusiones tubáricas y ser la causa de esterilidad. Aunque el sitio inicial de la infección es usualmente cervix, la uretra y el recto también pueden verse afectados. Cuando los síntomas ocurren se presentan descarga vaginal y disuria (23).

Las complicaciones por Chlamydia trachomatis en la mujer por orden de aparición son: (1) Infección vaginal: al inicio del contacto, portadora asintomática, (2) Cervicitis: Inflamación del cuello de la matriz por la infección, (3) Endometritis: Infección de la mucosa de la cavidad de la matriz, (4) Salpingitis: Inflamación de las trompas de Falopio, (5) Enfermedad Inflamatoria Pélvica: Infección de la cavidad peritoneal y estructuras anexas.

Infección en el Hombre: La infección de *C. trachomatis* en hombres es la causa más común identificada de uretritis no gonocócica (UNG). Aunque la uretritis usualmente resulta en una descarga mucosa, es reconocido un espectro que va desde la ausencia de descarga a una descarga francamente purulenta. Entre los hombres heterosexuales, las infecciones por Chlamydia son usualmente uretrales y más del 50% son asintomáticas. Cuando los síntomas

Especies	Serotipo	Enfermedades
<i>C. trachomatis</i>	L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo (LGV)
<i>C. trachomatis</i>	A, B, C	Tracoma
<i>C. trachomatis</i>	D, E, F, G, H, I, J, K	Conjuntivitis (en adulto y recién nacido), uretritis no gonocócica, cervicitis, salpingitis, proctitis, epididimitis, neumonía del recién nacido
<i>C. psittaci</i>	Varios serotipos no definidos	Psittacosis
<i>C. pneumoniae</i>	Un serotipo	Neumonía atípica, tal vez asma y enfermedad Coronaria
<i>C. pecorum</i>		Neumonitis infecciosa

Tabla 2. Enfermedades causadas por diferentes especies y serotipos de Chlamydia.

ocurren, usualmente de 1 a 3 semanas después de la exposición, estos son indistinguibles de los causados por la gonorrea. En el hombre pueden presentarse complicaciones como epididimitis o infección de los ductos espermáticos de los testículos (23).

Linfogranuloma Venéreo : Es una enfermedad sistémica producida por *C. trachomatis* tipos L1-L3, que se inicia por la aparición de una pápula o vesícula en la piel de la región genital, la cual se transforma en una úlcera indolora que evoluciona hacia la curación. La infección difunde por vía linfática, de manera que desde el primer mes se produce una adenitis inguinal, que se reblandece y forma un absceso que posteriormente se fistuliza y abre hacia el exterior. Le sigue una fase de esclerosis, con formación de estenosis en el recto, uretra o vagina (23,1).

Infección en Niños: *C. trachomatis* es la causa más común de conjuntivitis neonatal y una de las causas más comunes de neumonía en la infancia temprana. A los 5 - 14 días del nacimiento se puede presentar una conjuntivitis purulenta; la infección generalmente respeta la córnea y evoluciona lentamente hacia la curación. Sin embargo, en algunos casos puede volverse crónica

y producir lesiones corneales irreversibles. Muchas veces, consecutivo a una conjuntivitis neonatal puede presentarse la neumonía, que se caracteriza por una tos persistente y polipnea, que a veces se hace paroxística (23).

Otros procesos : *Chlamydia trachomatis* también puede producir en el recién nacido otros procesos como rinitis, rinofaringitis, otitis y vulvitis (23).

La neumonía chlamidial de infantes es una enfermedad que se encuentra en niños de uno a tres meses de edad. El síndrome es bastante característico, los niños desarrollan taquipnea (ocasionalmente apnea) y tos.

Chlamydias han sido recuperadas del tracto nasofaríngeo, garganta y biopsias de pulmones de infantes con esta neumonía. *C. trachomatis* puede ser cultivada de tejidos nasofaríngeos. Se ha demostrado que en la neumonía se desarrollan altos títulos de IgM, contrario a lo que sucede en los casos de conjuntivitis de inclusión.

Trachoma es una conjuntivitis crónica con una marcada reacción folicular y una hipertrofia papilar de la conjuntiva, como resultado de la necrosis de los folículos, la conjuntiva puede desarrollar cicatrices. Estas lesiones, llamadas trichiasis y entropion, son las lesiones responsables de la ceguera por trachoma. La córnea es dañada por daño mecánico al abrir y cerrar los ojos y por infección secundaria, resultando en la ceguera. La patogénesis del trachoma es dependiente de la interacción o de los efectos combinados entre la *C. trachomatis* y un segundo patógeno (*Haemophilus spp* and *Moraxella spp.*); con persistentes o múltiples reinfecciones es posible que la hipersensibilidad también juegue un rol en esta enfermedad.

El período de incubación para la mayoría de las infecciones oculares con *C. trachomatis* es de aproximadamente de 1-2 semanas (23). La presencia de inclusiones citoplasmáticas características en las células de la conjuntiva es relevante; la distorsión de las

estructuras externas del ojo interfiere también con el flujo lacrimal normal, con el crecimiento de las pestañas y con el funcionamiento glandular; en consecuencia, las infecciones bacterianas de los globos oculares por efecto del trachoma son frecuentes. Todos estos factores coadyuvan a la pérdida de la visión (24).

El trachoma se ha reconocido desde la antigüedad y las inclusiones intracitoplasmáticas características de las infecciones por *C. trachomatis* fueron identificadas en células epiteliales conjuntivales en 1907. En 1910, Lindner describió inclusiones en células epiteliales de cervix de la madre de un lactante con conjuntivitis, y también demostró inclusiones epiteliales en el cervix de la pareja de un hombre con uretritis no gonocócica (UNG).

Diagnóstico

Existen varias técnicas para realizar el diagnóstico de infecciones causadas por *Chlamydia* (24,25); las más utilizadas son:

Método de detección directa: Tinciones de Giemsa, Macchiavello por técnicas de inmunofluorescencia.

Métodos de detección indirecta: Cultivo en huevos embrionados en cultivos de células de McCoy, detección de antígenos, detección de anticuerpos por la técnica de fijación del complemento y la prueba de Frei, diagnóstico molecular: sondas de ADN, PCR y LCR.

Detección Directa: los cuerpos de inclusión de *Chlamydia trachomatis* contienen glucógeno, que históricamente se han coloreado con Yodo, Giemsa y Gram; después de incubar 48-72 horas los cubreobjetos son extraídos y coloreados. Si hay gran presencia de gran cantidad de cuerpos de inclusión de *Chlamydias*, el diagnóstico se puede establecer con facilidad por los métodos de coloración con Giemsa o Giménez, que permiten distinguir las inclusiones por su color de reacción, morfología y localización; las inclusiones se ubican en el citoplasma de las células epiteliales y tienen a menudo una ubicación perinuclear; sin embargo se

requiere de un microscopista especializado. La coloración de Gram no es específica pues presenta muchas variaciones; la tinción con yodo tiene dificultades pues el glucógeno está presente solo en algunas fases del desarrollo del ciclo de la *Chlamydia trachomatis* y algunas células normales de la cervix contienen glucógeno dando falsos positivos.

En las células epiteliales del raspado conjuntival teñido con anticuerpos fluorescentes o con Giemsa se encuentran las inclusiones citoplasmáticas típicas; esta técnica es más sensible para el diagnóstico de las infecciones oculares en el recién nacido y en uretritis que para el diagnóstico de las infecciones cervicales.

Inmunofluorescencia Directa (Ifd): Los anticuerpos monoclonales van dirigidos contra el antígeno específico de especie, sobre lipopolisacáridos (LPS) de membrana y sobre la proteína principal de la membrana externa de la *Chlamydia trachomatis* (MOMP) (21,23, 27). Los antígenos son detectados en las células obtenidas del sitio infectado con el empleo de un anticuerpo monoclonal conjugado a un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína). Los cuerpos elementales son las formas infecciosas que se observan en muestras clínicas, son pequeños (0.25-0.35 μ m), de forma redonda, bordes netos y bien definidos. La presencia de células de epitelio columnar aumenta la sensibilidad de la prueba. Esta técnica presenta una sensibilidad del 80-90% y una especificidad del 98-99% (36, 47). Es un método sensible para detección de conjuntivitis de inclusión y debe ser realizada por personal altamente capacitado, con un microscopio de alta calidad para alcanzar niveles valiosos de diagnóstico.

Aislamiento – Cultivo: Es el método más sensible y considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* del tracto genital tanto en hombres como en mujeres. La sensibilidad es del 70-85% (23). Las muestras más indicadas para la

realización del cultivo son: muestras uretrales de hombres y mujeres asintomáticos, muestras nasofaríngeas, muestras rectales y muestras vaginales de niñas prepúberes y en casos de abuso sexual (28).

Como la *Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada requiere de una célula hospedadora para su desarrollo y multiplicación. Las líneas celulares más utilizadas son células McCoy (fibroblastos de ratón), las HeLa 229 (carcinoma humano), las BHK-21 (células de ovario de hámster) y recientemente BGMK. El aislamiento también puede obtenerse por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollo embrionados de 6 - 8 días de edad (29,30).

Las líneas celulares se tratan con irradiación, dextran, cicloheximida, para aumentar la sensibilidad del aislamiento. Antes de inocular la muestra se puede sonificar para romper las células huésped y permitir que los cuerpos elementales se separen (31).

La línea celular más utilizada es la McCoy tratada con ciclohexamida. El cultivo se propaga en una monocapa sobre un cubreobjeto inoculando las muestras; si hay suficiente número de cuerpos elementales de *Chlamydia* ellos infectan las células y crecen para formar inclusiones citoplasmáticas; luego de ser infectadas las inclusiones, son visualizadas después de 48-72 horas de incubación por tinción con anticuerpos marcados con fluorescencia que se ligan al lipopolisacárido de la *Chlamydia*; otros reconocen específicamente la proteína de membrana MOMP para *Chlamydia trachomatis*. La visualización directa de las inclusiones que posee una morfología distintiva contribuye al 100% de especificidad del diagnóstico por cultivo (23). A todos los cultivos negativos se les debe realizar un segundo pase después de 96 horas de incubación.

Determinación de Antígenos-ELISA: Es un test de diagnóstico basado en la detección inmunohistoquímica de antígenos de lipopolisacáridos de género

específico y fueron desarrolladas durante los años 1980; actualmente se comercializa un gran número de estos tests(23).

La técnica del inmunoensayo enzimático para la determinación del antígeno de *Chlamydia* permite el análisis de diferentes tipos de muestras y un gran número de muestras; los resultados se obtienen a las cuatro horas después de iniciada la prueba. Se detectan antígenos lipopolisacáridos específicos del género extraídos de los cuerpos elementales de la muestra, los cuales son más abundantes y más solubles que la proteína MOMP (23).

El fundamento de la técnica consiste en que *Chlamydia trachomatis* cuando está presente en la muestra, se une al anticuerpo monoclonal anti-LPS (IgG murina) usado como el reactivo detector, presente en la placa o perla comercial, formando un complejo que se revela al adicionar el conjugado del anticuerpo anti-inmunoglobulina humana con la peroxidasa (anticuerpo anti-murino IgG) y, posteriormente, el sustrato de la enzima. Se desarrolla un color amarillo a naranja en proporción a la cantidad de antígeno presente en la muestra se detecta por medio de un detector espectrofotométrico (23). Una desventaja de esta técnica es que los LPS puede dar reacciones cruzadas con los LPS de otras bacterias Gram negativas y producir falsos positivos (31- 33).

Se han realizado estudios que comparan múltiples ELISAS directos con técnicas de cultivo, demostrando que tienen una sensibilidad menor y algunos son menos sensibles que otros. Esta técnica, sin utilizar reactivos bloqueadores de anticuerpos, presenta una especificidad de cerca del 97%; con reactivos bloqueadores la especificidad es de cerca del 99% (23,34,35).

Determinación de Anticuerpos: Debido a múltiples problemas, el diagnóstico de la infección por *Chlamydia*, con la determinación de anticuerpos, es limitado. Una sola muestra de suero es inadecuada y los sueros apareados suelen ser difíciles de obtener

porque la enfermedad suele ser inicialmente inaparente o tener un largo periodo de incubación lo que dificulta obtener el suero en la fase aguda de la infección. Los anticuerpos persisten por largos periodos y la detección en un suero indica, únicamente, una exposición anterior al microorganismo. Un aumento de 4 diluciones del título, entre la fase aguda y la de convalecencia, acompañado de sintomatología clínica, apoya el diagnóstico de la infección por *Chlamydia*. La concentración de anticuerpos está relacionada con la naturaleza de la infección. Generalmente, entre más invasivo el organismo, más alto el título de los anticuerpos. Los títulos más altos se encuentran en los casos de linfogranuloma venéreo activo; los títulos de las mujeres con salpingitis son más altos que los de cervicitis y los de las mujeres, en general, son más altos que los de los hombres.

Fijación del Complemento: Esta prueba detecta anticuerpos contra el género *Chlamydia*, pero no distingue entre especies e inmunotipo; se puede usar para medir anticuerpos de la psitacosis y Linfogranuloma venéreo.

Microinmunofluorescencia Indirecta: Esta técnica utiliza pequeños volúmenes de suero; es muy sensible para detectar, inmunotipificar y cuantificar anticuerpos. Anteriormente se utilizaron antígenos por separado para cada inmunotipo; actualmente se ha encontrado que es más práctico utilizar un pool de antígenos. La prueba puede ser utilizada con conjugados monoespecíficos de las clases IgM, IgG e IgA.

Técnicas Moleculares: Los recientes desarrollos de métodos moleculares patógeno específicos han revolucionado el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual, tests basados en la tecnología de la amplificación de ácidos nucleicos pueden utilizar muestras como orinas, hisopados vaginales, disminuyendo la necesidad de exámenes físicos y aumentando la especificidad y la sensibilidad (36-37).

La primera técnica molecular implementada utilizó una sonda de DNA quimioluminiscente, la cual hibridaba con una secuencia de rRNA 16S específica de la especie de Chlamydia; las chlamydias poseen hasta 10^4 copias de estos RNA. Una vez formados los híbridos se absorbían sobre esferillas y la cantidad de quimioluminiscencia se podía detectar en un luminómetro. Esta técnica presenta una sensibilidad del 85% y una especificidad del 98-99%. Ha sido aprobada para el uso en muestras genitales y oculares (38, 39).

Debido a la dificultad en el diagnóstico y a los avances científicos y tecnológicos se han venido implementando técnicas alternas de valoración de la Chlamydia a escala molecular, basadas en la amplificación del DNA utilizando PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa) (36). Estos procedimientos son altamente sensibles, proporcionan alto grado de especificidad, lo que contribuye a la obtención de resultados de óptima calidad. La PCR es un método que permite detectar un bajo número de copias del DNA de Chlamydia, lo que la hace más sensible que otras pruebas (23, 40, 41, 42).

Un método comercial disponible es el test AMPLICOR CT PCR (Roche Molecular System) un ensayo comercialmente disponible y automatizado que proporciona un control interno y una mezcla maestra para PCR. El control interno contiene regiones de unión al primer idénticas a los blancos de la *C. trachomatis*, pero que son detectados con sondas específicas. Se amplifican ambos, la *C. trachomatis* y el blanco de DNA, seguida por una detección selectiva de cada amplicon. La falla en la detección del control interno, después de la amplificación indica una inhibición en la PCR (43, 44,45, 46,47).

En el ensayo de la Reacción en Cadena de la Ligasa se emplean cuatro oligonucleótidos sintéticos (dos por cadena de ADN) que hibridan a sitios específicos en el plásmido críptico. Una vez que los

oligonucleótidos se hibridizan, aquel intervalo es completado por la ADN polimerasa y sellado por la enzima ligasa; este proceso de dos pasos de «llenado» y «cerrado» del intervalo hace a la LCR, en teoría, muy específica, en la que se produce una amplificación logarítmica del ADN molde. El producto de la LCR es detectado en un instrumento automatizado que usa un sistema de captura inmunocolorimétrico (48 - 50).

Un ensayo confirmatorio utiliza cebadores dirigidos contra una porción del gen que codifica las proteínas de membranas externas. Las técnicas de amplificación son más útiles para el diagnóstico de uretritis en hombres o uretritis en cervicitis en las mujeres, con el beneficio adicional de que la prueba puede utilizarse por una muestra obtenida por métodos no invasivos (51,52)

Genotipificación de especies de Chlamydias por análisis de restricción del gen Omp-1

Existen grandes inconvenientes en la serotipificación de la MOMP por lo que el análisis por RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica) del previamente amplificado gen Omp-1, que codifica para la MOMP, es simple, rápido y una poderosa herramienta en estudios epidemiológicos para realizar la genotipificación. Este método permite la diferenciación de no solo todos los serotipos y serovariantes, sino también de genovariantes. Lo primero que se hace es la amplificación del gen Omp-1 mediante la técnica de PCR (reacción de la cadena de la polimerasa). Luego se procede a digerir el producto obtenido mediante enzimas de restricción. Para cada tipo de Chlamydia se obtendrá un patrón de bandas características en el corrido electroforético (53,54).

Otra técnica utilizada es el método de Secuencia Directa- La técnica, reconocida mundialmente como la prueba de oro para la genotipificación de cepas, permite identificar las variantes de genes que caracterizan los serotipos de *C. trachomatis* (19).

Esta información es de gran importancia para el desarrollo de vacunas contra esta enfermedad que hoy constituye un problema de salud pública.

Perspectivas:

En la próxima década se espera un significativo avance en el conocimiento molecular de *Chlamydia trachomatis* nivel mundial que permita el desarrollo de vacunas para el control y erradicación de las patologías causadas por este agente. En Colombia, el estudio y la caracterización molecular de *Chlamydia* aportará al conocimiento de las cepas que causan enfermedad en nuestra población, contribuyendo a la implementación de nuevos y mejores métodos diagnósticos, así como de tratamientos más adecuados, permitiendo generar valiosos aportes para desarrollar estudios filogenéticos bacterianos. La bioinformática como herramienta, apoyará los estudios sobre el genoma de *Chlamydia*, para determinación de tasas de mutación y otros eventos moleculares en el estudio de este interesante microorganismo.

REFERENCIAS

- Jawezt E, Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno; 1996.
- Everett K. IV Encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones de *Chlamydia*. Helsinki, Finlandia; 2002.
- Mandell GL, et al. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000.
- Matsumoto A. Structural characteristics of clamycial bodies. In: Microbiology of *Chlamydia*; 1988. p. 21-45.
- Raulton J. Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interaction. Mol Microb 1995;15(4):607-16.
- Raulton J, et al. Localization of *C.trachomatis* heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro. Inf and Immunity 1998;66(5):2323-9.
- Nichols, et al. New view of the surface projections of *Chlamydia trachomatis*. J of Bacteriology 1998;5:344-9.
- Koneman EW, et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000.
- Bush RM, Everett KDE. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. International Journal of systematic and evolutionary microbiology 2001;51:203-20.
- Kalma, et al. Comparatives genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *trachomatis*. Nature Genetics 1999;21:385-9.
- Read, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of human: *Chlamydia trachomatis*. Science 2000;282:754-9.
- Makarova, et al. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. Trends in Biochemical Science 2000;25:50-2.
- Shirai, et al. Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWLO29 from USA. Nucleic Acids Res 2000;28:2311-4.
- Zomorodipour A, Andersson. Obligate intracellular parassites: *Rickettsias prazekii* and *Chlamydia trachomatis*, FEBS letters 1999;452.
- Stephens R, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 1998;282:754-9.
- Hatch TP, Al-Hossainy E, Silverman JA. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. Journal of Bacteriology 1982;150:662-7.
- Gerard HC, Freise J, Wang Z, et al. *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. Persistent infection. Microbes and Infection 2002;4:13-22.
- Hartley JC, et al. PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. Journal of Clinical Microbiology 2001;39(9):3072-9.
- Dean D, Millman, K. Molecular and Mutation Trends Analyses of *omp1* Alleles for Serovar E of *Chlamydia trachomatis*. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 1997;99(3):475-83.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guiderlines for treatment of sexually transmitted disease. Morbidity and Mortaly Weekly reports 1998; 42 (Nº RR1): 1-118.
- Stamm W. *Chlamydia trachomatis* Infections: Progress and Problems. The Journal of Infectious Diseases 1999;179(Suppl 2):S380-3.
- Joyner J, Douglas J, Foster M, et al. Persistence of *Chlamydia trachomatis* Infection Detected by Polymerase Chain reaction Untreated Patients. Sexually Transmitted Diseases 2002;196-200.
- Black C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Microbiol Rev 1997;10:160-84.
- Ingraham JL, Ingraham CA. Introducción a la Microbiología. Barcelona: Ed. Reverté S.A.; 1998.
- Schachter J. Which test is best for *Chlamydia*? Curr Opin Infect Dis 1999;12:41-5.
- Schachter J, et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet (letter). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001;51:249.
- Lampe MF, Suchland RJ, Stamma WE. Necleotide sequence of the variable domains whitin the majour outer protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1993;61:213-9.

28. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for treatment of sexually transmitted disease. Morbidity and Mortality Weekly reports 1998; 42: (N° RR14): 1-102.
29. McComb DE, PuznlaK CI. Micro cell culture method for isolation of Chlamydia trachomatis. *Appl Microbiol* 1974;28:727-9
30. Youder BI, Stamm WE, Koester CM, Alexaner ER. Microtest procedure for isolation of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 1981;13:1036-9.
31. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:119-36
32. Kellogg JA, Seiple W, Hick ME. Cross-reactions of clinical isolates of bacteria and yeasts with the chlamydiazyme test for chlamidial antigen, before after use of a blocking agent. *Am J Clin Pathol* 1992;97:309-12.
33. Stamm WE. Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary infections. *Ann Intern Med* 1988;108:710-7.
34. Moncada J, Schanchter J, Shafer MA, Williams E, Gourlay L, Lavin B, et al. Detecion of Chlamydia trachomatis in first catch urine samples from symptomatic and asymptomatic males. *Sex Transm dis* 1994;21:8-12.
35. Newhall WJ, Delisle S, Fine D, Jhonson RE, et al. Head to Head evaluation of live different nonculture Chlamydia tests relative to quality assured culture standard. *Sex Transm Dis* 1994;21:S165-S166 (Abstract).
36. Chernsky M, Jang D, Lee H. Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infection in Men and Women by Testing First Void Urine by Ligase Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;32(11):682-5.
37. Gaydos C, Crotchfelt K, Shah N, et al. Evaluation of Dry and Wet Transporte Intravaginal Swabs in Detection of Chlamydia and Neisseria gonorrhoeae infections in Female Soldiers by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;32:758-61.
38. Andreu D, Pumarola S, Sanz C, et al. Prevalencia de infección por Chlamydia trachomatis determinada mediante métodos de Biología molecular. *Enfermedades infecciosas. Microbiología Clínica* 2002;20(5):205-7.
39. Bass C, Jungkind N, Silverman N. Clinical Evaluation of a New Polymerase Chain Reaction Assay for detection of Chlamydia trachomatis in Endocervical Specimens 1993;31(10):2648-53.
40. Cribb P, Scapini J, Serra E. One Tube Nested Polymerase Chain Reaction for detection of Chlamydia trachomatis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(6):897-900.
41. Toye B, Peeling R, Jessamine P, et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections in Asintomatic Men and Women by PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34(6):1396-1400.
42. Toye B, Woods W, Bobrowska R. Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for Chlamydia trachomatis Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;3(8):2356-8.
43. Niederhauser C, Kaempf L. Improved Sensitivity of Chlamydia trachomatis Cobas Amplicor Assay Using an optimized Procedure for Preparation of Specimens. *Eur Jmicrobiol Infect Dis* 2003;22:118-21.
44. Schlott T, Ruda G, Hoppert M. The In Situ Polymerase Reaction for Detection of Chlamydia trachomatis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1998;46(9):1017-23.
45. Altwegg M, et al. Comparison of Gen Probe PACE 2, Amplicor Roche. And conventional PCR for the detection of Chlamydia trachomatis in genital specimens. *Med Microbiol Lett* 1999;3:181-7.
46. Van Der Pol. Multicenter Evaluation of the AMPLICOR and Automated COBAS AMPLICOR CT/NG Tests for Detection of Chlamydia trachomatis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38(3):1105-12.
47. Quinn T, Welsh L, Lentz A, et al. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachomatis Infection in Urine Samples for Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. 1996; 34(6):1401-6.
48. Wandall D, Ostergaard L, Overgaard L. Opportunistic screening for Chlamydia trachomatis cervicitis: the value of cytobrush specimens for detection by PCR compared with culture. *APMIS*, 1998;106:580-4.
49. Wiesenfeld H, Uhrin M, Dixon B. Diagnosis of Male Chlamydia trachomatis Urethritis by polimerse Chain Reaction. *Sexually Transmitted Diseases* 1994;21(5):268-71.
50. Crotchfelt K, et al. Detection of Chlamydia trachomatis by the gen probe amplified Chlamydia Trachomatis assay (AMP) in urine especimens from men and women and endocervical specimen from women. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;38(2):391-4.
51. Pannekoek Y, Westenberg S, De Vries J. PCR Assessment of Chlamydia trachomatis Infection of semen Specimens Processed for Artificial Insemination. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;3763-7.
52. Verhoeven V, Avonts D, Mehesus A, et al. Chlamydial infection: an accurate model for opportunistic screening in general practice. *Sex Transm Infect* 2003.
53. Yang C, Maclean I, Brunham R. DNA Sequence Polymorphism of Chlamydia trachomatis omp1 Gene. *The Journal of Infectious Diseases* 1993;168:1225-30.
55. Bandea CI, et al. Typing of Chlamydia trachomatis strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (omp1). *Sex Transm Infect*.2001;77:419-22.
56. López Hurtado M, Guerra 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(3):140-50.
57. The web site for chlamydia researchers health care professionals and students. Disponible en: URL: http://www.chlamydiae.com/Professional_index.htm