

## I. RESUMEN

Las infecciones oculares causadas por *Chlamydia trachomatis* suelen causar síntomas de ardor bilateral y sensación de cuerpo extraño, al igual que infecciones víricas o alergias, lo que hace difícil un diagnóstico conclusivo y pueden pasar inadvertidas. El presente estudio fue realizado en 120 pacientes de ambos sexos, mayores de 15 años que acudieron a consulta por primera vez a la Unidad Nacional de Oftalmología, con síntomas de infección clamidial, con el fin de evaluar la concordancia de dos métodos diagnósticos de diferente principio. Uno de los métodos fue la observación directa con coloración de Giemsa y el otro fue la prueba rápida ICH-502 Quick-Check (Acon Laboratorios, USA).

Se tomó la muestra mediante un raspado del tarso superior de ambos ojos de los pacientes. A cada una se le practicó tanto la prueba rápida como la coloración de Giemsa. Todas las muestras dieron resultado negativo con la prueba rápida, mientras que 32 por ciento presentó cuerpos de inclusión clamidiales con la tinción de Giemsa, mostrando falta de concordancia entre ambas pruebas según el índice de kappa. Los resultados indican que la observación microscópica de la tinción de Giemsa sigue siendo la prueba diagnóstica de elección por ser de bajo costo y con resultados confiables para diagnosticar tempranamente infecciones oculares por *C. trachomatis*. Esto último bajo la premisa de que una muestra tomada adecuadamente sea analizada por personal capacitado. Se observaron escasos cuerpos de inclusión en 24.5 por ciento de los casos, indicando que las características epidemiológicas de *C. trachomatis* relacionada con tracoma, orientan hacia una entidad más benigna.

## II. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una variedad de métodos diagnósticos disponibles con los que se ha incrementado el reconocimiento del papel que juegan las especies del género *Chlamydia*, en especial *C. trachomatis*, en la patogénesis de diversas enfermedades. Desde hace algunos años se considera al género *Chlamydia* como un grupo de “bacterias especializadas” por ser de tamaño pequeño y reproducirse tan sólo en el interior de la célula huésped, lo que contribuyó a que se considerara como virus por mucho tiempo. Sin embargo, existen importantes diferencias como su división por fisión binaria, su contenido de ácidos nucleicos (ADN y ARN), su pared celular es Gram negativo y son sensibles a las sulfonamidas y a otros antibióticos (1 - 3).

*C. trachomatis* afecta a una gran parte de la población mundial produciendo enfermedades a nivel genital, pulmonar y ocular; en Guatemala por ser un agente etiológico importante, con fines de este estudio, ha tenido la mayor atención las infecciones a nivel ocular. En el adulto la infección ocular por *C. trachomatis* se suele diagnosticar de forma errónea y para su reconocimiento es necesario sospechar de la enfermedad y conocer sus características clínicas. Muchos de los casos no son diagnosticados a tiempo, sino cuando ya existe un tracoma establecido, que afecta aproximadamente a 400 ó 500 millones de personas y es la principal causa de ceguera prevenible en el mundo (1, 3, 4).

La infección ocular causada por *C. trachomatis* se diagnostica en el laboratorio por una prueba citológica con tinción de Giemsa, demostrando las inclusiones basófilas intracitoplásmicas en un frote de raspado del tarso conjuntival. Esta es una prueba sencilla, rápida y de alta especificidad, siempre y cuando sea examinada la totalidad del frote. Por serología se diagnostica al determinar el título de anticuerpos específicos; sin embargo, éste último no ha demostrado su eficacia en las patologías oculares. El diagnóstico confirmatorio se realiza mediante la demostración de inclusiones de *Chlamydia* en las células de cultivo, el cual es más sensible y específico, pero a la vez muy laborioso, caro, tardado y no está disponible rutinariamente en la mayoría de laboratorios. Gracias a los avances de la biología molecular se puede diagnosticar por

medio de la técnica de amplificación del ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR), las cuales son pruebas con alta especificidad y sensibilidad pero, al igual que el cultivo celular, su costo es elevado y no se encuentran disponibles en los laboratorios de nuestro medio. Últimamente se han desarrollado métodos inmunológicos para la detección cualitativa del antígeno de *Chlamydia* en pruebas rápidas, por medio de un inmunoensayo cromatográfico; las cuales ofrecen una alternativa al diagnóstico temprano y correcto de infección ocular causada por *C. trachomatis* (1, 4-7).

Se estima que un 10 por ciento de los pacientes nuevos que acuden a la Unidad Nacional de Oftalmología presentan sensación de cuerpo extraño y ardor bilateral, síntomas característicos de una infección por *C. trachomatis*, pero igualmente de una infección vírica o de una reacción alérgica, lo que hace difícil su diagnóstico conclusivo. El presente estudio se realizó con el fin de evaluar la concordancia entre la prueba rápida para determinar el antígeno de *Chlamydia* ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), según el índice de concordancia de kappa en relación con la tinción de Giemsa para diagnosticar la infección ocular por *C. trachomatis* a los pacientes de ambos sexos, mayores de 15 años que acudieron por primera vez a la Unidad Nacional de Oftalmología, con uno o ambos síntomas, éstos están acompañados por otros como prurito y fotofobia. A todos los pacientes se les realizó un raspado del tarso conjuntival superior de ambos ojos, muestra que se procesó para diagnosticar una infección por *C. trachomatis* por medio de una prueba citológica, que fue la tinción de Giemsa; y por una prueba inmunológica, para detectar el antígeno de *Chlamydia* como una prueba rápida (ICH-502®).

De los pacientes estudiados, no se obtuvo resultados positivos de la prueba rápida ICH-502 Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), mientras que el 32 por ciento de ellos fue positivo para la tinción de Giemsa; mostrando que no existe concordancia entre ambas pruebas y que la tinción de Giemsa sigue siendo la prueba más confiable para diagnosticar infecciones oculares por *C. trachomatis*. De los frotis positivos según Giemsa, la mayoría mostró escasos cuerpos de inclusión orientando a que la clamidia relacionada con tracoma es menos agresiva; a esto se le atribuye que el antígeno de *C. trachomatis* no fuera detectado por la prueba rápida ICH 502 Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), a pesar de tener una alta sensibilidad y especificidad en el

diagnóstico de otro tipo de infecciones clamidiales, por lo que esta prueba rápida no es una alternativa para diagnóstico de infecciones clamidiales relacionadas a tracoma.

La celularidad de los frotis se observó normal en los casos positivos y negativos según la tinción de Giemsa, lo que orienta a que la *C. trachomatis* relacionada con tracoma únicamente infecta las células columnares de la conjuntiva, y que la infección persiste ya que pasa inadvertida por los fagocitos, los linfocitos T y B, por lo que es conveniente diagnosticar la infección tempranamente con una prueba confiable como la tinción de Giemsa, siempre y cuando se tenga la instrucción necesaria tanto para la toma de muestra como para la observación microscópica de los cuerpos de inclusión característicos de *C. trachomatis*.

### III. ANTECEDENTES

La infección por clamidia y especialmente el tracoma, fue originalmente descrito como virus por Halbertadter y von Prowebeck en 1907. Desde entonces se han hecho innumerables estudios sobre aspectos diagnósticos, microbiológicos y clínicos. Sin embargo, ésta ya era conocida por los egipcios y estudiada por Hipócrates. Entonces se circunscribía al Mediterráneo Oriental pero penetró en Europa con los cruzados que volvían de Tierra Santa, en España con los árabes y luego se extendió por el occidente europeo con las incursiones de Napoleón. El tracoma, enfermedad ocular producida por clamidia, afecta aproximadamente a una séptima parte de la población mundial y es la mayor causa de pérdida de visión evitable. En el adulto, la conjuntivitis por clamidia suele ser diagnosticada de forma errónea; para su reconocimiento es necesario sospechar la enfermedad y conocer sus características clínicas (1- 3, 7-10).

#### A. Clasificación Taxonómica

La clamidia ha recibido una variedad de nombres por los cuales ha sido conocida desde hace mucho tiempo. El término que ha sido aceptado viene de la palabra griega *chlamys* que significa “estar cubierto con capa”. Esto describe las inclusiones intracitoplásmicas causadas por la bacteria que “cubren” el núcleo de la célula infectada. Después de mucha confusión en cuanto a su clasificación, en 1945 Jones propuso el nombre de *Chlamydia*, sin embargo no se generalizó su uso hasta que Page, en 1966, revisó la clasificación de este grupo de agentes (2, 10).

Como el aislamiento obtenido de un paciente que sufría tracoma era indistinguible del obtenido de un bebé con *oftalmia neonatorum*, o del de un adulto con conjuntivitis de inclusión y, que a su vez, estos no se diferenciaban fácilmente de los obtenidos por cultivo a nivel genital, se acuñó la expresión “agente TRIC” para hacer referencia a estos organismos (TR de tracoma e IC de conjuntivitis de inclusión). Hoy se sabe que el tracoma y la conjuntivitis de inclusión son causados por diferentes serotipos de la misma especie por lo que esta expresión ya no es utilizada (1, 11, 12).

Actualmente se considera a *Chlamydia* como una bacteria especializada que se divide por fisión binaria y es parásito intracelular obligado, no tiene vectores conocidos

y es de distribución geográfica universal. Gordon y Quan en 1965 (13) dividieron las clamidias en dos grupos basándose en la morfología de sus inclusiones y presencia de glucógeno en ellas. Store y Page en 1971 (14) establecieron la clasificación taxonómica que se conoce hasta ahora. Subsecuentemente la clasificación taxonómica incluyó la susceptibilidad a sulfonamida como otro criterio, identificándose claramente dos especies: 1) *C. trachomatis*, con glucógeno positivo y sensible a sulfonamida, y 2) *C. psittaci* con glucógeno negativo y resistente a sulfonamida. Una tercera especie, *C. pneumoniae*, originalmente designada como agente TWAR del ingles (Taiwan acute respiratory), tiene un fenotipo más relacionado con el biovar tracoma. Una cuarta especie ha sido descrita, *C. pecorum*, pero aún no se ha establecido claramente su papel como patógeno. Este género fue considerado el único dentro de la familia *Chlamydiaceae*. Sin embargo, la reciente descripción de varias bacterias nuevas relacionadas con *Chlamydia* y un nuevo análisis filogenético de ARN ribosomal y secuencias de otros genes, cambiaron la visión sobre la diversidad y taxonomía clamidial y llevaron a la reclasificación del Orden *Chlamydiales*. Everett y colaboradores (15), subdividieron la familia *Chlamydiaceae* en dos géneros: el género *Chlamydia*, que contiene *C. trachomatis*, *C. muridarum* y *C. suis*; y el género *Chlamydophila*, conteniendo a *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. abortus*, y *C. caviae*; además establecieron nuevas familias: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, y *Waddliaceae*; comprendiendo organismos recientemente descubiertos relacionados con *Chlamydia*. Por esta nueva clasificación no ha sido aceptada por todos los miembros de la comunidad científica, a que hace falta mucho por descubrir de estos nuevos organismos y a que las especies *C. trachomatis*, *C. psittaci* y *C. pneumoniae* son consideradas como patógenos clínicamente relevantes (de mayor interés para fines de este estudio), se seguirá utilizando *Chlamydia* sin distinguir entre los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila* (Tabla No. 1) (7, 8, 10, 16 - 18).

Las especies de *Chlamydia* representan un grupo único intermediario de microorganismos que exhiben características morfológicas similares. Dentro de cada una de estas especies existe una considerable homología a nivel del ADN, pero esta homología es muy escasa entre las distintas especies, lo que sugiere que durante su evolución la separación se efectuó hace ya mucho tiempo. Entre *C. trachomatis* y *C. psittaci* se ha establecido que existe una relación del ADN de un 10 al 30 por ciento, mientras que *C. pneumoniae* exhibe una relación del 10 por ciento del ADN de las otras

dos especies. Dentro de cada una de las especies existe una considerable superposición antigénica y puede ponerse de manifiesto que tiene un ciclo de desarrollo característico, una morfología común y un antígeno común a todos los miembros de la familia. Se han dividido con base en su composición antigénica, inclusiones intracelulares, susceptibilidad a las sulfonamidas y producción de enfermedad. Las clamidias se han ordenado de acuerdo a su potencial patogénico, rango de huéspedes, diferencias antigénicas y según lo que se sabe de cada especie (Tabla No. 2) (2, 7, 8, 11).

### **1. *Chlamydia trachomatis***

Esta especie produce inclusiones intracitoplásmicas compactas que contienen glucógeno y suelen inhibirse por las sulfonamidas. Incluye agentes de trastornos humanos: tracoma, conjuntivitis de inclusión, uretritis no gonocócica, salpingitis, cervicitis, neumonitis de lactantes, linfogranuloma venéreo (LGV) y síndrome de Reiter. La mayoría de los miembros de esta especie presentan un espectro de relaciones antigénicas y propiedades biológicas similares, así como ser huéspedes del humano (7, 12).

Anteriormente se distinguían tres biovars de *C. trachomatis*: 1) del ratón (agente de la neumonitis murina); 2) el de tracoma y 3) de linfogranuloma venéreo (LGV). Actualmente, el biovar del ratón se clasifica como una especie aparte, *C. muridarum*. Se ha identificado que el biovar de tracoma y de LGV tienen una homología del ADN de 100 por ciento, mientras que entre estos dos biovars y el de neumonitis murina hay una homología del ADN del 30 al 60 por ciento, lo que llevó también a clasificarlo en una especie aparte. De los dos biovars que afectan al hombre, se han identificado 18 serotipos, de los cuales 14 son de biovar tracoma y 4 de LGV. Los serotipos A, B, Ba y C suelen asociarse al tracoma clásico endémico, los serotipos D, Da E, F, G, H, I, Ia, J y K con enfermedades venéreas y conjuntivitis de inclusión y los serotipos L1, L2, L2a y L3 con LGV. Todos los serotipos parecen estar distribuidos en todo el mundo. Los serotipos del A al K son los causantes de tracoma y conjuntivitis de inclusión, fueron denominados como el agente TRIC: infectan la conjuntiva, el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal y genital, incluyendo la uretra femenina y masculina y el cérvix, endometrio y trompas de Falopio en la mujer (8, 11, 12, 17, 19).

## **2. *Chlamydia pneumoniae***

Es una especie descubierta recientemente que ha sido propuesta como el agente causal de TWAR, es un agente importante de neumonía en humanos y recientemente se ha relacionado con aterosclerosis. No se conoce el reservorio en otros mamíferos o aves. Produce inclusiones intracitoplásmicas que carecen de glucógeno y suele ser resistente a la sulfonamida (2, 7, 16).

## **3. *Chlamydia psittaci***

Los diferentes miembros de esta especie causan la psitacosis y enfermedades en animales. Estos han demostrado la mayor diversidad de propiedades biológicas, y dado lo heterogéneo de esta especie no existen avances en los intentos de subdivisión. Se han descrito varios serotipos por fijación de complemento, pero su diferenciación serológica no ha logrado total reconocimiento. Produce inclusiones intracitoplásmicas difusas que carecen de glucógeno y son resistentes a las sulfonamidas (7, 8).

## **B. Microbiología**

La clamidia se encuentra particularmente distribuidas entre los vertebrados, pudiendo infectar a un amplio espectro de huéspedes que pueden ubicarse en aves, mamíferos y humanos. El huésped natural para *C. trachomatis* es el hombre, los monos y los chimpancés pueden adquirir la infección en el ojo y en el aparato genital.

### **1. Morfología y composición química**

La clamidia tienen una pared celular semejante a las bacterias gramnegativo. Tiene un contenido relativamente alto de lípidos; contiene algunos lipopolisacáridos de membrana, pero no contiene el peptidoglucano bacteriano típico, es posible que esté formada por una matriz con enlace tetrapeptídico. En 1974, Garrett, Harrison y Marine (20); utilizando análisis químicos altamente sensible, no detectaron la presencia de ácido murámico, lo que indicó que no hay ácido N-acetilmurámico en estas paredes celulares. Sin embargo podrían contener un azúcar carboxilado en vez del ácido murámico. La estructura de la membrana está unida a una proteína con enlaces disulfuro, también contiene proteínas enriquecidas con cisteína que podrían ser equivalentes funcionalmente al peptidoglicano (Figura No. 1) (2, 7, 8, 18).



Existen dos tipos de partículas que representan funcionalmente los dos estadios básicos del ciclo de desarrollo del género *Chlamydia*, ambas son esféricas cocoides y carecen de motilidad.

La partícula infecciosa ambientalmente estable es una célula pequeña denominada cuerpo elemental (CE), metabólicamente inactiva; mide cerca de 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro con un nucleoide electrónico denso, en donde se concentra la mayor parte del ADN. La mayor parte del ARN es ribosómico procariótico con coeficientes de sedimentación de 21S, 16S y 4S. Posee una cubierta rígida y resistente que lo hace similar a una spora, la estructura rígida y la resistencia al ambiente es dado por puentes disulfuro enriquecidos con tres moléculas de cisterna fuera de las proteínas de la membrana. La inactividad metabólica es causada por un cromosoma muy condensado, de estructura inusual mediado por ADN ligado a proteínas, el cual es incapaz de replicarse o generar la transcripción de estos genes (2, 7, 10, 18).

El cuerpo inicial o reticular (CR) es el segundo tipo de partícula, es la forma no infectiva y metabolitamente activa; mide cerca de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ . Su existencia es estrictamente intracelular, por lo que su envoltura es frágil y flexible; se divide por fisión binario y es precursor de los CE infecciosos. Contienen una cantidad de ARN aproximadamente cuatro veces mayor que de ADN (7, 8).

La clamidia tiene un peso seco aproximado de 33 a 35 por ciento de proteínas, 40 a 50 por ciento de lípidos, los cuales son fosfolípidos como la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, asociados principalmente al antígeno de grupo de la pared celular; 1 a 2 por ciento de carbohidratos y 6 por ciento de ácidos nucleicos. Poseen genomas compuestos por ADN de doble cadena con diferencias mínimas en su tamaño, el peso molecular aproximado es de  $660 \times 10^6$  daltons, con cerca de  $6-8.5 \times 10^5$  pares de bases, que proveen la información para la síntesis de 600 diferentes proteínas (7,19).

## **2. Naturaleza bacteriana**

La clamidia es anaerobia, produce  $\text{CO}_2$ , es inmóvil, carece del sistema citocrómico completo, no utiliza el glutamato y no contiene el complejo mecanismo para la producción de ATP, lo que hace que tenga un ciclo de vida intracelular. Contienen tanto ADN como ARN y ribosomas procarióticos para la síntesis de ácidos

nucleicos y proteínas celulares; se multiplica por fisión binaria, es susceptible a muchos antibióticos, contiene algunas enzimas metabólicas y su pared es semejante a la pared celular de las bacterias gramnegativo, a pesar de que se tiñe muy levemente con la safranina. Todas estas características hacen diferente a la clamidia de los virus, con los cuales eran anteriormente clasificadas y hacen que sean clasificadas como “bacterias especializadas” (3, 7, 8, 19).

Las envolturas de los CE y CR son del tipo gramnegativo ya que poseen una membrana interna citoplásmica y una membrana externa que puede ser escindida por la polimixina B y el EDTA. Otra semejanza con las bacterias gramnegativo es que la membrana externa contiene la llamada “proteína mayor de membrana externa” cuyo peso molecular es aproximadamente la mitad del total proteico contenido en dicha membrana, pero la membrana no contiene peptidoglicano. El genoma circular de las clamidias (PM  $7 \times 10^8$ ) es similar al de los cromosomas bacterianos (2, 10,19).

Es susceptible a un amplio espectro de antibióticos, particularmente a tetraciclina y macrólidos de la eritromicina. Debido a que la pared celular de *Chlamydia* es diferente a la de muchas otras bacterias, los antibióticos beta lactámicos como la penicilina tiene poca actividad bactericida *in vitro* contra estos microorganismos (1).

### **3. Ciclo de desarrollo**

Sir Samuel Bedson, adelantado en el estudio de estos microorganismos, demostró que su morfología se modifica durante el ciclo de desarrollo. Las clamidias tienen un ciclo de vida único, que consiste en la alternancia de dos estadios: el cuerpo elemental y el cuerpo reticular. Precisamente el ciclo de desarrollo formó la base para la colocación de su propio orden taxonómico (8).

El ciclo inicia con la fijación e invasión de la célula huésped por el CE, induciendo fagocitosis activa; esta interacción puede ser inhibida por heparina y depende de un receptor tripsina-sensible (para *C. psittaci*) o de ácido siálico (para *C. trachomatis*), y sitios de unión termolábiles y complementarios en la célula huésped. Las clamidias parecen haber adquirido la habilidad de sintetizar un ligando de fijación, que la célula huésped enlaza y endocita. La penetración del agente conduce a la

formación de una vesícula fagocítica o fagosoma inhibiéndose la fusión fagolisosómica. Una vez el CE penetra en la célula huésped se inician cambios en la estructura molecular de ambos, el CE se convierte en la forma vegetativa y no infecciosa, cuerpo reticular (CR); los cambios ocurren de la siguiente forma:

- Entre 6 a 8 horas: hay pérdida de la estructura nucleoide densa; incremento activo en la biosíntesis de ADN, transcripción, síntesis de ARN y proteínas; aumento del tamaño normal del CE, la envoltura contribuye aún el 15 por ciento de su peso total.
- De 8 a 12 horas: hay un incremento en la permeabilidad de la envoltura, que permite un fácil transporte del material necesario del citoplasma de la célula huésped a la partícula clamidial; la envoltura constituye un 5 por ciento de su peso total; aumento en el número de ribosomas y no hay nucleoide. Ocurre entonces, la transformación de CE a CR.
- De 12 a 20 horas: se replica por fisión binaria repetida, el metabolismo de la célula huésped declina; el CR parasita el ATP; se forma inclusión constituida básicamente por CR (hasta 500 partículas), que desplaza al núcleo celular o se dispone cerca de éste; la membrana de la inclusión se expande.

Se detiene la multiplicación y se inicia la reversión o condensación de CR a CE junto con cambios en la estructura de la membrana y en la organización cromosómica, mientras que algunos CR continúan dividiéndose. En la reversión de CR a CE ocurren los siguientes cambios:

- De 20 a 30 horas: los nutrientes y otros constituyentes que han pasado del citoplasma de la célula huésped a través de la envoltura permeable de los CR, contribuirán a la formación de la pared celular de los CE; hay un descenso en el tamaño de la partícula; dentro de la inclusión pueden observarse los CR, CE y lo que se denomina “formas intermedias condensadas” o “cuerpo intermedio”; se sintetiza el glicógeno en *C. trachomatis*.

- De 30 a 40 horas: la progenie de CE inicia su predominio en número sobre los CR y formas intermedias de desarrollo; se incrementa la infectividad.

El ciclo de desarrollo de clamidia produce de cientos a miles de progenitores por célula; los CE liberados para iniciar nuevos ciclos de infección, que dependen de la destrucción de la célula huésped por los lisosomas, aproximadamente dos días después de la infección por el CE (Figura No. 2) (3, 10, 18, 19).

El metabolismo de las clamidias y de la célula huésped, posee cambios marcados. Son parásitos energéticos ya que son incapaces de sintetizar ATP u otro compuesto de alta energía, para la síntesis propia de macromoléculas las actividades enzimáticas de los CE incluyen una ARN polimerasa-ADN dependiente (inhibida por rifampicina), polinucleótido fosforilasa y transaminasa. Además puede llevar a cabo reacciones catabólicas que involucran a la glucosa, piruvato y otros sustratos, pero ninguno de ellos proporciona energía, aunque si produce CO<sub>2</sub>. Entre las enzimas que contiene para el metabolismo de la glucosa, la hexoquinasa es la única que utiliza de la célula huésped. Así también utiliza una gran parte o la totalidad de las purinas y pirimidinas para la síntesis de su propio ARN y ADN, en los que se codifican las enzimas para la síntesis de la envoltura y el glicógeno (2, 7, 17).

#### **4. Composición antigénica**

Las clamidias poseen un antígeno liposoluble fijador del complemento, durante todo el ciclo de desarrollo que se encuentra en todos los miembros de las tres especies, a este antígeno se le denomina antígeno específico a grupos compartidos (género); ya que no diferencia entre las infecciones producidas por las tres especies. Es semejante a la estructura de lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativo, en cuanto a su termoestabilidad. Solubilidad en éter y procedimientos de extracción. Puede inactivarse con periodato y precipitarlo con acetona. Se localiza en la membrana externa. Del antígeno liposoluble con tres dominios antiénicos evidenciados por anticuerpos monoclonales anti-LPS clamidial, puede obtenerse un polisacárido hidrosoluble, que sometido a una hidrólisis, libera ácido 2-ceto-3-desoxioctónico. Este compuesto ácido es el grupo inmunodominante crítico para la antigenicidad (2, 7, 8, 19).

Los antígenos específicos a especie o específicos a serovar son principalmente proteínas de la membrana exterior; distinguen a las diferentes especies y dentro de cada especie, a los diferentes inmunotipos de cada biovar. En 1950 Marine y Meyer (21), tipificaron varias cepas de *C. psittaci*; mientras que Alexander, Wang y Grayston en 1967 (22), lo hicieron para *C. trachomatis*, utilizando la técnica de microinmuno-fluorescencia (micro-IF), aplicada por Wang y Grayston en 1970 (23), que posibilitó la inmunotipificación de los organismos causantes de enfermedades oculogenitales (biovar tracoma), y de los productores de LGV (biovar LGV), introduciendo así un método para el estudio de la distribución epidemiológica de dichas enfermedades. Se estableció la existencia de 15 serotipos. Los determinantes antigénicos para la especificidad de los serotipos, parece estar localizada en la “proteína mayor de membrana externa”. Tres nuevos serotipos han sido identificados por varios anticuerpos monoclonales en el test de micro-IF; estableciéndose entonces, 18 serotipos de *C. trachomatis* (3, 7, 12, 17, 19, 24).

Además de las dos fracciones antigénicas, poseen una hemaglutinina relacionada al antígeno específico de género de la partícula CE, que hemaglutina los glóbulos rojos de ratón, hamster y de algunos pollos. En clamidias infecciosas se encuentra un principio tóxico; mata a los ratones después de la administración intravenosa de más de  $10^8$  partículas. La toxicidad es destruida por el calor, pero no por la luz ultravioleta; esto sirvió para establecer la prueba de prevención de toxicidad al ratón (7, 19).

## **5. Mecanismos de patogenicidad y respuesta inmune**

Hay numerosos los factores que contribuyen a la patogenicidad de *C. trachomatis*. La colonización de *Chlamydia* comienza con el ataque a los receptores de ácido salicílico de las células del ojo, la infección persiste ya que pasa inadvertida por los fagositos, las células T y las células B. La pared celular tiene una estructura única capaz de inhibir la fusión fagolisosoma de los fagocitos y el ácido murámico que contiene no es detectado por los anticuerpos dirigidos contra ella (2, 7, 10).

Curiosamente los 15 serotipos muestran una especificidad extraordinaria en cuanto al tropismo de tejido. Los serotipos A, B, Ba y C son patógenos del ojo, infectan células de epitelio columnar de la conjuntiva causando tracoma, estos serotipos raramente afectan el tracto genital. Por otro lado, los serotipos D a K son patógenos de

transmisión sexual, infectan células de epitelio columnar del tracto genital; causan también conjuntivitis neonatal y conjuntivitis de inclusión, pero no son asociados con tracoma. Además, las infecciones con los serotipos ocular (A-C) y genital (D-K) no son invasivos y son restringidos al epitelio de las mucosas, a diferencia de los serotipos que causan LGV (L1, L2, L2a y L3) son invasivos, penetran el tejido submucoso, infecta monocitos y macrófagos; y se disemina a los nódulos linfáticos locales, produciendo una enfermedad crónica granulomatosa. Los factores que controlan estas propiedades no invasivo/invasivo han sido relacionados con la producción de una citotoxina clamidial (1, 2, 10, 16, 17, 24 - 26).

Las células T juegan un papel importante en el desarrollo de la inmunidad contra infecciones en la mucosa de *C. trachomatis*, y el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) es la llave a esta función protectora. El mecanismo por el cual el INF- $\gamma$  controla la infección *in vitro* es interfiriendo la capacidad de replicación de los parásitos. A través de la unión del INF- $\gamma$  a un receptor, lo que hace que se degrade el tripófano. Esta citosina de la célula huésped priva al CR de triptófano, lo que reduce su crecimiento y capacidad de replicación. Una proteína con especificidad de género, “antígeno común” como posibles epitopes y reactividad potencial en el shock térmico induce la hipersensibilidad retardada conjuntival en individuos que padecen tracoma. La infección persistente es uno de los mecanismos de patogenicidad que se ha observado *in vivo* en las infecciones de *C. trachomatis*, pero no *in vitro*; Dean y Powers en el 2001 (27), encontraron que existe una resistencia al estímulo de la apoptosis, tanto en infección aguda como en infección persistente; también se observó que la proteína hsp60, proteína inductora de inflamación, permanece expresada en infecciones agudas y en persistentes; lo que muestra un posible mecanismo en las lesiones inmunes observadas en las cicatrices características de tracoma y de la enfermedad pélvica inflamatoria (1, 10, 17, 24 - 26).

## **6. Reacciones a los agentes físicos y químicos**

Clamidia se inactiva rápidamente por el calor. Deja de ser infecciosa completamente después de la exposición durante 10 minutos a una temperatura de 60°C. Mantiene infectividad durante años a temperatura de -70° a -50° C. Durante el proceso de liofilización pierde mucha de su infectividad. Algunas clamidias desecadas al aire pueden ser infecciosas por largos periodos, y se inactiva rápidamente por el éter en 30 minutos, por el formol o por el fenol a 0.5 por ciento por 24 horas (7).

## **C. Patologías oculares causadas por *Chlamydia trachomatis***

*Chlamydia trachomatis* está relacionada un gran número de enfermedades variadas en el humano, especialmente infecciones oculares y genitales. Los serotipos A, B, Ba y C están asociados con tracoma endémico, los serotipos del D al K causan uretritis no gonocócica en el hombre, epididimitis, conjuntivitis de inclusión y síndrome de Reiter; y los serotipos L1, L2, L2a y L3, causan LGV. Principalmente, las infecciones oculares por *C. trachomatis* en el adulto, suelen ser diagnosticadas de forma errónea y para ello es necesario sospechar la enfermedad y conocer sus características clínicas. (Tabla No. 3 y 4) (2, 3, 7, 10).

### **1. Conjuntivitis de Inclusión**

Es una de las entidades clínicas severas causadas por los serotipos D al K. En contraste con tracoma, esta infección es transmitida sexualmente y frecuentemente involucra varios sitios en el proceso de infección. Existe una alta prevalencia sobre todo en individuos jóvenes, sexualmente activos; se ha visto que la edad media de los pacientes positivos para clamidias es de 45 años para las mujeres y 37 años para los hombres. Existen estudios que muestran una alta frecuencia de conjuntivitis por *Chlamydia* (65 por ciento) y muchos de estos no presentan sintomatología urogenital; aún cuando, aproximadamente un 40 a 50 por ciento de los hombres que acuden a clínicas de enfermedades de transmisión sexual presentan uretritis no gonocócica, y de estos un 70 por ciento están infectados con *C. trachomatis* y un 25 por ciento son asintomáticos. La inoculación ocular puede producirse por diseminación desde los genitales a los dedos y al ojo, desde los genitales directamente al ojo y desde los genitales por los fomites al ojo. El período de incubación tiene una media de 5 días, aunque puede oscilar desde 2 a 19 días. Es una enfermedad unilateral, el comienzo es típicamente subagudo, pero puede ser agudo. El paciente se queja de sensación de cuerpo extraño, lagrimeo, fotofobia, enrojecimiento e hinchazón del párpado. El ojo aparece ligeramente inyectado e irritado y existe una escasa secreción mucopurulenta. La hipertrofia folicular es más intensa en la conjuntiva tarsal inferior, en contraste con el tracoma, y puede tardar 2 a 3 semanas en aparecer. No existen pseudomembranas pero se puede desarrollar un pequeño ganglio blando preauricular; se suele observar pseudoptosis, puede haber una queratitis epitelial que consiste en lesiones epiteliales pequeñas y focales que tienden a ser más frecuentes en la periferia; y producirse

infiltrados subepiteliales, por lo general 2 – 3 semanas después de iniciarse la conjuntivitis. Puede aparecer un micropannus corneal superior, así como pequeños abscesos corneales marginales (3, 11, 12, 28 - 32).

## **2. Conjuntivitis de Inclusión Neonatal**

Se define como el proceso inflamatorio de la conjuntiva que ocurre durante el primer mes de vida. Esta enfermedad constituye en la población infantil, una causa muy importante de ceguera corneal susceptible a ser prevenida y tratada. Es la forma clínica más obvia e históricamente es una de las primeras infecciones conocidas. El infante al pasar por el canal de parto infectado por los serotipos genitales y se contamina con las secreciones cervicales de la madre. Posteriormente algunos sitios manifiestan infección clínica, mientras que otros se mantienen colonizadas sin patentizar enfermedad. La manipulación del niño juega un papel importante en la implantación del agente en sitios originalmente no contaminados. La infección intrauterina, como una posible forma de transmisión materno – fetal no es apoyada por la mayoría de estudios, pues la ausencia de anticuerpos IgM anti- *C. trachomatis* en la sangre del cordón umbilical es evidencia suficiente de ello. Por lo tanto se deduce que aquellos niños nacidos por sección cesárea no están a riesgo de infectarse por *C. trachomatis*, a menos que también exista una ruptura prematura de membranas (28, 33 - 35).

Algunos casos de conjuntivitis de inclusión neonatal (CIN), se acompañan de infección nasal, en cuya situación la oftalmia toma un curso crónico. También se le encuentra formando parte de los síntomas prodrómicos de la neumonía clamidial y asociada con infección nasofaríngea. La rinitis puede ser severa y conducir a obstrucción de las fosas nasales y de la misma nasofaringe; puede acompañar bronquiolitis, se produce apnea y en algunos pacientes la etapa final podría ser el síndrome de muerte súbita del infante, del que aproximadamente cinco por ciento es de etiología clamidial. Si bien la CIN por *C. trachomatis* puede resolverse en forma espontánea entre los 3 a 12 meses de vida, la infección subclínica o moderada puede persistir durante años, describiéndose secuelas y complicaciones oculares en los pacientes no tratados. Además, la neumonitis en el lactante por *C. trachomatis* también está asociada con las clamidias oculogenitales, aunque esta enfermedad no resulta del drenaje de *C. trachomatis* al tracto respiratorio desde la conjuntiva infectada; se sabe que algunos casos de infección del tracto respiratorio, resulta del inóculo proveniente de



la conjuntiva a través del ducto lacrimal, mientras que otros son el resultado de la infección directa en el proceso de parto. De los pacientes con CIN, se calcula que uno de cada cuatro puede desarrollar neumonía; y tres de cada cuatro neumonías no tienen antecedentes de infección conjuntival (11, 33, 36)

### **3. Tracoma**

Se remota a hace 3,000 años, si no más y ha asolado buena parte del planeta; es la causa más importante de ceguera prevenible en el mundo. El nombre tracoma, deriva del vocablo griego *trachus* (rugoso), se refiere al aspecto granuloso de la conjuntiva infectada. En 1907, se identificó la causa del tracoma cuando Neisser y colaboradores, describieron las inclusiones intracitoplásmicas en células epiteliales de frotis de la conjuntiva de niños de Indonesia con tracoma, teñidos con Giemsa. No fue sino hasta 1957 que Tang y colaboradores, en Pekín, aislaron *C. trachomatis* en embriones de pollo. Los postulados de Koch se cumplieron poco después de esto, en el Instituto de Oftalmología en Londres, cuando los signos característicos de tracoma fueron inducidos por la inoculación con un aislado de *C. trachomatis* a un ciego voluntario (3, 4, 10, 37, 38).

#### **a. Patogenia**

*C. trachomatis* se replica de preferencia sobre superficies mucosas dentro de las células epiteliales cilíndricas o de transición. Los microorganismos estimulan una infiltración activa de las células polimorfonucleares, en especial al comienzo de la infección. Hay infiltración linfocítica de la submucosa, lo que conduce a la formación de folículos linfoides y a alteraciones fibróticas. Recientemente, un estudio indicó que los serotipos A, B, Ba y C no son capaces de utilizar el indol exógeno para la biosíntesis de la célula, lo que posiblemente explica la afinidad al epitelio columnar de la conjuntiva. Un mecanismo importante que se ha observado *in vivo* en el tracoma es la reinfección reiterada de *C. trachomatis*, varios estudios se han realizado para explicar este importante mecanismo; entre ellos está un estudio en el 2001 de Dean y Powers (27), indica que *C. trachomatis* provoca una resistencia al estímulo de apoptosis en la célula huésped; mientras que, otro estudio en el 2000 de Jendro y colaboradores (39), indicó que la infección chlamydial intracelular de macrófagos puede inducir la apoptosis de células T, la inducción de apoptosis por *Chlamydia* posiblemente explica

como la infección persistente de macrófagos escapa de la vigilancia de las células T y porque la respuesta de las células T específica a *Chlamydia* disminuye durante la infección clamidial persistente (3, 11, 12, 17, 24, 27, 28, 30, 34, 40 y 41).

### **b. Inmunidad**

La respuesta inmune humoral ocular local y sistémica a la infección ocular por clamidias ha sido bien caracterizada, aunque el papel preciso de la inmunidad mediada por anticuerpos no está claro. Muchos pacientes con infecciones por *C. trachomatis* presentan hiperinmunoglobulinemia con activación policlonal y secreción de IgM, IgG e IgA en las lágrimas y el suero. Aunque los anticuerpos neutralizantes desempeñan un papel protector en la infección experimental, los anticuerpos no son totalmente protectores ya que la enfermedad persiste mientras continúa la reinoculación. El papel de los anticuerpos *in vivo* puede consistir en limitar la extensión de la multiplicación de las clamidias más que en ejercer un efecto curativo. Un concepto actual sobre la cronicidad de las enfermedades causadas por biovariedades de *C. trachomatis* es el de la existencia de un trastorno de la inmunorregulación en algunos individuos, lo que conduce a un fracaso de la erradicación o a secuelas cicatrizales (3, 10 – 12, 28).

### **c. Manifestaciones clínicas**

El tracoma puede empezar como una infección aguda o bien puede ser una infección leve o pasar inadvertida. Aproximadamente 5 días después de la inoculación aparece una inyección bilateral de la conjuntiva, lagrimeo fotofobia y sensación mucopurulenta. En estadios tempranos, se presenta como una conjuntivitis folicular con infiltración difusa e hipertrofia papilar. En niños menores de dos años, la reacción papilar con tejido inflamatorio de la conjuntiva puede ser el signo más predominante. La enfermedad envuelve toda la conjuntiva, pero es más notable en el tarso superior, el cual ha sido seleccionado como el área conveniente para toma de muestra y observar las líneas de cicatrización y la inflamación tracomatosa. Puede existir un ganglio preauricular blando. Unas 3 semanas después pueden desarrollarse folículos en la conjuntiva tarsal superior y a veces en el limbo. Se han dividido los signos clínicos del tracoma en cuatro estadios según MacCallan (3, 7, 12):

- **Estadio I:** Se denomina tracoma incipiente y los signos y síntomas son similares a los de la infección aguda, se caracteriza por la presencia de folículos inmaduros en la conjuntiva tarsal superior, folículos que son blandos y fácilmente exprimibles, aparece un exudado mínimo. Este estadio puede pasar inadvertido en algunos casos, o confundirse con infecciones víricas o alergias. También aparece hipertrofia papilar, que causa que los folículos queden sepultados. En este estadio se puede observar queratitis punteada difusa y la formación precoz de un pannus corneal superior. Puede crecer tejido fibrovascular dentro de la córnea debajo del epitelio y destruir la capa de Bowman (3, 11, 24, 28, 35).
- **Estadio II:** Es el tracoma establecido, se caracteriza por la presencia de folículos maduros y queratitis más avanzada. Se subdivide en IIa, en el que predomina la respuesta folicular; y IIb, en el que se observan folículos, aunque muy oscurecidos por la intensa respuesta papilar. El estadio IIb consiste fundamentalmente en una inflamación aguda. Los folículos maduros tienen la apariencia de granulos de sagú y pueden sufrir necrosis central. También aparecen folículos límbicos, más frecuentemente en la parte superior y unión corneoescleral o en la córnea. En la sustancia fundamental de la conjuntiva aparecen grandes macrófagos con restos fagocitados llamadas células de Leber (3, 12, 30, 32, 37).
- **Estadio III:** Los folículos presentan una cicatrización de intensidad variable, aparecen las fositas de Herbert, que son áreas transparentes, redondeadas o festonadas, en el seno de un limbo más opaco, estas fositas son patognomónicas del tracoma, también se forman cicatrices lineales, a veces entrecruzadas, en la conjuntiva tarsal. La línea de Arlt es una línea cicatrizal densa de la conjuntiva tarsal superior, empieza a desarrollarse una cicatrización de los párpados, simbléfaron, triquiasis y otras deformidades del párpado (3, 11, 12, 30, 35, 37, 41).
- **Estadio IV:** Llamado “tracoma curado”, donde la inflamación corneal y conjuntival disminuyen, ya no aparecen folículos ni papilas y no existe

infiltración inflamatoria de la córnea, la cicatrización produce ojo seco, entropión y triquias. Las complicaciones de esas afectaciones, entre ellas la consiguiente queratitis bacteriana, son la que conducen a la ceguera (3, 12, 24, 27, 28).

Se producen largos períodos de infección latente y la sobreinfección por otras bacterias contribuye a formas más avanzadas de la enfermedad. Las personas tracomasas que viven en condiciones higiénicas experimentan un curso leve o una resolución clínica de la infección; sin embargo, una exposición repetida a la infección se asocia con un incremento de la incidencia de infiltración marginal y neovascularización. Esto puede tener un comienzo tardío después que las inclusiones ya no son detectables en raspados conjuntivales y representa la respuesta de huésped al antígeno de las clamidias, el que entonces contribuye al daño ocular severo que culmina en el deterioro de la visión. Las recurrencias muchas veces se producen después de una aparente curación (3, 12, 28, 30, 38, 41).

#### **4. Síndrome de Reiter**

*C. trachomatis* es uno de los agentes causales del síndrome de Reiter, que fuera descrito en 1916 en un caso histórico de un joven con la triada de uretritis, artritis y conjuntivitis. También causa balanitis circinada, ulceraciones superficiales de la mucosa bucal y una dermatitis característica, queratoderma blenorragica. Los hombres jóvenes son los más afectados. Está estrechamente relacionado con HLA-B27 en más del 76 por ciento. En cualquier momento del curso de la enfermedad puede darse afectación ocular, la conjuntivitis es la manifestación más frecuente, también puede observarse iridociclitis, epiescleritis, escleritis y queratitis. La conjuntivitis es de naturaleza papilar, bilateral normalmente y con secreción mucopurulenta (3, 11, 28).

#### **D. Diagnóstico**

Los esfuerzos por lograr un control de la infección por *Chlamydia* se han visto limitados por la falta de una simple, confiable y económica prueba de diagnóstico. El diagnóstico de las infecciones clamidiales causadas por el biovar tracoma, especialmente las infecciones oculares, puede hacerse mediante la observación clínica; sin embargo, se requiere de mucha experiencia. Por lo anterior, los métodos

diagnósticos de laboratorio son los que realmente señalan a *C. trachomatis* como el agente causal del gran espectro de enfermedades con las que se le ha asociado. La técnica de cultivo de tejidos es la más específica, pero a la vez costosa, laboriosa y tardada; el desarrollo de las nuevas técnicas de amplificación de ácido nucleicos y la aplicación de estas pruebas han demostrado que el cultivo no es sensible y que la prevalencia de infecciones de *C. trachomatis* es alta en muchas poblaciones. Recientemente, el método de detección por antígenos viene ofreciendo una alternativa para el diagnóstico temprano, de bajo costo y rápido de las infecciones por *C. trachomatis*. Se dispone, también, de los métodos serológicos que se usan frecuentemente como herramientas de investigación, por no haber sido comprobada su eficacia en el diagnóstico de estas infecciones (1, 2, 4, 7, 9, 10).

En cada una de las infecciones clamidiales, las respuestas del huésped y propiedades biológicas del serotipo infectante difieren lo suficiente como para requerir de diferentes pruebas diagnósticas. A pesar de que el mismo método puede ser usado para más de una enfermedad, las interpretaciones de los resultados pueden diferir en cada una de ellas (1, 2 y 4).

### **1. Recolección , transporte y almacenaje de especímenes**

La habilidad en la colección de muestra y transporte es el parámetro mas importante para la exactitud en las pruebas de diagnóstico para *C. trachomatis*, la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas están relacionados directamente con una muestra adecuada; la falta de una muestra adecuada ha sido un serio problema en muchos programas de prevención y estudios recientes. En algunos estudios de salud pública por el Centro de Control de Enfermedades (CDC de sus siglas del inglés) se observó que el 30 por ciento de las muestras son inadecuadas, a pesar del entrenamiento extenso del profesional, el clínico debe ser entrenado en las técnicas apropiadas. Como *Chlamydia* es un patógeno intracelular obligado, el objetivo de la recolección de muestra deberían incluir las células huésped que contienen el organismo, por lo que las muestras que contienen secreciones o exudados, pero escasez de células columnares, no son satisfactorias. La muestra se toma haciendo un raspado con el hisopo vigorosamente en los sitios sospechosos del tarso superior, limpiando antes el drenaje purulento, que no favorece la obtención de resultados precisos. Para el aislamiento de las células infectadas se puede utilizar una espátula para hacer el raspado de la conjuntiva o

simplemente utilizar hisopos, con los que se obtiene fácilmente buen material. La ventaja del raspado con espátula, es que proporciona células bien preservadas con inclusiones intracitoplásmicas intactas; mientras que con el hisopo, buena cantidad de las células se rompen y liberan las partículas clamidiales. Una alternativa para obtener buena cantidad de células en el frote es introducir el hisopo con la muestra en un tubo con solución salina estéril, agitarlo vigorosamente para que las células que contenga el hisopo se desprendan, centrifugar el tubo; y el sedimento, que contiene las células, puede utilizarse para hacer los frotos. El material se disemina homogéneamente sobre una lámina portaobjetos; idealmente el frote debe ser de no más de una célula de grosos y debe proveer de 500 a 1000 células epiteliales (1, 2, 4, 7, 10).

Para el aislamiento en cultivo celular, el tipo de hisopo con el que se toma la muestra es más importante que para fines citológicos, pues la toxicidad que presentan algunos de ellos eliminan la viabilidad de las partículas infectivas en un tiempo menor que el utilizado hasta que se inocula en la línea celular, mientras que en citología, el material obtenido se distribuye casi inmediatamente después en una lámina portaobjetos que se fija poco tiempo después. Numerosos estudios han revelado que el hisopo de alginato de calcio con palillo de aluminio, es tan tóxico como el de algodón con palillo de madera; de menor toxicidad y que permite duplicar o triplicar la frecuencia de aislamiento de *C. trachomatis*, así como aumentar el número de inclusiones clamidiales en los cultivos positivos son los hisopos de rayón con palillo de plástico o los de algodón con palillo de aluminio (1, 7, 9, 17, 42).

Antes de inocular la línea celular para el aislamiento de *C. trachomatis*, el hisopo utilizado para tomar la muestra se coloca en un tubo que contiene una solución amortiguadora de sucrosa 0.2M, fosfato (2SP) y antibióticos. Si el cultivo celular es inoculado antes de 24 horas, el medio se mantiene hasta entonces de 0 a 4° C. Sin embargo, cuando el medio de transporte con el espécimen clínico, no puede ser inoculado antes de 24 horas, es necesario que el mismo se refrigere de -60° C a -70° C, siempre y cuanto no sea más de varias semanas o meses. El almacenamiento en nitrógeno líquido (-170° C) produce una moderada pérdida en la infectividad y viabilidad del agente clamidial, pero cuando se agrega suero bovino fetal al tres por ciento en el medio de transporte, se protege al mismo del proceso de congelamiento y deshielo. Recientemente, han sido desarrollados medios de transporte sintéticos para

cultivo y otras pruebas utilizando medio de transporte M4 y medio FlexTrans. Estudios han demostrado que el nuevo M4 sintético o medio “universal” es comparable al 2SP para cultivo y equivalente o mejor a otras formulaciones comerciales para test como inmunoensayo enzimático (EIA) y PCR (de sus siglas en inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa); y que es efectivo para uso en cultivo y estas otras pruebas utilizando un solo hisopado (1, 2, 17, 42).

La recolección de muestras para pruebas comerciales se realiza conforme las instrucciones de la casa comercial que las distribuye. La recolección de muestra para la detección de antígeno de clamidia con la prueba rápida ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA); requiere de un procedimiento vigoroso que proporcione el material celular, puede realizarse utilizando el hisopo de dacrón que proporciona la prueba o un hisopo de algodón estéril. Si existe material purulento o secreción debe limpiarse antes de la recolección de la muestra. Si no es posible procesar las muestras en el momento de la recolección, deben ponerse en un tubo de transporte seco para su almacenamiento o transporte. Los hisopos pueden guardarse durante 4 a 6 horas a la temperatura ambiente o 24 a 72 horas en refrigeración (1, 2, 17).

Las tecnologías más sensibles como las pruebas de amplificación del ADN (PCR o LCR) pueden no requerir CE intactos, en teoría sólo una leve copia de genes es necesaria para un resultado positivo; aunque un estudio reciente muestra que algunos test de amplificación de ADN pueden ser afectados por la presencia de células huésped. Las muestras se pueden almacenar en medios de transporte de 2 a 8° C por 4 días (1, 2).

## **2. Cultivo**

El cultivo de tejidos es hasta el momento, el “patrón estándar” para realizar el diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*, puesto que, tiene una especificidad del 100 por ciento. Las desventajas de usar el cultivo como un patrón estándar incluyen su relativa insensibilidad comparada con las técnicas de amplificación de ADN, los requerimientos estrictos para el transporte en frío de las muestras, disponibilidad limitada del clínico debido a lo costoso, son necesarias técnicas de alto nivel, y el tiempo necesario para obtener el resultado (3 a 7 días). Una ventaja del cultivo es que preserva los organismos para estudios adicionales como genotipificación o pruebas de susceptibilidad antibiótica. Por los avances en técnicas de amplificación de ADN, cada

vez el cultivo es menos utilizado, y ha quedado para uso casi exclusivo de laboratorios de referencia especializados (1, 8, 10, 17).

Se requiere de dos componentes para el cultivo de *C. trachomatis*: 1) un sistema de cultivo celular; y, 2) un método para identificar las inclusiones que crecen en el cultivo celular. Tradicionalmente, McCoy, HeLa 229 y, más recientemente, células BGMK, han sido usadas para el crecimiento de *C. trachomatis*. Hay dos técnicas de cultivo, utilizar viales individuales o placas con 96 pozos para microcultivos; la elección entre estos métodos, generalmente la determina el número de especímenes que el laboratorio tiene que procesar; el método de tubos es ligeramente más sensitivo y menos susceptible de contaminación cruzada, que las placas de 96 pozos con células McCoy pero, requiere de más tiempo y es más costoso (1, 2, 4, 17).

Las inclusiones son reconocidas a las 48 o 72 horas de incubación, utilizando el método de fluorescencia con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los lipopolisacáridos (LPS) clamidiales, que reconoce todas las especies de *Chlamydia*, o dirigidos a la proteína mayor de membrana externa (MOMP), para reconocer específicamente a *C. trachomatis*. La especificidad de estos últimos anticuerpos mencionados, contribuyen al 100 por ciento de especificidad del método de cultivo; aunque tiene la desventaja de utilizar microscopio de fluorescencia (1, 2, 4 – 6, 9, 17)

Históricamente, otras tinciones como Gram, Giemsa y Lugol han sido utilizadas para la identificación de *C. trachomatis* en cultivo celular; pero estas no son muy utilizados hoy en día por la poca especificidad y sensibilidad, comparados con la técnica de anticuerpos fluorescentes (AF). Se ha registrado en estudios que la tinción de Giemsa tiene una alta especificidad, porque *C. trachomatis* puede ser distinguida de otros organismos por el color de la reacción, morfología y localización de las inclusiones; aunque, esta distinción requiere de personal con experiencia para su observación. La tinción con yodo tiene una especificidad muy baja puesto que el glucógeno no está presente en todo el ciclo de *Chlamydia* (1, 2, 4, 17).

En comparación con otros métodos de diagnóstico para *Chlamydia*, la principal ventaja del cultivo de tejidos es su especificidad; mediante este método, el microorganismo puede ser identificado positivamente, o guardado, por ejemplo, para



otros estudios de clasificación inmunológica. Por lo tanto, el cultivo es el método de elección para los estudios de investigación. El cultivo tiene una sensibilidad de 80 a 90, y una especificidad de 100 por ciento respectivamente; pero, tiene varias desventajas: 1) los costos y la complejidad de los requerimientos de laboratorio no son accesibles; 2) los especímenes pueden conservarse a 4° C solo por 24 horas (preferible solo 12 horas antes de procesarse), o congelados a -70° C si no pueden inocularse dentro de las 24 horas; 3) los especímenes deben transportarse en un medio especial; y 4) el cultivo celular puede contaminarse con otras bacterias o virus, especialmente en el caso de especímenes vaginales o rectales (1, 2, 4, 9, 17).

### **3. Método citológico**

La identificación citológica de las infecciones por *Chlamydia*, consiste en un examen del raspado de células epiteliales, en un frotis teñido, para evidenciar la presencia de la típica inclusión intracitoplásmica. Se utiliza la técnica de AF que es la más sensible y específica de los métodos directos, aunque por lo general se usa una tinción de Giemsa modificada, que también ha dado muy buenos resultados (1). Las inclusiones de *Chlamydia* en células epiteliales son observadas microscópicamente bajo el objetivo de inmersión como masas distintivas intracitoplásmicas de partículas que van de un tamaño pequeño (cerca de 300 nm), de rojo a púrpura en cuerpos de inclusión elemental hasta azul intenso de 1 nm de tamaño con los cuerpos iniciales (1, 4, 8, 11, 17, 42).

Resulta claro que la ventaja del examen citológico es la facilidad del proceso, particularmente si se utiliza un microscopio de luz. La desventaja es la poca sensibilidad para diagnosticar infecciones por *Chlamydia* que no sean conjuntivitis en el neonato, para la cual la sensibilidad de la citología comparada con la del cultivo es de 95 por ciento. La sensibilidad del métodos citológico par identificar la conjuntivitis por *Chlamydia* en el adulto es de 45 y 85 por ciento con la tinción de Giemsa y con la tinción AF. En las pruebas para las infecciones cervicales, la sensibilidad de estas tinciones es solo del 40 y 65 por ciento respectivamente. Más aún, estos niveles sólo pueden ser alcanzados con especímenes de buena calidad (muchas células epiteliales) y un observador experimentado. Hay estudios que sugieren que el patrón de inflamación de los frotis cervicales con tinción de Papanicolaou, pueden resultar útiles para la reconfirmación de la infección ya detectada mediante cultivo o pruebas con anticuerpos

monoclonales. El método de Papanicolaou por sí mismo no es satisfactorio para el diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia* (1, 4-10, 31).

#### **a. Propiedades de tinción:**

Las clamidias tienen propiedades de tinción características, las cuales difieren en las distintas etapas del desarrollo. Los CE se tiñen de morado con tinción de Giemsa, en contraste con el azul del citoplasma de la célula huésped. Los CR de mayor tamaño, se tiñen de azul con la tinción de Giemsa. La reacción de Gram es negativa o variable, y no es de utilidad en la identificación de los agentes. Las partículas e inclusiones de las clamidias se tiñen brillantemente por inmunofluorescencia, con anticuerpos específicos a grupo, específicos a especie o específicos a serovar (1, 2, 7, 42).

Las inclusiones intracelulares maduras bien formadas de *C. trachomatis*, están constituidas por masas compactas cercanas al núcleo que se observan de un color púrpura oscuro cuando se tiñen con Giemsa, por la compacta densidad de las partículas maduras. Si se tiñen con solución de yodo Lugol diluida, algunas de las inclusiones de *C. trachomatis* (pero no de *C. pneumoniae* o *C. psittaci*) presentan color pardo por la matriz del glucógeno que rodea a las partículas. Las inclusiones de *C. psittaci* son agregados intracitoplásmicos difusos (1, 2, 42).

#### **b. Tinción de Giemsa:**

La tinción de Giemsa es una prueba rápida sensible y específica para la detección de *C. trachomatis* en muestras clínicas, se sabe que para diagnóstico de CIN tiene una sensibilidad mayor al 90 por ciento, pero para diagnóstico de infecciones oculares y genitales en adultos, ha dado buenos resultados en estudios realizados; pero, tiene el inconveniente que debe ser examinado todo el frote y por una persona con experiencia (1, 2, 4, 31).

Para observar *Chlamydia* con la tinción de Giemsa, se separa el colorante disolviendo 0.5g de polvo en 33 ml de glicerina de 55° C a 60° C durante 1 hora y media a 2 horas; a esto se añade 33 ml de alcohol metílico absoluto, libre de acetona; se mezcla bien la solución y se deja sedimentar, se guarda a temperatura ambiente como solución madre, para efectuar las diluciones del colorante madre se utiliza agua destilada neutra o agua amortiguada en la proporción de una parte de solución de

Giemsa, por cada 1 a 5 partes de líquido. Se deja secar el extendido al aire, se fija con alcohol etílico absoluto durante 5 minutos por lo menos, y se vuelve a secar, luego se cubre con el colorante de Giemsa; la dilución se prepara todos los días. Durante 1 hora se enjuaga rápidamente el portaobjetos en el alcohol etílico de 95° para quitar el exceso de colorante, se deja secar al aire. En el microscopio de luz se examina con el objetivo de inmersión, para tratar de descubrir la presencia del típico cuerpo de inclusión intracitoplásmico, que aparece púrpura cuando contiene cuerpos elementales y más basófilo, azul, cuando contiene cuerpos reticulares; el núcleo de la célula aparecerá color rosa. Los cuerpos de inclusión pueden ser observados también en microscopio de campo oscuro, los cuales se ven de color amarillo y muy granulados (1, 2, 8, 10, 42).

#### **4. Detección de antígenos**

Actualmente, se dispone de una variedad de métodos para detección de antígenos de *Chlamydia*, entre ellos están: a) examen mediante AF de un frotis directo, b) inmunoensayo con enzimas y c) pruebas comerciales para detección cualitativa del antígeno de *Chlamydia* (1, 2, 4,).

##### **a. Examen AF de frotis-directo**

El examen consiste en incubar el frotis con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína dirigido a LPS chlamidiales o Anti – MOMP, para después observarlo en el microscopio de fluorescencia. Cuando se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos a MOMP, en comparación con el cultivo, la sensibilidad del frotis directo es mayor del 90 por ciento, en la mayoría de los estudios publicados; mientras que la especificidad es mayor del 98 por ciento. El valor predictivo de esta prueba es del orden de aproximadamente 80 por ciento en poblaciones con un 10 por ciento de prevalencia de *Chlamydia*, a un 95 por ciento en poblaciones con 30 por ciento de prevalencia. Cuando se encuentran sensibilidades y especificidades inferiores, generalmente se debe a que los especímenes obtenidos no son óptimos y a que la observación microscópica no se realiza por una persona experimentada. A pesar de ser la única prueba directa avalada para el diagnóstico de *C. trachomatis*, en nuestro medio no es muy utilizada por tener el inconveniente de necesitar microscopio de fluorescencia para su observación (1, 2, 4, 33)

### **b. Inmunoensayo con enzimas**

Este examen mide las reacciones antígeno-anticuerpo a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o por análisis inmunoenzimático EIA. La mayoría de estos productos detectan LPS clamidial, la cual es más soluble que MOMP. Estos métodos pueden utilizar, ya sea, anticuerpos monoclonales o policlonales. La sensibilidad de estos exámenes varía del 67 al 90 por ciento, su especificidad del 92 al 97 por ciento, y el valor de predicción positiva entre el 32 y el 87 por ciento, dependiendo de la población que se estudie. Algunos estudios han demostrado que estos métodos son menos sensibles y menos específicos que el análisis de AF (1, 2, 4).

### **c. Prueba rápida para la detección de antígenos de *Chlamydia***

El desarrollo reciente de métodos inmunológicos para la detección de antígeno de *C. trachomatis* en pruebas rápidas como la prueba ICH-502<sup>®</sup> Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), podría ser una alternativa. Este es un inmunoensayo cromatográfico de tamizaje para la detección cualitativa de *C. trachomatis* en muestras ginecológicas. Esta prueba, utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra el antígeno de *C. trachomatis*, que se colocó en la región de línea de prueba de la tira (T). Durante la prueba, la solución del antígeno extraída de la muestra reacciona con el anticuerpo de *Chlamydia* que recubre las partículas. La mezcla migra a reaccionar con el anticuerpo de *Chlamydia* en la membrana y genera una línea roja en la región de la prueba, la presencia de esta línea roja en la región de la prueba indica un resultado positivo, mientras su ausencia indica un resultado negativo. Para servir como un control interno, una línea roja aparecerá siempre en la región del control que indica que fue añadido el volumen apropiado de muestra y que la membrana ha reaccionado adecuadamente (43).

Comparado con el método convencional de cultivo y tinción de Giemsa, con el método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay); esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad relativa de 93.3 y 97.7 por ciento respectivamente (43).

## **5. Método serológico**

Normalmente, la serología de la *C. trachomatis* es de poco valor en el manejo clínico de rutina y se le considera básicamente una herramienta de investigación. A pesar que hay algunas pruebas serológicas disponibles en el mercado, no hay

demostrado su utilidad en el diagnóstico de rutina. Existen dos métodos estándar: fijación de complemento (FC) y micro-inmunofluorescencia (MIF). El método de FC únicamente, ha dado buenos resultados para el diagnóstico de psitacosis, en donde el 50 por ciento de estas infecciones son FC positivo. El método de MIF, es más sensible para determinar anticuerpos anticlamidiales. El tracoma, la conjuntivitis de inclusión e infecciones genitales, pueden ser diagnosticadas por técnicas de MIF, sí la enfermedad está en fase aguda o en fase convaleciente. El único uso clínicamente válido de las pruebas serológicas es en la neumonía del infante por *C. pneumoniae*, en el cual, la serología por MIF de la IgM está disponible, es la prueba de elección, y en algunas ocasiones en que se sospeche la presencia de linfogranuloma venéreo. Las dificultades en la preparación del antígeno y en la conducción de la prueba, restringen el uso de la misma a un limitado número de laboratorios de investigación (1, 2, 10, 17, 18, 27).

## **6. Técnicas de amplificación de ADN**

Varias pruebas de ácido nucleico son ahora, comercialmente avaladas, y muchas otras han sido desarrolladas y evaluadas por laboratorios de investigación. La prueba que ha sido más utilizado es el GenProbe que utiliza la técnica de quimioluminiscencia en hibridación de ADN-ARN, específicamente a la secuencia de ARNr 16S clamidial. La sensibilidad y especificidad de este método son del 85 y 98 al 99 por ciento respectivamente; comparados al cultivo. La sensibilidad relativa del GenProbe comparada a un estándar de amplificación de ADN, aun no ha sido bien evaluada por haber reportado de 77 a 93 por ciento (1, 2, 11, 17, 33, 42).

La segunda clase de pruebas de ácido nucleico envuelven los métodos de amplificación, estas técnicas son el avance más importante en el campo de diagnóstico de *Chlamydia*, desde el cultivo de células *in vitro* remplazó el cultivo en embriones para el aislamiento de *C. trachomatis* de muestras clínicas. Como la amplificación de ácidos nucleicos es altamente sensible y específica, ofrece la oportunidad de diagnosticar tempranamente la infección de *C. trachomatis* en pacientes asintomáticos. La técnica más utilizada y que comercialmente está más disponible es PCR, ésta técnica emplea dos primers de oligonucleótidos sintéticos con secuencias que son complementarias a un segmento de ADN específicos, presente en el organismo. Los primers son extendidos a través de la actividad de una enzima ADN polimerasa termoestable, la más común es la *Taq* polimerasa. La doble banda, producto de PCR

sirve como plantilla para la segunda ronda del primer de temple a desnaturalización. Múltiples ciclos de desnaturalización, temple y extensión del producto, resulta en una amplificación logarítmica del segmento de ADN. Los productos de PCR, son detectados por ensayos colorimétricos o por electroforesis. La prueba comercial de PCR para detectar la presencia de *C. trachomatis*, utiliza los primers contra la región 207-bp del ADN de un plásmido de *C. trachomatis*. Hoy el patrón estándar para el diagnóstico de *C. trachomatis* es la técnica de PCR (1, 2, 11, 12, 33, 38, 42).

Otra tecnología de amplificación de ácidos nucleicos usada para el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis* es la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la cual utiliza 4 bases de oligonucleotidos sintéticos específicos a un fragmento de ADN del plásmido de *C. trachomatis*, se hace la misma reacción con la polimerasa y se cierra con la enzima ligasa. Este procedimiento hace que en teoría la técnica de LCR sea más específica que la técnica de PCR. Los productos de LCR son detectados en un instrumento automático (LCx) que utiliza un sistema de captación inmunocolorimétrico, lo que minimiza la posibilidad de contaminación cruzada. Estas tecnologías de amplificación de ADN ofrecen una sensibilidad y especificidad del 94% y 100% respectivamente (1, 2, 11, 12, 33, 38, 42).

## **E. Tratamiento**

El tratamiento ideal es a base de una dosis oral completa, de tetraciclina, sulfonamida, eritromicina o trisulfapirimidinas durante al menos 3 semanas. Si se administra tetraciclina, la dosis debe ser de 500 mg orales 3 veces al día durante al menos 3 semanas. El tratamiento sistémico es más eficaz en casos esporádicos en zonas no endémicas. En zonas hiperendémicas, en las que la mitad o más de los niños presentan la enfermedad activa o existen conjuntivitis epidémicas estacionales o bacterianas, la re infección y la infección bacteriana recidivante impiden la desaparición de la enfermedad. La eliminación del reservorio del microorganismo mediante tratamientos masivos con antibióticos sistémicos no resulta práctica. Por tanto, la finalidad terapéutica es evitar las complicaciones que producen la ceguera. La tetraciclina tópica dos veces al día, dada de forma continua durante 6 semanas, parece reducir o eliminar las complicaciones que dan lugar a la ceguera. Resultados similares se consiguieron con una pauta de 5 días de tetraciclina tópica repetida una vez al mes

durante 6 meses. Una dosis única de acitromicina, por vía oral, 20 mg/kg, parece tan eficaz como un tratamiento de 6 semanas con tetraciclina tópica (3, 11, 28, 30, 35, 37, 40, 44).

La medicación tópica puede reducir la intensidad de la enfermedad, el porcentaje de transmisión y la conjuntivitis de flora bacteriana y estacional que contribuyen a la gravedad del tracoma en estas zonas. El tratamiento antibiótico oral se recomienda como elemento accesorio en niños con tracoma moderado a grave para mejorar el resultado. El tratamiento quirúrgico también es importante para corregir el entropión, la triquiasis y los trastornos lagrimales (3, 11, 12, 34, 41).

## **F. Prevención**

El control y la prevención de las infecciones oculares por *C. trachomatis* dependen de la educación del público y a los profesionales en salud, especialmente ante la ausencia de una vacuna efectiva; y principalmente, depende de un diagnóstico y tratamiento temprano de las personas infectadas. Hasta el momento las vacunas desarrolladas para prevenir las infecciones de *C. trachomatis* siguen en investigación, en la Universidad de Johns Hopkins, los investigadores desarrollan una versión proteica del antígeno inyectando la *C. trachomatis* a los ratones, aislando y amplificando los anticuerpos producidos; estos anticuerpos los usan para “moldear” una proteína parecida al antígeno exoglicolipido. El próximo paso es adaptar el procedimiento a humanos (4, 44, 45).

## **G. Epidemiología**

Las infecciones en el humano producidas por *C. trachomatis* se encuentran distribuidas a nivel mundial. El tracoma se encuentra alrededor del mundo, se estima que 400 a 500 millones de personas están infectadas, pero es más común en África Norte, el Oriente Medio, Sudamérica y Sur de Asia. En poblaciones endémicas los niños actúan como el reservorio principal para la transmisión de la enfermedad, virtualmente todos los niños están infectados a los 2 años de edad; sin embargo, la mayoría de los niños están libres de enfermedad activa hacia la edad de 10 a 15 años.

La enfermedad se extiende de ojo a ojo a través de los dedos, fomites, el agua y por moscas que buscan los ojos. La incidencia es mayor en condiciones no saludables, de suciedad y de hacinamiento, sobre todo en las capas socioeconómicas más bajas de la sociedad; en Guatemala no se ha determinado la incidencia de esta patología, podría ocupar el tercer lugar entre las causas de ceguera más comunes (3, 4, 6, 9, 10, 12, 28, 37, 38).

En Guatemala únicamente están registrados pocos estudios sobre infección ocular causada por *C. trachomatis*; uno de ellos fue en 1979 en donde se evaluó la prevalencia de tracoma en la población de San Antonio Palopó, Sololá, encontrándose que el 57.52% fueron diagnosticados como tracomatosis según la evaluación clínica corroborando el diagnóstico un tinción de Giemsa, en el cual el 75% presentó cuerpos de inclusión. Otro estudio en 1984 evaluó la frecuencia de clamidiasis ocular en el Hospital Rodolfo Robles, encontrándose que de 200 pacientes de la consulta externa el 61 por ciento presentaron clamidiasis ocular, del total de pacientes el 26 por ciento resultaron positivos sin presentar síntomas relacionados con clamidiasis. Y el otro es un estudio más reciente, en 2002 realizado en la Unidad Nacional de Oftalmología indicó una prevalencia de *C. trachomatis* en pacientes mayores de 12 años que presentaban conjuntivitis, de 15.83 por ciento utilizando una prueba para la detección de antígeno y un 9 por ciento con la tinción de Papanicolaou, la cual no es recomendada para el diagnóstico de *C. trachomatis* (6, 9, 46).



#### IV. JUSTIFICACIÓN

En la Unidad Nacional de Oftalmología aproximadamente diez por ciento de los pacientes de primera consulta presentan síntomas tales como ardor bilateral y sensación de cuerpo extraño. Estos son síntomas comunes a una infección por *C. trachomatis*, a una infección viral o a una respuesta alérgica, lo que hace difícil establecer un diagnóstico conclusivo.

Las infecciones oculares por *C. trachomatis* pueden pasar inadvertidas al presentar los primeros síntomas y es diagnosticada cuando ya se ha instalado una infección crónica como el tracoma, complicando el tratamiento.

El diagnóstico de laboratorio de una infección ocular por *C. trachomatis* se realiza al observar las inclusiones intracelulares de *Chlamydia* por medio de la tinción de Giemsa del frote del tarso superior; una prueba sencilla y específica, pero se ha visto limitada en su realización y en la demanda del médico oftalmólogo por la falta de personal con la instrucción necesaria tanto para la toma adecuada de muestra como para su observación microscópica. El diagnóstico confirmatorio es realizado por medio de cultivo celular, el cual es sensible y específico pero a la vez caro, poco práctico, laborioso y no está disponible en la mayoría de laboratorios.

En Guatemala existen pocos estudios y por lo tanto los datos estadísticos sobre infección ocular por *C. trachomatis* son escasos, existiendo además controversia en cuanto a su prevalencia según publicaciones de estudios realizados en centros asistenciales en los cuales se han usado diversas metodologías diagnósticas.

Por lo anterior, el presente estudio busca evaluar la concordancia de la prueba rápida para determinar el antígeno de *Chlamydia* ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), con la tinción de Giemsa, que es el método convencional; y así poder utilizar la prueba rápida ICH-502® como una alternativa para el diagnóstico rápido, temprano y correcto de una infección ocular por *C. trachomatis*, aparte de presentar ventajas para su uso en estudios epidemiológicos que incluyan un número grande de pacientes.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar la concordancia de la prueba rápida para determinar el antígeno de *Chlamydia* ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), con la tinción de Giemsa para diagnosticar la infección ocular por *C. trachomatis* a pacientes mayores de 15 años que acudan a la Unidad Nacional de Oftalmología.

### B. Específicos

1. Diagnosticar por medio de la tinción de Giemsa de un frote tomado del tarso superior la infección ocular causada por *C. trachomatis*, a los pacientes que acudan con síntomas de ardor bilateral y sensación de cuerpo extraño.
2. Diagnosticar por medio de la prueba rápida para la detección del antígeno de *Chlamydia*, ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), la infección ocular causada por *C. trachomatis* a los pacientes que acudan con síntomas de ardor bilateral y sensación de cuerpo extraño.
3. Determinar si la prueba rápida para la detección del antígeno de *Chlamydia* proporciona resultados concordantes con la prueba citológica.

## **VI. HIPOTESIS**

La prueba rápida para la detección de antígeno de *Chlamydia* tiene una buena concordancia con el método convencional, tinción de Giemsa, por lo que puede ser utilizada para un diagnóstico temprano y preciso de una infección ocular causada por *C. trachomatis*.

## VII. MATERIAL Y METODOS

### A. Universo

Pacientes mayores de 15 años que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

Muestra: 120 pacientes que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología con sensación de cuerpo extraño y/o ardor bilateral (Anexo No. 1).

Criterios de Inclusión:

- Pacientes mayores de 15 años que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología con sensación de cuerpo extraño y/o ardor bilateral.
- Pacientes que no hayan utilizado algún antibiótico sistémico u ocular tópico.

Autora de la Investigación: Fabiola Alejandra Castillo De León

Asesores: Licenciada Margarita Paz de Ramírez

Doctor Julio Paz Morales

#### 2. Institucionales

Unidad Nacional de Oftalmología

Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### 3. Materiales

Equipo: Microscopio de luz

Materiales: Láminas portaobjetos

Hisopos estériles

Reactivos para la recolección de muestra de pruebas rápidas ICH-502®

Pota láminas

Tubos de ensayo

Guantes  
Crayón graso  
Reactivos: Metanol absoluto  
Solución salina estéril  
Reactivo de colorante de Giemsa  
Reactivos de extracción de antígeno A (NaOH 0.2 M)  
Reactivos de extracción de antígeno B (HCl 0.2 N con 0.02% Azida de Sodio)  
Aceite de inmersión

Control de calidad:

Hisopado vaginal proveniente de paciente confirmada con infección de *Chlamydia trachomatis*.

Frote de hisopado vaginal proveniente de paciente confirmada con infección de *Chlamydia trachomatis* teñido con Giemsa.

## C. Metodología

### 1. Selección de pacientes

Se tomaron todos los pacientes mayores de 15 años de ambos sexos que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología con sensación de cuerpo extraño y ardor bilateral; los pacientes que estuvieron de acuerdo en participar en el estudio, firmaron un consentimiento informado (Anexo 2).

### 2. Toma de muestra

Para diagnosticar una infección ocular por *C. trachomatis*, en cada uno de los pacientes se realizó un raspado del tarso superior de ambos ojos con un hisopo de dacrón. Se diseminó el material sobre una lámina de vidrio, identificando correctamente el frote, se dejó secar al aire las láminas y se fijaron con metanol absoluto. Posteriormente los hisopos se sumergieron en un vial de extracción para realizar la prueba rápida.

### **3. Procesamiento de las muestras**

#### **a. Realización de prueba rápida ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA)**

Se introdujeron los hisopos que con muestra de ambos ojos en un tubo que contenía 5 gotas del reactivo A (Hidróxido de Sodio 0.2M), se rotaron unas 10 veces y se dejó reposar por 2 minutos; se agregó 7 gotas del reactivo B (Acido Clorhídrico 0.2 N con 0.02% Azida de Sodio), se rotó de nuevo los hisopos 10 veces y se dejó reposar por 1 minuto. Se extrajo los hisopos y se le colocó un gotero al tubo de reacción, se colocaron 3 gotas de la solución en el pozo de muestra (S) del dispositivo; se leyó el resultado a los 10 minutos, no después de 20 minutos (43).

#### **b. Tinción de Giemsa**

En el laboratorio se hizo una dilución del reactivo de Giemsa con agua destilada 1:20, se cubrió el frote con la tinción de Giemsa por 20 minutos, se lavó con agua neutra y se dejó secar al aire.

### **5. Interpretación de resultados de la prueba ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA)**

- 4. Positivo:** Dos líneas rojas distintas aparecen. Una línea debe estar en la región de Control interno reacción de color (C) y otra línea debe estar en la región de Antígenos para Chlamydia (T). La intensidad del color rojo en la región de la línea de prueba (T) puede variar, dependiendo de la concentración de antígeno de *Chlamydia* presente en el espécimen; por consiguiente, cualquier sombra de rojo en la región de la prueba (T) debe ser considerado positivo.
- 5. Negativo:** Una línea roja aparece en la región del control (C). Ninguna línea roja o rosado claro aparece en la región de la prueba (T).
- 6. Inválido:** La línea del Control no aparece.

### **6. Observación microscópica**

Una vez teñido el frote con Giemsa se observó la totalidad bajo el objetivo de inmersión (100X). Se consideraron positivas aquellas láminas que presentaron células con inclusiones intracitoplásmicas basófilas. Se reportó también la proporción de células afectadas y tipo de células presentes.

## **7. Control de Calidad:**

### **a. Control de calidad de prueba rápida ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA)**

Se utilizó un control de una paciente con diagnóstico de infección vaginal por infección *Chlamydia trachomatis*. Se tomó dos hisopos vaginales uno se introdujo en un tubo que contenía 5 gotas del reactivo A (Hidróxido de Sodio 0.2M), se rotó 10 veces y se dejó reposar por 2 minutos; se agregó 7 gotas del reactivo B (Ácido Clorhídrico 0.2 N con 0.02% Azida de Sodio), se rotó de nuevo y se dejó reposar por 1 minuto. Se extrajo el hisopo y se le colocó un gotero al tubo de reacción, se colocaron 3 gotas de la solución en el pozo de muestra (S) del dispositivo; se leyó el resultado a los 10 minutos.

### **b. Control de calidad de tinción de Giemsa:**

El material del segundo hisopo con muestra vaginal de la paciente infectada con *Chlamydia trachomatis* se diseminó sobre una lámina de vidrio, se dejó secar al aire, se fijaron con metanol absoluto se cubrió el frote con la tinción de Giemsa por 20 minutos, se lavó con agua neutra, se dejó secar al aire y se observó al microscopio.

## **D. Diseño de la investigación**

### **1. Número de muestra**

Por las características del diseño y a la población que se evaluó se tomaron por conveniencia 120 muestras obtenidas del raspado del tarso superior del ojo (Anexo No.1).

### **2. Diseño de muestreo**

No probabilística, por cuota

### **3. Análisis de Resultados**

Se calculó el valor de Kappa para establecer concordancia entre la prueba rápida ICH-502® y la coloración de Giemsa, por medio de una tabla de contingencia de 2 x 2 y utilizando los criterios de Fleiss para interpretarlo (Anexo No. 3) (47).

## VIII. RESULTADOS

Para la realización del estudio se tomó un total de 120 pacientes, hombres y mujeres mayores de 15 años, que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología con sensación de cuerpo extraño y/o ardor bilateral (ver anexo 1). Cada paciente fue informado sobre los propósitos del estudio y posteriormente se obtuvo un consentimiento informado donde cada uno manifestó su acuerdo en participar en él (ver anexo 2). Después de asignársele un número correlativo, a cada paciente se le tomó un raspado del tarso conjuntival superior de ambos ojos con hisopos de dacrón, a partir de los cuales se prepararon improntas de la muestra sobre un portaobjetos, para su posterior coloración con Giemsa. Posteriormente la muestra fue utilizada para correr la prueba rápida ICH 502®.

En los 120 pacientes estudiados, ninguna prueba rápida ICH 502® resultó positiva para el antígeno de *C. trachomatis*, Dos pruebas fueron invalidadas por dar imagen errónea, además de ser negativas a la tinción de Giemsa, por lo que para el análisis estadístico de concordancia entre ambas pruebas, los dos pacientes fueron excluidos del estudio quedando un total de 118 pacientes. De ellos, 38 (32 por ciento) dieron resultado negativo para la prueba rápida y positiva para la microscopía. Ochenta pacientes (68 por ciento) dieron resultado negativo para ambos métodos, tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1

**Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* por tinción de Giemsa y por  
Prueba rápida ICH 502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA) (n=118)**

		GIEMSA		TOTAL
		Positivo	Negativo	
<b>Prueba rápida</b>	<b>Positivo</b>	0	0	0
<b>ICH 502</b>	<b>Negativo</b>	38	80	118
<b>TOTAL</b>	<b>No.</b>	38	80	118
	<b>%</b>	<b>32</b>	<b>68</b>	100

Fuente: Datos Experimentales



El índice de concordancia kappa entre la prueba rápida ICH502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA) y la tinción de Giemsa fue igual a 0.000 (ver anexo 3), demostrando que no hay acuerdo entre estas dos pruebas.

En la tabla 2 se muestran los resultados de los 118 frotos incluidos en el estudio teñidos con Giemsa, mostrando 80 negativos en los que no se observaron cuerpos de inclusión y 38 positivos se observaron cuerpos de inclusión, de los cuales 29 pacientes (25.8 por ciento) con escasos cuerpos de inclusión, 8 pacientes (6.7 por ciento) con regular cantidad de cuerpos de inclusión y 1 paciente (0.8 por ciento) con abundantes cuerpos de inclusión, al examinar clínicamente a este último paciente se le diagnosticó un tracoma establecido por los demás signos que presentaba.

Tabla 2  
**Número y porcentaje de la presencia de cuerpos de inclusión  
en los frotos positivos según la tinción de Giemsa**

<b>Cuerpos de Inclusión</b>	<b>No.</b>	<b>%</b>
Escasos	29	24.5%
Regular cantidad	8	6.7%
Abundantes	1	0.8%
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>32.0%</b>

Fuente: Datos Experimentales

También fue reportada la celularidad del frote, observándose 39 con escasos polimorfonucleares, de los cuales 15 dieron positiva la coloración de Giemsa y 24 negativa, 7 con regular cantidad de polimorfonucleares, de ellos 4 fueron Giemsa positivo y 3 negativo; y 2 con abundantes polimorfonucleares, uno con resultado de Giemsa positivo y uno negativo, tal como aparece en la tabla 3; se observaron en los frotos linfocitos y monocitos pero en cantidades muy pequeñas, por lo que no son tomados en cuenta en esta tabla.

Tabla 3

**Relación entre la presencia de Polimorfonucleares y la tinción de Giemsa**

<b>Polimorfonucleares</b>	<b>Giemsa</b>		<b>TOTAL</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
Escasos	15	24	39
Regular cantidad	4	3	7
Abundantes	1	1	2
No se observaron	18	52	70
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>80</b>	<b>118</b>

Fuente: Datos Experimentales

En la tabla 4 se muestra los síntomas de los 118 pacientes incluidos en el estudio con los resultados de la tinción de Giemsa; para que los pacientes fueran incluidos en el estudio debían presentar sensación de cuerpo extraño y ardor en ambos ojos. Se observa que el síntoma más frecuentemente por el cual acudían los pacientes a consulta es el ardor y otro síntoma (37.2 por ciento). Veintitrés pacientes (19.5 por ciento) consultaron por ardor, sensación de cuerpo extraño y otros síntomas, 19 pacientes (16.2 por ciento) consultaron por ardor y sensación de cuerpo extraño. Se puede observar que no existe un síntoma específico que tenga correlación con una infección por *C. trachomatis*.

Tabla 4

**Correlación entre síntomas presentados por los pacientes y la tinción de Giemsa.**

<b>Síntomas</b>	<b>Tinción de Giemsa</b>		<b>TOTAL</b>	
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>No.</b>	<b>%</b>
Ardor	5	12	17	14.4%
Sensación de cuerpo extraño	1	3	4	3.4%
Ardor y SCE	10	9	19	16.2%
Ardor y otro síntoma	11	33	44	37.2%
SCE y otro síntoma	4	7	11	9.3%
Ardor, SCE y otros síntomas	7	16	23	19.5%
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>80</b>	<b>118</b>	<b>100.0%</b>

Fuente: Datos de encuesta y experimentales

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las infecciones por *C. trachomatis* constituyen un problema de salud importante a nivel mundial ya que es una causa importante de ceguera y de problemas genitourinarios tanto en hombres como en mujeres. La infección ocular por *C. trachomatis* más conocida es el tracoma, infección que generalmente pasa inadvertida en sus etapas tempranas (1,3,4).

En las infecciones oculares causadas por clamidia, el diagnóstico está basado en los hallazgos clínicos y el análisis de laboratorio que consiste en realizar un raspado vigoroso del tarso conjuntival con un hisopo y procediendo a teñir con colorante de Giemsa, con lo que se pueden identificar las inclusiones intracitoplasmáticas características en las células epiteliales. Sin embargo esta técnica necesita una instrucción minuciosa tanto para la toma de la muestra como para su observación microscópica. El presente estudio fue realizado en 120 pacientes, hombres y mujeres mayores de 15 años, que acudieron a la Unidad Nacional de Oftalmología con sensación de cuerpo extraño y/o ardor bilateral. Tuvo por objeto comparar dos pruebas de diagnóstico con principio metodológico diferente; la primera consistente en la observación microscópica de preparaciones teñidas con Giemsa y la segunda, una prueba rápida diseñada para detectar el antígeno de *C. trachomatis*. Aunque el test es utilizado para muestras cervicovaginales y uretrales se utilizó en este estudio para muestras del tarso conjuntival basándose en los principios inmunológicos existentes (1, 4 -7).

En los 120 pacientes estudiados, ninguna prueba rápida ICH 502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA) resultó positiva para el antígeno de *C. trachomatis*. Para aplicar el análisis estadístico de concordancia entre ambas pruebas, dos pacientes fueron excluidos del estudio, debido a que dieron inválida la prueba rápida ICH 502® (banda control no coloreada) y negativa la tinción de Giemsa, por lo que fueron incluidos en el estudio un total de 118 pacientes.

El índice Kappa fue de 0.00, mostrando que no existe concordancia entre ambas pruebas diagnósticas, ya que como se observa en la tabla 1 de los 38 pacientes (32 por ciento) positivos para la tinción de Giemsa, ninguno fue positivo para la prueba rápida ICH-502.® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA)

No fue posible evaluar las características diagnósticas (sensibilidad y especificidad) de la prueba rápida ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA), - Inmunoensayo cromatográfico de tamizaje para la detección cualitativa de *C. trachomatis*-. En la literatura está reportada una comparación de esta prueba rápida con el método convencional de tinción de Giemsa y con el método ELFA (Enzyme Linked Flourescent Assay) en la que se obtuvo una sensibilidad y especificidad relativa de 93.3 y 97.7 por ciento, respectivamente. Sin embargo en el presente este estudio el desempeño de la prueba no puede ser evaluado (ver anexo 4), por no haberse obtenido ningún resultado positivo para la prueba rápida (1, 5, 43).

Al analizar las razones por las que la prueba rápida no detectó el antígeno de *C. trachomatis* en las infecciones oculares demostradas con el método de Giemsa, podría pensarse que una explicación podría ser que la cantidad de antígeno clamidial obtenido en el raspado, no fue suficiente para ser detectable. Esto puede deberse también que los tipos de antígeno clamidial relacionados con el tracoma, no provoquen mucho desprendimiento de células columnares, encontrándose así menor cantidad de antígeno en estas muestras, aún cuando la toma de muestra sea la correcta. La literatura ha reportado que las cepas de *C. trachomatis* que causan paratracoma son muy agresivos y provocan un mayor desprendimiento de células columnares por lo que es posible que se encuentre mayor cantidad de antígeno en esos casos y que la prueba rápida de mejores resultados (9, 32, 36, 37, 43).

Al utilizar la prueba rápida para el diagnóstico de tracoma puede permanecer sin diagnóstico certero, mostrándose así la importancia de realizar un diagnóstico diferencial entre infecciones víricas o alergias que presentan los primeros síntomas relacionados con infecciones clamidiales, por medio de una prueba sencilla y específica, que como muestra este estudio sigue siendo la tinción de Giemsa por su bajo costo y sus resultados confiables, siempre y cuando el personal tenga la instrucción necesaria tanto para la toma adecuada de muestra como para su observación microscópica (1, 5, 6, 9, 24, 43).

Al examen de los 118 frotos teñidos con Giemsa (tabla 2), 38 frotos fueron positivos, de los cuales 29 frotos presentaron escasos cuerpos de inclusión, lo que podría ir relacionado con antígenos menos agresivos; únicamente en 8 frotos se observó

regular cantidad de cuerpos de inclusión y un frote se encontró abundante cantidad de cuerpos de inclusión. Este último paciente fue diagnosticado posteriormente un tracoma establecido, ya que además de consultar por fuerte ardor en ambos ojos y sensación de cuerpo extraño presentaba folículos, papilas, ectropión y una inflamación aguda, que como lo indicó la observación del frote hay una infección establecida de *C. trachomatis*. Tal como se ha visto en estudios anteriores la prevalencia de infecciones oculares por *C. trachomatis* sigue siendo alta, mostrándose hasta un 69 y 75 por ciento en estudios realizados en Guatemala en 1984 por Ortiz, R. en pacientes de consulta externa del Hospital Rodolfo Robles el cual utilizó la tinción de Giemsa y en 1979 por Fischmann, K. en la población de San Antonio Palopó, Sololá en el cual utilizó tinción de Giemsa, Gram y lugol. En el presente estudio se encontró una positividad de 32 por ciento, lo que muestra que las características epidemiológicas de los serotipos relacionados con tracoma están orientados hacia una entidad más benigna, mientras que en conjuntivitis de inclusión la prevalencia es menor, 9.16 por ciento según la tinción de Papanicolaou, tal como reporta Rosal en un estudio realizado en el 2002 en la Unidad Nacional de Oftalmología (1, 6, 9, 46).

La celularidad mostrada en los frotos tanto positivos como negativos es normal observándose linfocitos y monocitos en escasa cantidad en la mayoría de los frotos, mientras que se observaron polimorfonucleares en escasa cantidad en 39 por ciento de los frotos, regular cantidad en el 7 y 2 por ciento con abundante cantidad, sin diferencia significativa entre si estaba positivo o negativo para clamidia, lo cual confirma que estos antígenos de *C. trachomatis* únicamente infectan las células columnares de la conjuntiva, y que la infección persiste ya que pasa inadvertida por los fagocitos, los linfocitos T y B (2, 7, 10, 24 – 28).

De los síntomas que presentaron los pacientes se observó que no hay un patrón establecido entre la relación de los síntomas tales como ardor y/o sensación de cuerpo extraño acompañado de prurito o fotofobia, con una infección clamidial (ver tabla 4), por lo que también no puede distinguirse de una infección viral o alergia al inicio de la enfermedad, lo que acentúa evaluar correcta y tempranamente a los pacientes para evitar el desarrollo de un tracoma establecido (3, 11, 15).

## X. CONCLUSIONES

1. No existe concordancia de la prueba rápida para determinar el antígeno de *Chlamydia* ICH-502®, con la tinción de Giemsa para diagnosticar la infección ocular por *C. trachomatis* a los pacientes mayores de 15 años que acudan a la Unidad Nacional de Oftalmología.
2. La tinción de Giemsa es la prueba de la cual se obtiene mejores resultados para diagnosticar infecciones por *C. trachomatis* con síntomas de ardor bilateral y sensación de cuerpo extraño.
3. No es posible utilizar la prueba rápida para la detección del antígeno de *Chlamydia*, ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA) para el diagnóstico de la infección clamidial ocular.

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. No utilizar la prueba rápida ICH-502® Quick-Check (Acon Laboratorios, USA) para el diagnóstico de infecciones oculares por *C. trachomatis*.
2. Realizar adecuadamente la toma de muestra para la tinción de Giemsa: raspado vigoroso del tarso superior del ojo con un hisopo que no debe frotarse en la lámina, sino depositar la muestra suavemente a manera de impronta para evitar que las células se rompan y asegurar que los cuerpos de inclusión puedan ser debidamente coloreados y observados al microscopio.

## XII. REFERENCIAS

1. Black C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev. 1997. 10 (1). (p. 160–184).  
Disponible en <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/10/1/160.pdf> fecha de consulta 5 de marzo de 2004.
2. Murray P. *et al.* Manual of clinical microbiology. 6. Ed. Estados Unidos: ASM Press, 1995. 993p. (p. 669–676).
3. Arffa RC. Grayson's enfermedades de la cornea. 4. Ed. España: Harcourt Brace, 1999. 766p. (p. 142 -152).
4. Infecciones por *Chlamydia trachomatis*, pautas para la prevención y control. Estados Unidos: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Servicio de Salud Pública, Centro para el Control de Enfermedades, Doc. Tec. No 30333, 1985. 20p. (p. 5–11).
5. Wizel Cohen B. Infección cervical materna por *Chlamydia trachomatis* y riesgo de conjuntivitis de inclusión neonatal. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1985. 141p.
6. Rosal Sittler LF. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en pacientes mayores de 12 años. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 2002. 61p.
7. Jawertz E. *et al.* Microbiología médica. México: Manual Moderno, 1996. 688p. (p. 363-369).
8. David B. *et al.* Tratado de microbiología. 2. Ed. España: Salvat, 1979. 1291p. (p. 938–944).
9. Roldan Ortiz MR. Frecuencia de clamidiasis ocular en doscientos pacientes de la consulta externa del hospital Rodolfo Robles diagnosticada por microscopio. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1984. 37p.
10. Joklink W. *et al.* Zinzzler Microbiología. 3. Ed. México: Panamericana, 1990. 651p. (p. 363–373).
11. Krachmer M. *et al.* CORNEA. Cornea and external disease: clinical diagnosis and management. Estados Unidos: C.V. Mosby. Vol. 2, 1997. 752p. (p. 779–789).
12. Leibowitz H, Waring G. Corneal Disorders: clinical diagnosis and management. 2. Ed. USA: Saunders Company, 1998. 1172p. (p. 644 – 658).
13. Gordon F, Quan A. Occurrence of glycogen inclusions of psittacosis – limphogranuloma venereum – trachoma agents. J Infect Dis, 1965. 115:186.



14. Page L. Proposal for recognition of two species in *Chlamydia*. Jones, Rake and Stearns. J Bacteriol, 1945. 18. (p. 51 – 66).
15. Everett K. Architecture of the cell envelop of *Chlamydia*. GBC J Bacteriol, 1995. 177. (p. 877 – 882).
16. Poppert S. *et al.* Detection and differentiation of *Chlamydiae* by fluorescence in situ hybridization. Appl Envir Microbiol. 2002. 68. (p. 4081–4089).  
Disponible en <http://aem.asm.org/cgi/reprint/68/8/4081.pdf> fecha de consulta 5 de marzo de 2004.
17. Fehlner-Gardiner C. *et al.* Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. J Biol Chem. 2002. 277 (30). (p. 26893-26903).
18. Pelczar M. *et al.* Microbiología. 4. Ed. México: McGraw-Hill, 1995. 532p. (p. 241-243).
19. Moulder J. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. Microbiol Rev, ASM. 1991. 55. (p. 143-190).
20. Garrett A, Harrison M, Marine G. A search for the bacterial mucopeptid component muramic acid in *Chlamydia*. J. Gen Microbiol, 1974. 80. (p.315 - 318).
21. Marine G, Meyer K. The toxins of the psittacosis – lymphogranuloma group of agents, the toxicity of various members of the psittacosis lymphogranuloma group. J Infect Dis, 1950. 86. (p. 227 – 232).
22. Wang S, Grayton J, Alexander E. Simplified micoinmunofluorescence test with trachoma – lynchogranuloma venereum (*C. trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. J Clin Microbiol, 1975. 1. (p. 250 – 255).
23. Wang S, Grayston J. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. J Ophtalmol, 1970. 70 (p. 367).
24. Caldwell H. *et al.* Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. J Clin Inv, 2003. 1. (p. 1757–1769).
25. Mygind P. *et al.* Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. Clin Diagn Lab Immunol. 1998. 5. (p. 313-318).  
Disponible en <http://cdli.asm.org/cgi/reprint/10/1/103.pdf> fecha de consulta 7 de marzo de 2004.
26. Porting JC. *et al.* Characterization of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2 in chlamydial infection. Clin Diagn Lab Immunol. Jan 2003. (p. 103–107).  
Disponible en <http://cdli.asm.org/cgi/reprint/10/1/103.pdf> fecha de consulta 7 de marzo de 2004.

27. Dean D. *et al.* Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimulation. *Infect Immunol*, 2001. 69. (p. 2442–2447).  
Disponible en <http://iai.asm.org/cgi/reprint/69/4/2442.pdf> fecha de consulta 7 de marzo de 2004.
28. Smolin G. *et al.* *The Cornea*. 3. Ed. Estados Unidos: Little, Brown and Company, 1994. (p. 277–292).
29. Bustein G. *et al.* Incident *Chlamydia trachomatis* infections among incity adolescent fameless. *JAMA* 1998. 280 (6). (p. 521–526).
30. Yenoff M. *et al.* *Ocular Pathology*. 5. Ed. Tailandia: Mosby-Wolfe, 2002. 761p. (p. 210–213).
31. Nave OF. Detección de *Chlamydia trachomatis* en ojo y uretra en pacientes asintomaticos. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. 52p.
32. Basualdo JA. *et al.* Conjuntivitis folicular debida a *Chlamydia trachomatis*. *medicina*. 2001. 61 (4). (p. 397–400).
33. Valencia C. *et al.* Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en conjuntivitis neonatal determinada mediante las técnicas de inmunofluorescencia y amplificación génica. *Revista Médica de Chile*. 2000. 128 (7).
34. Forrester D. *et al.* *The eye basic sciences in practice*. 2. Ed. Inglaterra: Saunders, 2002. 409p. (p. 377 y 378).
35. Kanski J. *Clinical Ophthalmology*. 5. Ed. Inglaterra: Butterworth Heinemann, 2003. 733p. (p. 73).
36. Rodríguez Gazquez MA. *et al.* Etiología bacteriana de la conjuntivitis neonatal. *Colombia Médica*, Colombia. 1997. 28 (2). (p.58–61).
37. Mabel D, Bailey R. Eradication of trachoma worldwide. *BJ Ophthalmol*. 1999. 83. (p.1261–1263).
38. Baral K. *et al.* Reliability of clinical diagnosis in identifying infectious trachoma in a low-prevalence area of Nepal. *Bull World Health Org*. 1999. 77 (6). (p. 461–466).
39. Jendro MC. *et al.* Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potencial mechanism for persistent infeccion. *Infect Immun*. 2000. 68. (p. 6704–6711).  
Disponible en <http://iai.asm.org/cgi/reprint/68/12/6704.pdf> fecha de consulta 27 de febrero de 2004.
40. Yanoff M. *et al.* *Ophthalmology*. 2. Ed. España: C.V. Mosby, 2004. 521p. (p. 402).

41. Apple R. *et al.* Ocular Pathology. 5. Ed. Estados Unidos: C.V. Mosby, 1998. 705p. (p. 568–571).
42. Bailey-Scott. Diagnóstico Microbiológico. 6. Ed. Argentina: Panamericana, 1983. 1116p.(p. 625).
43. Inserto del producto ICH-502®. Prueba rápida para detección del antígeno de *Chlamydia*. Estados Unidos. 2004.
44. Lenart J. *et al.* Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001. 45. (p. 2198-2203).  
Disponible en <http://aac.asm.org/cgi/reprint/45/8/2198.pdf> fecha de consulta 16 de marzo de 2004.
45. DeMets A. *Chlamydia trachomatis*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Bacteriol 330 Home Page. 1998.  
Disponible en <http://www.bact.wisc.edu/bact330/lecturechlamydia.htm> fecha de consulta 10 de diciembre de 2003.
46. Fischmann K. Prevalencia de tracoma en la población de San Antonio Palopo Sololá, Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1979. 46p.
47. Cantor AB. Simple size calculating for cohn's Kappa. Psychol Methods, 1996 (1). (p. 150 – 153).

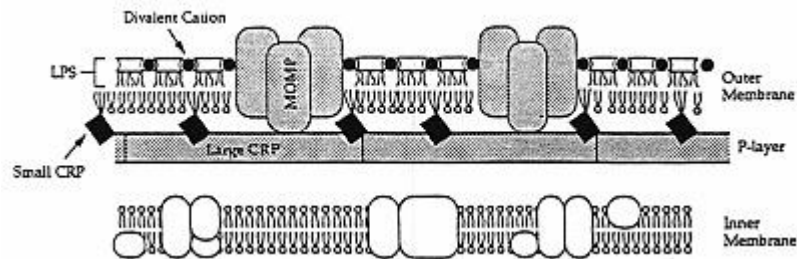
### XIII. ANEXOS

**Tabla. No. 1. Clasificación Taxonómica del orden *Chlamydiales***

Orden:	<i>Chlamydiales</i>	
Familia:	<i>Chlamydiaceae</i>	
Géneros:	<i>Chlamydophila</i>	<i>Chlamydia</i>
Especies:	<i>C. psittaci</i> <i>C. abortus</i> <i>C. caviae</i> <i>C. felis</i>	<i>C. muridarum</i> <i>C. suis</i> <i>C. trachomatis</i>

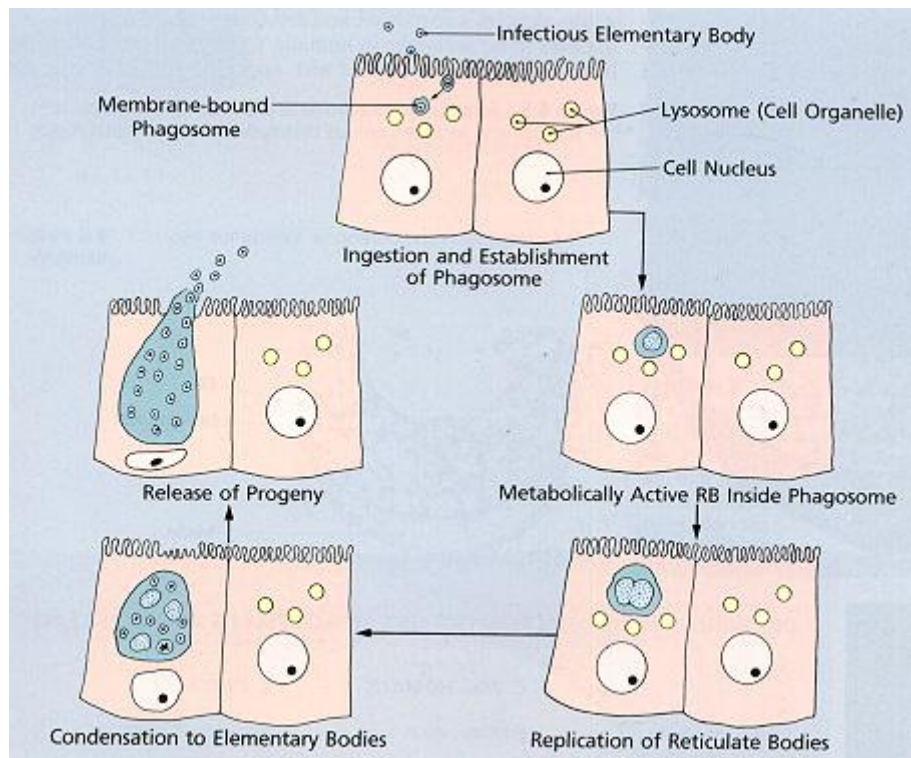
Tomado de: Clasificación taxonómica basada en la reclasificación por Everett *et al*, Detection and differentiation of *Chlamydiae* by fluorescence in situ hybridization. Appl Envir Microbiol. 2002. 68. (p. 4081–4089).

**Figura No. 1: Modelo de la pared celular de *Chlamydia***



Tomado de: DeMets A. *Chlamydia trachomatis*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Bacteriology 330 Home Page. 1998.

**Figura No. 2: Ciclo de vida infeccioso de *Chlamydia*.**



Tomado de: DeMets A. *Chlamydia trachomatis*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Bacteriology 330 Home Page. 1998.

**Tabla No. 2. Características de las Clamidas**

	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. Pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>
Morfología de la Inclusión	Redonda, vacuolar	Redonda, densa	Grande de forma variable densa
Glucógeno en inclusiones	Sí	No	No
Morfología del cuerpo elemental	Redonda	Periforma, redonda	Redonda
Susceptible a sulfonamidas	Sí	No	No
Homología de DNA a <i>C. pneumoniae</i>	< 10 %	100%	< 10 %
Plásmido	Sí	No	Sí
Serovares	18	1	≥ 4
Huésped natural	Seres humanos	Seres humanos	Aves
Modo de transmisión	De persona a persona, madre a lactante	Por el aire, de persona a persona	Excretas de aves transmitidas al humano por el aire
Enfermedades principales	Tracoma, conjuntivitis De inclusión, ETS, pneumonitis neonatal LGV, Síndrome de Reiter	Neumonía, faringitis, sinusitis bronquitis,	Psitacosis, neumonía, fiebre de origen inexplicable

Tomado de: Jawertz E, *et al.* Microbiología médica.

**Tabla No. 3 Enfermedades Humanas Causadas por *Chlamydia trachomatis***

Biovariedad	Serovariedad	Enfermedad o Síndrome Clínico	Distribución Geográfica
Tracoma	A, B, Ba y C	Tracoma	Endémico principalmente en Asia y Africa
	D - K	Conjuntivitis de inclusión Neumonía en lactantes Uretritis no gonocócica Epididimitis Síndrome de Reiter	Mundial
Linfogranuloma Venéreo (LGV)	L1, L2, L2a y L3	LGV	Mundial

Tomado de: Jawertz E, *et al.* Microbiología médica.

**Tabla No. 4** Dianóstico Diferencial de las Infecciones Oculares por *Chlamydia trachomatis*

<b>Signos Clínicos</b>	<b>Trachoma</b>	<b>Conjuntivitis de Inclusión</b>	<b>Conjuntivitis Neonatal</b>
Tiempo de incubación	5 días	5 días	3 - 12 días
Nodulo Preauricular	Presente	Presente	Ausente
Bilateral	Usual	Raro	Usual
Reacción Conjuntival	Folicular, se afecta la conjuntiva superior	Folicular, afecta conjuntiva inferior	Papilar, se afecta la conjuntiva superior e inferior
Complicaciones Conjuntivales	Cicatrización, simblefaron	no hay cicatrizes	puede haber cicatrización
Reacción Corneal	Foliculos limbares, infiltrados, úlceras	Infiltrados intra Y subepiteliales	Raros infiltrados
Complicaciones Corneales	Agujeros de Herbert pannus marcado, cicatrización densa disminución visual	Micropannus, no cicatrizes, no disminuye la visión	Pannus, cicatrizes, rara disminución de la visión
Otras complicaciones	Entropio, triquiasis ojo seco, ulceración cornel recurrente	Enfermedad pélvica inflamatoria, uretritis	Pneumonitis, vaginitis, posible gastroenteritis

Tomado de: Leibowitz H, Waring G. Corneal Disorders: clinical diagnosis and management.

## Anexo 1

### Tamaño de la muestra

Se estima que el 10% de los pacientes que acuden a la Unidad Nacional de Oftalmología, presenta sensación de cuerpo extraño y/o ardor bilateral. Para la ejecución del estudio se realizó un muestreo por conveniencia en el que se tomó una muestra de 120 pacientes.

### 2. Numero de muestra (“n”)

Para calcular el “n” es necesario establecer que:

- Nivel de confianza será del 95% con  $Z = 1.96$
- Variación esperada igual a  $r^2 = pq = 0.25$ , donde  $p =$  proporción positiva = 0.5 y  $q =$  proporción negativa = 0.5
- Límite de error (%) será del 10%.
- El número poblacional aproximado  $N = 1,400$  pacientes por año.

El cálculo se realizó utilizando el programa Epi-info 6.0 dando un “n” mínimo de 90 pacientes.

Por conveniencia se tomará un “n” de 120 pacientes.



## Anexo 2

### CARTA DE CONSENTIMIENTO:

YO \_\_\_\_\_, ESTOY INFORMADO(A) QUE PARTICIPARÉ EN EL ESTUDIO TITULADO: **DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E INMUNOLÓGICO DE *Chlamydia trachomatis* EN PACIENTES QUE ACUDEN A LA UNIDAD NACIONAL DE OFTALMOLOGIA.** POR LO QUE DOY AUTORIZACIÓN PARA TOMAR LA MUESTRA DEL TARSO CONJUNTIVAL SUPERIOR QUE SEA NECESARIA, PARA SU PROCESAMIENTO Y LA OBTENCIÓN DEL DIAGNÓSTICO.

### Anexo 3

- **Tabla de 2 x 2:**

		Método de Referencia	
		+	-
Método	+	a	b
ICH-502®	-	c	d

- **Criterios de Fleiss:**
  - < 0.4 = No hay acuerdo
  - 0.4 – 0.75 = Acuerdo intermedio
  - > 0.75 = Buen acuerdo

#### Anexo 4

- Concordancia entre dos observadores con dos o más categorías

Nivel de confianza: 95 %

Número de categorías: 2

Tabla de clasificaciones

		Giemsa	
		1 (+)	2 (-)
Método	1 (+)	0	0
	ICH-502® 2 (-)	38	80

**Kappa 0.000**

Kapa mínimo: -0.1813

Kappa máximo: 0.4389

**Valor P: 1.000**

**Sensibilidad:**  $P(\text{positivos prueba rápida} / \text{positivos Giemsa}) * 100$

$$1.000(0/35) * 100 = \mathbf{0\%}$$

**Especificidad:**  $P(\text{negativos prueba rápida} / \text{negativos Giemsa}) * 100$

$$1.000(79/79) * 100 = \mathbf{100\%}$$

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA BIOLÓGICA

**DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E INMUNOLÓGICO  
DE *Chlamydia trachomatis* EN PACIENTES QUE ACUDEN  
A LA UNIDAD NACIONAL DE OFTALMOLOGIA**

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Proveniencia \_\_\_\_\_

Número de Registro

\_\_\_\_\_

**Síntomas y Signos:**

**Resultado de la prueba rápida ICH-502® para *Chlamydia trachomatis*:**

Positivo

Negativo

Inválido

**Resultado del Frote teñido con Giemsa:**

Figura No. 3 Tinción de Giemsa de control positivo.



Tomado de: datos experimentales de paciente diagnosticado con *C. trachomatis*.

Figura No. 4 Prueba rápida ICH 502 de control positivo.



Tomado de: datos experimentales de paciente diagnosticado con *C. trachomatis*.