

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

44.

**Diagnóstico microbiológico
de las infecciones por
Chlamydia spp. y especies
relacionadas**

2 0 1 2

Coordinador: Juan Carlos Galán

**Autores: Roberto Alonso
Juan Carlos Galán
José Gutiérrez Fernández
Mario Rodríguez-Domínguez
Jesús Salinas
Sara Sanbonmatsu Gámez**



ISBN- 978-84-616-0701-3

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO:

1. Introducción

2. Controversia en la taxonomía de la familia *Chlamydiaceae*

3. Epidemiología

- 3.1. *Chlamydia trachomatis*
- 3.2. *Chlamydia pneumoniae*
- 3.3. *Chlamydia psittaci*

4. Características biológicas de la familia *Chlamydiaceae*

- 4.1. Ciclo biológico
- 4.2. Estructura antigénica y factores de virulencia
 - 4.2.1. Lipopolisacárido
 - 4.2.2. Proteínas de membrana externa
 - 4.2.2.1. MOMP: principal proteína de membrana externa
 - 4.2.2.2. PMPs: proteínas polimórficas de membrana
 - 4.2.2.3. COMC: complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína
 - 4.2.3. Proteínas del proceso celular: proteínas Hsp
 - 4.2.4. Sistema de secreción tipo III
 - 4.2.5. Otros mecanismos patogénicos

5. Manifestaciones clínicas de las infecciones en humanos causadas por especies del orden *Chlamydiales*.

- 5.1. Infecciones en humanos por *Chlamydia trachomatis*
 - 5.1.1. Tracoma
 - 5.1.2. Linfogranuloma venéreo (LGV)
 - 5.1.3. Infección óculo-genital
 - 5.1.3.1. Uretritis
 - 5.1.3.2. Cervicitis
 - 5.1.3.3. Infección perinatal
- 5.2. Infecciones en humanos por *Chlamydia pneumoniae*
 - 5.2.1. Infecciones agudas del tracto respiratorio
 - 5.2.2. Implicaciones de *Chlamydia pneumoniae* en patologías crónicas
 - 5.2.2.1. Asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica
 - 5.2.2.2. Aterosclerosis
 - 5.2.2.3. Esclerosis múltiple
 - 5.2.2.4. Artritis reactiva
- 5.3. Infecciones en humanos por *Chlamydia psittaci*
 - 5.3.1. Infección respiratoria
 - 5.3.2. Infección extrarrespiratoria
- 5.4. Potencial patógeno de las nuevas *Chlamydiae*

6. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por especies del orden *Chlamydiales*

- 6.1. Diagnóstico de las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*
 - 6.1.1. Amplificación de ácidos nucleicos (TAAN)
 - 6.1.2. Hibridación de ácidos nucleicos
 - 6.1.3. Detección de antígenos
 - 6.1.4. Cultivo en línea celular
 - 6.1.5. Recogida, transporte y conservación de las muestras
- 6.2. Diagnóstico de las infecciones causadas por *Chlamydia pneumoniae*
 - 6.2.1. Diagnóstico indirecto: serología
 - 6.2.1.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras
 - 6.2.1.2. Microinmunofluorescencia
 - 6.2.1.3. Enzimoimmunoensayo
 - 6.2.1.4. Fijación del complemento
 - 6.2.2. Diagnóstico directo: cultivo
 - 6.2.2.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras
 - 6.2.2.2. Selección de líneas celulares. Condiciones para la optimización de los resultados del cultivo
 - 6.2.3. Diagnóstico directo no basado en el cultivo
 - 6.2.3.1. Técnicas de detección de antígeno
 - 6.2.3.2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
 - 6.2.3.2.1. Recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras

- 6.2.3.2.2. Descripción de las técnicas disponibles
 - 6.2.3.3. Hibridación *in situ*
 - 6.3. Diagnóstico de las infecciones causadas por *Chlamidia psittaci*
 - 6.3.1. Diagnóstico indirecto de la psitacosis: serología
 - 6.3.1.1. Fijación del complemento
 - 6.3.1.2. Microinmunofluorescencia
 - 6.3.1.3. Enzimoimmunoensayo
 - 6.3.2. Diagnóstico directo: cultivo
 - 6.3.2.1. Recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras
 - 6.3.2.2. Condiciones para la realización del cultivo
 - 6.3.3. Diagnóstico directo no basado en cultivo
 - 6.3.3.1. Microscopía mediante tinción
 - 6.3.3.2. Técnicas de detección de antígenos
 - 6.3.4. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN)
 - 6.4. Diagnóstico de las infecciones causadas por nuevas *Chlamydiae*
- 7. Tratamiento antibiótico de las infecciones producidas por miembros de la familia *Chlamydiaceae***
- 7.1. Técnicas de evaluación de la sensibilidad antimicrobiana

8. Tipación molecular en *Chlamydiae*

9. Implicaciones en Salud Pública

- 9.1. Implicaciones en Salud Pública de las infecciones por *Chlamydia trachomatis*
- 9.2. Implicaciones en Salud Pública de las infecciones por *Chlamydia psittaci*

10. Bibliografía

DOCUMENTOS TÉCNICOS:

PNT-DC-01. Detección molecular de *Chlamydia trachomatis* genotipo linfogranuloma venéreo mediante PCR en tiempo real

PNT-DC-02. Diagnóstico serológico de la neumonía por *Chlamydia pneumoniae* mediante microinmunofluorescencia

PNT-DC-03. Aislamiento de *Chlamydia psittaci* en la línea celular McCoy

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

44. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR *Chlamydia* spp. Y ESPECIES RELACIONADAS. 2012

Coordinador: Juan Carlos Galán

Autores: Roberto Alonso
Juan Carlos Galán
José Gutiérrez Fernández
Mario Rodríguez-Domínguez
Jesús Salinas
Sara Sanbonmatsu Gámez

1. INTRODUCCIÓN

Las especies patógenas para el hombre de la familia *Chlamydiaceae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci* pertenecen a una división bacteriana muy divergente del resto del árbol evolutivo de las eubacterias. Constituyen junto con los micoplasmas, las especies bacterianas con los genomas más pequeños entre 1,04-1,23 Mb (25% del genoma de *Escherichia coli*), posiblemente debido a que son bacterias intracelulares obligadas desde hace mucho tiempo, lo que les ha permitido perder ciertas rutas metabólicas como la biosíntesis de aminoácidos o la fermentación anaeróbica. Además, las características de su ciclo biológico, no facilitan la posibilidad de intercambio y adquisición de material genético exógeno.

La detección e identificación precisa de estas bacterias como agentes causales de ciertas patologías humanas no ha resultado tradicionalmente fácil de realizar, debido a la necesidad de disponer de instalaciones de bioseguridad para el aislamiento de estas bacterias mediante cultivo celular, a los problemas relacionados con las reacciones cruzadas de las pruebas serológicas disponibles, y al hecho de ser muchas veces responsables de patologías de evolución lenta e inespecífica. La disponibilidad de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos altamente específicas, sensibles y de fácil implantación, ha incrementado sensiblemente el potencial diagnóstico de estas bacterias en los laboratorios de Microbiología. Por otra parte, la simplificación y abaratamiento de las técnicas de secuenciación genómica ha revelado que la biodiversidad del orden *Chlamydiales* es mucho mayor de lo previamente esperado; además se han podido identificar e implicar a nuevas especies evolutivamente próximas como *Parachlamydia acanthamoebae*, *Simkania negevensis* o *Rhodochlamydia* spp. en procesos patológicos para el hombre.

2. CONTROVERSIA EN LA TAXONOMÍA DE LA FAMILIA *Chlamydiaceae*

La clasificación taxonómica de las bacterias pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* ha sido muy discutida en los últimos años. Basándose en el análisis genético de las subunidades 16S y 23S del ADNr, Everett y cols, establecieron, en 1999, los géneros *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *Chlamydia suis* y *Chlamydia muridarum*) y *Chlamydophila* (*Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila caviae* y *Chlamydophila felis*). Sin embargo, la propuesta de establecer un nuevo género no ha sido bien aceptada, ya que se considera que podría llevar a confusiones tanto en el ámbito de la investigación básica, como en Salud Pública. Así el subcomité sobre la taxonomía de las clamidias, dependiente del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* ha recomendado reiteradamente que los dos géneros se refunden en uno, *Chlamydia*, conservándose las nueve especies

establecidas anteriormente. La edición de 2011 del Manual Bergey, se hace eco de esta recomendación. Si bien, debemos aceptar esta última propuesta como la clasificación actual, la página web del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy>) no solo mantiene los dos géneros sino que además las especies incluidas en cada género no coinciden con la propuesta de Everett y cols, contribuyendo a mantener la confusión sobre la posición y distribución taxonómica de las especies de *Chlamydia* (última fecha de acceso 21 Junio 2012). El género *Chlamydia* es por tanto el único género de la familia *Chlamydiaceae*, que tradicionalmente era la única familia del orden *Chlamydiales*, sin embargo la disponibilidad de técnicas de secuenciación masiva y los conceptos de biología de poblaciones aplicados a la taxonomía bacteriana, permite identificar ahora otras 6 familias pertenecientes a este mismo orden: *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhodochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, y *Waddliaceae*. Algunas de estas familias engloban especies patógenas para el hombre. Este continuo cambio en la taxonomía bacteriana debido a la facilidad para obtener nuevas secuencias génicas, casi garantiza futuros cambios taxonómicos en este grupo de bacterias tan separado evolutivamente del resto de las bacterias.

3. EPIDEMIOLOGÍA

3.1. *Chlamydia trachomatis*

Las infecciones por *C. trachomatis* afectan exclusivamente a humanos y están entre las infecciones bacterianas más comunes en el mundo. Los 18 serovares descritos se distribuyen en tres cuadros infecciosos: a) tracoma (serovares A, B/Ba, C), b) linfogranuloma venéreo, LGV (serovares L1, L2, L2a, L3) y c) enfermedad óculo-genital no invasiva (serovares D/Da, E, F, G, H, I/Ia, J, K). Cada una de estas patologías tiene una distribución geográfica diferente y afecta mayoritariamente a distintos grupos poblacionales. El tracoma que se manifiesta como una conjuntivitis folicular crónica, es endémico en más de 50 países, especialmente en áreas rurales de África sub-sahariana. Aunque no hay casos descritos en España en la actualidad, a finales de los años 60 el litoral mediterráneo español, desde Gerona a Almería se consideraba endémico. La OMS formó en 1997 la alianza para la eliminación global del tracoma para 2020 (<http://www.who.int/blindness/en>). Su transmisión esta relacionada con las bajas condiciones higiénicas y ocurre por vía de contacto directo con fómites, contacto con ojos o bien a través de moscas. En zonas endémicas, los niños y en menor medida las mujeres son los principalmente afectados. El LGV es una infección de transmisión sexual que invade los tejidos linfoides, es endémico de África, India, Sudamérica o el Caribe. El LGV "clásico" se caracteriza por un síndrome inflamatorio inespecífico (uretritis o cervicitis) que progresa hacia linfadenopatías inguinales. Hasta principios del siglo

XXI, los casos detectados en Occidente se consideraban importados de estas regiones. Desde 2003 se ha expandido una nueva presentación de la enfermedad entre hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH) en Europa y Norteamérica. La característica en común es la presencia de proctitis, y está considerada hoy en día un problema de Salud Pública, especialmente por la estrecha asociación entre el LGV y el VIH.

La infección óculo-genital no invasora es la principal causa infecciosa de transmisión sexual en el mundo y el número de casos nuevos crece cada año, especialmente desde 2008, pero no está claro si este incremento está directamente relacionado con mayores tasas de transmisión o con la implantación generalizada de técnicas de diagnóstico molecular, más sensibles y específicas. Esta infección afecta fundamentalmente a mujeres entre 15-24 años, aunque el 60% de los casos son asintomáticos. Este desequilibrio hacia las mujeres podría no ser real, ya que muchos de los casos se detectan en los cribados de controles periódicos rutinarios a los que las mujeres acuden con mayor frecuencia. Por el contrario entre el 10-20% de las infecciones de cérvix evolucionan hacia enfermedad inflamatoria pélvica, embarazos ectópicos e infertilidad. Los cuadros de conjuntivitis están asociados a niños menores de 2 años que se infectan en el canal del parto de madres portadoras de los serovares D-K de *C. trachomatis*.

3.2. *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae es un microorganismo con una amplia distribución geográfica y temporal y que tiene un amplio rango de hospedadores. Existen 3 biovarios aceptados: humano, caballo y koala. Mientras que del biovar koala, no hay ninguna descripción de infección en humanos y tan sólo una infección descrita por el biovar caballo, *C. pneumoniae* biovar humano es un patógeno reconocido de las vías respiratorias altas y bajas, responsable de aproximadamente el 10% de las neumonías comunitarias y el 5% de los casos de bronquitis y sinusitis en adultos. El hombre es el único hospedador de *C. pneumoniae* biovar humano, transmitiéndose de humano a humano, sin reservorio animal, a través de las secreciones respiratorias. Se han documentado casos de contagio en personal de laboratorio mediante aerosoles, así como brotes epidémicos de infección respiratoria por *C. pneumoniae* en familias y poblaciones cerradas tales como campamentos militares y residencias de ancianos. A pesar de que las cepas humanas son genéticamente muy homogéneas entre sí, las reinfecciones son frecuentes, sugiriendo que la inmunidad inducida es incompleta o de corta duración o ambas.

La primoinfección suele ocurrir durante la edad escolar y se incrementa drásticamente con la edad, hasta el 50% de adultos jóvenes y el 75% en ancianos, por lo que se deduce que la mayoría de las infecciones son asintomáticas o cursan con clínica leve. En los casos sintomáticos, la infección producida por *C. pneumoniae* se puede diferenciar

en aguda o crónica. La infección aguda esta relacionada con otitis, sinusitis, resfriado común, bronquitis o neumonía, mientras que la infección persistente o crónica, que podría estar asociada con las formas aberrantes de *Chlamydia* generadas durante el ciclo biológico (ver apartado 4.1), está relacionada con procesos no infecciosos como asma, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple o incluso el Alzheimer, si bien, esta asociación es aún controvertida y se necesitan estudios que la demuestren definitivamente (ver apartado 5.2.2).

3.3. *Chlamydia psittaci*

C. psittaci ha sido aislada en cerca de 500 especies de aves pertenecientes a más de 30 géneros, donde causa infecciones latentes o clínicamente poco relevantes. Sin embargo, en situaciones de estrés para el animal, pueden convertirse en infecciones severas afectando fundamentalmente al tracto intestinal y respiratorio. La transmisión a humanos está estrechamente relacionada con el contacto (esporádico o permanente) con pájaros de compañía como loros, o aves domésticas presentes en zoológicos o granjas, por lo que no debe ser considerada solamente una zoonosis profesional. La vía de transmisión a humanos es por polvo de heces u orina desecadas o por secreciones del animal infectado. La transmisión humano-humano es posible, pero se clasifica como rara. La psitacosis humana suele afectar más a varones jóvenes aunque este dato podría estar sesgado por razones ocupacionales de exposición. Antes de la introducción de los antibióticos la mortalidad en humanos por psitacosis era 10-20%, pero descendió al 1% desde la introducción de los antibióticos.

Desde principios del siglo XX se han sucedido brotes pandémicos, y han estado asociados en numerosas ocasiones a la importación de aves psitácidas desde Sudamérica a Europa o a América del Norte. Las medidas de aislamiento de aves importadas y el tratamiento con tetraciclinas redujo drásticamente los casos de psitacosis humana (~50 casos/año). Sin embargo en los últimos años, se han descrito, en varios países europeos, numerosos casos de infecciones humanas asociadas a brotes de clamidiosis aviar, especialmente en explotaciones de pavos y patos.

4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA FAMILIA *Chlamydiaceae*

4.1. CICLO BIOLÓGICO

Las clamidias tienen un ciclo biológico bifásico único: el cuerpo elemental (CE), que es la forma infecciosa y el cuerpo reticular (CR), que es la forma replicativa y metabólicamente activa (figura 1).

El ciclo biológico se divide en tres fases:

- 1) Penetración de la forma infecciosa o cuerpo elemental (CE) en la célula hospedadora.
- 2) Multiplicación del CR mediante fisión binaria y conversión en CE.
- 3) Liberación de los CE de la célula hospedadora.

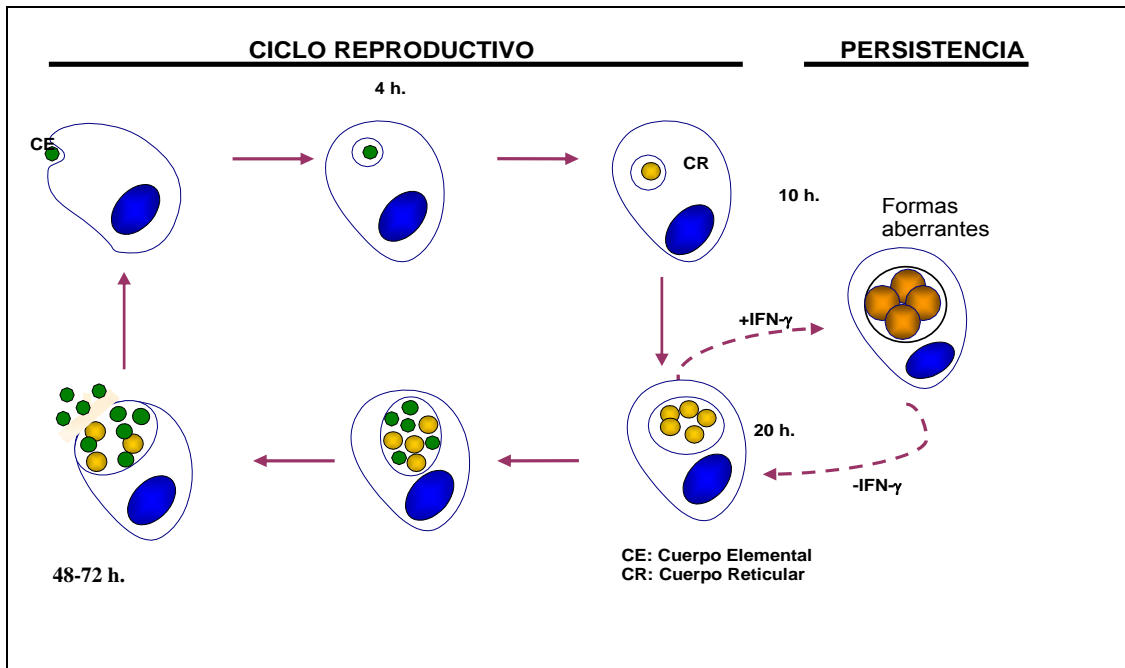


Figura 1. Ciclo de desarrollo biológico de *Chlamydia*.

1) *Penetración de la forma infecciosa o cuerpo elemental.* El CE está perfectamente adaptado al medio extracelular ya que su membrana externa contiene una gran cantidad de proteínas muy ricas en aminoácidos azufrados, como cisteína. La proteína más abundante es MOMP (del término inglés *major outer membrane protein*), codificada por el gen *ompA*, aunque también se encuentran otras dos proteínas de membrana externa (Omp2 y Omp3), que forman numerosos puentes disulfuro y son las responsables de la rigidez y escasa permeabilidad de CE. Sin embargo el CE es incapaz de replicarse por división, requiriendo la penetración al interior de la célula eucariota para continuar su ciclo biológico. La adhesión de las bacterias a la célula hospedadora es necesaria como un paso previo a la fagocitosis. Estas bacterias son fagocitadas, con más facilidad que otras bacterias como *Escherichia coli*, sugiriendo un proceso específico. No se conocen bien los receptores específicos de la célula huésped ni de la bacteria implicados en este proceso, pero se sugiere que los distintos serovares pueden emplear diferentes y quizás múltiples estrategias de adhesión (MOMP, PMPs, TarP...). *C. trachomatis* patotipos LGV y *C. psittaci* tienen más afinidad por macrófagos, mientras que *C. pneumoniae* y los patotipos de tracoma de *C. trachomatis* tienen más afinidad hacia células epiteliales de mucosas.

2) *Multiplicación del CR mediante fisión binaria.* Una vez en el interior del fagosoma, comienza un proceso de reorganización o diferenciación del CE a CR. Los primeros cambios tras la formación del fagosoma, son el inicio de la síntesis proteica y la transformación de la MOMP de su forma trimérica a monomérica, con lo que aparecen poros de un

tamaño adecuado para el paso de ATP y nutrientes. Tras estos sucesos iniciales, a las 12 horas post-infección, todas las bacterias intracelulares están en forma de CR. Los CR se dividen por fisión binaria sin una aparente septación. Durante esta etapa se produce un crecimiento exponencial dentro del fagosoma hasta 100-1000 bacterias (figura 1), con un tiempo de duplicación de 2-3 h que dura ~12 a 20 horas (aunque algunos patotipos como los implicados en el LGV tienen una velocidad de crecimiento mayor). A la conclusión de este ciclo de crecimiento, comienza una nueva reorganización de los CR a CE para formar una inclusión madura. La reorganización no es un proceso sincrónico, es decir que coexisten CR en reproducción junto a CE maduros.

3) *Liberación de los CE de la célula hospedadora.* El mecanismo de liberación no se conoce aún con exactitud. Generalmente los CE son detectados en el medio extracelular tras la lisis de la célula hospedadora, lisis que se produce como consecuencia de la liberación tardía de enzimas lisosomales así como por la acción de una proteasa de origen clamidial. Además, en estudios ultraestructurales sobre cultivos celulares infectados con *C. trachomatis*, se ha descrito un mecanismo de liberación del microorganismo semejante a la exocitosis, lo que también ocurre *in vivo* en infecciones intestinales por *C. pecorum*. El proceso global del ciclo de desarrollo biológico es de 48-72h

Parece ser que, al menos en condiciones *in vitro*, factores como el IFN- γ , ciertos antibióticos como los β -lactámicos (pese a ser bacterias gramnegativas carentes de peptidoglicano) y factores nutricionales esenciales como el triptófano inducen la aparición de unos cuerpos reticulares anormales, también

denominados formas aberrantes (FA) en los que la actividad metabólica disminuye y el organismo suele ser resistente al tratamiento antibiótico (figura 1). El efecto de estos factores inductores de las FA es reversible, ya que cuando son aclarados del medio, las FA pasan a CE normales. Las FA permanecen en el interior de la célula como agente infeccioso latente o persistente y se ha asociado la presencia de FA con procesos crónicos infecciosos y no infecciosos.

4.2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA Y FACTORES DE VIRULENCIA

Para estudiar los antígenos presentes en las bacterias de la familia *Chlamydiaceae*, se describen previamente aquellos comunes a las especies patógenas humanas más importantes.

4.2.1. Lipopolisacárido. El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, que fue puesto en evidencia por primera vez en 1936 por Bedson mediante la prueba de fijación del complemento con suspensiones no purificadas de estas bacterias. Pero la demostración de la relación del LPS como factor de virulencia en especies de *Chlamydia* ha sido establecida recientemente, cuando en 2011 Nguyen y cols. constataron que en ausencia de LPS, las clamidias no son capaces de realizar la transición de CR a CE, que es la forma infectiva.

El LPS clamidial presenta reacción cruzada en las pruebas serológicas, no sólo entre los distintos miembros de la familia *Chlamydiaceae*, también con algunos de los LPS de los mutantes rugosos de las enterobacterias (aquellos mutantes a los que les falta la parte correspondiente al antígeno O y tienen incompleto el núcleo oligosacárido), en concreto con cepas de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella minnesota* así como con cepas de *E. coli*.

4.2.2. Proteínas de membrana externa

4.2.2.1. MOMP: principal proteína de membrana externa. La MOMP representa el 60% del peso seco de la membrana de *Chlamydia* spp. y es, sin duda, el antígeno dominante, al menos en *C. trachomatis* y *C. psittaci* ya que en estas especies la proteína está expuesta en la superficie de la membrana y por tanto es muy inmunogénica. Por el contrario en *C. pneumoniae*, la MOMP no está expuesta en la superficie de la membrana, por lo que no parece ser un antígeno inmunodominante, como demuestra la obtención de secuencias genéticas casi idénticas de aislados de diferentes áreas geográficas. La baja capacidad inmunógena de la MOMP en *C. pneumoniae* parece ser debida a la existencia de una proteína de 54 kDa, específica de esta especie que presenta una localización más externa que MOMP.

La estructura trimérica de la MOMP actúa como adhesina, facilitando las interacciones no específicas y la penetración de los CE al interior de la célula eucariota. Por otra parte, la estructura monomérica actúa como porina en los CRs facilitando la permeabilidad de nutrientes y de ATP. La topología proteica de la MOMP es bien conocida en las

diferentes serovariedades de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. abortus* y *C. psittaci*. Consta de 5 dominios transmembranarios conservados (CDI-V) y 4 dominios variables (VDI-IV) que están expuestos en la superficie externa. Diversos autores han estudiado la importancia de los VDs de la MOMP, llegando a la conclusión de que los dominios VDI, VDII y VDIV son donde se localizan los epítomos reconocidos por los linfocitos B. La variabilidad de los epítomos localizados en esta proteína parece responder a la presión inmunológica a la que se ve sometida la bacteria. Hay una remarcada evidencia de que las mutaciones en MOMP están relacionadas con las estrategias de evasión del sistema inmune: acumula más cambios aminoacídicos que cualquier otra proteína, estos cambios se producen 4,3 veces más frecuentemente en los dominios variables que interaccionan con los linfocitos B. La clasificación de las 18 serovariedades de *C. trachomatis*, se basa en las diferentes respuestas serológicas de los dominios variables de la MOMP, aunque no existe relación entre serovar y patotipo.

4.2.2.2. PMPs: proteínas polimórficas de membrana.

Las PMPs son una familia única de proteínas de membrana, con un alto grado de diversidad entre ellas (>50%), que tienen un papel importante en la biología y patogénesis de todas las clamidias, aunque su número varía en las diferentes especies. *C. pneumoniae* y *C. psittaci* tienen 21 de estas proteínas, mientras que *C. trachomatis* tan solo 9, llegando a representar entre 3,5-5% de la capacidad codificante del genoma. Su síntesis se lleva a cabo en las últimas fases del ciclo de desarrollo y tienen la función de autotransporte y adhesinas. Así, por ejemplo, anticuerpos específicos frente a la PMP21 de *C. pneumoniae* bloquean la infectividad de la bacteria en las células epiteliales.

En *C. trachomatis*, a diferencia de la MOMP, las reconstrucciones filogenéticas de las PMPs, permiten agrupar correctamente los patotipos de las diferentes enfermedades descritas, indicando que estas proteínas pueden estar modulando el tropismo tisular. Este dato sugiere que estas proteínas juegan un papel importante en la diversificación antigénica para escapar del sistema inmune del huésped.

4.2.2.3. COMC: complejo proteico de membrana externa rico en residuos de cisteína.

El CE está envuelto por un complejo proteico que gracias a los residuos azufrados de los muchos aminoácidos cisteína que contiene pueden formar un conglomerado de interacciones inter e intra-proteicos. Este complejo contribuye a la rigidez y estabilidad osmótica del CE y participa en las primeras fases del anclaje del CE a la célula eucariota como otra adhesina. Recientemente se ha podido definir que hasta 28 proteínas forman parte de ese complejo, entre ellas PmpB, PmpC, PmpE, PmpF, PmpG, PmpH, OprB o PorB. Pero las 2 proteínas más prevalentes de este complejo son OmcA y OmcB. La proteína OmcB, (también denominada Omp2 o EnvB) es la más abundante del complejo y está en una proporción 1:5 respecto de MOMP. Parece estar implicada en la transición de

CR a CE, por lo que esta proteína tiene un papel más relevante en la virulencia. Es muy inmunogénica, aunque no es específica de especie, compartiendo epítomos con otras especies bacterianas.

4.2.3. Proteínas del proceso celular: proteínas Hsp. Se trata de proteínas con una estructura muy conservada durante la evolución, presentes en todos los organismos, desde las bacterias al hombre. Tienen dos funciones principales: actúan como chaperonas, y se inducen en respuesta al estrés. Las proteínas Hsp se clasifican en diferentes familias de acuerdo con su peso molecular, más que por su función.

La Hsp60 ó “GroEL-like”, aparece durante las infecciones crónicas persistentes y se ha descrito su presencia en macrófagos presentes en lesiones ateroscleróticas durante infecciones por *C. pneumoniae*. Igualmente, esta proteína parece asociarse a fenómenos de infertilidad tubárica, enfermedad inflamatoria pélvica o gestación ectópica en pacientes infectados crónicamente con *C. trachomatis*, donde la exposición de manera prolongada a la Hsp60 de *C. trachomatis*, parece conducir a la existencia de fenómenos autoinmunes. La Hsp70 ó “Dnak-like”, se localiza en el citoplasma y en la membrana externa de los CE. Se le sugiere un papel mediador en la adhesión de *C. trachomatis* a la célula hospedadora, papel que no se ha verificado en el resto de especies. Lo que sí se ha comprobado es que inducen una respuesta inmune de tipo humoral.

4.2.4. Sistema de secreción tipo III. El sistema de secreción tipo III (TTSS) es un mecanismo clave de la virulencia ya que facilita la interacción entre la célula huésped y el patógeno bacteriano. Los TTSS presentes en todas las especies de clamidias son como una compleja jeringa molecular consistente en >40 ORFs que libera proteínas efectoras directamente al citosol o a la membrana de inclusión. Muchas de estas proteínas efectoras están relacionadas con la patogénesis de las clamidias: como la TarP (del término inglés *translocated actin recruiting phosphoprotein*) relacionada con la invasión, o las proteínas Inc que parecen estar localizadas en las membranas de las inclusiones clamidiales. Existen 7 proteínas Inc bien caracterizadas en *C. trachomatis* (IncA-G) y sólo tres en *C. pneumoniae* y *C. psittaci* (IncA-C). En *C. trachomatis* la expresión de IncD-G se produce 2 h después de la infección y podría esta relacionada con la transición desde CE a CR. En *C. psittaci*, IncB podría tener un papel importante en impedir la fusión del lisosoma una vez que el CE ha sido fagocitado. A medida que se avanza en el estudio del genoma clamidial, se están identificando otros candidatos de proteínas Inc. Dentro de estas proteínas se encuentra una denominada CrpA que parece activar a los linfocitos CD8+ y conferir una protección parcial en ratones infectados con *C. trachomatis*. Otra posible proteína secretada a través del sistema TTSS es la recientemente identificada CPAF (siglas del término inglés “*chlamydial protease-like activity*

factor”). Se ha comprobado que las proteínas CPAF son secretadas en el interior de la célula hospedadora, donde puede degradar los factores implicados en la transcripción del hospedador, necesarios para la presentación de los antígenos por parte de los complejos MCH-I y MCH-II, lo que interfiere en la habilidad del hospedador a la hora de responder frente a la infección clamidial.

4.2.5. Otros mecanismos patogénicos. *C. pneumoniae* comienza infectando las células epiteliales de las vías respiratorias y los monocitos. La capacidad de infectar los monocitos posibilita la diseminación a localizaciones anatómicas alejadas del aparato respiratorio.

Una vez dentro de la célula huésped *C. pneumoniae* actúa sobre la apoptosis celular, inhibiéndola o activándola en función de la fase del ciclo en el que se encuentre. En estudios *in vitro* se ha observado que la infección aguda por *C. pneumoniae* induce la apoptosis en la célula hospedadora facilitando la liberación de CE, mientras que la infección crónica produce cambios que inhiben la apoptosis lo que sugiere que esta modulación tenga un papel protector del microorganismo durante la fase de persistencia.

La respuesta inmune celular ante los antígenos de *C. pneumoniae* activan linfocitos T CD4 que segregan citocinas implicadas en la inflamación, activación de macrófagos y linfocitos B productores de anticuerpos específicos. El IFN- γ inhibe la replicación de *C. pneumoniae* induciendo la síntesis de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), enzima que degrada el triptófano, aminoácido esencial para el desarrollo de la bacteria por lo que ésta queda detenida en estado de latencia o persistencia. La adición de triptófano al medio revierte esta situación activándose de nuevo el crecimiento del microorganismo.

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES EN HUMANOS CAUSADAS POR ESPECIES DEL ORDEN *Chlamydiales*

5.1. INFECCIONES EN HUMANOS POR *Chlamydia trachomatis*

Las infecciones por *C. trachomatis* se pueden dividir en 3 categorías: tracoma, LGV e infección oculo-genital, incluyendo la infección perinatal.

5.1.1. Tracoma. Clínicamente la enfermedad del tracoma se produce por los serovares A, B/Ba y C de *C. trachomatis*, y puede dividirse en 2 etapas: fase aguda o tracoma activo y fase crónica. La fase aguda es más frecuente en niños mientras que la fase crónica es más común en adultos jóvenes.

La fase aguda, cuyo período de incubación oscila entre 5-12 días, se caracteriza por una conjuntivitis folicular de la conjuntiva tarsal (párpado superior), acompañada de una descarga mucóide o mínimamente acuosa. Esta etapa inicial puede resolverse espontáneamente, aunque son frecuentes las sobreinfecciones por *Haemophilus influenzae*, adenovirus o *Molluscum contagiosum*. El cuadro evoluciona hacia un incremento de la respuesta inflamatoria que causa hinchazón y edema del

párpado. Este es muchas veces el primer signo de la enfermedad. Si no se instaura tratamiento, la enfermedad evoluciona hacia la fase crónica, apareciendo cicatrices en la conjuntiva. Las cicatrices pueden deformar el párpado, y las pestañas entran en contacto con el globo ocular, dando como resultado una abrasión (triquiasis). Este daño crónico de la córnea genera pérdida de visión y ceguera en último término. La OMS promueve la lucha contra el tracoma bajo un enfoque multidisciplinar que implica la cirugía, la distribución masiva de antibióticos, el fomento de la higiene facial y mejoras medioambientales. Estas intervenciones se han asociado con reducciones significativas en la prevalencia de la enfermedad activa en los últimos 20 años, pero sigue habiendo un gran número de personas con triquiasis que están en riesgo de desarrollar ceguera.

5.1.2. Linfogranuloma venéreo (LGV). El LGV es una enfermedad de transmisión sexual causada por los serovares L1, L2 (y sus genovariantes recientemente descritas 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f y 2g) y L3 de *C. trachomatis*, que causa una infección sistémica (se puede recuperar de la sangre o del LCR) que implica invasión de los nodos linfoides (causando linfadenitis). Clínicamente pueden diferenciarse tres fases:

La primera etapa (3-30 días después de la práctica de riesgo) se caracteriza por una lesión o lesiones ulcerativas o herpetiformes en la mucosa genital o piel adyacente. Esta lesión inicial puede ser también intrauretral, cervical o rectal causando uretritis, cervicitis o proctitis, respectivamente. Pero generalmente esta etapa suele ser asintomática o con muy pocos síntomas. La segunda etapa se produce 2-4 semanas después y se caracteriza por una linfadenopatía inguinal eritematosa y dolorosa (bubones), generalmente unilateral. Los bubones pueden romperse espontáneamente, drenando pus. Las manifestaciones sistémicas durante esta etapa son fiebre, dolor de cabeza, mialgias, etc. La tercera etapa implica complicaciones severas como el engrosamiento hipertrófico crónico con ulceración de los genitales externos que puede llegar a elefantiasis e infertilidad.

Debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de otras infecciones de transmisión sexual como herpes simplex, sífilis, pero también de linfomas y enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn.

5.1.3. Infección óculo-genital. Los serovares D-K de *C. trachomatis* y ocasionalmente B y Ba producen una amplia variedad de infecciones óculo-genitales. Estas pueden diferenciarse en infecciones en el hombre adulto: uretritis (y sus complicaciones como epididimitis y artritis reactiva incluyendo el síndrome de Reiter), proctitis y conjuntivitis, infecciones en la mujer adulta: cervicitis (y sus complicaciones como endometritis, salpingitis y peritonitis o perihepatitis), proctitis, uretritis y conjuntivitis y en caso de mujeres embarazadas responsable de partos prematuros, e infecciones en el recién nacido en el que producen conjuntivitis y neumonía.

5.1.3.1. Uretritis. *C. trachomatis* es la causa del 20-55% de las uretritis no gonocócicas en el hombre, si bien la mitad de los casos son asintomáticos. En ~20% de los casos existe coinfección simultánea con *Neisseria gonorrhoeae*. En estos casos, son frecuentes las descripciones de uretritis postgonocócicas; pero no son el resultado de una sobreinfección o postinfección, sino un enmascaramiento debido a que el período de incubación de *N. gonorrhoeae* es más corto (4 días y entre 7-14 días el de *C. trachomatis*) y por tanto la sintomatología de uretritis gonocócica aparecerá antes. Además, la tinción de Gram del exudado uretral revelaría abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) y diplococos gramnegativos como en el caso de una mono infección por *N. gonorrhoeae* (ya que la infección por *C. trachomatis* se caracteriza por pocos PMNs y ausencia de microorganismos). Finalmente el tratamiento empírico de la uretritis gonocócica con β -lactámicos, facilitará la eliminación de *N. gonorrhoeae*, pero no eliminará *C. trachomatis*, facilitando incluso la formación de las formas aberrantes.

Cuando *C. trachomatis* se disemina desde la uretra al epidídimo, causa epididimitis (en 1-3% de los hombres infectados). Se caracteriza por un dolor testicular y escrotal generalmente unilateral. En la fase aguda se observa oligospermia, pero no parece que ocasione infertilidad. Como artritis reactiva se conoce a la respuesta inflamatoria, de origen inmune, a nivel de las articulaciones, secundaria a una infección primaria de las mucosas. La artritis aséptica ocurre en 1% de los casos de uretritis no gonocócica, cursando en un 30% de éstos con uretritis, conjuntivitis y lesiones cutáneas (síndrome de Reiter). Los casos de artritis reactiva debidos a una infección primaria por *C. trachomatis*, clásicamente se han asociado a los serovares D-K, sin embargo en los últimos años se han descrito casos asociados a la infección por el genotipo L2b relacionado con el patotipo de LGV. En estos pacientes hay un elevado nivel de anticuerpos en suero y líquido sinovial frente a Hsp60.

La uretritis también se puede producir en mujeres, y se caracteriza por disuria, piuria y micción frecuente, pero se puede confundir con una infección urinaria.

5.1.3.2. Cervicitis. La cervicitis mucopurulenta causada por *C. trachomatis* en mujeres es el equivalente a la uretritis no gonocócica del hombre. Aproximadamente 50-70% de las mujeres con infección por *C. trachomatis* no presentan síntomas o la sintomatología es muy leve, pero las complicaciones son más serias que en el hombre, probablemente porque *C. trachomatis* puede persistir en estado asintomático por períodos prolongados en el tracto genital femenino. De hecho, en el 45-50% de mujeres con infección por *C. trachomatis* no tratada, la infección persiste 1 año después de la detección. Esta cronificación puede facilitar la diseminación de *C. trachomatis* hacia el endometrio, causando endometritis, hacia las trompas de Falopio

causando salpingitis o hacia el peritoneo causando peritonitis. Por difusión a través del peritoneo puede desarrollarse ascitis y perihepatitis (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis que está frecuentemente asociado a infecciones por *C. trachomatis*). Esas infecciones del tracto genital femenino se denominan colectivamente enfermedad inflamatoria pélvica y se produce entre el 10-20% de los casos de cervicitis. Las consecuencias a largo plazo de la enfermedad inflamatoria pélvica son dolor pélvico crónico, embarazos ectópicos, prematuridad, e infertilidad. Se estima que dos tercios de todos los casos de infertilidad debido a un factor tubárico y una tercera parte de todos los casos de embarazo ectópico pueden ser debidos a una infección por *C. trachomatis* no diagnosticada. Esta es la razón de recomendar el cribado sistemático a mujeres en edad fértil. Sin embargo la persistencia y por tanto la mayor probabilidad de desarrollar complicaciones puede estar relacionada también con el tipo de serovar. Así, se ha documentado que los serovares B, D, E H, I, J y K son 2 veces más propensos a la persistencia que los serovares F y G, revelando la importancia del subtipo de los serovares de *C. trachomatis* en las infecciones genitales en mujeres.

5.1.3.3. Infección perinatal. La infección perinatal inicialmente afecta a las membranas mucosas de los ojos, provocando conjuntivitis, denominada conjuntivitis de inclusión, que se desarrolla 5-12 días después del nacimiento, tras exposición a *C. trachomatis* presente en el cuello del útero de la madre infectada (20-45% de los casos). Clínicamente se observa una inflamación de la conjuntiva con un exudado claro o mucopurulento, pero se resuelve espontáneamente transcurridos 3-12 meses, aunque la infección subclínica pueda permanecer durante años.

La neumonía aparece en el 10-20% de los casos, probablemente por diseminación desde la nasofaringe ya que el 70% de los niños infectados tienen cultivos positivos de esta localización. La radiografía de tórax refleja un infiltrado intersticial bilateral, hipoxemia y es característica la aparición de eosinofilia y aumento de los títulos de IgM. En recién nacidos con poco tiempo de vida la infección puede ser más severa y relacionarse con la aparición de apneas. En un estudio, con seguimiento durante 8 años, de niños que habían sufrido infección respiratoria por *C. trachomatis* en los primeros 6 meses de vida, se demostró un mayor desarrollo de asma y trastornos obstructivos de las vías respiratorias.

5.2. INFECCIONES EN HUMANOS POR *Chlamydia pneumoniae*

Se pueden distinguir dos grandes grupos de patologías producidas por *C. pneumoniae*: las infecciones agudas que afectan al tracto respiratorio, en las que está bien establecida la implicación de esta bacteria y las infecciones persistentes que se han asociado a procesos crónicos en los que su papel es mucho más controvertido.

5.2.1. Infecciones agudas del tracto respiratorio.

C. pneumoniae es un patógeno que afecta a las vías respiratorias bajas (neumonía) y altas (sinusitis, faringitis y laringitis). La mayoría de las infecciones por este microorganismo son asintomáticas, aunque puede causar enfermedad grave sobre todo en ancianos, pacientes con enfermedades cardiovasculares o inmunodeprimidos, aunque también se han descrito casos graves en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo conocidos.

C. pneumoniae se considera responsable del 3-8% de las faringitis en el contexto de un síndrome gripal con frecuencia acompañada de algún otro patógeno respiratorio. La bronquitis es otra de las manifestaciones clínicas de la infección por *C. pneumoniae*, causando hasta el 5% de los casos. La tos, ronquera y dolor de garganta suelen estar presentes en estos cuadros respiratorios, con presencia o no de fiebre. El período de incubación es prolongado, de unas 3 semanas. El comienzo de los síntomas suele ser gradual, la tos puede aparecer días o semanas después y tardar en desaparecer incluso meses. Otras presentaciones clínicas de vías altas como laringitis, otitis o sinusitis, son menos frecuentes y el papel de *C. pneumoniae* en estos procesos es más discutible.

El cuadro clínico más característico es la neumonía, estimándose que es responsable del 5-20% de las neumonías adquiridas en la comunidad. Inicialmente se describió como neumonía atípica, de menor gravedad y sintomatología más leve, similar a la producida por *Mycoplasma pneumoniae*, aunque estudios posteriores han demostrado que es clínicamente indistinguible de la producida por otros microorganismos. Es frecuente su detección simultánea junto con otros patógenos respiratorios especialmente *Streptococcus pneumoniae*.

5.2.2. Implicaciones de *C. pneumoniae* en patologías crónicas. Se ha relacionado a *C. pneumoniae* con enfermedades respiratorias crónicas, como asma, o exacerbaciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística o cáncer de pulmón, pero también en enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis y otras enfermedades crónicas como espondiloartritis, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer.

La controversia existente en torno a la implicación o no de *C. pneumoniae* en el desarrollo de patologías crónicas, en principio no infecciosas, se debe en gran parte a la ausencia de métodos estandarizados que permitan diagnosticar de una forma fiable la infección por *C. pneumoniae* en sus diferentes etapas. Este hecho ocasiona que los distintos estudios obtengan resultados contradictorios y poco reproducibles, y no puedan compararse entre sí, ya que dependen en gran medida de las técnicas elegidas, su interpretación y la población analizada.

5.2.2.1. Asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *C. pneumoniae* se ha asociado con exacerbaciones de enfermedades inflamatorias crónicas pulmonares tales como asma y la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La primera asociación entre asma e infección por *C.pneumoniae* fue en 1991, por Hahn y cols. Hay evidencias de la relación entre asma e infección por *C. pneumoniae* tales como: títulos elevados de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en asmáticos, tasas de infección entre 4,5-25% veces superiores en episodios de asma o mayor afectación y gravedad de los síntomas en pacientes infectados frente a los que no lo están. El factor de virulencia previamente descrito Hsp60 y el factor de transcripción kappa-B pueden contribuir en estos procesos al provocar hiperreactividad e inflamación en las vías respiratorias. La inflamación provocada por la infección crónica en el caso de la infección por *C. pneumoniae* en pacientes con EPOC conlleva un mayor daño de las células epiteliales bronquiales y alteración de la función ciliar, situación que facilita la colonización o infección por otros microorganismos. Este círculo vicioso acelera la progresión de la enfermedad de base.

5.2.2.2. Aterosclerosis. Una de las asociaciones más estudiadas es la que relaciona a *C. pneumoniae* con la aterosclerosis y sus manifestaciones clínicas, infarto, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica. Son numerosos los estudios que apoyan esta asociación basados en el mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en individuos con anticuerpos anti-*C. pneumoniae* respecto a individuos seronegativos, o el aislamiento del microorganismo en cultivo celular a partir de placas de ateroma, o la detección de antígenos (inmunohistoquímica) o ácidos nucleicos (TAAN) en lesiones arterioscleróticas.

Es cierto que *C. pneumoniae* puede infectar y replicarse en el interior de macrófagos y monocitos, y propagarse de esa manera desde el tracto respiratorio a otras localizaciones anatómicas. También es capaz de infectar células del endotelio vascular y músculo liso, inducir la producción de citoquinas y otros procesos implicados en la aterogénesis. Sin embargo, con las evidencias de las que se dispone actualmente no se puede afirmar que *C. pneumoniae* es causa suficiente, ni tampoco imprescindible para producir aterosclerosis, aunque puede ser un factor de riesgo importante que contribuya al desarrollo de esta patología.

5.2.2.3. Esclerosis múltiple. La asociación entre *C. pneumoniae* y la esclerosis múltiple se apoyó inicialmente en estudios que encontraron ácidos nucleicos de *C. pneumoniae* en el 80% de LCR de pacientes con esclerosis múltiple frente a un 20% en pacientes con otra enfermedad neurológica. Estos hallazgos no pudieron confirmarse por otros investigadores. Estas discrepancias en los resultados se deben en gran parte a la heterogeneidad en las técnicas de PCRs utilizadas, algunas de ellas con muy baja especificidad. Las técnicas moleculares no detectaron evidencia de *C. pneumoniae* en LCR. En un subgrupo de pacientes con una forma progresiva de esclerosis múltiple se obtuvieron PCR positivas para *C. pneumoniae*. Estos datos sugieren que *C. pneumoniae* podría no tener un papel central en la

patogénesis de la esclerosis múltiple, pero sí que la infección crónica persistente en el cerebro podría ser un cofactor en el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, son necesarios nuevos estudios prospectivos, controlados, con un número suficiente de pacientes y controles, que utilicen técnicas diagnósticas estandarizadas o comparables.

5.2.2.4. Artritis reactiva. La artritis reactiva es una inflamación no purulenta de una o varias articulaciones, que ocurre como respuesta a una infección aunque ésta se produzca en un órgano distinto al afectado por la artritis, por similitud entre antígenos humanos, o por depósitos de inmunocomplejos en la articulación. Algunos microorganismos intracelulares como *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. o *C. trachomatis* pueden desencadenar esta misma reacción inflamatoria. *C. pneumoniae*, aunque con menor frecuencia que los anteriores, también puede ocasionar estos cuadros. La infección previa por *C. pneumoniae* puede ser asintomática, dificultando la identificación del microorganismo desencadenante de la artritis. Mediante técnicas de PCR se ha podido demostrar en algunos casos la presencia de ADN de *C. pneumoniae* y *C. trachomatis* en el líquido sinovial y sangre periférica de pacientes afectados. Estos hallazgos sugieren que en estos cuadros crónicos no infecciosos, el tratamiento antibiótico adecuado podría ser una medida eficaz para eliminar el microorganismo, contribuyendo a un estado general de mejoría.

5.3. INFECCIONES EN HUMANOS POR *Chlamydia psittaci*

La psitacosis, también conocida como ornitosis, es una infección con escasa incidencia en el hombre. Anecdóticamente, desde 1988 hasta 2003, el CDC registró sólo 935 casos de infección humana por *Chlamydia psittaci*. En Europa los países que tradicionalmente comunican un mayor número de casos humanos son Gran Bretaña, Alemania y Holanda. Los casos de psitacosis humana descritos en nuestro país, tanto esporádicos como epidémicos, son muy escasos y muy frecuentemente en personas relacionadas con las aves. El contacto frecuente con aves es, por tanto, un factor de riesgo fundamental en la infección, aunque se han dado casos de infección por contactos esporádicos.

Pese a estos datos, el impacto de las infecciones por *C. psittaci* en la salud humana es difícil de cuantificar y se considera que el diagnóstico está subestimado ya que es una enfermedad de declaración obligatoria en pocos países y su sintomatología respiratoria se puede confundir con otras infecciones más frecuentes como las infecciones por *Legionella pneumophila*. Los médicos no suelen incluir *C. psittaci* en el diagnóstico diferencial, ni los laboratorios tienen instauradas técnicas diagnósticas implementadas, necesarias para la definición del caso. Además, la infección humana por *C. psittaci* es difícil de diagnosticar pues responde bien al tratamiento empírico de la neumonía adquirida en la comunidad. Un ejemplo en

este sentido fue el brote que se produjo en 2008 en Pays de la Loire (Francia) en relación a una feria de aves, que pudo afectar hasta a 48 personas (pero solamente hubo 2 casos confirmados y 2 posibles).

5.3.1. Infección respiratoria. La infección se presenta generalmente como una neumonía atípica con fiebre alta, cefalea y tos en pacientes con historia de contacto con aves. La tos no productiva se presenta el 80% de los casos. El período de incubación medio oscila entre 5 y 14 días, aunque puede prolongarse hasta más de un mes. Muy rara vez se presenta con expectoración o incluso con hemoptisis. Pueden evidenciarse alteraciones de la auscultación como estertores o, menos frecuentemente, roncus pero aunque los pacientes refieren dolor torácico el derrame pleural es raro. La radiografía revela un infiltrado unilateral en el lóbulo inferior, y las imágenes de alta resolución, muestran infiltrados nodulares rodeados por un halo de apariencia de “vidrio deslustrado”. La cefalea es frecuente e intensa y puede estar acompañada de fotofobia. Hasta un 25% de los pacientes pueden presentar además dolor abdominal, diarreas y cuadros de desorientación. Se describe con cierta frecuencia un rash maculopapular (manchas de Horder) que recuerda ligeramente a las manchas que se evidencian en la fiebre tifoidea. Se han descrito casos de insuficiencia respiratoria severa con consecuencias fatales. Los pacientes con afectación respiratoria grave, generalmente manifiestan complicaciones neurológicas, renales o gastrointestinales. Aunque la infección por *C. psittaci* en el hombre es generalmente leve o asintomática, se han descrito también complicaciones hematológicas severas con coagulación intravascular diseminada.

El diagnóstico diferencial de la psitacosis debe establecerse con otras entidades que cursan con neumonía atípica, principalmente la infección bacteriana por *Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia pneumoniae* o por etiologías víricas como el virus influenza.

5.3.2. Infección extrarrespiratoria. Se puede afectar cualquier órgano, pero siempre con posterioridad a la infección primaria respiratoria y como complicación de ésta. Los casos de endocarditis asociados a *C. psittaci* son muy escasos. Esta etiología debe considerarse en cualquier caso de endocarditis con hemocultivo negativo. Los pacientes afectados suelen requerir cirugía, que cuenta con una elevada tasa de mortalidad (hasta del 50%). Si se dispone de tejido valvular, debe intentarse el diagnóstico etiológico con sistemas de detección molecular o inmunofluorescencia. La miocarditis es también una complicación muy rara. Se ha publicado un caso de miocarditis con diagnóstico serológico de infección por *C. psittaci*, con dilatación del ventrículo izquierdo y gran compromiso de la función ventricular.

Se han descrito casos de meningitis, encefalitis e incluso cerebelitis. En un paciente con enfermedad neurológica severa se detectó la presencia de ADN de *C. psittaci* mediante PCR en LCR. Se han descrito

casos de uveítis y parálisis del 4º, 6º, 7º y 12º par craneal en asociación con meningoencefalitis, diplopía persistente durante meses, sordera transitoria neurosensorial o incluso mielitis transversa relacionada con psitacosis. Adicionalmente, parece que podría aparecer síndrome de Guillain-Barré como consecuencia de una infección aguda por *C. psittaci*. Se ha descrito con cierta frecuencia la afectación renal leve, con proteinuria y oliguria.

Los casos de hepatitis asociadas a *C. psittaci* son muy raros y no ha podido establecerse una clara relación causa-efecto. Se ha publicado un caso de afectación hepatoesplénica con colestasis, acompañada de ligera pericarditis y fiebre de 1 mes de evolución en un varón de 18 años hospitalizado. La ecografía reveló múltiples formaciones nodulares en hígado y bazo y la biopsia hepática evidenció lesiones granulomatosas con focos de hiperplasia de las células de Kupffer rodeadas de tejido sano. El paciente fue diagnosticado de infección por *C. psittaci* por seroconversión, utilizándose una técnica de fijación de complemento. El paciente evolucionó favorablemente tras el inicio de tratamiento con tetraciclinas, la fiebre desapareció, la función hepática se normalizó y las imágenes hepáticas mejoraron considerablemente.

Entre las raras complicaciones del sistema musculoesquelético cabe destacar artritis, poliartitis simétrica o artritis reactiva (síndrome de Reiter) e incluso la rabdomiolisis. La crioglobulinemia es relativamente frecuente en las complicaciones hematológicas, por contrario la anemia y la hiperbilirrubinemia son muy raras.

5.4. POTENCIAL PATÓGENO DE LAS NUEVAS *Chlamydiae*

Históricamente el término “clamidia-like” ha servido para definir organismos intracelulares que al igual que *Chlamydiaceae* tienen un ciclo biológico en 2 etapas. Pero el término “clamidia-like” es solamente descriptivo. La secuenciación genómica de esos microorganismos aislados de procesos patológicos en humanos ha permitido identificar nuevas familias evolutivamente muy relacionadas con la familia *Chlamydiaceae* en algunas patologías. Probablemente las dos especies mejor descritas actualmente son *Parachlamydia acanthamoebae* (familia *Parachlamydiaceae*) y *Simkania negavensis* (familia *Simkaniaceae*).

Hay varias líneas de evidencia que relacionan *P. acanthamoebae* con infección respiratoria humana, si bien en los casos descritos hasta la fecha son pacientes con algún grado de inmunosupresión (pacientes trasplantados, infectados por el VIH, politraumatizados en unidades de cuidados intensivos), sugiriendo que se trata de un patógeno oportunista. Se ha relacionado a *P. acanthamoebae* con bronquitis, neumonía adquirida en la comunidad y neumonía por aspiración (hasta en 13% de los pacientes de larga duración en unidades de cuidados intensivos). Existen también publicaciones que implican a *P. acanthamoebae* en cuadros de queratitis y arteriosclerosis.

Simkania negevensis se ha asociado a cuadros de bronquiolitis en niños, a infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos y en biopsias arteriales, se ha relacionado con cuadros de aterosclerosis.

6. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR ESPECIES DEL ORDEN *Chlamydiales*

Muchos estudios han demostrado una correlación pobre entre los resultados obtenidos por cultivo, por serología y por PCR, mientras que en otros casos la correlación es buena. Estos resultados

aparentemente contradictorios sólo están indicando la necesidad de definir con precisión la fase de la infección o el tiempo en el que se obtiene la muestra, para saber qué técnica de referencia debe ser comparada en cada caso o que técnica ofrece el diagnóstico más preciso. En la figura 2 se representa la dinámica de aparición de los anticuerpos y marcadores moleculares específicos.

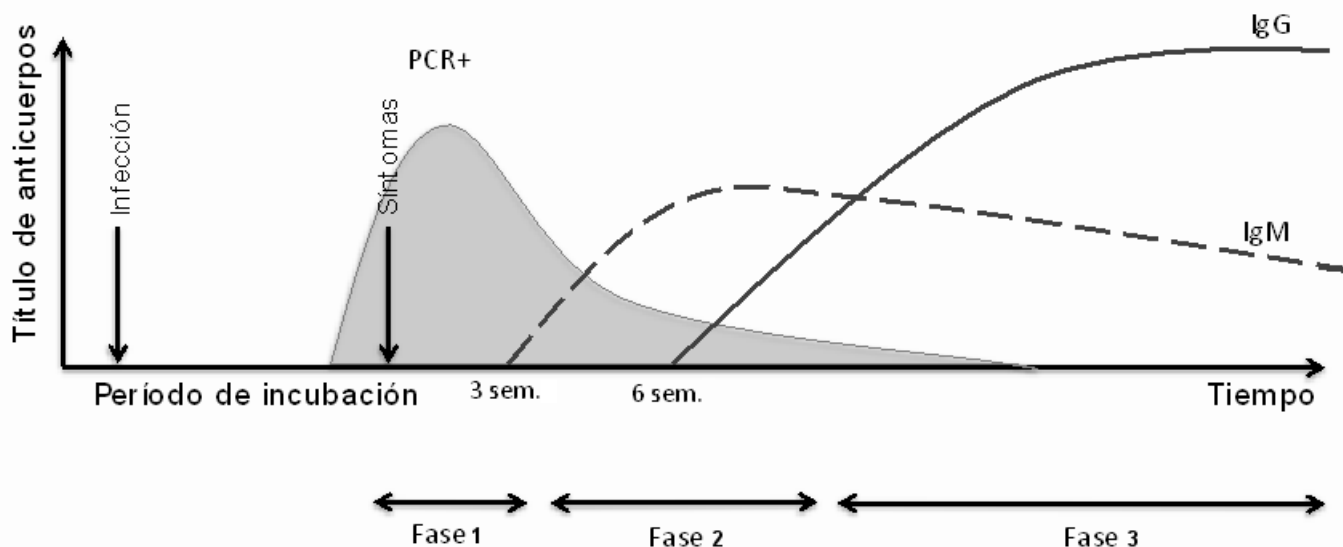


Figura 2.- Dinámica de la aparición de títulos de anticuerpos y marcadores moleculares para ser detectado por serología o técnicas de PCR (Adaptado de Hvidsten, *Clin Microbiol Infec* 2009; 15: 42-49).

6.1. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *Chlamydia trachomatis*

Hasta principios de los años 80, el principal método de diagnóstico de infección por clamidias fue el cultivo celular, pero paulatinamente fueron reemplazados por otras técnicas más sencillas, rápidas y que permitieran un flujo de trabajo mayor. En esa época aparecieron los primeros ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales y las técnicas de enzimo-inmunoensayo (EIA) que por su sencillez llegaron a tener una gran aceptación. En los años 90 apareció la técnica de hibridación de ácidos nucleicos. Pero el gran desarrollo del diagnóstico de la infección por *C. trachomatis* han sido las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que permiten un flujo de trabajo elevado con excelente sensibilidad y especificidad, facilitando la instauración del cribado de la infección por *C. trachomatis* en población sexualmente activa.

6.1.1. Amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han supuesto el avance más importante para la detección de las infecciones por clamidias desde el

desarrollo del cultivo celular. Son las técnicas de última generación y dada su elevada sensibilidad y especificidad han desplazado al resto de técnicas convirtiéndose en el nuevo patrón de referencia para el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis*. Aunque las primeras técnicas comerciales fueron aprobadas en 1993, las técnicas actualmente disponibles en el mercado empezaron a aprobarse desde 2006 hasta nuestros días (tabla 1), basándose en todos los casos, excepto en uno, en tecnología de PCR en tiempo real (qPCR). Estas técnicas están aprobadas para realizar la detección de *C. trachomatis* en muestras oculares, cervicales, uretrales, semen y muestras de orina. Algunas publicaciones han ensayado la rentabilidad de estas técnicas en otro tipo de muestras como faringe o recto pero aún no han sido aprobadas por la FDA ni por la CE.

Tabla 1.- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos disponibles comercialmente.

	Ensayo	Comercialización (FDA/CE IVD)	Método	Diana
Roche	Amplicor CT Cobas Amplicor Cobas TaqMan Cobas TaqMan v2.0 Cobas 4800	1993/1995 1998/2003 2006/2005 --/2008 2012/--	qPCR qPCR qPCR qPCR qPCR	Plásmido críptico Plásmido críptico Plásmido críptico Plásmido críptico+OmpA Plásmido críptico+OmpA
Abbott	RealTime CT/NG	--/2006	qPCR	2 dianas plásmido críptico
Qiagen	Artus plus RG PCR	--/2007	qPCR	Plásmido críptico+ompA
Becton-D	Probe Tec	--/2009	SDA	Plásmido críptico
Siemens	Versant kPCR	--/2010	qPCR	Plásmido críptico
BioRad	BioRad DX CT/NG/MG	--/2010	qPCR	Plásmido críptico
Cepheid	GeneXpert	--/2012	qPCR	Plásmido críptico

qPCR: PCR en tiempo real; SDA: amplificación por desplazamiento de hebra

Con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica, estos tests se basan en la detección de genes presentes en alto número de copias, como el plásmido críptico X06707 (~10 copias/genoma) presente tanto en los cuerpos elementales como en los reticulados, o algunas técnicas caseras que se basan en el 16S ADNr (2 copias/genoma). En 2006, se detectó, en Suecia, una variante del serovar E con una delección de 377bp en la región del plásmido utilizada como diana diagnóstica por los tests TAANs disponibles en ese momento, que supuso un infradiagnóstico en el número de casos (esta misma delección había sido detectada también en el plásmido de *C. pneumoniae*). Como consecuencia de esa pérdida de sensibilidad, los sistemas disponibles rápidamente desarrollaron una modificación de la técnica que suponía la incorporación de una segunda diana. Así los sistemas Cobas TaqMan CT/NG v 2.0 de Roche y Artus *C. trachomatis* plus RG PCR de Qiagen detectan simultáneamente 2 dianas de *C. trachomatis*, una en el plásmido críptico y otra en el gen *ompA* que codifica para la proteína de membrana externa MOMP, mientras que el sistema Abbott RealTime CT/NG emplea 2 dianas en el mismo plásmido críptico. Gracias a estas nuevas plataformas se pudo concluir que en Suecia entre 10-65% de las nuevas infecciones fueron debidas a esta nueva variante. Aunque esta nueva variante apenas se ha descrito fuera de Suecia es recomendable no usar técnicas que pudieran fracasar en detectar esta variante. Las más recientes técnicas comerciales aprobadas para el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis*, solamente disponen de una única diana en el plásmido críptico pero en otra región diferente de la delección de 377 bp descrita. Aunque la sensibilidad global de todas estas técnicas de TAAN oscila entre 300-350 copias/mL, el inconveniente de las plataformas que solamente disponen de dianas en el plásmido

críptico es que existe ~1% de cepas que carecen del plásmido. Además en la nueva variante de Suecia con la delección descrita, el número de copias del plásmido disminuye, disminuyendo también la sensibilidad de aquellas plataformas que basan su diagnóstico únicamente en dianas presentes en el plásmido críptico.

Para reducir el efecto de los inhibidores, aumentar aún mas la reproducibilidad y la capacidad de los laboratorios de diagnóstico molecular, muchas de estas plataformas están asociadas a sistemas de extracción automática del material genético de las muestras biológicas para las que están aprobados. Así, Abbott RealTime, Versant kPCR de Siemens o Cobas TaqMan de Roche disponen de sistemas de extracción de alta capacidad. Probablemente el mayor grado de automatización ha sido alcanzado con el sistema Cobas 4800 de Roche, único sistema de TAANs disponible en el mercado aprobado por FDA.

Una limitación de todas estas técnicas diagnósticas es la falta de discriminación entre los diferentes biovares de *C. trachomatis* relacionados con procesos patológicos diferentes que pueden detectarse en muestras uretrales o cervicales. Ninguna técnica puede discriminar entre los serovares D-K y serovares L1-L3 relacionados con el LGV. Así el diagnóstico diferencial tenía que estar basado en datos clínicos y epidemiológicos. Es cierto que hasta hace poco tiempo la identificación de biovares relacionado con el LGV era muy infrecuente en nuestro medio y se aceptaba como enfermedad de los trópicos. Pero desde el año 2003, los casos de LGV en Europa constituyen un problema emergente de Salud Pública que requiere el diseño de estrategias de diagnóstico diferencial. Esta falta de tests diagnósticos se ha visto agravada con la falta de conocimiento sobre si las TAANs eran suficientemente sensibles, específicas y reproducibles para detectar *C. trachomatis* en

muestras rectales ya que los casos de LGV en Europa están estrechamente relacionados a población homosexual con prácticas de riesgo anal. Aunque estas técnicas no están aun aprobadas por la FDA, algunos grupos han realizado ensayos de validación en muestras de recto con resultados de sensibilidad y especificidad iguales o superiores al cultivo. Actualmente se han publicado distintos tests caseros, basados en la tecnología de qPCR, para la diferenciación entre las serovariedades LGV y el resto. Algunas de estas qPCR se basan en diferencias nucleotídicas en las regiones variables del gen *ompA* pero probablemente las técnicas más robustas se basan en una delección de 36 pb presente en el gen *pmpH* característica de los biovares L1-L3 causantes del LGV (ver PNT-DC-01 de este procedimiento).

6.1.2. Hibridación de ácidos nucleicos. Las primeras versiones de esta tecnología fueron aprobadas a finales de los años 80, como etapa previa al desarrollo de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que llegaron a ser las técnicas de referencia al ser más sensibles. Son técnicas basadas en técnicas de captura e hibridación de ácidos nucleicos mediante el empleo de sondas específicas. El sistema más ampliamente distribuido, especialmente en EEUU, es Aptima CT o la versión dual Aptima Combo 2 para detectar simultáneamente *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, desarrollado por Gen-Probe. Ambos han sido aprobados por la FDA en 2005 y 2001 respectivamente, y también disponen del marcado CE.

El sistema de Aptima, se basa en la tecnología Pace2 que al igual que las estrategias de PCR en tiempo real, usan como aproximación diagnóstica la detección de las dianas que están en mayor número de copias en la bacteria. Se trata de una tecnología combinada, basada en la captación (o enriquecimiento) de las miles de copias del ARNr de *C. trachomatis* (16S ARNr en el ensayo Aptima CT y 23S ARNr en Aptima Combo 2), amplificación mediada por transcripción (TMA) y un ensayo de hibridación (HPA). Sus ventajas son que es un sistema totalmente automatizado (fácil estandarización), con una carga de trabajo superior a otras plataformas, alta reproducibilidad al eliminar los inhibidores en la fase de captación de la diana que había supuesto una de las limitaciones de las versiones de primera generación en muestras de orina, y sensibilidad superior incluso a algunas TAAN, como Probe Tec.

La técnica de hibridación de señal Digene Hybrid Capture II (Qiagen), usa como diana de detección fragmentos de ADN del plásmido críptico y *OmpA*. A diferencia de Aptima, la diana es ADN y la sonda es ARN. Su sensibilidad es comparable a las TAAN en el caso de muestras cervicales, pero no está adaptada para muestras de orina.

6.1.3. Detección de antígenos. En este punto, se pueden distinguir dos grupos de técnicas, aquellas basadas en la tinción directa de las muestras con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (DFA) y los enzimoimmunoensayos

(EIA). Las plataformas que emplean DFA se basan en el uso de anticuerpos especie-específicos dirigidos principalmente frente al antígeno MOMP (Syva Microtrak, Trinity Biotech.) y en menor medida frente al LPS (Pathfinder, Sanofi) porque es más probable que se observen reacciones cruzadas con miembros de la familia. Este inconveniente ha sido reconducido para ser una ventaja, ya que en muestras conjuntivales, para descartar una conjuntivitis por *C. trachomatis* de otras clamidias, una amplificación positiva para LPS y negativa para MOMP permite sugerir infección por *C. pneumoniae*. Las principales ventajas de las DFA son su rapidez (30 min) y especificidad cercana al 100%, la sensibilidad es del 85-90%, respecto al cultivo y no requiere un medio de transporte específico. Entre sus desventajas está que la interpretación de los resultados es subjetiva y requiere personal experimentado, baja reproducibilidad y el volumen de muestras no puede ser elevado.

La tecnología EIA se basa en la detección del antígeno por la detección de una señal colorimétrica generada por la reacción del antígeno (generalmente regiones epitopo-específicas del LPS) con el anticuerpo. Tradicionalmente han gozado de gran popularidad por ser técnicas sencillas, objetivables y automatizadas por lo que han sido de elección en laboratorios con pocos recursos que no podían implementar las técnicas moleculares pero con un elevado número de muestras. La especificidad de EIA es baja pudiendo darse falsos positivos por la presencia de otros LPS bacterianos, especialmente si la carga bacteriana es elevada (ver apartado 4.2.1). Por este motivo no puede emplearse en muestras rectales ni faríngeas, tampoco en poblaciones de baja prevalencia. No presentan una buena sensibilidad, por lo que cualquier resultado positivo debería confirmarse por otra técnica, bien DFA o EIA usando otro antígeno.

Basada en la tecnología EIA se desarrollaron varios test rápidos o *point of care* (entre 40s-30 min), para su implantación en regiones con recursos limitados o en consultas de cribado. Sin embargo, pese a su tentadora sencillez, no debe recomendarse su uso. Han demostrado una sensibilidad entre 40% y 25% en población con alta y baja prevalencia respectivamente, por lo que multitud de trabajos desaconsejan su uso para la detección de infecciones urogenitales incluso en regiones con recursos limitados.

6.1.4. Cultivo en línea celular. Hasta finales del siglo XX, el cultivo celular de *C. trachomatis* ha sido el estándar de referencia frente al cual se han comparado todas las demás pruebas. Pero debido principalmente a la aparición de nuevos métodos diagnósticos más fáciles de implementar, rápidos y sensibles, el cultivo celular ha quedado relegado a laboratorios de referencia, con utilidad en estudios epidemiológicos y/o forenses. Una descripción más detallada puede encontrarse en el PNT-DC-03 de este procedimiento. Las líneas celulares óptimas para el crecimiento de *C. trachomatis* son HeLa 229 y McCoy. Otra particularidad, respecto al

procedimiento descrito en el PNT-DC-03 es que los biotipos del LGV tienen una velocidad de crecimiento mayor que otras clamidias, por lo que no es necesario en la mayoría de los casos la incubación a 35°C durante 3 días.

Presenta ventajas inherentes, sólo se detectan las bacterias vivas, lo que supone una ventaja con las técnicas moleculares basadas en ADN, pero es también un inconveniente, pues al ser una bacteria muy lábil, las condiciones de transporte deben de ser excelentes, garantizando que no se pierda la cadena de frío. Es por este motivo que aunque es una técnica muy específica, la sensibilidad puede no ser muy buena (75-80%) y dar lugar a falsos negativos, por lo que actualmente se desaconseja su uso con fines diagnósticos. Para garantizar una mejor tasa de recuperación de organismos vivos es indispensable usar un medio de transporte adecuado. Otra ventaja

añadida del cultivo celular, es la posibilidad de realizar estudios de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, los métodos de cultivo presentan grandes inconvenientes, son difíciles de estandarizar, son técnicamente exigentes, requieren varios días de incubación (3-7 días) y personal muy entrenado.

6.1.5. Recogida, transporte y conservación de las muestras. En cuanto a los tipos de muestras, se podrían clasificar en invasivas o no invasivas. Entre las primeras se encuentra el raspado o cepillado uretral y endocervical, también se pueden incluir en este grupo las muestras conjuntivales, nasofaríngeas y del tracto respiratorio inferior. Solo las TAAN y Gen-Probe, han demostrado la utilidad en muestras no invasivas como la primera porción de la orina, torundas vaginales o rectales.

Tabla 2.- Ventajas y desventajas de las técnicas de diagnóstico descritas para *C. trachomatis* y los tipos de muestras adecuadas en cada caso.

Método diagnóstico	Procesamiento	Ventajas	Desventajas
TAANs	2-4 h	- Elevada sensibilidad (90-95%) - Permite su empleo con muestras vaginales y de orina - Validadas para su empleo con muestras no genitales, incluidas muestras rectales	- Técnicas costosas - El % de falsos positivos se debe evaluar - No aprobadas para extragenitales
EIA	4 h	- Económicas - Utilidad como <i>point of care</i>	- Baja sensibilidad (40-70%)
DFA	1 h	- Puede emplearse con cualquier espécimen.	- Baja sensibilidad - Técnicamente laboriosas y requieren personal entrenado
Cultivo Celular	48-72 h	- Elevada especificidad - Útil con cualquier tipo de muestra	- Baja sensibilidad (60-80%) - Laborioso - Capacitación técnica - No es útil con gran número de muestras

La principal ventaja de las muestras no invasivas, es que pueden ser auto-recogidas por el propio paciente, punto importante en los programas de cribado. La carga bacteriana de estas muestras no invasivas, es menor que en las invasivas pero dada la elevada sensibilidad de las técnicas moleculares, permiten un diagnóstico adecuado. En general, en el caso de los hombres se prefiere la primera porción de la orina, mientras que en las mujeres se ha comprobado que las muestras vaginales tienen una mayor carga bacteriana que la orina (tabla 2). En las muestras invasivas, las torundas adecuadas para la toma de muestras serán de Dacron con vástago de aluminio o plástico. No se deben emplear torundas de alginato cálcico o con el vástago de madera, pues pueden inhibir tanto el crecimiento en cultivo celular como las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).

Con la excepción de la técnica DFA, las condiciones de transporte son críticas para garantizar que la bacteria es preservada hasta llegar

la laboratorio. Por eso es importante que las unidades o consultas de infecciones de transmisión sexual, dispongan de un medio de transporte adecuado en el que inocular las muestras. Habitualmente, los medios de transporte son tampón fosfato rico en sacarosa con antibacterianos como anfotericina B, gentamicina y estreptomycin (medio de transporte Bartels Flextrans), o anfotericina, vancomicina y colistina (UTM Copan) entre otros. Una vez inoculada la muestra en el medio de transporte, esta puede mantenerse refrigerada a 4°C, no más de 24 horas, especialmente si se va a inocular en *shell-vial*. Para períodos de conservación superiores, hay que mantener a -70°C.

6.2. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *Chlamydia pneumoniae*

En 2001, los *Centers for Disease Control and Prevention* de Estados Unidos (CDC) y el *Laboratory Centre for Disease Control* (LCDC) de Canadá publicaron unas recomendaciones para el

diagnóstico de *C. pneumoniae*, con el fin de estandarizar la metodología e interpretación de los resultados en la investigación de esta bacteria de forma que las conclusiones de los distintos estudios pudieran ser comparadas. Pese a estas recomendaciones sigue existiendo un alto grado de heterogeneidad en los métodos serológicos y los criterios empleados. Así un estudio multicéntrico realizado en Alemania en 2006 empleando técnicas de PCR y microinmunofluorescencia reveló que sólo el 0,9% de los pacientes podrían tener una infección aguda por *C. pneumoniae*. De los casos positivos ninguno mostró IgG, IgM o IgA anti-*C. pneumoniae* confirmando la baja correlación entre las pruebas serológicas y las basadas en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). Esta dificultad en establecer un diagnóstico de certeza puede ser la causa de las discrepancias entre diferentes estudios para definir el papel de *C. pneumoniae* en la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), que oscila entre 0%-45%, aunque también se deben contemplar otras explicaciones como las diferencias geográficas o la posibilidad de infecciones cíclicas en la población con épocas epidémicas y no epidémicas.

La fase de la infección en la que se obtiene la muestra va a determinar en gran parte el rendimiento de la técnica diagnóstica elegida. Las TAAN tienen mayor rendimiento en las fases tempranas de la infección y las pruebas serológicas cuando la infección se encuentra en fase avanzada. Las técnicas serológicas son las más utilizadas en los laboratorios clínicos, pero tienen limitaciones de especificidad, reproducibilidad y correlación clínica. El cultivo de este microorganismo en líneas celulares tiene un rendimiento muy escaso, es muy lento y laborioso, quedando su uso relegado a laboratorios de investigación y centros de referencia. Las TAAN, son más sensibles y específicas especialmente la PCR en tiempo real, aunque aún requiere protocolos de estandarización, pero probablemente será la técnica de elección en el futuro.

6.2.1. Diagnóstico indirecto: serología. La elevada seroprevalencia de IgG frente a *C. pneumoniae* en la población adulta sana (sin síntomas respiratorios), de hasta un 70%, dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en un único suero. La necesidad de un segundo suero para realizar un diagnóstico fiable, limitan la utilidad de la serología en el manejo del paciente con infección aguda. Para poder interpretar los resultados de la serología es importante conocer la cinética de la respuesta inmune. En fase aguda, la IgM se detecta entre las 2-3 semanas tras la aparición de los síntomas (período de incubación prolongado ~3semanas), hasta 2-6 meses después, mientras que la IgG puede tardar en alcanzar títulos elevados hasta 6-8 semanas tras el comienzo de la enfermedad. El retraso en la respuesta serológica condiciona que en la mayoría de los casos el diagnóstico de infección respiratoria se haga de forma retrospectiva.

Diversos estudios *in vitro* han observado cambios en el nivel de expresión de genes de *C. pneumoniae*

cuando se induce el estado de persistencia mediante exposición a IFN- γ o privación de hierro. En el caso de infección persistente la IgA parece ser un potencial marcador de infección persistente o crónica, ya que su vida media es de 5-7 días, mientras que la de la IgG es de semanas o meses. Es posible por tanto, que el perfil antigénico expresado durante la infección persistente sea distinto, por lo que encontrar un marcador más sensible y específico de esta fase sería de gran ayuda para establecer el papel que juega *C. pneumoniae* en patologías inflamatorias crónicas u otros procesos.

Tradicionalmente los ensayos serológicos más comúnmente usados incluyen la fijación del complemento, la microinmunofluorescencia y el inmunoensayo para detectar IgM, IgG e IgA. La fijación del complemento no es una técnica útil porque tiene baja sensibilidad y no permite diferenciar entre las diferentes especies de *Chlamydia* (ver PNT-DC-01 de este procedimiento).

6.2.1.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras. La muestra de elección para el diagnóstico serológico de la infección por *C. pneumoniae* es el suero. Para su obtención se recomienda realizar venopunción guardando las medidas generales de asepsia, utilizando jeringa estéril o dispositivo para tubo primario con vacío (por ejemplo, VacutainerTM). Es recomendable utilizar un tubo seco para obtener suero por centrifugación después de formado el coágulo. Tratará de evitarse la utilización de tubos con anticoagulante (obteniéndose así plasma) con el fin de evitar posibles interferencias. Las recomendaciones son las generales para cualquier suero que se envíe al laboratorio para su estudio. La sangre debe llegar al laboratorio en el mínimo tiempo posible (máximo 2-3 horas), donde será centrifugada, separada y conservada en refrigeración. Se puede mantener el suero refrigerado a 4°C hasta 72 horas. Si el ensayo no se va a realizar antes de ese tiempo congelar la muestra a -20°C. Si la muestra se quiere conservar largos periodos de tiempo, se recomienda su congelación a -80°C. Se deben tomar dos muestras de suero, una de fase aguda al comienzo de la sintomatología y otra de fase convaleciente 4-8 semanas después.

6.2.1.2. Microinmunofluorescencia. La microinmunofluorescencia (MIF) es la técnica de referencia para el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae*, fue desarrollada por Wang y cols. en 2000 para detectar anticuerpos específicos (IgM, IgG e IgA) frente a *C. pneumoniae* y a día de hoy sigue siendo el método de referencia para el serodiagnóstico de la infección aguda por *C. pneumoniae*, conforme a las recomendaciones del CDC.

Los antígenos presentes en la fase CE del ciclo biológico de *C. pneumoniae* (fase infectiva) son los recomendados. Estos antígenos son purificados y fijados a un portaobjetos. El procedimiento es dependiente de cada casa comercial pero básicamente se puede resumir en que la muestra de suero a estudiar se incuba en los pocillos con el

antígeno, de manera que si hay anticuerpos frente a *C. pneumoniae* se unirán a los antígenos del portaobjetos. Tras un lavado con un tampón fosfato salino (PBS) se eliminan todos los anticuerpos que no se han unido y a continuación se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana conjugados con isotiocianato de fluoresceína que formarán un complejo con los anticuerpos que hayan quedado fijados en los pocillos. Esta anti-

inmunoglobulina puede ser específica de clase IgA, IgG o IgM. Al examinar las preparaciones al microscopio de fluorescencia, los pocillos en los que se observe el patrón típico de fluorescencia indicarán presencia de anticuerpos específicos de *C. pneumoniae* en la muestra.

A continuación se muestran algunos sistemas comerciales para la detección de *C. pneumoniae* por MIF (ver tabla 3).

Tabla 3.- Sistemas comerciales para la detección de *C. pneumoniae* mediante microinmunofluorescencia (MIF)

Nombre equipo	Anticuerpos	Antígenos	Fabricante
<i>C.pneumoniae</i> IFA IgG	IgM/G	<i>C. pneumoniae</i> (CE)	VIRCELL, S.L (Granada, España)
DxSelect™ CHLAMYDIA	IgA/M/G	<i>C. pneumoniae</i> (CE)	FOCUS DIAGNOSTICS (CA, USA)
SeroFIA™ <i>C. pneumoniae</i>	IgA/M/G	<i>C. pneumoniae</i> (CE)	SAVYON (Israel)
PNEUMOSLIDE IgG	IgG	<i>C. pneumoniae</i> (CE), <i>L. pneumophila</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. burnetii</i> , AD, VRS, INFA, INFB, PIV1,2,3	VIRCELL, S.L (Granada, España)
PNEUMOBACT	IgM/G	<i>C. pneumoniae</i> (CE) <i>L. pneumophila</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. burnetii</i>	VIRCELL, S.L (Granada, España)
<i>C. pneumoniae</i> IgG/IgM o IgA MIFA	IgA/M/G	<i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i> (CE)	ANI LABSYSTEMS (Vantaa, Finlandia)
<i>Chlamydia</i> IgG SeroFIA™	IgG	<i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i> (CE)	SAVYON (Israel)

Los criterios usados para identificar una infección aguda por *C. pneumoniae* son: IgM $\geq 1:16$ o incremento de 4 veces el título de IgG (necesidad de sueros pareados obtenidos con 4-8 semanas de diferencia), o IgG $\geq 1:512$ y una infección pasada si IgG $\geq 1:16$.

A pesar de ser el método de referencia, la MIF tiene algunas limitaciones:

a) Problemas de estandarización, condicionada por el antígeno empleado. Los CE que se utilizan como antígeno se obtienen mediante cultivo celular, por lo que los antígenos presentes en su superficie pueden ser distintos de los que se expresan durante la infección natural. Esto implica que un resultado negativo con una prueba que tenga un 100% de sensibilidad analítica podría no detectar anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en el suero de un paciente infectado.

b) Repetidamente se ha demostrado que la MIF es insensible en la detección de *C. pneumoniae* o tiene poca correlación con la PCR o cultivo, especialmente en niños (respuesta inmune incompleta), incluso después de tres meses de seguimiento.

c) Se ha demostrado la presencia de títulos elevados de anticuerpos IgM $\geq 1:16$ e IgG $\geq 1:512$

en individuos sanos asintomáticos, con cultivos y/o PCR de *C. pneumoniae* negativos. Las posibles explicaciones a estos posibles falsos positivos son: 1) reacción cruzada con otras especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp, o *Yersinia* spp.; 2) la presencia de factor reumatoide; 3) títulos elevados de anticuerpos IgG $>1:512$ en individuos sanos asintomáticos o pacientes con EPOC que pueden mantener títulos persistentemente elevados de IgG; 4) personal poco entrenado para diferenciar un resultado positivo de artefactos en la inmunofluorescencia.

d) La presencia de anticuerpos IgG en neonatos debe ser interpretada con precaución por la posible transferencia de anticuerpos maternos al feto. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.

e) Elevada tasa de variabilidad interlaboratorio. La concordancia entre diferentes laboratorios para cuantificar el título de IgA e IgG es tan baja como 55-38% respectivamente.

f) No es una técnica muy práctica si la carga de trabajo es elevada.

6.2.1.3. Enzimoinmunoensayo (EIA). Los EIAs suelen ser las técnicas elegidas para el diagnóstico serológico de *C. pneumoniae* en los laboratorios

clínicos por ser fácilmente automatizables, permitiendo un mayor número de muestras procesadas, objetividad en la lectura de los resultados y ser técnicamente más sencillos que la MIF. En Europa se comercializan numerosos equipos con marcado CE, aunque en Estados Unidos todavía no hay ninguno aprobado por la FDA para diagnóstico *in vitro*. La sensibilidad y especificidad de estos EIAs depende en gran medida de los antígenos utilizados, que pueden ser antígenos purificados de proteínas de membrana o antígenos recombinantes de CE. Los equipos que contienen LPS recombinante son específicos de género, detectando anticuerpos frente a *Chlamydia* spp., a diferencia de los que usan MOMP, que son específicas de especie. Estudios comparativos entre diferentes fabricantes sugiere que SeroCP mostró los mejores valores de sensibilidad, seguido por Vircell ELISA (tabla 4).

Existen EIAs cualitativos, en los que el resultado es positivo o negativo en función de unos puntos de corte, generalmente establecidos por el fabricante. La cuantificación en estos equipos se puede realizar mediante titulación del suero hasta punto final (última dilución con la que se obtiene un resultado positivo). También se comercializan EIAs cuantitativos en los que la densidad óptica es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Con estándares de calibración que contienen una cantidad conocida de anticuerpos, se calcula la curva de cuantificación, correspondiendo un valor de densidad óptica a una determinada concentración de anticuerpos en la muestra. Todos estos equipos deben estar validados frente a la técnica de referencia de microinmunofluorescencia. Estudios comparativos entre varios equipos de EIAs comerciales frente a la técnica de referencia MIF ofrecen resultados muy diversos de sensibilidad y especificidad. La correlación entre los resultados de MIF y EIAs para la detección de IgG en infección respiratoria por *C. pneumoniae* oscila entre sensibilidad 58-96% y especificidad 95-100%. En general la MIF mostró mejores resultados de sensibilidad con títulos bajos de anticuerpos. En la tabla 4 se muestran algunos sistemas de EIA comercializados para la detección de anticuerpos frente a *C. pneumoniae*.

6.2.1.4. Fijación del complemento. La fijación del complemento (FC) es una técnica capaz de detectar incrementos en el título de anticuerpos entre muestras tomadas con una sola semana de diferencia y la lectura de resultados es objetiva.

Detecta anticuerpos frente a un determinante antigénico del LPS común a todas las especies de clamidias, por lo que no es específica de *C. pneumoniae*. Actualmente no se recomienda la FC como técnica para el diagnóstico de infección por *C. pneumoniae* por la posibilidad de reacciones cruzadas con otras especies de clamidias y bacilos gramnegativos y por su baja sensibilidad.

6.2.2. Diagnóstico directo: cultivo. Los miembros del género *Chlamydia* son bacterias intracelulares obligadas, por tanto sólo pueden crecer en cultivos celulares. El cultivo en línea celular Hep-2 o HL ha sido tradicionalmente considerado un método de referencia para cultivar *C. pneumoniae*, sin embargo debido a las limitaciones del cultivo (técnica muy laboriosa y larga, bajo rendimiento, fácil inactivación durante el transporte, crecimiento lento y éxito diagnóstico variable) hace que el cultivo permanezca restringido a laboratorios especializados. El cultivo sigue siendo insustituible en estudios de validación de nuevos métodos diagnósticos como PCR, para demostrar la viabilidad del microorganismo, obtener cepas para caracterización, producción de antígenos, en pruebas de sensibilidad a antibióticos o en ensayos clínicos de eficacia de tratamientos. *C. pneumoniae* es más difícil de cultivar que *C. trachomatis*.

C. pneumoniae es un patógeno respiratorio que requiere para su manejo un nivel de bioseguridad 2 por lo que las muestras y cultivos deben trabajarse en cabina de seguridad biológica II (CSB-II), con el equipo de protección adecuado (guantes, bata, etc) y según todas las precauciones recomendadas para este nivel de bioseguridad (ver Procedimientos en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica"). Hay casos documentados de transmisión de *C. pneumoniae* en laboratorios a través de aerosoles, por lo que debe evitarse la formación de éstos, prestando especial atención durante los procesos en los que hay mayor riesgo de formación de aerosoles como la centrifugación, sonicación o disgregación.

6.2.2.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras. Las muestras clínicas más habituales para el aislamiento de *C. pneumoniae* son las respiratorias, siendo las más apropiadas para el cultivo el exudado nasofaríngeo u orofaríngeo, el lavado broncoalveolar (LBA) y el líquido pleural. El esputo, aunque puede utilizarse, no es la mejor muestra para la recuperación de *C. pneumoniae* ya que puede inhibir el crecimiento celular y ser tóxico para la monocapa. En ocasiones se ha conseguido recuperar de tejidos y sangre periférica, pero resulta muy difícil por la poca cantidad de organismos viables y el bajo rendimiento intrínseco de este procedimiento.

Las muestras de exudados naso/orofaríngeos se toman con escobillones estériles de Dacron y con mango de aluminio o de plástico. Hay que evitar los escobillones de alginato, algodón o con mango de madera ya que pueden inhibir el crecimiento de *C. pneumoniae*. Se deben introducir los escobillones en tubos con medio de transporte para clamidias (ver sección 6.1.5). La viabilidad de clamidias se mantiene mejor en medios de transporte tamponados, con un pH 7,4-7,6, que contengan sacarosa y fosfato, como 2SP (2 sacarosa fosfato) o SPG (sacarosa, fosfato, glutámico).

Tabla 4.- Relación de sistemas comerciales para el diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* basado en enzimo-inmunoensayo (EIA)

Nombre equipo	Anticuerpos	Antígenos	Fabricante
Específicos especie <i>C. pneumoniae</i>			
<i>C. pneumoniae</i> ELISA IgA/M/G	IgA/M/G	CMOP, sin LPS	Vircell, S.L
<i>C. pneumoniae</i> IgA/M/G sELISA	IgA/M/G	MOMP	Medac Diagnostika (Hamburgo, Alemania)
HITAZYME Anti- <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgA/G/gM Antibodies	IgA/M/G	CMOP	Hitachi Chemical (Tokyo, Japón)
SERO CP IgA/M/G	IgA/M/G	Proteínas de CE	Savyon Diagnostics
RIDASCREEN® <i>C. pneumoniae</i> IgA/M/G	IgA/M/G	CMOP	R-biopharm (Darmstadt, Alemania)
ImmunoLISA® <i>C. pneumoniae</i> Ig(A/M/G)	IgA/M/G	CMOP	Orgenics (Yavne, Israel)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> IgA/M/G ELISA	IgA/M/G	Proteínas de CE	IBL International (Hamburgo, Alemania)
Específicos género <i>Chlamydia</i> spp.			
ImmunoComb® bivalent Chlamydia IgG	IgG	LPS	Orgenics
RIDASCREEN® Chlamydiae IgM/G	IgM/G	IgM/G	R-biopharm
Chlamydia IgA/ M/G rELISA	IgA/M/G	LPS recombinante	Medac Diagnostika
Chlamydia ELISA IgG/M	IgM/G	IgM/G	Vircell, S.L
Multitest			
PNEUMOBACT ELISA IgG o IgM	IgM/G	<i>C. pneumoniae</i> (CMOP), <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>C. burnetii</i>	Vircell, S.L
Cuantificación			
<i>Chlamydia pneumoniae</i> IgA/M/G ELISA plus	IgA/M/G	MOMP	Medac Diagnostika
SERO CP QUANT IgA/M/G	IgA/M/G	CE	Savyon Diagnostics

Se puede añadir un 10% de suero fetal bovino (SFB) para aumentar la estabilidad de clamidias. Para evitar que la microbiota saprófita de las muestras no estériles prolifere y contamine los cultivos celulares se añaden al medio de transporte antibióticos (gentamicina, vancomicina) y antifúngicos (anfotericina B o nistatina). Hay que conservar el medio de transporte a 4°C. Las muestras de LBA, líquido pleural, esputo, biopsias o tejidos se recogen en frascos estériles con tapón de rosca, a los que se añade medio de transporte para clamidias en una proporción de 2 partes de medio de transporte por 1 de muestra (1:2).

Las muestras se mantienen y transportan refrigeradas a 4°C. Si la muestra biológica se procesara dentro de las 24 horas siguientes a la toma de muestra, hay que mantenerla a 4°C ya que *C. pneumoniae* pierde el 99% de infectividad si se mantiene durante 1 día a temperatura ambiente, frente al 30% que pierde a 4°C. Por el contrario, si la muestra biológica no se procesara dentro de las 24 horas siguientes, se debe mantener menos de 4 h a 4°C y a continuación congelarla a -70°C. Si se congela la muestra directamente, la pérdida de infectividad es del 61%. Una vez congelada, se puede conservar durante años, evitando congelaciones y descongelaciones sucesivas.

6.2.2.2. Selección de líneas celulares. Condiciones para la optimización de los resultados del cultivo. Como se ha comentado anteriormente, debido a la complejidad técnica y eficiencia en la recuperación de organismos viables, la instauración de esta técnica en los laboratorios de diagnóstico clínico tiene un interés escaso y muy limitado, quedando reservada a laboratorios de referencia con fines de sensibilidad antibiótica o producción de antígenos entre otras aplicaciones. Las líneas celulares humanas HL y Hep-2 son las que se utilizan para el cultivo de *C. pneumoniae* por ser las que ofrecen mayor sensibilidad. El cultivo se puede realizar en *shell-vial* o en placas de cultivo celular de múltiples pocillos (ver PNT-DC-03 de este procedimiento).

Se han publicado numerosos protocolos con distintas estrategias para optimizar el cultivo de *C. pneumoniae*, como el pretratamiento de las monocapas celulares con polietilenglicol, dextrano o tripsina, aumentar el número de veces que se centrifuga la muestra sobre la monocapa, usar medios de cultivo sin suero, etc. Sin embargo las dos únicas estrategias con suficientes evidencias a su favor como para recomendarlas de manera rutinaria son la centrifugación de la muestra sobre la monocapa y la adición de cicloheximida al medio de inoculación. La realización de pases sucesivos y la

expansión lenta del cultivo con inóculos pequeños, mejora el rendimiento de esta técnica en cuanto al número de muestras clínicas positivas y cantidad de microorganismos, unidades formadoras de inclusiones (UFI). Tras la incubación se tiñe la monocapa de uno de los viales o pocillos con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína, específicos de género o de especie, para visualizar si hay inclusiones de *C. pneumoniae*. Hay que fijar la monocapa con acetona, no se debe utilizar metanol para este fin, ya que puede modificar la estructura de algunas proteínas y alterar su antigenicidad.

Interpretación de los resultados:

- Negativo: no se observan inclusiones tras dos pases consecutivos.
- Posible positivo: se detectan ≥ 1 inclusiones por vial o pocillo.
- Positivo confirmado: sólo si la cepa se puede propagar en pases sucesivos o confirmarse mediante otros métodos como PCR (TAAN) puede confirmarse como "positivo".

6.2.3. Diagnóstico directo no basado en el cultivo.

6.2.3.1. Técnicas de detección de antígeno. Las técnicas de detección de antígeno tienen poca sensibilidad para el diagnóstico de infecciones respiratorias por *C. pneumoniae*, por lo que actualmente su uso no está recomendado para este fin (20-60% respecto del cultivo). La detección de antígenos de *C. pneumoniae* en preparaciones histológicas, mediante inmunofluorescencia (IF) y sobre todo inmunohistoquímica (IHC), tiene utilidad en estudios de investigación para demostrar la presencia de este microorganismo en diversos tejidos y conocer su implicación en patologías crónicas. El método de ICH con anticuerpos biotinilados y avidina es el más extendido. Con estas técnicas se ha podido detectar *C. pneumoniae* en tejido pulmonar, placas de ateroma, endotelio vascular, músculo liso, macrófagos y tejido cerebral. La interpretación de la IHC es complicada y requiere personal muy entrenado y capacitado para diferenciar las tinciones positivas de las señales de fondo o las que presentan artefactos. Para evitar resultados equívocos, se debe teñir cada muestra con al menos dos anticuerpos anti-clamidia distintos.

6.2.3.2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). La complejidad del cultivo de *C. pneumoniae* y los inconvenientes de la serología han motivado que se utilicen cada vez más las TAAN para el diagnóstico de estas infecciones por su rapidez, sensibilidad y especificidad. En 1992 fue publicado el primer protocolo para la detección de *C. pneumoniae* por PCR, desde entonces se han propuesto multitud de protocolos, haciendo de la PCR una atractiva alternativa para el diagnóstico de las infecciones por *C. pneumoniae*. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de artículos que describen el uso de esta tecnología para la detección de *C. pneumoniae*, ninguno de ellos ha sido aprobado por la FDA (aunque algunos sí disponen de marcado CE) debido principalmente a la falta de estandarización en los procedimientos de extracción,

al número limitado de muestras de diferentes áreas geográficas y grupos de edad testadas y la correlación entre detección de ácidos nucleicos en muestras respiratorias y su significación clínica. Más complejo de interpretar resulta aún sin criterios claramente validados la detección simultánea de ácidos nucleicos de *C. pneumoniae* con otros patógenos respiratorios (*S. pneumoniae*, virus respiratorios, etc..) en muestras de pacientes sintomáticos.

Las TAAN son las herramientas más sensibles para el diagnóstico de *C. pneumoniae* durante las etapas iniciales de la infección, que ofrecen resultados rápidos y requieren poca manipulación, lo que está facilitando su rápida implantación en los laboratorios de microbiología clínica. Pero no hay que olvidar que pueden observarse resultados falsos positivos y negativos y que éstos son más frecuentes con algunos procedimientos. Así por ejemplo la PCR anidada es más propensa a contaminación que la PCR en tiempo real. La detección de ácidos nucleicos de la bacteria en muestras respiratorias de individuos asintomáticos se considera como falso positivo. Para evaluar adecuadamente la utilidad de las TAAN en el diagnóstico de las infecciones por *C. pneumoniae* son necesarios estudios con pacientes y controles sanos y un número suficiente de muestras clínicas que permitan determinar valores predictivos, sensibilidad y especificidad en el contexto clínico.

6.2.3.2.1. Recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras. La mayoría de las TAAN comerciales están validadas para su utilización con muestras respiratorias. Pueden aplicarse a las siguientes: LBA, esputo, lavado nasofaríngeo, exudados nasofaríngeos, tejidos y biopsias, sangre o cultivos celulares. Los escobillones para la toma de muestra serán de dacrón, rayon o poliéster, no deben usarse escobillones de alginato cálcico. Una vez realizada la muestra se remitirá al laboratorio en medio de transporte específico que garantice la viabilidad de la bacteria e inhiba el crecimiento de otras bacterias, grampositivas y gramnegativas como el medio 2SP *chlamydial transport* o el UTM (*Universal Transport Medium*, Copan). Las muestras de sangre se tomarán en tubos con un anticoagulante diferente a la heparina. La muestra debe mantenerse a 4°C.

El paso previo a la amplificación y detección de ácidos nucleicos es la extracción de los mismos a partir de la muestra clínica. Para la detección de ácidos nucleicos de *C. pneumoniae* son válidas las mismas consideraciones y recomendaciones que las descritas en el apartado 5.3.3.1. "Consideraciones generales de la aplicación de la técnica de PCR al diagnóstico de infecciones por micoplasmas", del procedimiento número 40 de la SEIMC: "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp."

6.2.3.2.2. Descripción de las técnicas disponibles. Las dianas más frecuentes para la detección de *C. pneumoniae* son OmpA, PsTI, Pmp4 y 16S ADNr. La mayoría de los más recientes protocolos son de PCR

en tiempo real, el los que la detección de los fragmentos amplificados se realiza con sondas fluorescentes específicas (TaqMan®, Scorpion®, *molecular beacon*) o con colorantes fluorescentes como SYBR® Green y determinación de curvas de temperaturas de disociación. Pueden estar diseñadas para detectar únicamente *C. pneumoniae* o ser ensayos multiplex que detectan simultáneamente otros patógenos respiratorios. Hay otras técnicas que aún no están comercializadas o comercializadas para uso exclusivo en investigación (Research Use Only, RUO) pero que han mostrado su utilidad en el diagnóstico de *C. pneumoniae*. Una de ellas es la detección de *C. pneumoniae* (diana: gen *ompA*), *Legionella* spp. y *M. pneumoniae* directamente de muestras respiratorias mediante una PCR multiplex en tiempo real, detección con SYBR® Green y curvas de temperatura de disociación sin necesidad de extracción previa de ácidos nucleicos. Usan un reactivo de PCR, AmpDirect® PLUS (Shimadzu, Kyoto, Japón), que elimina los inhibidores que pudieran contener las muestras, con resultados equivalentes a los obtenidos si la PCR se realiza a partir de ácidos nucleicos extraídos, en cuanto a límite de detección, especificidad y sensibilidad.

La amplificación isotérmica de ARN (*nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA) en tiempo

real y la detección con sondas fluorescentes *molecular beacons*, se ha utilizado con el sistema NucliSENS EasyQ® (bioMérieux, Francia) para la detección de fragmentos del 16S ARNr de *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* en muestras respiratorias con resultados prometedores. Otra estrategia es la utilizada por el sistema ResPlex I (Qiagen), capaz de detectar *C. pneumoniae* y otros 6 patógenos respiratorios más. La amplificación se realiza con dos pares de cebadores específicos anidados para cada una de las dianas. Estos cebadores se encuentran a una concentración muy baja en la mezcla de reacción y se utilizan sólo para el enriquecimiento inicial de copias diana. La amplificación eficiente se realiza con unos cebadores universales que hibridan con la pareja de cebadores internos. El uso de estos cebadores universales permite homogeneizar las condiciones de amplificación. La detección se realiza mediante un array en suspensión basado en la tecnología xMAP® (Luminex®, USA) en el que bolas de poliestireno de distintos colores se conjugan con las sondas de oligonucleótidos específicas de cada patógeno. Un láser identifica el color de las bolas y el otro identifica la sonda unida al amplicón. En las tablas 5 y 6 se indican diferentes sistemas comerciales para el diagnóstico de *C. pneumoniae* basado en TAANs.

Tabla 5.- Relación de sistemas comerciales para el diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* basado en TAANs

Equipo	Técnica amplificación/detección	Microorganismos detectados	Fabricante
<i>C. pneumoniae</i> Real-TM Quant	PCR-TR / sondas TaqMan	<i>C. pneumoniae</i>	Sacace Biotechnologies
<i>C. pneumoniae</i> Q-PCR Alert Kit	PCR-TR / sondas TaqMan	<i>C. pneumoniae</i>	Nanogen Advance Technology
<i>C. pneumoniae</i> . oligomix Alert Kit	PCR anidada / electroforesis	<i>C. pneumoniae</i>	Nanogen Advance Technology
Speed-oligo® <i>C. pneumoniae</i>	PCR / oligocromatografía	<i>C. pneumoniae</i>	Vircell
Prodesse® ProPneumo-1 Assay	PCR-TR / sondas fluorescentes	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	GenProbe
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>C. pneumoniae</i> Real-Time	PCR-RT dual /sondas TaqMan	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	Sacace Biotechnologies
RealCycler® MYCH	PCR-RT dual/ sondas fluorescentes	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	Progenie Molecular
Speed-oligo® Bacterial pneumonia combi	PCR múltiple/ oligocromatografía	<i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>M. pneumoniae</i>	Vircell
Seplex® PneumoBacter ACE	PCR Múltiple DPO™/ electroforesis	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>B. pertussis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	Seegene

PCR-RT: PCR en tiempo real; DPO: Dual Priming Oligonucleotide.

Tabla 6.- Otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para detección de *C. pneumoniae*.

Equipo	Técnica amplificación/detección	Microorganismos detectados	Fabricante
Kit <i>C. pneumoniae</i> ¹	PCR-TR/ sondas TaqMan	<i>C. pneumoniae</i>	TIB Molbiol
ResPlex ¹	PCR / arrays en suspensión	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>H. influenzae</i> Adenovirus	Qiagen
EasyQ <i>C. pneumoniae</i> / <i>M. pneumoniae</i> ²	NASBA/ sondas "molecular beacons"	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>	bioMérieux
AmpDirect [®] PLUS <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i> ²	PCR-TR sin extracción/SYBR green y temperatura disociación	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i>	Shimadzu

¹Comercializados para uso en investigación (RUO) ²No comercializados en España.

6.2.3.3. Hibridación *in situ*. Al igual que las técnicas anteriores comentadas de detección de antígeno, la utilidad principal de la hibridación de ácidos nucleicos *in situ* es la detección de *C. pneumoniae* en preparaciones histológicas, aunque su uso está mucho menos extendido que la IHC.

En lugar de un anticuerpo anti-clamidia en esta técnica se usan sondas de ADN que contienen nucleótidos conjugados con digoxigenina (DIG dUTPs) específicas de alguna región del genoma de *C. pneumoniae* o del 16S ARNr. La visualización de la unión de la sonda con la diana se realiza mediante anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa y un sustrato cromogénico, indolfostato/azul de nitrotetrazolio o diaminobencidina respectivamente, que produce una reacción cromogénica. También pueden conjugarse los anticuerpos anti-digoxigenina con fluoresceína o rodamina visualizándose la hibridación mediante fluorescencia.

6.3. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *Chlamydia psittaci*

6.3.1. Diagnóstico indirecto de la psitacosis: serología. Dada la complejidad del cultivo del microorganismo, las técnicas serológicas constituyen la base del diagnóstico de la psitacosis. Según el CDC, se considera que un paciente constituye un caso de psitacosis confirmada si presenta un cuadro clínico compatible con la enfermedad y si se confirma por el laboratorio por uno de los siguientes métodos: a) cultivo de *C. psittaci* de una muestra respiratoria; b) evidencia por FC o MIF de una seroconversión de anticuerpos frente a *C. psittaci* con un aumento de al menos 4 títulos (en 2 muestras de suero de fase aguda y fase convaleciente respectivamente, separadas al menos 2 semanas) o c) detección de inmunoglobulinas de clase IgM frente a *C. psittaci* por MIF (con un título mayor o igual a 1/16). Se considera caso probable de psitacosis si existe cuadro clínico compatible y a) el paciente está relacionado epidemiológicamente con un caso

humano confirmado o b) se evidencia por CF o MIF un único título mayor o igual a 1/32 en un suero único obtenido después del inicio de los síntomas. Tradicionalmente se han utilizado dos procedimientos para este fin, la fijación de complemento (FC) y la microinmunofluorescencia (MIF), sin embargo no hay actualmente ningún test serológico específico de *C. psittaci*, debido a las reacciones cruzadas con diferentes especies de clamidia, como *C. trachomatis* o *C. pneumoniae*, lo que dificulta el diagnóstico diferencial de *C. psittaci*.

6.3.1.1. Fijación del complemento. La fijación del complemento (FC) es la técnica que más se ha utilizado para el diagnóstico serológico de clamidia, aunque no es capaz de distinguir entre las diferentes especies ya que utiliza como antígenos el LPS presente en todas ellas o la proteína de shock térmico. Es también conveniente evidenciar seroconversión en parejas de sueros separados al menos dos semanas. En caso de alta sospecha y reacciones de FC negativas se recomienda repetir la técnica con un nuevo suero pasadas otras dos semanas. Si no se dispone de sueros pareados, un título superior a 1/64 es altamente indicativo de infección en pacientes con un síndrome clínico compatible. El tratamiento con tetraciclinas puede dificultar el diagnóstico por FC al retrasar o disminuir la producción de anticuerpos.

6.3.1.2. Microinmunofluorescencia. La microinmunofluorescencia (MIF), también denominada inmunofluorescencia indirecta (IFI) es probablemente la técnica más sensible para el diagnóstico serológico de la psitacosis. Se utilizan antígenos de superficie de *C. psittaci* como moléculas de captura inmovilizados sobre un portaobjetos. El portaobjetos se incuba con el suero del paciente que, en caso de contar con anticuerpos específicos quedarán unidos a las moléculas de captura y posteriormente revelados con un anticuerpo anti-humano conjugado con un marcaje fluorescente. El marcaje se detecta con un microscopio de fluorescencia. El kit comercial Focus

Diagnósticos contiene antígenos para *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Idealmente, la infección se diagnostica por una elevación en cuatro veces el título de anticuerpos IgG del paciente. Si no se cuenta con dos sueros seriados, suele ser suficiente un título superior a 1/16 de IgM o uno superior a 1/32 de IgG con una historia clínica compatible desde el punto de vista epidemiológico. La MIF sigue siendo un método con un gran valor predictivo negativo (98%) y alta sensibilidad para la detección de infecciones por clamidias. Algunos autores han publicado la utilidad de detectar anticuerpos en lágrima como indicio de infección ocular, aunque esta afirmación no ha sido bien contrastada. La MIF también ha sido utilizada con fines de tipación de cepas.

6.3.1.3. Enzimoimmunoensayo. Se han descrito también técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) para detectar anticuerpos frente a *C. psittaci*. Existen técnicas comerciales que detectan anticuerpos de clase IgG aunque no cuentan con gran experiencia en la bibliografía. Estas aproximaciones son menos sensibles que la MIF y la FC aunque son una opción válida para laboratorios pequeños o no especializados.

6.3.2. Diagnóstico directo: cultivo. Aunque sigue siendo esencial para la caracterización biológica y molecular de los aislados clínicos, pocos laboratorios clínicos ofrecen el cultivo como medio de diagnóstico de las infecciones por *C. psittaci*, ya que el cultivo de este microorganismo implica un trabajo arduo y complejo que requiere un laboratorio de bioseguridad de nivel 3. Por ello, el cultivo solo debe realizarse a partir de las muestras patológicas obtenidas de los pacientes en los que se haya demostrado la presencia de estos microorganismos por otros métodos, y generalmente con objeto de realizar estudios epidemiológicos. Además, cuando *C. psittaci* crece en las líneas celulares, debe ser confirmado por inmunofluorescencia y los cultivos negativos deben ser confirmados después de 6 días de cultivo realizando un subcultivo en un medio nuevo.

6.3.2.1. Recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras. Las muestras respiratorias apropiadas incluyen los frotis de exudado faríngeo, esputos, aspirado bronquial y endotraqueal, líquido de lavado broncoalveolar y biopsias de tejido pulmonar. Es importante, para una mejor conservación, que las muestras sean recogidas en un medio de transporte adecuado, como el SPG (siglas del término inglés "*sucrose/phosphate/glutamate*") suplementado con antibióticos y antifúngicos que no afecten a la supervivencia clamidial, tales como la gentamicina o la estreptomina, y la fungizona, respectivamente. Además, las muestras deben mantenerse refrigeradas a 4°C durante el transporte, para tratar de conservar la viabilidad y evitar el crecimiento de bacterias contaminantes que resistan la acción de estos antibióticos.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio y antes de inocular en las líneas celulares, las

muestras serán homogenizadas en el medio de transporte mediante agitación vigorosa. La inoculación en embrión de pollo es el método descrito en 1957 y aunque ofrece buenos resultados éstos son inferiores a los cultivos que se desarrollaron posteriormente. En la actualidad, esta metodología está siendo sustituida por el cultivo en líneas celulares, que proporciona un mejor crecimiento y permite un mejor seguimiento de la evolución de la infección. Las líneas celulares más utilizadas son las células McCoy, células HeLa 229, células L-929, células "African Green Monkey" (Vero), células BHK-21 y células de riñón de "Buffalo Green Monkey" (BGM), siendo estas últimas las más sensibles.

6.3.2.2. Condiciones para la realización del cultivo.

Las diferentes técnicas se diferencian únicamente en los tratamientos físico-químicos que se aplican a las células para favorecer la penetración y el desarrollo de estos microorganismos. Se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que inhiben o retrasan la multiplicación celular (ya que la infección celular debe producirse cuando el cultivo se encuentre en la fase estacionaria) y los que favorecen la penetración de este microorganismo. Para los primeros se han utilizado la adición al medio de cultivo (medio esencial mínimo de Eagle, EMEM) de la cicloheximida, que interfiere la síntesis del ADN de las células eucariotas sin afectar a las clamidias; la citocalasina B, que interfiere la división citoplasmática; la 5-yodo-2-desoxiuridina, que se incorpora al ADN en sustitución de la timidina; la irradiación, los corticoides y diversas sustancias inhibitorias de la mitosis. De todos ellos, el más empleado en la actualidad es el tratamiento con cicloheximida. Entre los procedimientos utilizados para favorecer la penetración de las estas bacterias en la célula hospedadora (proceso lento y de baja frecuencia) se pueden seleccionar la centrifugación, el tratamiento con dietil-aminoetil dextrano (DEAE-D), polimerización hidrosoluble que actúa de puente entre las membranas del microorganismo y de las células eucariotas cargadas negativamente, y el tratamiento con polietilenglicol. En la práctica, se utilizan combinaciones de dos o más de los métodos indicados.

El cultivo de líneas celulares se realiza normalmente en monocapas, sobre frascos de fondo plano y también en placas de microtitulación de 24 ó 96 pocillos, practicándose la infección sobre estas monocapas. Tras una incubación a 37°C durante 3-4 días, las muestras deben ser fijadas en metanol o en acetona para la confirmación de la presencia de *C. psittaci* mediante la tinción de MayGrünwald-Giemsa o mediante inmunofluorescencia, respectivamente, al objeto de demostrar la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas (ver figura 3). En este segundo supuesto resulta posible la identificación de la serovariedad mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos, o también la titulación del número de unidades formadoras de inclusiones (UFI).

6.3.3. Diagnóstico directo no basado en cultivo.

6.3.3.1. Microscopía mediante tinción. Se basa en la preparación de extensiones a partir de material de exudados y secreciones procedentes de órganos o tejidos afectados, aplicándose las tinciones específicas para *Chlamydia* spp. Un primer grupo incluye los métodos basados en la técnica modificada de Ziehl-Neelsen, como los de Stamp (figura 3), Macchiavello o Giménez, los cuales utilizan como colorante principal la fucsina fenicada y como colorante de contraste el verde malaquita o el azul de metileno, realizándose la decoloración con un ácido débil diluido (ácido acético o cítrico). Los microorganismos se observan microscópicamente en forma de agrupaciones de estructuras cocoides de color rojo, sobre un fondo verde o azul, según el colorante de contraste empleado. Con este tipo de tinciones es necesario efectuar el diagnóstico diferencial con respecto a *Brucella* spp. o *Coxiella* spp., ya que estas bacterias también presentan ácido-resistencia. La diferenciación con *Coxiella* spp. es más difícil ya que poseen un tamaño muy pequeño, semejante al de *Chlamydia* spp. Además, en este último caso se complica el problema al haberse descrito infecciones mixtas producidas por ambas bacterias, lo que obliga a recurrir al empleo de otras técnicas.

Otra tinción es la de May Grünwald-Giemsa (figura 3) que, a pesar de no ser específica de *Chlamydia* spp., cuenta con la ventaja de proporcionar más información sobre la morfología de la inclusión y la composición y procedencia de las células del frotis. Las bacterias sólo pueden ser observadas cuando aparecen en el interior de las inclusiones, no en localización extracelular. La inclusión se observa más o menos densa dentro de la célula, con una coloración intensamente basófila sobre un citoplasma acidófilo.

Todos estos métodos adolecen del inconveniente de su baja sensibilidad, lo que determina un gran porcentaje de falsos negativos cuando la concentración del microorganismo en la muestra es escasa. Sí que resultan útiles, sin embargo, ante una tinción positiva, al permitir emitir un diagnóstico presuntivo, que deberá confirmarse mediante el aislamiento o la aplicación de técnicas moleculares.

6.3.3.2. Técnicas de detección de antígenos. Se basan en la utilización de anticuerpos específicos para la detección de los antígenos de *C. psittaci* a partir de órganos, tejidos o exudados. La reacción inmunológica se revela mediante la utilización de compuestos fluorescentes o mediante una enzima y su sustrato. La inmunofluorescencia directa (IFD) (figura 3), muy utilizada para el diagnóstico de este tipo de infecciones, es una técnica más sensible que los métodos de bacteroscopia tras tinciones específicas, o los empleados para el aislamiento y cultivo. Inicialmente, se utilizaban anticuerpos frente al LPS clamidial, con especificidad de género, pero la técnica se ha mejorado al introducir anticuerpos monoclonales, que en la actualidad permiten la diferenciación entre las diferentes serovariedades, si bien, no están disponibles comercialmente. La

técnica de inmunocaptura es una variante de las técnicas ELISA utilizadas en serología, en las que las placas se tapizan con anticuerpos policlonales o monoclonales frente a *C. psittaci*. Existen métodos comerciales desarrollados para el diagnóstico de *C. trachomatis* en humanos, que emplean anticuerpos monoclonales frente al LPS, por lo que al ser esta molécula específica de la familia *Chlamydiaceae*, también puede recurrirse a ellos para la detección de *C. psittaci* en muestras patológicas, con resultados muy aceptables en comparación con el aislamiento y la IF. Las técnicas inmunohistoquímicas (figura 3) se aplican normalmente sobre órganos o tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, utilizando anticuerpos secundarios conjugados con enzimas, como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, añadiendo posteriormente el sustrato adecuado que, al entrar en contacto con la enzima, precipita y colorea el área donde se localiza el antígeno.

6.3.4. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). Se han utilizado distintas aproximaciones basadas en PCR especialmente en la caracterización de brotes epidémicos. Se han publicado ensayos de TETR-PCR (*touchdown enzyme time release*) que amplifican regiones del gen 16S y los espaciadores 16S-23S ADNr para detectar de forma sensible y específica las diferentes especies del género *Chlamydia*. Se ha descrito también un ensayo de PCR a tiempo real, que amplifica el gen *ompA* de *C. psittaci* a partir de muestra respiratoria con buenos resultados para el diagnóstico rápido de psitacosis. Las técnicas de PCR han demostrado ser positivas rápidamente (al tercer día de inicio de los síntomas) mientras que el diagnóstico serológico podría retrasarse hasta 14 días. Sin embargo ninguna de las TAAN están disponibles comercialmente. También se ha conseguido amplificar ADN de *C. psittaci* a partir de muestras extrarrespiratorias como sangre y orina. Recientemente se ha publicado un método de detección de *C. psittaci* por PCR a tiempo real del gen *envB* utilizando SYBR-Green. El método es rápido y sensible aunque sólo se ha utilizado para detectar el microorganismo en muestras de heces de aves. Por otra parte su especificidad es relativa, ya que también detectaría otras especies del género.

6.4. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR NUEVAS *Chlamydiae*

Se han desarrollado TAANs no comerciales con fines epidemiológicos y diagnósticos de las infecciones por *P. acanthamoebae* y *S. negevensis*. Las técnicas de PCR desarrolladas están basadas mayoritariamente en el operón ribosómico tanto 16S ADNr como 23S ADNr, aunque también se han descrito otras dianas como el gen *tlc*, que codifica para la translocasa presente solo en *Chlamydiales* y *Rickettsiales*. Los primeros protocolos publicados eran realmente PCR "pan-clamidia" ya que el objetivo era amplificar el 16S ADNr de cualquier clamidia no caracterizada, por lo que solamente con posterior secuenciación del producto amplificado se podría identificar esas nuevas clamidias.

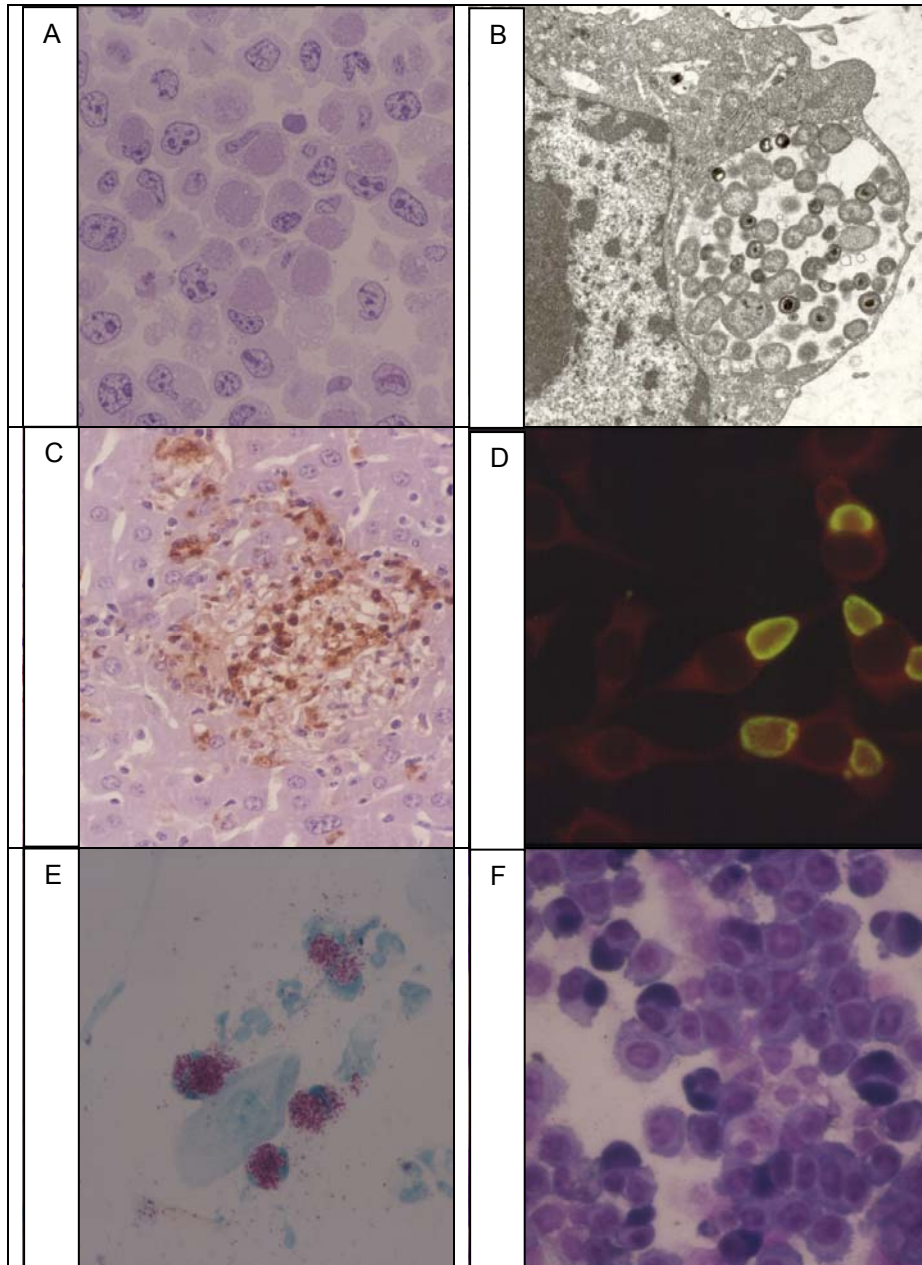


Figura 3. Detección de *Chlamydia psittaci* por diferentes métodos de diagnóstico. A) Corte semifino de células McCoy infectadas por *C. psittaci*, teñido con azul de toluina, donde se observan las inclusiones intracitoplasmáticas. B) Electronografía mostrando una inclusión clamidial. C) Técnica inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico donde se muestra un foco de infección por *Chlamydia* spp. en hígado. D) Inmunofluorescencia indirecta que muestra inclusiones intracitoplasmáticas de *C. psittaci*. E) Tinción de Stamp mostrando *C. psittaci* en un frotis conjuntival de un loro, donde se observan a los microorganismos tanto intracelularmente en inclusiones como extracelularmente, con una tonalidad rojiza. F) Tinción de May Grünwald-Giemsa donde se muestran las inclusiones de *Chlamydia* spp., muy basófilas, en el interior del citoplasma de células HeLa 229, perteneciente a un control de aislamiento del microorganismo a partir de una muestra patológica.

Esta aproximación tenía la ventaja de poder identificar cualquier organismo, pero perdía sensibilidad y especificidad. Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de PCR en tiempo real basada en el 16S ADNr para identificar específicamente miembros de las familias *Parachlamydiaceae* y *Simkaniaceae*, aumentando su

especificidad y sensibilidad. También se han desarrollado técnicas de EIA no comerciales específicamente para el diagnóstico de *S. negavensis*, aunque presentan reacción cruzada con *C. pneumoniae*. Asimismo, técnicas de microinmunofluorescencia desarrolladas para *C. pneumoniae* se han empleado para *P.*

acanthamoebae, con resultado positivo. Estas bacterias se han podido cultivar en las mismas líneas celulares, como Vero, que se han empleado para otras clamidias.

7. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR MIEMBROS DE LA FAMILIA *Chlamydiaceae*

En el tracoma activo el tratamiento de elección es tetraciclina en pomada 2 veces al día durante 6 semanas, aunque es más recomendable la terapia con macrólidos por vía oral, especialmente azitromicina (20 mg/kg) ya que en niños (el grupo más afectado por esta infección) está contraindicado el tratamiento con tetraciclinas. En las infecciones por los serovares relacionados con infección genitourinaria, el tratamiento recomendado es doxicilina cada 12 h durante 7 días o azitromicina 1g por vía oral en una única dosis que es el tratamiento de elección en mujeres embarazadas, en quienes está recomendado un test de TAAN 3 semanas después de completar el tratamiento. Las tasas de eficacia del tratamiento oscilan entre 97-98%. Si existe o se sospecha una complicación como epididimitis o enfermedad inflamatoria pélvica el tratamiento debe prolongarse entre 10-14 días y puede incluir ceftriaxona intramuscular como tratamiento empírico frente a *N. gonorrhoeae*. En el caso de los biovares relacionados con LGV el tratamiento con doxicilina se prolonga durante 21 días o azitromicina semanalmente durante 3 semanas. También se pueden emplear las quinolonas frente a *C. trachomatis* excepto ciprofloxacino.

C. pneumoniae es sensible a las tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. El macrólido más activo frente a *C. pneumoniae* es claritromicina, mientras que levofloxacino es la fluoroquinolona más activa. Diferentes ensayos clínicos han revelado que el tratamiento con macrólidos o fluoroquinolonas tienen un éxito de erradicación de *C. pneumoniae* entre el 70-85% en pacientes con neumonía. El tratamiento convencional es de 10-14 días, excepto en regímenes con azitromicina que son solamente 5 días. En casos de complicaciones como artritis reactiva por *C. pneumoniae* o *C. trachomatis*, recientes ensayos clínicos revelan que es significativamente más eficiente la terapia combinada de doxicilina más rifampicina, o azitromicina más rifampicina, durante 6 meses.

La psitacosis no tratada raramente es mortal. Las tetraciclinas constituyen el tratamiento de elección para la psitacosis (tetraciclina, 500 mg cada 6 horas, o doxicilina 100 mg cada 12 horas por vía oral durante 10-21 días). La doxicilina puede administrarse por vía intravenosa (4,4 mg/kg de peso dividido en dos dosis diarias) en los casos más graves. También se ha utilizado con éxito la minociclina. Alternativamente, los macrólidos (eritromicina, 500 mg cada 6 horas o la azitromicina, en dosis total de 1,5 g administrada durante 3-5 días) han demostrado ser un tratamiento eficaz en casos en los que se desaconseja el tratamiento con

tetraciclinas. Existe alguna experiencia de tratamiento con cloramfenicol y con rifampicina, aunque la posibilidad de recidivas parece considerable. El tratamiento con ofloxacino podría ser otra opción válida aunque no existe una gran experiencia al respecto.

Aunque los antibióticos beta-lactámicos, no deben tener efecto sobre las clamidias, parece que los beta-lactámicos reducen mucho la infectividad, porque inhiben la maduración del cuerpo reticular (CR).

7.1. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La variabilidad inter-cepa en la sensibilidad a antimicrobianos y la adquisición de resistencias son fenómenos muy infrecuentes en el género *Chlamydia*. Estos hechos, junto con la dificultad de cultivo del microorganismo hacen que las técnicas de evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos se realicen, casi exclusivamente, en laboratorios de referencia muy especializados y que los datos obtenidos tengan una escasa utilidad en la práctica clínica.

No existe una técnica estandarizada pero, en general, los microorganismos se cultivan en medio libre de antibiótico previamente al ensayo de sensibilidad. Se utiliza un inóculo ajustado de 100 unidades formadoras de cuerpos de inclusión para infectar monocapas celulares. Posteriormente, se añaden diluciones seriadas del antibiótico en evaluación, bien inmediatamente o a distintos tiempos de incubación durante las primeras 24 horas. Después de 48 horas, se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína para identificar la mayor dilución del antimicrobiano que inhibe la formación de cuerpos de inclusión (CMI). Las monocapas pueden ser sometidas a nuevos pases en medio sin antibiótico para estudiar la máxima dilución que inhibe la viabilidad de los microorganismos (CMB). Se define la CMI como la concentración de antibiótico más baja que inhibe completamente la formación de placa partiendo de 10^5 partículas infectivas.

Se ha descrito resistencia a tetraciclinas por la presencia del gen *tet(C)* y aunque no se han descrito mecanismos de resistencia a azitromicina en aislados clínicos, el bajo número de *rrn* (operón que codifica para 16 y 23S ADNr) en chlamydia (2 en *C. trachomatis* y 1 en *C. pneumoniae* o *C. psittaci*), permite suponer una gran facilidad para desarrollar resistencia por mutaciones puntuales en los genes *rrn*. Esta sospecha teórica junto con el incremento de fracaso terapéutico de azitromicina frente a *N. gonorrhoeae* o *Mycoplasma genitalium*, está cuestionando el uso generalizado de azitromicina para el tratamiento de infecciones por *Chlamydia* spp.

8. TIPACIÓN MOLECULAR EN *Chlamydiae*

Las técnicas de tipación permiten la comparación de cepas, información de gran importancia en la caracterización de brotes o en el estudio de nodos

de transmisión. En el caso de *C. psittaci*, sería posible, por ejemplo, relacionar focos potenciales de infección en determinadas aves con las cepas de pacientes afectados, en el caso de *C. trachomatis*, puede ser importante en los casos de identificar redes de transmisión sexual.

La disponibilidad de genomas completos secuenciados de miembros pertenecientes al orden *Chlamydiales*, permite definir un genoma core común a todos los miembros conocidos, que llega a ser de más del 90% entre miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Este alto grado de similitud entre las diferentes especies de clamidias, está relacionado con su ciclo biológico que dificulta la posibilidad de intercambio genético con otras especies, pero también sugiere que la tasa de variabilidad genética es baja y basada fundamentalmente en mutaciones puntuales, más que en eventos de recombinación. Esto supone una dificultad añadida a la hora de diseñar esquemas de tipación dentro de la familia *Chlamydiaceae*. La elección de genes únicos como potencial diana para obtener genotipados de alta resolución han fracasado. En este escenario, obviamente la mejor opción, pero poco realista actualmente, sería la secuenciación de genomas completos. En 2008 se han descrito dos sistemas de tipificación alternativos que aportan un alto poder de resolución: VNTR (*variable number of tandem repeats*) y MLST (*multilocus sequence typing*). El sistema VNTR son secuencias repetidas de una misma secuencia nucleotídica en las regiones genómicas CT1335, CT1299 y CT1291 y variaciones en el número de repeticiones dan lugar a diferente longitud del segmento genómico, lo que permite diferenciar cepas. El poder discriminativo de esta técnica aumenta al secuenciar también el gen *ompA* denominado MLVA (Multi locus-VNTR-ompA). Esta estrategia ofrece el mayor grado de discriminación. Por MLVA se ha alcanzado gran poder de discriminación en cepas estudiadas de distintos serotipos de *C. psittaci* y *C. trachomatis* de diferentes orígenes geográficos.

Existen dos propuestas para realizar MLST en *Chlamydia*. El sistema MLST7, se basa en la secuenciación de 7 genes: *gatA*, *oppA*, *hflX*, *gidA*, *enoA*, *hemN* y *fumC* y el sistema MLST5 basado en los genes: *hctB*, CT058, CT144, CT172 y *pppB*. Curiosamente el sistema MLST5 ofrece mejor poder discriminativo que MLST7. Por ello, el subcomité sobre la taxonomía de las clamidias sugiere en su reunión de 2009 que al menos se deberían usar 5 genes *housekeeping* y que los criterios de distancia genética deberían compararse con análisis filogenéticos, cuando exista un número suficientemente alto de secuencias conocidas. La caracterización de cepas de *C. psittaci* por MLST ha demostrado su utilidad para la clasificación de genotipos de acuerdo a la especie del huésped. Sin embargo esta estrategia tiene escaso poder de discriminación en cepas de *C. pneumoniae*.

Recientemente se ha publicado un estudio basado en la amplificación de una región variable de *ompA* con un sistema de PCR a tiempo real, seguido de un

análisis del amplicón por *high resolution melting* (HRM). El sistema, sencillo y rápido, demostró su eficiencia en la detección y tipación de *C. psittaci* y *C. trachomatis*. Una particularidad ha supuesto la caracterización molecular de los aislados de LGV. Schaeffer y cols., describieron cómo la PCR y secuenciación de *pmpH* y *ompA* ofrecía un excelente poder discriminativo, pero sólo para cepas de los genotipos L1-L3 de LGV (ver PNT-DC-01 de este procedimiento).

9. IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA

9.1. IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA DE LAS INFECCIONES POR *Chlamydia trachomatis*

Las infecciones sexuales por *C. trachomatis*, constituyen las infecciones más frecuentes de transmisión sexual, siendo el grupo poblacional de mujeres entre 15-24 años el más afectado. En la mayoría de los casos son mujeres asintomáticas lo que facilita la transmisión y el mantenimiento en la población. Para controlar la alta tasa de infecciones por *C. trachomatis* se han instaurado cribados sistemáticos en la población sexualmente activa. Por otra parte desde el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), la red de vigilancia para el control de infecciones de transmisión sexual presta especial atención a las producidas por *C. trachomatis*. En España, el sistema de vigilancia de las infecciones por *C. trachomatis* se realiza a través de los centros centinelas y no obliga a la declaración de casos, por lo que es posible que exista una subestimación de los casos reales de *C. trachomatis* procedentes de nuestro entorno.

Sin embargo, el mayor problema actual son los casos de LGV que se están describiendo en toda Europa, incluido España. Los casos de LGV en Europa se han considerado tradicionalmente casos importados desde regiones tropicales, pero desde el 2003, se han descrito en población autóctona, desde Portugal a Finlandia, brotes de LGV biovar L2b. El grupo poblacional de individuos afectados son HSH. Ante un diagnóstico de LGV debe de investigarse la presencia de VIH y VHC ya que entre el 76-96% de los pacientes diagnosticados de LGV estaban también infectados por el VIH. Estos datos sugieren que los biovars de LGV pueden facilitar la transmisión de VIH y VHC. La desproporcionada y preocupante asociación entre el VIH y el LGV en personas homosexuales requiere una urgente reevaluación de lo que se está haciendo para controlar la epidemia.

9.2. IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA DE LAS INFECCIONES POR *Chlamydia psittaci*

El impacto de las infecciones por *C. psittaci* en los humanos es difícil de determinar. En numerosos países, aunque no en España, la psitacosis/ornitosis es una enfermedad de declaración obligatoria en las primeras 48 horas tras su diagnóstico. Sin embargo, los datos proporcionados representan una gran subestimación de los casos reales de infección humana, no solo por la dificultad del diagnóstico y por el habitual tratamiento común aplicado a las

neumonías atípicas, sino también porque no todas las infecciones cursan con neumonía, y por tanto no son comunicadas.

Hasta la fecha no existen vacunas comercializadas para su empleo en las aves, por lo que el control se basa en estrategias de reducción del riesgo de contagio a los humanos, incluyendo el tratamiento con antibióticos de los animales sospechosos. Hasta hace poco, las normativas europeas 2000/666/EC y 2005/760/EC, que estaban especialmente destinadas al control de la enfermedad de Newcastle y a la gripe aviar, incidían en el control de la psitacosis al controlar la importación de aves de terceros países.

Sin embargo, la normativa EC 318/2007

(<http://www.boe.es/doue/2007/084/L00007-00029.pdf>),

que deroga las anteriores, regula la importación de aves de terceros países a la Unión Europea, y en ella se incluye específicamente el control de *C. psittaci* en las aves, al objeto de evitar el contagio a los humanos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía general

1. Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, Read TD, Bavoil PM, Sachse K, Kahane S, Friedman MG, Rattei T, Myers GS, Horn M. Unity in variety—the pan-genome of the *Chlamydiae*. *Mol Biol Evol*. 2011; 28:3253-3270.
2. Everett, KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*, 1999; 49 (Pt 2): pp. 415-440.
3. Greub G. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the *Chlamydiae*: minutes of the closed meeting, 21 June 2010, Hof bei Salzburg, Austria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010; 60(Pt 11):2694.
4. Kuo CC, et al. Genus I. *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns 1945, 55^{AL}, in Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, N.R.e.a. Krieg, Editor. 2011, Springer: New York. pp. 846-865.
5. Nguyen BD, Cunningham D, Liang X, Chen X, Toone EJ, Raetz CR, Zhou P, Valdivia RH. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:10284-10289.

Chlamydia trachomatis

1. Baraitser P, Alexander S, Sheringham J. *Chlamydia trachomatis* screening in young women. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011; 23:315-320.
2. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:160-184.
3. Darville T, Hiltke TJ. Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis*. 2010; 201 (Suppl 2):S114-125.
4. Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, Borrego MJ, Florindo C, Dean D. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination

- and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol*. 2006; 188:275-286.
5. Heras E, Llibre JM, Martró E, Casabona J, Martín R, Sirera G. Lymphogranuloma venereum proctocolitis in men with HIV-1 infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29:124-126.
6. Liu X, Afrane M, Clemmer DE, Zhong G, Nelson DE. Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics. *J Bacteriol*. 2010; 192:2852-2860.
7. Mukherjee A, Sood S, Bala M, Satpathy G, Mahajan N, Kapil A, Sharma VK. The role of a commercial enzyme immuno assay antigen detection system for diagnosis of *C. trachomatis* in genital swab samples. *Indian J Med Microbiol*. 2011; 29:411-413.
8. Quint KD, Bom RJ, Bruisten SM, van Doorn LJ, Nassir Hajipour N, Melchers WJ, de Vries HJ, Morre SA, Quint WG. Comparison of three genotyping methods to identify *Chlamydia trachomatis* genotypes in positive men and women. *Mol Cell Probes*. 2010; 24:266-270.
9. She RC, Welch R, Wilson AR, Davis D, Litwin CM. Correlation of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. IgG and IgM antibodies by microimmunofluorescence with antigen detection methods. *J Clin Lab Anal*. 2011; 25:305-308.
10. Solomon AW, Peeling RW, Foster A, Mabey DC. Diagnosis and assessment of trachoma. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17:982-1011.
11. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24:62-69.

Chlamydia pneumoniae

1. Bessède E, Renaudin H, Clerc M, de Barbeyrac B, Bébéar C, Pereyre S. Evaluation of the combination of the NucliSENS easyMAG and the EasyQ applications for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory tract specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29:187-190.
2. Burillo A, Bouza E. *Chlamydophila pneumoniae*. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24:61-71.
3. Hammerschlag MR, Kohlhoff SA. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practices of infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. pp. 2467-2475.
4. Hvidsten D, Halvorsen DS, Berdal BP, Gutteberg TJ. *Chlamydophila pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:42-49.
5. Kerdsin A, Uchida R, Verathamjamrus C, Puangpatra P, Kawakami K, Puntanakul P, et al. Development of triplex SYBR green real-time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Legionella* spp. without extraction of DNA. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63:173-180.
6. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2007;44:568-576.
7. Rizzo A, Domenico MD, Carratelli CR, Paolillo R. The role of *Chlamydia* and *Chlamydophila* infections in reactive arthritis. *Intern Med*. 2012; 51:113-117.
8. She RC, Thurber A, Hymas WC, Stevenson J, Langer J, Litwin CM, et al. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3380-3382.

9. Villegas E, Sorlózano A, Camacho A, Gutiérrez J. *Chlamydomydia pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:629-637.
10. Villegas E, Sorlózano A, Gutiérrez J. Serological diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection: limitations and perspectives. *J Med Microbiol*. 2010;59:1267-1274.

Chlamydia psittaci

1. Anónimo. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2000. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, 2000; 49:3-17.
2. Ausina Ruiz V, ed. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006, Editorial Médica Panamericana. Madrid.
3. Gaede W, Reckling KF, Dresenkamp B, Kenkies S, Schubert E, Noack U, et al. *Chlamydomydia psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses Public Health*, 2008; 55: 184-188.
4. García LS, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd. ed. 2010, ASM Press: Washington DC.
5. Harkinezhad T, Geens T, Vanrompay D. *Chlamydomydia psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol*, 2009; 135: 68-77.
6. Hatch, TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacterio*, 1996; 178:1-5.
7. Hinton DG, Shipley A, Galvin JW, Harkin JT, Brunton RA. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust Vet J* 1993. 70:174.
8. Petrovay F, Balla E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydomydia psittaci*. *J Med Microbiol*, 2008; 57:1296-1298.
9. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol*. 2009; 135:2-21.
10. Stewardson AJ, Grayson ML, Psittacosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24:7-25.
11. Versalovic J., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. 2011, ASM Press: Washington DC, USA.
12. Voigt A, Schöfl G, Saluz HP. The *Chlamydomydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS One* 2012; 7:e35097.

Especies bacterianas próximas a *Chlamydia* spp.

1. Corsaro D, Greub G. Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:283-297.
2. Lienard J, Croxatto A, Aeby S, Jaton K, Posfay-Barbe K, Gervaix A, Greub G. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:2637-2642.

Epidemiología molecular

1. Carter MW, Harrison TG, Shuja Shafi M, George RC. Typing strains of *Chlamydomydia pneumoniae* by amplified fragment length polymorphism typing. *Clin Microbiol Infect*. 1998; 4:663-664.
2. Ikryannikova LN, Shkarupeta MM, Shitikov EA, Il'ina EN, Govorun VM. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital *Chlamydomydia trachomatis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59:188-196.
3. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DS, Jolley KA, Keijzers WC, Vretou E, ET AL. Multi-locus sequence typing of *Chlamydomydia* reveals an association between *Chlamydomydia psittaci* genotypes and host species. *PLoS One*. 2010; 5:e14179.
4. Pedersen LN, Herrmann B, Møller JK. Typing *Chlamydomydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 55:120-130.
5. Rupp J, Solbach W, Gieffers J. Single-nucleotide-polymorphism-specific PCR for quantification and discrimination of *Chlamydomydia pneumoniae* genotypes by use of a "locked" nucleic acid. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:3785-3787.

PNT-DC-01
DETECCIÓN MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis* GENOTIPO *linfogranuloma venéreo*
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>Chlamydia trachomatis</i> genotipo <i>linfogranuloma venéreo</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-DC-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la detección de ADN de los serovares L1, L2 y L3 de *Chlamydia trachomatis* causantes del linfogranuloma venéreo (LGV) en muestras genitourinarias, rectales o faríngeas mediante amplificación de ácidos nucleicos por PCR en tiempo real.

2. FUNDAMENTO

El LGV es una enfermedad de transmisión sexual causada por los genotipos L1, L2 y L3 de *C. trachomatis*. Es una enfermedad endémica en África, Latinoamérica y Asia. Los casos detectados en Europa se consideraban casos importados, pero desde 2003 se ha distribuido un brote de LGV por Europa, Estados Unidos y Australia. Los métodos comerciales de diagnóstico molecular de *C. trachomatis*, no diferencian el LGV de otros serovares de *C. trachomatis* de transmisión sexual (serovares D-K). Es necesario por tanto, el desarrollo de estrategias que permitan el genotipado de *C. trachomatis*, no solo con fines epidemiológicos, sino también por su interés desde el punto de vista de la duración de tratamiento antimicrobiano.

Las diferentes serovariedades de *C. trachomatis* descritas se han basado en una diferente respuesta serológica frente a la proteína de membrana externa MOMP. Sin embargo, no existe correlación entre cuadro clínico y serovariante. Por lo tanto la mejor y mas rápida estrategia para el genotipado de *C. trachomatis* son las técnicas moleculares, basadas en la amplificación de genes que guarden un alto grado de correlación con la patogénesis. Los genes mas comúnmente empleados son los genes *pmp*. La deleción interna de 36 pb del gen *pmpH* se ha empleado como marcador molecular específico de los patotipos L1, L2 y L3 del LGV.

El procedimiento propuesto es una PCR en tiempo real usando sondas TaqMan, siguiendo el protocolo propuesto por Morré y cols. en 2005 y posteriormente revisado por Schaeffer y cols. en 2008.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador), Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá ML. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 10, 1ª edición. SEIMC 2000.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Las muestras adecuadas son exudados uretrales, cervicales, faríngeos o rectales tomados con torundas de dacron. Las condiciones para la recogida y el transporte deben contemplar:

- Respetar las normas descritas en el procedimiento de recogida y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología.
- En el caso de muestras recogidas con torunda, garantizar la recogida suficiente de células epiteliales. Una vez tomada la muestra introducir la torunda en un medio de transporte adecuado.
- Identificar correctamente el tubo (código empleado) y los tubos que se deriven de los procesos subsiguientes: extracción de ácidos nucleicos y PCR.
- Si no se puede procesar inmediatamente, se recomienda no prolongar la conservación a 4°C más de 24 horas. En caso necesario conservar las muestras a -70°C para periodos más prolongados.
- El material genético una vez extraído debe procesarse. En caso contrario se puede conservar a temperatura de -20°C.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

a) Sistema de extracción de ácidos nucleicos (automática o manual).

b) Master mix: TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems).

c) Control interno de amplificación: se amplificará mediante sonda Taqman específica un fragmento del gen que codifica para la proteína GAPDH de origen humano.

Primer F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'

Primer R: 5'-ATGGGATTTCCATTGATGAC AAG-3'

Sonda: FAM-5'-TGGCACCGTCAAGGCTGA GAACG-3' TAMRA

(Adaptado de Schaeffer y col. 2008)

d) Reactivos específicos para amplificar el gen *pmpH* de LGV: las secuencias de primers y sonda específicos para los genotipos L1-L2-L3 de *C. trachomatis* estan basados en la deleción interna de 36 bp y proceden de la publicación de Schaeffer y cols. en 2008.

Primer F: 5'-CTGTGCCAACCTCATCAT CAA-3'

Primer R: 5'AGACCCTTTCCGAGCATCACT-3'

Sonda: FAM-5'-CCGCCTGCTCCAACAGTT AGTGATG- 3'-TAMRA

6. APARATOS Y MATERIAL

- Agitador orbital tipo vórtex.
- Termociclador: la técnica está validada para el sistema ABI 7500 Fast de Applied Biosystems. En caso necesario se puede adaptar a otros sistemas teniendo en cuenta las modificaciones oportunas en el marcaje de las sondas adaptándolas a los sistemas ópticos de cada termociclador.
- Cabina de seguridad.
- Pipetas automáticas de volumen variable.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección molecular de <i>Chlamydia trachomatis</i> genotipo <i>linfogranuloma venéreo</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-DC-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- Tubos de plástico de fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- Puntas con filtro de diferentes calibres.
- MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction plates.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

El procesamiento de las muestras se hará en campana de bioseguridad.

Las muestras tomadas en torunda se homogeneizarán utilizando un vortex en 1-2 ml de medio de transporte.

La extracción de ácidos nucleicos se realizará a partir de alícuotas de 500 µL del medio de transporte, según se indique en el procedimiento habitual de trabajo del laboratorio correspondiente. Se puede emplear como sistema de extracción automática el EasyMag de BioMérieux y como sistema manual el Quiamp Mini kit de Quiagen. Pueden ser igualmente eficientes otros sistemas de extracción manual y automática y cada laboratorio puede utilizarlos según su conveniencia.

7.2. AMPLIFICACIÓN

La reacción se hace en un volumen final de 25 µL, con 12,5 µL de TaqMan Fast Universal PCR Master MIX (2x), 0,15 µM de cada primer, 0,1 µM de la sonda (tanto para la reacción de genotipado como para el control), y 5 µL de ADN extraído de la muestra.

El protocolo de amplificación es de 2 minutos a 50°C, 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (programar la lectura del termociclador en este paso).

Controles:

- Además de una reacción del control de extracción y amplificación por muestra, incluir en cada tanda un control negativo de la master mix añadiendo 5 µL de agua en lugar de muestra y un control positivo que garantice la calidad óptima de los reactivos y del material genético eluido.
- Al estar marcadas las sondas del control interno y de la diana de amplificación con la misma sonda FAM, no se pueden emplear en un mismo tubo de amplificación.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresarán en términos cualitativos de positivo o negativo.

Si no amplifica ni la diana ni el control, la reacción no es válida y se debe repetir el procedimiento.

La amplificación del control negativo indicaría una contaminación. Esta circunstancia invalida el resultado obtenido. Repetir el procedimiento desde la extracción del material genético.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio o Unidad de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio o Unidad de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el Laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La sensibilidad de la técnica depende en gran medida de una correcta toma de muestra y de una buena extracción de ácidos nucleicos.
- Al no tratarse de una técnica comercial aprobada para diagnóstico *in vitro*, este procedimiento debe ser validado y sometido a los controles adecuados en cada Laboratorio de Microbiología. Los resultados obtenidos deben ser interpretados junto con la información clínica del paciente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Chen CY, Chi KH, Alexander S, Martin IM, Liu H, Ison CA, Ballard RC. The molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction test using rectal and urethral specimens. *Sex Transm Dis.* 2007; 34:451-455.
2. Chen CY, Chi KH, Alexander S, Ison CA, Ballard RC. A real-time quadriplex PCR assay for the diagnosis of rectal lymphogranuloma venereum and non-lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* infections. *Sex Transm Infect.* 2008;84:273-276.
3. Jalal H, Stephen H, Alexander S, Carne C, Sonnex C. Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:2649-2653.
4. Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA, Peña AS. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1311-1312.
5. Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the lymphogranuloma venereum associated L-serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:56.

PNT-DC-02
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA NEUMONÍA POR *Chlamydia pneumoniae*
MEDIANTE MICROINMUNOFLUORESCENCIA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Chlamydia pneumoniae</i> mediante microinmunofluorescencia	PNT-DC-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de anticuerpos frente a *Chlamydia pneumoniae* mediante la técnica de referencia de microinmunofluorescencia.

2. FUNDAMENTO

C. pneumoniae es un patógeno respiratorio causante de hasta el 10% de las neumonías adquiridas en la comunidad y 5% de bronquitis y faringitis. Es una bacteria intracelular de difícil cultivo, por lo que éste no se recomienda como método de diagnóstico clínico. La microinmunofluorescencia es el método de referencia para el diagnóstico de las infecciones por *C. pneumoniae*. Los anticuerpos específicos presentes en el suero a estudiar reaccionan con los antígenos de *C. pneumoniae* (cuerpos elementales purificados) fijados en un portaobjetos. Tras un lavado se eliminan todos los anticuerpos que no se han unido y en un segundo paso se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana conjugados con isotiocianato de fluoresceína que formarán un complejo con los anticuerpos que hayan quedado fijados en los pocillos. Al examinar las preparaciones al microscopio de fluorescencia, los pocillos en los que se observe el patrón típico de fluorescencia indicarán presencia de anticuerpos específicos de *C. pneumoniae* en la muestra.

Para poder interpretar los resultados de la serología mediante inmunofluorescencia es importante conocer la cinética de la respuesta inmunológica.

Infección primaria: la IgM se detecta entre las 2-3 semanas tras la aparición de los síntomas, hasta 2-6 meses después. La IgG puede tardar en alcanzar títulos elevados hasta 6-8 semanas tras el comienzo de la enfermedad.

Reinfección: la presencia de IgM es variable. La concentración de IgG se eleva en suero con mayor rapidez que en la infección primaria y en 1-2 semanas puede alcanzar títulos elevados.

Infección crónica: no hay ningún marcador serológico que se pueda asociar inequívocamente con infección crónica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador), Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá ML. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 10, 1ª edición. SEIMC 2000. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Ficha técnica de *Chlamydia pneumoniae* IFA IgG e IgM® (Laboratorios Vircell, Santa Fe, Granada).

4. MUESTRAS

La muestra de elección para el diagnóstico serológico de la infección por *C. pneumoniae* es el suero. Para su obtención se recomienda realizar venopunción guardando las medidas generales de asepsia, utilizando jeringa estéril o dispositivo para tubo primario con vacío (ej. vacutainer™). Es recomendable utilizar un tubo seco para obtener suero por centrifugación después de formado el coágulo. Tratará de evitarse la utilización de tubos con anticoagulante (obteniéndose así plasma) con el fin de evitar posibles interferencias. La sangre debe extraerse en condiciones asépticas para evitar contaminación de la muestra. Las recomendaciones son las generales para cualquier suero que se envíe al laboratorio para su estudio. La sangre debe llegar al laboratorio en el mínimo tiempo posible (máximo 2-3 horas), donde será centrifugada, separada y conservada en refrigeración. Se puede mantener el suero refrigerado a 4°C hasta 72 horas. Si el ensayo no se va a realizar antes de ese tiempo hay que congelar la muestra a -20°C. Si la muestra se quiere conservar largos periodos de tiempo, se recomienda su congelación a -80°C. Hay que evitar congelaciones y descongelaciones sucesivas.

Para determinación de IgG se recomienda analizar sueros pareados obtenidos con 4-8 semanas de diferencia.

La centrifugación del tubo de sangre se realiza a 1000-1500 g durante 10 minutos. No utilizar sueros hiperlipémicos o contaminados.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. DESCRIPCIÓN

a) *Chlamydia pneumoniae* IFA IgG, REF: PCHPNG (Vircell):

- Vircell Anti-human IgG FITC conjugate: solución de globulina anti-IgG humana marcada con fluoresceína
- Vircell *Chlamydia* IgG Positive control: suero control positivo
- Vircell *Chlamydia* Negative control: suero control negativo

b) *Chlamydia pneumoniae* IFA IgM, REF PCHPNM (Vircell):

- Vircell Anti-human IgM FITC conjugate: solución de globulina anti-IgM humana marcada con fluoresceína
- Vircell Anti-human IgG globulin (sorbent): sorbente, suero de cabra anti-IgG humana.
- Vircell *Chlamydia* IgM Positive control: suero control positivo.
- Vircell *Chlamydia* Negative control: suero control negativo.

c) Reactivos comunes:

- Vircell *Chlamydia* slide (REF: SCHPN): portaobjetos de 30 pocillos cada uno con 10 pocillos para cada especie: *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci*.
- Vircell PBS: Tampón fosfato salino pH 7,2.
- Medio de montaje: glicerol tamponado.
- Agua destilada.

5.2. PREPARACIÓN

PBS: Agregar el contenido del vial Vircell PBS a 1L de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución. Alternativamente puede usarse PBS pH 7,2 de cualquier otra marca.

El resto de los reactivos y productos vienen listos para su uso.

5.3. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar entre 2-8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

El PBS una vez reconstituido es estable durante 4 meses a 2-8°C. No debe emplearse si presenta turbidez.

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Incubador 37°C
- Microscopio de fluorescencia
- Pipetas automáticas
- Puntas de pipeta
- Placa de microtitulación
- Tubos de dilución
- Cubreobjetos 24 x 60 mm
- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado

7. PROCEDIMIENTO

- Sacar los reactivos del frigorífico y dejar atemperar a temperatura ambiente. No sacar los portaobjetos de su envase hasta que se hayan atemperado.

- Realizar las determinaciones de IgG e IgM en portaobjetos separados.

7.1. DETERMINACIÓN DE IgG

En caso de que se disponga de suero de fase aguda y de fase convaleciente se analizarán las dos muestras simultáneamente.

1.a. Para determinación de IgG, realizar un screening de los sueros a diluciones iniciales de 1:8. Se titularán los sueros positivos con diluciones dobles seriadas hasta punto final. En una placa de microtitulación preparar la dilución inicial de los sueros 1:8. Poner 10 µL de suero en 70 µL de PBS pH 7,2.

1.b. Para la titulación de los sueros positivos realizar diluciones dobles seriadas con 50 µL de PBS pH 7,2 y 50 µL de la dilución anterior como se indica en la figura 1, hasta la dilución 1:2048. Mezclar bien con la pipeta y cambiar de punta entre cada dilución (figura 1).

2.a. Screening: añadir 5 µL de la dilución 1:8 del suero en cada uno de los tres pocillos de una columna. Repetir esta operación para cada uno de los sueros a analizar (figura 2).

Figura 1. Diluciones dobles seriadas

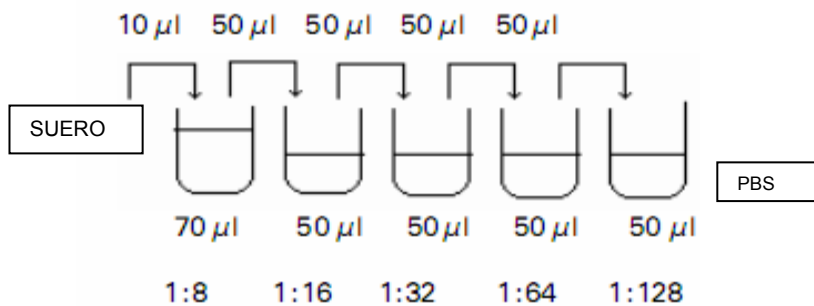
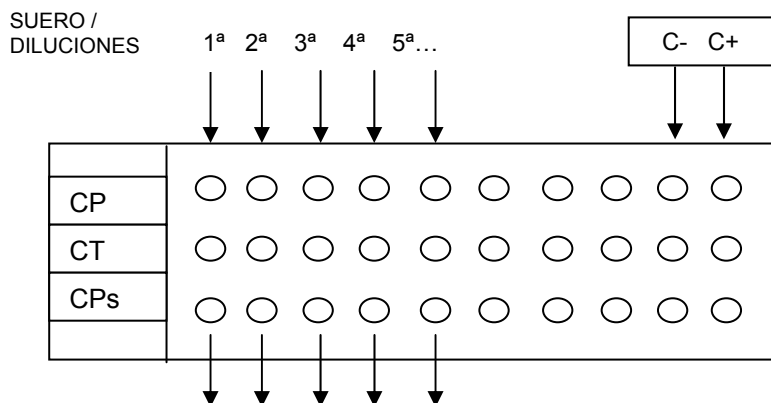


Figura 2. Distribución de los antígenos y sueros en el portaobjetos.

CP: *C. pneumoniae*; CT: *C. trachomatis*; CPs: *C. psittaci*; C-: control negativo; C+: control positivo



Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Chlamydia pneumoniae</i> mediante microinmunofluorescencia	PNT-DC-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

2.b. Titulación: añadir 5 µL de la dilución mayor del suero en cada uno de los tres pocillos de una columna. Repetir esta operación para cada una de las diluciones a analizar hasta 1:16 (figura 2). No es necesario cambiar de punta de pipeta si se comienza de la dilución mayor a la menor

3. Incluir en cada análisis controles negativo y positivo. No diluir los controles. Añadir 5 µL de Vircell *Chlamydia* IgG Negative control a cada uno de los tres pocillos de una columna. Proceder de igual manera con el reactivo Vircell *Chlamydia* IgG Positive control (figura 2).

4. Incubar en cámara húmeda 30 minutos a 37°C.

5. Enjuagar el portaobjetos con PBS pH 7,2 sin verterlo directamente sobre los pocillos. Sumergir el portaobjetos durante 10 minutos en una cubeta de lavado con PBS.

6. Lavar ligeramente con agua destilada.

7. Dejar que los portaobjetos se sequen.

8. Añadir 5 µL de solución anti-IgG humana (Vircell Anti-human IgG FITC conjugate) a cada pocillo.

9. Repetir los pasos 4 al 7.

10. Depositar una gota de medio de montaje en cada pocillo y tapar con un cubreobjetos.

11. Examinar el portaobjetos en el microscopio de fluorescencia con el ocular de 10x y objetivo de 40x. Si no se va a realizar la lectura inmediatamente, guardar la preparación en oscuridad a 2-8°C durante un máximo de 24 horas.

7.2. DETERMINACIÓN DE IgM

Para la determinación de IgM es recomendable pre-adsorber las muestras de suero para eliminar IgG que podrían interferir en el ensayo. El precipitado que se forma tras la adsorción puede eliminarse centrifugando el suero, aunque no es necesario ya que no afecta al desarrollo de la prueba.

1. Diluir los sueros a analizar 1:2 añadiendo 25 µL de suero y 25 µL de PBS pH 7,2 en un tubo.

2. Añadir 5 µL de sorbente de IgG (Vircell Anti-human IgG globulin) y agitar vigorosamente.

3.a. Screening: añadir 5 µL de la dilución 1:2 del suero pretratado en cada uno de los tres pocillos de una columna. Repetir esta operación para cada uno de los sueros a analizar (figura 2).

3.b. Titulación: para la titulación de los sueros positivos realizar diluciones dobles seriadas en PBS pH 7,2 a partir del suero pretratado como se indica en la figura 1, hasta dilución 1:16. En el caso de que aparezcan resultados positivos frente a más de una especie de clamidia, seguir diluyendo hasta que sólo aparezca reacción positiva a una de ellas.

Añadir 5 µL de la dilución mayor del suero en cada uno de los tres pocillos de una columna. Repetir esta operación para cada una de las diluciones a analizar (figura 2). No es necesario cambiar de punta de pipeta si se comienza de lo más diluido a lo más concentrado.

4. Incluir en cada análisis controles negativo y positivo. No diluir los controles. Añadir 5 µL de Vircell *Chlamydia* IgM Negative control a cada uno de los tres

pocillos de una columna. Proceder de igual manera con el reactivo Vircell *Chlamydia* IgM Positive control (figura 2).

5. Incubar en cámara húmeda 30 minutos a 37°C.

6. Enjuagar el portaobjetos con PBS pH 7,2 sin verterlo directamente sobre los pocillos. Sumergir el portaobjetos durante 10 minutos en una cubeta de lavado con PBS pH 7,2.

7. Lavar ligeramente con agua destilada.

8. Dejar que los portaobjetos se sequen.

9. Añadir 5 µL de solución anti-IgM humana (Vircell Anti-human IgM FITC conjugate) a cada pocillo.

10. Repetir los pasos 5 al 8.

11. Depositar una gota de medio de montaje en cada pocillo y tapar con un cubreobjetos.

12. Examinar el portaobjetos en el microscopio de fluorescencia con ocular de 10x y objetivo de 40x. Si no se va a realizar la lectura inmediatamente, guardar la preparación en oscuridad a 2-8°C durante un máximo de 24 horas.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. LECTURA DE LOS RESULTADOS

- La reacción es positiva si presenta fluorescencia color verde manzana de morfología coco-bacilar.

- La reacción es negativa si no se observa fluorescencia. Patrones de fluorescencia diferentes al definido para la reacción positiva deben interpretarse como negativos.

- El título de anticuerpos corresponde a la máxima dilución en la que se observa una reacción positiva.

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- La identificación de la respuesta específica de especie se realiza en función de las diferencias de los títulos obtenidos cuando se enfrenta el suero con los antígenos de las distintas especies de clamidias.

- Infección aguda: IgM \geq 1:16 o incremento de 4 veces el título de IgG entre suero de fase aguda y suero de fase convaleciente.

- Infección posible: un único suero con título IgG \geq 1:512.

- Probable infección pasada o exposición: un único suero con título IgG \geq 1:16.

8.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados se informan expresando el título de anticuerpos, máxima dilución con la que se obtiene una reacción positiva, para cada una de las especies, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci*.

a) Microinmunofluorescencia IgG:

- Prueba Positiva, título IgG.

- Prueba Negativa, IgG < 1:8

b) Microinmunofluorescencia IgM:

- Prueba Positiva, título IgM.

- Prueba Negativa, IgM < 1:2

Añadir un comentario con la interpretación de los resultados según se expone en el apartado 8.2.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Chlamydia pneumoniae</i> mediante microinmunofluorescencia	PNT-DC-02	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio o Unidad de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio o Unidad de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Se ha demostrado la presencia de títulos elevados de anticuerpos IgM e IgG en individuos asintomáticos. En personas mayores y pacientes con EPOC pueden existir títulos de IgG persistentemente elevados en ausencia de enfermedad aparente.

- La presencia de títulos elevados de anticuerpos en una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de infección reciente. Se recomienda analizar muestras pareadas para determinar seroconversión.

- La presencia de anticuerpos IgG en neonatos debe ser interpretada con precaución por la posible transferencia de anticuerpos maternos al feto. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.

- El momento de la toma de muestra puede determinar la obtención de resultados falsamente negativos (niveles de anticuerpos indetectables si se toma la muestra demasiado pronto en el transcurso de una infección o demasiado tarde para observar seroconversión).

- La ausencia de aumento significativo de anticuerpos o negatividad de la prueba no excluye la posibilidad de infección.

- Los resultados deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos.

- El rendimiento de esta técnica para el diagnóstico de enfermedades producidas por *C. pneumoniae* distintas de neumonía no se ha evaluado.

- La validez de esta técnica para seguimiento del tratamiento no se ha evaluado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. De Ory F, Guisasola ME, Eirós JM. Detection of *Chlamydomphila pneumoniae* IgG in paired serum samples: comparison of serological technique in pneumonia cases. APMIS 2006;114:279-284.
2. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clin Infect Dis 2001; 33:492-503.
3. Fernández F, Gutiérrez J, Mendoza J, Linares J, Soto MJ. A new microimmunofluorescence test for the detection of *Chlamydia pneumoniae* specific antibodies. J Basic Microbiol 2004;44:275-279.

PNT-DC-03
AISLAMIENTO DE *Chlamydia psittaci* EN LA LÍNEA CELULAR McCOY

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Chlamydia psittaci</i> en la línea celular McCoy	PNT-DC-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir y establecer la metodología básica para el cultivo y aislamiento de *Chlamydia psittaci* a partir de muestras patológicas de pacientes sospechosos de padecer una infección por este patógeno. Este protocolo puede ser empleado por todos los centros que dispongan de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 y que estén especializados en realizar diagnóstico de laboratorio de infecciones por microorganismos del género *Chlamydia*, y en el empleo de cultivos celulares para el aislamiento de virus y bacterias intracelulares obligadas. Su aplicación se puede efectuar sobre muestras clínicas obtenidas del tracto respiratorio que sean remitidas al laboratorio de microbiología, con la solicitud de detección por cultivo de este patógeno.

2. FUNDAMENTO

Los microorganismos del género *Chlamydia* son bacterias intracelulares obligadas por lo que se requiere del empleo de líneas celulares para su cultivo y aislamiento. *Chlamydia psittaci* es un agente zoonótico que se transmite desde múltiples especies de aves al hombre, causando principalmente un cuadro neumónico (psitacosis), pero que puede derivar en diversas complicaciones, originando otros cuadros extrapulmonares, habiéndose aislado el microorganismo especialmente a partir de las secreciones respiratorias.

El cultivo de este microorganismo es complejo ya que requiere la presencia de células vivas, proporcionadas por los cultivos de diversas líneas celulares susceptibles, como las células McCoy. La identificación definitiva se realiza mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta, que emplea un anticuerpo monoclonal específico de *C. psittaci* como anticuerpo primario, y un anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína como anticuerpo secundario, o con técnicas moleculares como la PCR, que además permiten el genotipado.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Loza E (Coordinador), Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá ML. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 10, 1ª edición. SEIMC 2000.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2004). Se puede consultar en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

- Manuales de instrucciones de los diferentes sistemas comerciales y aparatos utilizados.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

Tipo de muestra, recogida, transporte y conservación

Las muestras más adecuadas para el cultivo de *C. psittaci* incluyen exudado faríngeo, esputo o lavado broncoalveolar, que se recogerán según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a, 2ª edición (PNT-RTP-01, 2003). Se recomienda que el paciente se enjuague la boca con agua estéril o solución salina y que produzca tos profunda para recoger muestras procedentes de vías bajas. Las muestras se deben recoger en contenedores estériles de un solo uso con cierres con tapón de rosca y perfectamente etiquetados antes de su envío al laboratorio. Si las muestras son espesas, se añadirán 2 ml del medio de transporte SPG. Los frotis faríngeos se recogerán con torunda estéril en medio de transporte para *Chlamydia* (del tipo "Escobillón para *Chlamydia*", Deltalab) que contengan glutamato y un 1% de albúmina sérica bovina, además de antibióticos que no afecten a estos microorganismos, y antifúngicos. El procesamiento de las muestras se realizará inmediatamente o éstas se conservarán a -80°C hasta su envío. Si el cultivo se va a realizar en un laboratorio perteneciente a un centro con diferente localización del centro donde se ha tomado la muestra, el envío debe llevarse a cabo en hielo seco para prevenir la descongelación. Dadas las características de este microorganismo, las muestras deben manejarse como potencialmente peligrosas, siguiendo las medidas de bioprotección apropiadas.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Todos los reactivos empleados pueden ser suministrados por diferentes proveedores.

Medio de transporte SPG (*Sucrose Phosphate Glutamate*)

Composición: sacarosa (150 g) + KH₂PO₄ (1,04 g) + Na₂HPO₄.12H₂O (6,15 g) + Acido glutámico (1,44 g) + Agua destilada (2 l). Se ajusta a un pH de 7,6 y se esteriliza por filtración (0,22 µm). Para la conservación de muestras que presumiblemente contengan una alta contaminación bacteriana se añaden antibióticos: gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml).

Medio de cultivo para las células McCoy

Composición: se utiliza el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con suero fetal bovino (al 10% para la infección del tapiz celular, y al 5% para el mantenimiento de la línea celular McCoy) + L-glutamina (200 mM) + glucosa (3,7 g/L) + piruvato de sodio (0,01%) + extracto de levadura (1 g/L) + hidrolizado de lactoalbúmina (5 g/L) + gentamicina

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Chlamydia psittaci</i> en la línea celular McCoy	PNT-DC-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

(50 µg/ml) + anfotericina B (2,5 µg/ml). Se esteriliza mediante filtración (filtro de 0,22 µm).

Solución de tripsina

Composición: PBS (1 L) + tripsina (2,5 g) + EDTA (etilen-diamino-tetra-acético, 0,25 g). Se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm).

Tampón PBS-dietil-aminoetil-dextrano (PBS-DEAE-D)

El tampón PBS se prepara según la siguiente composición: NaCl (7,65 g) + Na₂HPO₄·12H₂O (0,724 g) + KH₂PO₄ (0,27 g) + agua destilada (1 l). Su pH se ajusta a 7,2 y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se prepara una solución concentrada 100X del tampón PBS-DEAE-D: PBS (100 ml) + DEAE-D (1 g). El pH se ajusta a 7,2 y se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm).

Cultivos celulares

En los laboratorios especializados en cultivos celulares se pueden utilizar viales de vidrio de fondo plano de 15 mm de diámetro externo con tapón, que contienen una laminilla de cristal redonda, de 12 mm de diámetro, sobre la que se cultiva una monocapa confluyente de células McCoy (ATCC CRL 1696). Estos viales estériles se preparan en el laboratorio 24 horas antes de ser empleados, colocando 2 ml de una suspensión celular ajustada a 5×10^4 células por ml. También pueden utilizarse viales de plástico desechables que contienen un cubreobjetos de 13 mm de diámetro sobre los que se preparan las monocapas de células, y que se comercializan por varios laboratorios bajo el nombre de "shell-vial".

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Cabina de flujo laminar vertical de nivel de bioseguridad tipo 2.
- Centrífuga con adaptadores para viales que alcance una velocidad de 4.000 g.
- Estufa de CO₂, programada para proporcionar una atmósfera con un 5% de CO₂.
- Micropipetas de varios volúmenes.
- Microscopio invertido, dotado de objetivos 10X, 20X y 40X.
- Microscopio de fluorescencia con filtros para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.
- Pipeteadores automáticos.
- Bomba de vacío para aspiración.
- Agitador orbital tipo vórtex.

6.2. MATERIAL

- Guantes y bata de trabajo.
- Pipetas estériles de diferentes volúmenes.
- Puntas de micropipeta.
- Viales estériles de *shell vial*
- Frascos de cultivo Falcon de 25 cm².

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CULTIVOS CELULARES: MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA McCOY Y PREPARACIÓN DE LOS VIALES SHELL VIAL

Las células de la línea celular McCoy se dejan multiplicar hasta obtener la cantidad suficiente para llevar a cabo el aislamiento. No obstante, cada vez que el tapiz celular sea confluyente, y en el caso de no necesitar células para un aislamiento, éste se somete a un pase. Para ello, se procede a disgregar el tapiz mediante un tratamiento enzimático, añadiendo al frasco de 25 cm² un volumen de 2 ml de una solución de tripsina después de retirar el medio de cultivo, y dejándola actuar durante 1,5-2 minutos. Posteriormente, la solución enzimática se elimina por aspiración, y las células, que se terminan de despegar con ligeros golpes sobre el frasco, se recogen en 5 ml de EMEM suplementado. De este volumen, se transfiere 1 ml a un nuevo frasco de 25 cm² y se completa hasta 6 ml con EMEM suplementado (medio de mantenimiento). Transcurridos 3 ó 4 días de incubación del cultivo a 37°C con un 5% de CO₂, se tripsinizan de nuevo en las condiciones ya referidas. En el momento de disponer muestras patológicas para realizar un aislamiento, las células se tripsinizan de nuevo y, tras un recuento de las células viables mediante una tinción con azul tripán (son viables las células refringentes, que no permiten la entrada del colorante) con una cámara hematocimétrica, se transfieren a los *shell vial* a razón de 5×10^4 células/ml, con un total de 2 ml por vial (10^5 células por vial). Los viales se incuban en las mismas condiciones, hasta que el tapiz sea confluyente y, por tanto, preparado para la infección, que generalmente se realiza a las 24 h.

7.2. INOCULACIÓN DE LOS VIALES

Las muestras patológicas se diluyen al 1/5 en una solución de PBS-DEAE-D preparada al 1/10.000 (a partir de la solución madre previamente preparada al 1/100). A continuación, especialmente si las muestras son sólidas o semisólidas, tras una homogenización con vórtex, se centrifugan a 300 g durante 10 minutos a 4°C, con el fin de eliminar los restos más groseros. Se recoge el sobrenadante y se realiza la inoculación de cada muestra sobre dos viales simultáneamente. Para ello, se retira el medio de cultivo de mantenimiento por aspiración y se depositan 200 µL de muestra. Se incuba durante 90 minutos a 37°C en una estufa de cultivos celulares, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A continuación, los viales se centrifugan a 2.200 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se procede a un lavado con PBS (1 mL por vial). Una vez eliminado este tampón por aspiración, se añaden 2 mL por pocillo de EMEM suplementado (medio de infección) y se incuban en la estufa de CO₂ a 37°C, durante 40-48 horas. Transcurrido este tiempo, uno de los viales, tras la eliminación del

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Chlamydia psittaci</i> en la línea celular McCoy	PNT-DC-03	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

medio de cultivo por aspiración, se lava una vez con PBS (1 mL) y, tras su eliminación, se fijan las células adicionando a cada pocillo 300 µL de acetona al 80% en PBS (v/v), enfiada a -20°C, durante al menos una hora. Los *shell vial* se pueden conservar a -20°C hasta su lectura. El otro vial se mantiene 72-96 h en incubación en las mismas condiciones indicadas, al objeto de repetir los mismos métodos si el resultado del primero es negativo, o para conservar la cepa viable tras congelación a -80°C, para posteriores estudios, si el resultado del primer vial es positivo.

7.3. REVELADO Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Para la visualización de las inclusiones clamidiales que se forman en los cultivos de células McCoy (casos positivos), se utiliza un método de inmunofluorescencia indirecta, recurriendo a un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-LPS (género) o anti-MOMP (específico de la especie *C. psittaci*) comercializados por diferentes proveedores. Tras retirar la acetona de las placas, se efectúa un lavado con 500 µL de PBS y, tras su eliminación, se añaden 300 µL por vial del AcMo a la dilución recomendada por el proveedor, que se incuba durante 45 minutos a 37°C. Seguidamente, se lava dos veces con PBS. Como anticuerpo secundario, se utiliza un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en cabra, conjugado con fluoresceína (diferentes proveedores), a la dilución recomendada por el fabricante; como colorante de contraste, se emplea el azul de Evans a una dilución 1/5.000. Se colocan 300 µL de esta mezcla en cada vial y se incuba durante 45 minutos a 37°C. La técnica finaliza con tres lavados con PBS y un cuarto con agua destilada, tras lo cual se elimina el agua sobrante y, con el fin de favorecer la visualización de la fluorescencia, una vez extraídas las laminillas de los *shell vial*, se montan sobre una mezcla de PBS-glicerol (1:9, con un pH ajustado a 8,6).

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez concluido el cultivo de las muestras patológicas sobre las células McCoy al objeto de aislar *C. psittaci*, se realizan las técnicas de revelado mediante una inmunofluorescencia. Si, con el empleo del microscopio de fluorescencia se detectan inclusiones intracitoplasmáticas a las 42-48 horas de incubación, se considera que la muestra es positiva. En caso negativo, hay que realizar la misma técnica con el segundo vial a las 72-96 horas para confirmar este resultado. Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta en el cultivo se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Por otro lado, hay que considerar que con el empleo de un anticuerpo monoclonal de género (anti-LPS) no es posible diferenciar entre especies, por lo que en el proceso respiratorio podría estar implicada tanto *Chlamydia pneumoniae* como *C.*

psittaci. Por ello, es preferible emplear un AcMo específico de esta última especie, o confirmar mediante métodos moleculares, como la PCR, la especie de *Chlamydia* aislada.

9. RESPONSABILIDADES

- Personal del área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras, rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo, realización de la técnica, lectura y registro de resultados, archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, adopción de medidas correctoras en el caso de que se hayan cometido errores, firma del informe de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Un aislamiento positivo de *C. psittaci* indica la presencia del microorganismo en la muestra y, por tanto, si este resultado se asocia con otros datos clínicos y epidemiológicos, es posible demostrar que el paciente sufre una infección activa.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación de esta metodología es su dificultad, ya que se requiere un personal especializado y la utilización de instalaciones de nivel 3 de bioseguridad, por lo que su empleo queda limitado a los laboratorios que cumplan estos requisitos. Otro problema adicional es la contaminación de las muestras patológicas por otras bacterias, pese al empleo de antibióticos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Igualmente, no se recomienda el empleo de esta metodología en aquellos pacientes que ya están siendo sometidos a un tratamiento antibiótico, lo que podría originar falsos negativos. Estos hechos hacen que este procedimiento resulte poco viable en la aplicación rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica hospitalarios, y sólo se deben practicar en casos seleccionados y por los centros debidamente equipados, tanto en infraestructura como en personal especializado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4993-5002.
2. Johnston SL, Siegel C. Comparison of Buffalo green monkey kidney cells and McCoy cells for the isolation of *Chlamydia trachomatis* in shell vial centrifugation culture. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 1992; 15:355-357.
3. Salinas J, Caro MR, Cuello F. Antibody prevalence and isolation of *Chlamydia psittaci* from pigeons (*Columba livia*). *Avian Dis* 1993; 37:523-527.