



Artículo original

Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de hisopado endocervical por inmunofluorescencia directa y reacción en cadena de la polimerasa

Nailet Arráiz Rodríguez^{a,*}, Messaria Ginestre Perez^a, Maribel Castellano González^a,
Armindo Perozo Mena^b, Vladimiro Urdaneta^a

^aEscuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia

^bCentro de Referencia Bacteriológica SAHUM
Maracaibo – Venezuela

Recibido 18 de enero de 2006; aceptado 11 de mayo de 2006

Resumen: *Chlamydia trachomatis* es un patógeno de alta prevalencia en infecciones urogenitales; según datos de la OMS, anualmente se detectan 89 millones de nuevos casos a nivel mundial. Con la finalidad de comparar la sensibilidad del método de inmunofluorescencia directa (IFD) con técnicas de amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), e investigar la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres sintomáticas y asintomáticas, se analizaron 54 muestras de hisopado endocervical de pacientes quienes solicitaron atención ginecológica en un Ambulatorio de la ciudad de Maracaibo. Para investigar *Chlamydia trachomatis* por IFD se utilizó el kit *Chlamydia Direct IF* (bioMerieux®). La detección molecular se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-CTP), utilizando los oligonucleótidos CTP1 y CTP2 dirigidos a secuencias de un plásmido endógeno de *Chlamydia trachomatis* que genera un producto de 201 pb. 5/54 muestras resultaron positivas con PCR-CTP; mientras que mediante IFD se detectaron 3 casos. 49 muestras fueron negativas por ambos ensayos. La prevalencia de *Chlamydia trachomatis* fue de 5,55% para IFD y 9,26% para PCR-CTP. Comparada con el ensayo PCR-CTP, la sensibilidad del análisis por IFD fue de 60,00%. Los métodos moleculares ofrecen una estrategia diagnóstica que puede contribuir al diseño de programas de control epidemiológico, dirigidos a disminuir la prevalencia de este microorganismo.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, IFD, PCR-CTP, Detección molecular, infección urogenital

Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical swabs samples by direct immunofluorescence and polymerase chain reaction

Abstract: *Chlamydia trachomatis* is a pathogen of high prevalence in urogenital infections; according to data of the WHO, annually 89 millions of new cases are detected at world wide level. With the purpose of comparing the method sensibility of direct immunofluorescence (DIF) and amplification techniques by PCR to the *Chlamydia trachomatis* detection in clinical samples, and to investigate the *Chlamydia trachomatis* prevalence in symptomatic and asymptomatic women; 54 endocervical swabbing specimens of patient that solicited gynecological attention in a Ambulatory of Maracaibo were analyzed. To investigate *Chlamydia trachomatis* by DIF *Chlamydia Direct IF* kit (bioMerieux®) was used. The molecular detection was carried out by polymerase chain reaction (PCR-CTP), using the CTP1 and CTP2 oligonucleotide directed to sequences of endogenous plasmid of *Chlamydia trachomatis* that generated a 201 pb product. 5/54 samples were positive with PCR-CTP; while by DIF 3 cases was detected. 49 samples were negative for both tests The prevalence of *Chlamydia trachomatis* was of 5,55% for DIF and 9,26% for PCR-CTP Compared with PCR-CTP test, the sensibility of the DIF analysis was 60,00%. The molecular methods offer a diagnostic strategy that can contribute to the design of epidemiological control programs, directed to diminish the prevalence of this microorganism.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, DIF, PCR-CTP, molecular detection, urogenital infection

* Correspondencia:
E-mail: narraiz@cantv.net

Introducción

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es uno de los patógenos de mas alta prevalencia en infecciones del tracto urogenital. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, anualmente se detectan 89 millones de nuevos casos de infecciones por *C. trachomatis* a nivel mundial [1,2,3,4]. Las infecciones por *C. trachomatis* se asocian con cervicitis y uretritis, pudiendo alcanzar las trompas de Falopio con consecuencias graves de infertilidad y embarazo ectópico [5-7]. Sin embargo, es preocupante la observación de una alta tasa de infecciones asintomáticas en mujeres (aproximadamente 70-90%) [3,5,8,9]; las cuales, por no presentar síntomas, no acuden a consultas médicas y por lo tanto, no son investigadas ni sometidas a tratamiento antimicrobiano. En consecuencia, estas mujeres asintomáticas son candidatas potenciales a padecer las complicaciones anteriormente mencionadas y paralelamente, se complica la situación epidemiológica debido a que los pacientes asintomáticos son portadores silentes del microorganismo.

El diagnóstico convencional de infecciones por *C. trachomatis* resulta difícil debido a que este organismo es un patógeno intracelular obligatorio, por lo cual no crece en medios de cultivo bacteriológico de uso común. *Chlamydia* requiere cultivos de líneas celulares, siendo éstos de alto costo y de difícil mantenimiento en un laboratorio de rutina, por lo cual muchos laboratorios han abandonado la práctica de investigación de *C. trachomatis* en muestras clínicas. Debido a esta problemática, resulta predecible un sub-registro importante de infecciones urogenitales causadas por *Chlamydia* en nuestra población, por lo cual se hace imperativo la estandarización y aplicación de pruebas diagnósticas que reúnan criterios de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para ser aplicables en poblaciones de mujeres con riesgo de infección, a fin de conocer la prevalencia real de este patógeno en nuestra comunidad. Recientemente se han desarrollado técnicas comerciales para la detección directa de *C. trachomatis* en muestras clínicas por inmunofluorescencia o inmunoensayo enzimático [10-12] y se han introducido nuevas estrategias de diagnóstico basadas en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, con altos porcentajes de especificidad y sensibilidad [8-10,13-16].

El objetivo de este trabajo fue comparar la sensibilidad del método de inmunofluorescencia directa con técnicas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: polymerase chain reaction) basada en secuencias del plásmido críptico de *C. trachomatis*, e investigar la prevalencia de infecciones genitales por *C. trachomatis* en una población de mujeres sintomáticas y asintomáticas.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio de tipo transversal, descriptivo y analítico.

Población y muestra

Se analizaron 54 muestras de hisopado endocervical proveniente de pacientes quienes asistieron a consulta de Ginecología en el Ambulatorio "María de la Candelaria" ubicado en la ciudad de Maracaibo. La población incluye 21 pacientes sintomáticas y 33 asintomáticas en edades comprendidas entre 18 y 45 años. La población sintomática se refiere al grupo de pacientes que acuden a consulta ginecológica con alguna manifestación clínica genitourinaria (descarga o flujo vaginal anormal, sangramiento postcoital, disuria, dolor abdominal, dismenorrea). La población asintomática fue definida como el grupo de pacientes que acuden a la consulta como rutinas de control ginecológico sin manifestaciones clínicas.

La muestra fue tomada por personal médico entrenado y consistió en un hisopado endocervical obtenido mediante rotación del hisopo en la zona de transición escamocolumnar del endocervix, previa eliminación de la secreción endocervical. Se tomaron dos hisopos, el primero se utilizó para realizar un extendido sobre una lámina portaobjeto para análisis por inmunofluorescencia directa (IFD) y el segundo se colocó en buffer fosfato salino como medio de transporte para ser analizado por PCR.

Ensayo por inmunofluorescencia directa

Para la investigación de *C. trachomatis* por la técnica de IFD se utilizó el kit comercial *Chlamydia* Direct IF (bio-Merieux®). Este método se basa en la asociación de dos anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína dirigidos cada uno de ellos a estructuras antigénicas diferentes. El primer anticuerpo monoclonal reconoce un epítopo situado sobre el antígeno de especie, proteína mayor de la membrana externa (MOMP); el segundo anticuerpo monoclonal está dirigido contra un antígeno de género y reconoce estructuras específicas de lipopolisacáridos (LPS). Estos dos anticuerpos tienen una actividad complementaria y permiten identificar los 15 serotipos de *C. trachomatis* en sus diferentes estadios de evolución: cuerpos elementales, cuerpos reticulados e inclusiones.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de *C. trachomatis* a partir de las muestras clínicas se llevó a cabo utilizando procedimientos de lisis enzimática reportados previamente (8-10), con algunas modificaciones. Se descartó el hisopo y el contenido de los tubos fue transferido a tubos de 1,5 ml. Esta suspensión se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 400 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Se agregó 70 µl de SDS 10% y 10 µl de proteinasa K 10 mg/ml, se incubó a 65°C por 3 horas. Se realizaron dos extracciones con 500 µl de cloroformo, se aplicó vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y el ADN se precipitó con 500 µl de isopropanol. El sedimento se resuspendió en 30

µl de buffer TE. Se utilizó 3 µl de la muestra para ensayos de amplificación.

Ensayos de amplificación por PCR

Para la detección de *C. trachomatis* se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando los oligonucleótidos CTP1 y CTP2 dirigidos a secuencias de un plásmido endógeno de *C. trachomatis* (8-11) que genera un producto de 201 pb. Se preparó un volumen final de mezcla de reacción, consistiendo en 5 µl de buffer taq DNA polimerasa 10X (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200µM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2 µl de cada oligonucleótido 10 µM (20 pmoles cada oligonucleótido). Se utilizó 0,5µl de Taq DNA polimerasa 1U/µl (PROMEGA) y 3 µl de muestra de ADN para cada reacción. El programa de amplificación consistió en 4 minutos a 94°C y 40 ciclos de amplificación de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de amplificación a 72°C por 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100™. Una

muestra fue considerada positiva cuando se obtuvo amplificación del fragmento de 201 pb en dos reacciones de PCR llevadas a cabo en dos momentos diferentes.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2,5% y se utilizó buffer TBE para la corrida electroforética (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH 8). La corrida se llevó a cabo a 60v/cm por 3 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en transiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP.

Resultados

En la Figura 1 se muestra el resultado de uno de los análisis donde se puede visualizar un producto de PCR de 201 pares de bases en cuatro muestras. Esta banda generada en ensayos PCR-CTP utilizando oligonucleótidos CTP1 y CTP2 fue detectada en 5 de las 54 muestras ensayadas, revelando la presencia de *C. trachomatis*, mientras que el ensayo de IFD detectó solo 3 casos positivos.

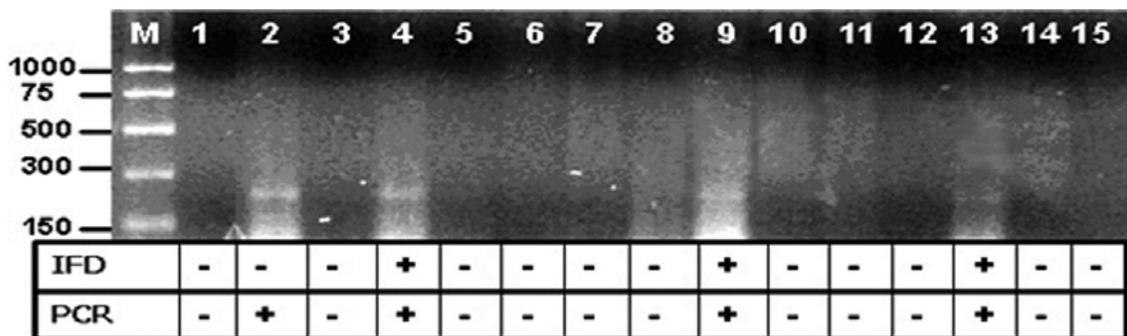


Figura 1. Análisis por PCR con oligonucleótidos CTP1 y CTP2. Se evaluaron 54 muestras endocervicales. Las muestras con el amplificación de 201 pb revelan la presencia de *C. trachomatis*. Se identifican muestras positivas por IFD.

Todas las muestras positivas por IFD también resultaron positivas por PCR-CTP, 49 muestras fueron negativas por ambos ensayos. La prevalencia estimada de infección por *C. trachomatis* en la población evaluada fue de 5,55% para IFD y 9,26% para PCR-CTP (Tabla 1). Comparada con el ensayo PCR-CTP, la sensibilidad del análisis por IFD resultó en un 60%.

Todos los casos positivos de infección por *C. trachomatis* fueron detectados en pacientes en edades comprendidas entre 20 y 25 años.

Los tres casos detectados tanto por IFD como PCR-CTP correspondieron a pacientes que presentaban secreción mucopurulenta y sangramiento post-coital (sintomáticas), mientras que las 2 muestras adicionales que resultaron positivas sólo por el ensayo PCR-CTP provenían de pacientes asintomáticas.

Tabla1. Comparación de ensayos IFD y PCR (CTP) para la detección de *C. trachomatis* en muestras endocervicales.

Muestras	Tipo de ensayo			
	IFD		PCR	
	Número de muestras	Porcentaje	Número de muestras	Porcentaje
Positivas	3	5,55	5	9,26
Negativas	51	94,45	49	90,74
Total	54	100,00	54	100,00

Discusión

La mayoría de infecciones por *C. trachomatis* son asintomáticas, pero pueden causar graves complicaciones a largo y mediano plazo, por lo cual se requieren técnicas sensibles y específicas de laboratorio para garantizar el diagnóstico y tratamiento oportuno de estas infecciones.

Hasta el momento la técnica estándar de laboratorio para el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis* ha sido el cultivo; sin embargo, esto ha sido cuestionado intensamente a través de diversos estudios que reportan baja sensibilidad en el orden de 50-80%, al ser comparado simultáneamente con varias técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, cuya sensibilidad alcanza valores de 94% a 98% [12, 15-19]. Además de la baja sensibilidad del cultivo aún en laboratorios de gran experiencia (18), el aislamiento del microorganismo puede requerir 7 días y el almacenamiento, transporte y procesamiento de la muestra requieren de cuidados especiales, de manera que se han introducido estrategias alternativas de diagnóstico tales como ensayos basados en inmunofluorescencia y técnicas de análisis de ácidos nucleicos.

La prevalencia de infección por *C. trachomatis* en la población evaluada fue de 9,26% por PCR-CTP, comparada con un 5,55% estimado por IF. Estos resultados permiten inferir que utilizando el ensayo IFD, potencialmente se podría errar en el diagnóstico en un 3,71% de pacientes, negando la posibilidad de brindarles un tratamiento adecuado e incrementando el riesgo de desarrollar complicaciones y favoreciendo por otra parte, la propagación de la bacteria.

Estos resultados y otros reportes que resaltan una baja sensibilidad para los inmunoensayos [12,17,20], deben ser tomados en cuenta por aquellos laboratorios que utilizan exclusivamente ensayos inmunoenzimáticos para la detección de *C. trachomatis*, particularmente algunos diseñados para ser aplicados en los consultorios médicos.

La prevalencia de infecciones en la población analizada puede considerarse relativamente baja, si se compara con resultados publicados por otros autores que reportan tasas de prevalencia en el rango de 1%-10% para poblaciones de baja a mediana prevalencia (12,18-20), hasta 11%-20% para poblaciones de alta prevalencia [5,10,12,20].

Los resultados de este estudio son consistentes con los datos reportados en la literatura [8,9,14-17], al encontrarse que la infección por *C. trachomatis* fue más frecuente en mujeres jóvenes y no estuvo asociada a la presencia de manifestaciones clínicas en la población evaluada, si se toma en cuenta que sólo 3 casos de los 5 detectados presentaban alguna manifestación clínica. Un hallazgo importante que se debe resaltar en este estudio es que las infecciones asintomáticas por *C. trachomatis* fueron detectadas sólo con el ensayo de PCR-CTP, de manera que la aplicación de técnicas sensibles brinda la posibilidad de ofrecer un tratamiento adecuado y oportuno a estas pacientes.

Los métodos moleculares ofrecen una estrategia de diagnóstico sensible y podrían ser utilizados para investigación a gran escala de infecciones causadas por *C. tracho-*

matis en la población, pudiendo brindar información epidemiológica para el diseño de programas de control y disminuir la prevalencia de este agente infeccioso. Uno de los argumentos utilizados para restringir el uso de técnicas moleculares es su alto costo, sin embargo, esta limitación puede ser superada si se obvia la adquisición de "kits" comerciales, los cuales además de costosos, no brindan resultados reproducibles [21]. Como alternativa, se pueden adquirir reactivos separadamente y estandarizar protocolos de extracción y de amplificación de ácidos nucleicos en los laboratorios locales, lo cual disminuye significativamente el costo por ensayo.

Referencias

- [1] Krul KG. Closing in on *Chlamydia*. CAP Today 1995; 9:1-20.
- [2] Adler MW. Sexually transmitted diseases control in developing countries. Genitourin Med 1996; 72:83-8.
- [3] Martínez MA, Diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis*: Estado actual de un problema. Rev Chil Infectol. 2001; 18(4):1-14.
- [4] Frontela M, Amores I, Yepe S Kourí V, Ferreira R, Mallea L. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudado endocervical por la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cubana Endocrinol 2002; 13(2):135-43.
- [5] Hay PE, Ghaem-Maghami S. *Chlamydia* and nongonococcal urethritis. Curr Opin Infect Dis 1997; 10:44-9.
- [6] Cates W, Rolfs RT, Aral SO. Sexually transmitted diseases, pelvic inflammation diseases and infertility an epidemiologic update. Epidemiol Rev 1990; 19:199-220.
- [7] Henry-Suchet J, Catalan F, Loffredo V, Sanson MJ, Debache C, Pigeau F, et al. *Chlamydia trachomatis* associated with chronic inflammation in abdominal specimen from women selected for tuboplasty. Fertil Steril 1981; 36:599-605.
- [8] Lan J, Melgers I, Meijer CJ, Walboomers JM, Roosendaal R, Burger C, et al. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by the highly sensitive PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:3194-7.
- [9] Morré SA, Rozendal L, Van Vankelgoed IG, Boeke AJ, Van Voorst Vader P, C. Schirm, et al. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations. J Clin Microbiol 2000; 38:2292-6.
- [10] Morré SA, Ossewaarde JM, Lan J, Van Doornum JM, Walboomers JM, Maclaren DM, et al. Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveals variants and serovars Ba, G y J as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. J Clin Microbiol 1998; 36:345-51.
- [11] Quinn TC. Recent advances in the diagnosis of sexually transmitted diseases. Sex Trans Dis 1994; 21(Suppl 2):S19-S27.
- [12] Black CM. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10:160-84.
- [13] Morré S.A, Moes R, Van Valkengoed I, Boeke JP, Van Eijk JT, Meijer CJ, et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens will facilitate large epidemiological studies. J Clin Microbiol 1998; 36:3077-8.

- [14] Yamazaki T, Hagiwara T, Kishimoto T, Sasaki N, Takahashi S, Ishihara O, et al. Distribution of *Chlamydia trachomatis* among female prostitutes and non prostitutes in Thailand, and non prostitutes in Japan during the mid-90s. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:211-3.
- [15] Tan HH, Chan R. Use of polimerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect *Chlamydia trachomatis* infections in female sex workers in Singapore. *Singapore Med J* 2005; 46:215-8.
- [16] Marrazzo JM, Johnson R, Green TA, Stamm WE, Schachter J, Bolan G, et al. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification test and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 577-84.
- [17] George JA, Panchatcharam TS, Paramasivam R, Balasubramanian S, Chakrapani V, Murugan G. Evaluation of diagnosis efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimen of symptomatic men and women India. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56:88-92.
- [18] Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, Suhonen S, Lahteenmaki P, Lehtinen M, et al. Comparison of performance of two commercially available test, a PCR Assay and a Ligase Chain reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1489-93.
- [19] Schepetiuk S, Tuckweng K, Martin L, Waddell R, Higgins G. Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine samples by nucleic acid test: Comparison with culture and enzyme Immunoassay of genital swabs specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3355-7.
- [20] Lauderdale TS, Landers L, Thorneycroft I, Chapin K. Comparison of the PACE 2 Assay, Two Amplification Assays, and clear view EIA for detection of *Chlamydia trachomatis* in females endocervical and urine specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2223-9.
- [21] Peterson EM, Darrow V, Blanding J, Aarnaes S, De La Maza LM. Reproducibility problems with the AMPLICOR PCR *Chlamydia trachomatis* test. *J Clin Microbiol* 1997; 35:957-9.