

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**



**Genotipificación de *Chlamydia trachomatis* en Trabajadoras Sexuales en Unidades de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual (UMIETS) de Tegucigalpa y San Pedro Sula, Marzo - Junio 2011**

**TESIS SUSTENTADA POR:**

**Suyapa A. Mendoza de Padilla**

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

**TEGUCIGALPA M.D.C. 21 de Febrero 2012 HONDURAS C.A.**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

**JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.**

VICERRECTORA ACADÉMICA

**RUTILIA CALDERON, Ph.D.**

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**OLGA MARINA JOYA, Ph.D.**

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

**MIRNA MARÍN, Ph.D.**

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

**MARITZA CANALES GIRON, MSc**

TEGUCIGALPA, M.D.C. 21 de Febrero 2012 HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOOTICAS

ASESOR DE TESIS

**María Elena Bottazzi Ph.D**

TERNA EXAMINADORA:

**María Elena Bottazzi Ph.D**

**y**

**Nelba Tabora Ph.D**

## **Dedicatoria**

**El presente estudio se lo dedico a mi esposo, hija y a mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado para culminar esta etapa tan importante en mi vida**

## **Agradecimiento**

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 *“Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”*. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial ([www.ghri.ca](http://www.ghri.ca)), al Dr. Nicholas Thomson del Instituto Sangers en Inglaterra, y a todo el personal médico de las UMIETS que participaron en la recolección de las muestras.

## INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA ABREVIATURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>CAPITULO 1 .....</b>	<b>1</b>
INTRODUCCION .....	1
HIPÓTESIS .....	5
OBJETIVOS .....	6
<b>CAPITULO 2 .....</b>	<b>6</b>
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 FISIOLÓGIA Y ESTRUCTURA.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
2.1.1 <i>Cuerpos elementales (CE)</i> .....	8
2.1.2 <i>Cuerpos reticulados (CR)</i> .....	9
2.2 CICLO DE VIDA.....	<u>10</u>
2.3 PATOGENIA E INMUNIDAD .....	12
2.4 INTERACCIÓN HUÉSPED- PARÁSITO.....	22
2.5 FACTORES GENÉTICOS DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	29
2.5.1 Características Fenotípicas .....	30
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMP).....	30

2.5.2 Características Genotípicas.....	34
2.5.3 Genoma de Chlamydia trachomatis .....	34
2.6 EPIDEMIOLOGIA .....	36
2.7 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS .....	43
2.7.1 Procedimiento de Cultivo Celular .....	44
2.7.2 Técnicas de Detección de Antígenos .....	46
2.7.3 Ensayos de Hibridación de Ácidos Nucleicos.....	50
2.7.4 Técnica de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT) .....	52
<b>CAPITULO 3 .....</b>	<b>60</b>
METODOLOGIA.....	60
3.1 TIPO Y UNIVERSO DEL ESTUDIO.....	60
3.2 TAMAÑO DE MUESTRA.....	60
3.3 CRITERIO DE INCLUSIÓN DE PARTICIPANTES.....	61
3.4 CONSIDERACIONES ETICAS .....	61
3.5 Consideraciones de Bioseguridad .....	62
<b>CAPITULO 4.....</b>	<b>65</b>
RESULTADOS.....	65
<b>CAPITULO 5.....</b>	<b>68</b>
DISCUSIÓN .....	68
<b>CAPITULO 6.....</b>	<b>71</b>
CONCLUSIONES.....	71
<b>CAPITULO 7 .....</b>	<b>72</b>
RECOMENDACIONES.....	72

**CAPITULO 8**.....73

REFERENCIAS ..... 73

**ANEXOS**.....79

## Lista de Figuras

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	12
Figura 2 Cèrvix Normal .....	31
Figura 3 Cervicitis por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 4 Tracoma .....	19
Figura 5 Conjuntivitis Neonatal por <i>Chlamydia tracomatis</i> .....	20

## Lista de Cuadros

Cuadro 1: Enfermedades causadas por serotipos específicos de Chlamydia trachomatis .....	13
Cuadro 2: Ensayos NAAT comercializados .....	54
Cuadro 3: Preparación de las mezclas de reacción.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cuadro 4: Protocolo del ciclo de amplificación ...	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cuadro 5: Ubicación de muestras y controles dentro de protocolo de trabajo .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cuadro 6: Interpretación de Resultados .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cuadro 7: Secuencia de iniciadores y sondas utilizadas en genotipificación .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cuadro 8: Muestras Recolectadas y Positivas por Chlamydia trachomatis según UMIETS .....	65
Cuadro 9: Total de genotipos encontrados .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## Lista de Gráficos

Grafico 1: Genotipos de Chlamydia trachomatis determinados por UMIET ..... 67

## Lista de Anexos

Anexo 1: Convenio de Consentimiento Informado.....	79
Anexo 2: Boleta de solicitud y Resultado de PACE 2 .....	82
Anexo 3: Flujograma de Procedimiento .....	83
Anexo 4:Flujograma de Manejo de Muestras.....	84
Anexo 5: Proceso de Extracción .....	85
Anexo 6: Procedimientos Estandar Operativos.....	86

## Lista Abreviaturas

<b>CE</b>	Cuerpos Elementales
<b>CDC</b>	Centro de Control de Enfermedades
<b>CR</b>	Cuerpos Reticulados
<b>EIA</b>	Enzimo Inmunoanálisis
<b>EPI</b>	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
<b>IFD</b>	Inmunofluorescencia Directa
<b>ITS</b>	Infecciones de Transmisión Sexual
<b>LGV</b>	Linfogranuloma venéreo
<b>NAAT</b>	Técnica de Amplificación de Ácidos Nucleicos
<b>nvCT</b>	Nueva Variante <i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>RFLP</b>	Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica
<b>TS</b>	Trabajadoras Sexuales
<b>HPV</b>	Virus de Papiloma Humano
<b>HCH</b>	Hombres que tienen sexo con hombres
<b>UMIETS</b>	Unidades de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>PEMAR</b>	Población en Mayor Riesgo

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Las infecciones de transmisión sexual son las mayores causas de morbilidad y mortalidad en edad reproductiva, así mismo facilitan la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, de tal manera que el control de las ITS ha sido reconocido como un medio efectivo para reducir la transmisión del VIH.

La infección por *Chlamydia trachomatis* es una de las Infecciones transmitidas sexualmente más frecuentemente reportada mundialmente. La Organización Mundial de la Salud estimó que en 1995 ocurrieron 89 millones de casos en el mundo y se calcula que el costo por morbilidad y secuelas de esta infección es de US \$2.4 billones por año [Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

La importancia de la infección causada por *Chlamydia trachomatis* radica en que la mujer puede infectarse sin darse cuenta y permanecer la mayor parte del tiempo de forma asintomática produciendo complicaciones futuras en fertilidad, ocasionar cervicitis, linfogranuloma venéreo y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) que es causa de abortos y esterilidad [Cervantes G Estrella, 2009].

Las estrategias diseñadas para el control de *Chlamydia trachomatis* poseen la limitante de perder un gran número de casos sin diagnosticar principalmente en mujeres asintomáticas, como ser las adolescentes sexualmente activas y las mujeres embarazadas.

Estas últimas transmitirán la infección al recién nacido al momento de dar a luz [Phillips Albert John] elevando así los costos para su tratamiento y control.

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son un problema de salud pública mundial y en Europa su tasa de incidencia presenta tendencias ascendente, con cifras de 100 casos por cada 100.000 habitantes (510 por cada 100.000 en el grupo de edad entre 15 y 24 años) [Piñeiro Luis, 2009].

OMS estimó que ocurrieron 89 millones de casos nuevos en el mundo. En Estados Unidos de Norteamérica las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son las más comúnmente son reportadas con 4.5 millones de casos anualmente. Las infecciones por este agente infeccioso se dan en todas las sociedades, en países en desarrollo la enfermedad es más común entre grupos de niveles socioeconómicos bajos, las mujeres tienen mayor riesgo de pasar de forma asintomática que los hombres [Cervantes G, 2009].

En Centroamérica se han realizado estudios para estimar la prevalencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) e Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) y cambios en el comportamiento sexual en poblaciones vulnerables .

En Honduras una de las primeras estrategias diseñadas para el control de *Chlamydia trachomatis* así como otras ITS es la implementación del “Manejo Síndromico” establecido desde 1994 e implementado en las Unidades de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual (UMIETS) de la Secretaria de Salud.

Las guías de vigilancia de segunda generación propuestas por la OMS y ONUSIDA promueven no sólo el monitoreo de VIH e infecciones de transmisión sexual, sino también monitorear los riesgos de comportamiento en poblaciones vulnerables para que las intervenciones puedan ser implementadas de forma temprana y con la rapidez necesaria. [CDC, 2008]. Por lo tanto contar con la información tanto biológica como de comportamiento resulta crucial para el diseño, la implementación y evaluación de programas de control del VIH e ITS.

Es así como en el 2006 se realiza en el país la “Encuesta Centroamericana de Vigilancia de Comportamiento Sexual y Prevalencia de VIH e ITS en Población Vulnerables” como las trabajadoras sexuales, hombres que tienen sexo con hombres y grupos étnicos como los garífunas. En este estudio se encontró que en trabajadoras sexuales la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* fue de 11.6 % en San Pedro Sula, en La Ceiba 11.5%, Comayagua 7,1 % y un 6% en Tegucigalpa [Departamento de ITS/VIH/SIDA de la Secretaria de Salud, 2008].

La Estrategia de Vigilancia y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual (VICITS) para poblaciones de mayor riesgo se inició en Honduras en el 2006, en respuesta a las necesidades de mejorar la prevención del VIH en trabajadoras sexuales a través de estrategias combinadas como el diagnóstico etiológico y tratamiento de las ITS, consejería y promoción del uso del condón. Del 2006 al 2010 se ha observado un incremento de *Chlamydia trachomatis* de 6.3% a 8.5% en las UMIETS de Tegucigalpa, San Pedro Sula y La Ceiba% [Laboratorio Nacional].

Aunque la información generada por la vigilancia centinela así como otras investigaciones realizadas en Honduras han sido muy importantes, es necesario profundizar más y conocer qué genotipos circulan en este grupo de población. La importancia de conocer los genotipos circulantes es que permitirán determinar cuales juegan un papel importante en la transmisibilidad de este agente etiológico y así poder desarrollar mejores estrategias para el manejo, control y diagnóstico de estas infecciones.

Este estudio de genotipificación de cepas de *Chlamydia trachomatis* en dos ciudades de Honduras es de gran relevancia ya que es el primero en Honduras que proveerá datos importantes sobre los genotipos circulantes de *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales y así poder desarrollar en un futuro estudios más profundos en relación a genotipos y la asociación a manifestaciones clínicas permitiendo así entender la patogénesis y epidemiología de las infecciones genitales producida por este agente, facilitando el diseño de estrategias para el control, prevención ,estudios de resistencia, y el desarrollo de vacunas.

## **OBJETIVOS**

### *Objetivo General*

Determinar los genotipos de *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales que asisten a las Unidades de Manejo Integral de Honduras.

### *Objetivo Específico*

Comparar los genotipos de *Chlamydia trachomatis* encontrados en dos Unidades de Manejo Integral del país.

## **HIPÓTESIS**

Los genotipos de *Chlamydia trachomatis* determinados en las diferentes clínicas de ITS son similares a los encontrados en el Continente Americano.

## CAPITULO 2

### MARCO TEÓRICO

La infección por *Chlamydia trachomatis* es la infección de transmisión sexual más frecuente en la mayoría de los países industrializados [Cacho Juana, 2001]. Es la más comúnmente reportada en los Estados Unidos oscilando el rango de prevalencia entre un 3%-11% en mujeres entre 15 a 24 años y se calcula que ocurren 4 millones de nuevas infecciones por año [Centers for Disease Control and Prevention, 1993].

El sitio de preferencia de este organismo es el sistema reproductivo siendo las mujeres las que sufren los mayores efectos adversos a largo plazo. El gran número de pacientes asintomáticas sexualmente activas representan un gran problema y el análisis de las pacientes en gestación se vuelve una necesidad para el control, ya que el recién nacido puede adquirir este agente al momento de nacer.

Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* se consideraron inicialmente como virus debido a que son muy pequeños capaces de atravesar filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y su multiplicación es intracelular sin embargo a diferencia de los virus estos organismos son procariotas y sus entidad celular se mantiene durante su ciclo de replicación, poseen una membrana interna y otra externa semejantes a las de las

bacterias Gram negativas, contienen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), poseen ribosomas, sintetizan sus propias proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y son sensibles a numerosos antibióticos antibacterianos [Murray Patrick R, 2002; Cervantes G, 2009 ].

*Chlamydia trachomatis* pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, género *Chlamydia*, tiene un espectro de huéspedes muy limitado, restringiéndose la infección a los humanos. Las especies se han dividido en dos biotipos, tracoma y linfogranuloma venéreo (LGV). Los biotipos se han dividido a su vez en 19 serotipos (llamados normalmente variantes serológicos o serotipos) por sus diferencias antigénicas en las principales proteínas de la membrana externa (MOMP). El biotipo LGV consiste en cuatro serotipos (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>2a</sub>, y L<sub>3</sub>); los restantes 15 serotipos (A, B, B Ba, C, D, Da, E, F, G, Ga, H, I, I<sub>a</sub>, J, y K) están en el biotipo del tracoma. [Murray Patrick R., 2002].

## **2.1 Fisiología y Estructura**

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria Gram negativa, no móvil de vida parasitaria intracelular obligatoria porque carece de la habilidad de sintetizar ATP por lo que colonizan el citoplasma de las células susceptible, presentan una estructura esférica u ovalada [Rodríguez Cerdeira Carmen, 2008; Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

Esta bacteria es aeróbica y utiliza el glutamato como fuente primaria de carbono complementada por la glucosa-2-oxoglutarato. Necesitan ATP de la célula huésped, sin embargo presentan genes que codifican por ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares que pueden estar involucradas en la síntesis de ATP [Vílchez Glenda, 2009].

### **2.1.1 Cuerpos elementales (CE)**

Los cuerpos elementales consisten en un nucleoide central, que están dentro de la pared celular, cuya constitución es diferente a las de las bacterias Gram negativas ya que el peptodoglicano no contiene ácido murámico. Son estructuras redondeadas de pequeño tamaño, rígidas resistentes a la rotura. Con la coloración de Giemsa se tiñen de púrpura y de rojo con la tinción de Macchiavello. Contienen ADN y ARN, presentan antígenos específicos de especie que inducen la fagocitosis. No tienen actividad metabólica, no pueden replicarse y son infectivos [Ortiz Olga Lucía Ostos, 2003; Arango Álvaro, 2001].

Son las diminutas formas infectivas de clamidia (0.3 - 0.4  $\mu\text{m}$ ). Poseen una membrana externa rígida que presenta extensivamente enlaces cruzados por enlace disulfuro [Murray Patrick R, 2002]. Es resistente a factores ambientales adversos, es aquí donde se encuentran los ácidos nucleicos ADN y ARN [Ortiz Olga Lucía, 2003].

Se unen a receptores en la célula huésped e inician la infección. La mayoría de las clamidias infectan las células del epitelio columnar y también infectan a los macrófago, es la forma metabólicamente activa de la bacteria. [Murray Patrick R, 2002; Fredlund Hans, 2004].

### **2.1.2 *Cuerpos reticulados (CR)***

Los cuerpos reticulados (CR) son osmóticamente inestables e incapaces de infectar otra célula. Las señales intracelulares regulatorios que controlan la conversión de cuerpo elemental a cuerpo reticular y viceversa no se conocen, pero la concentración de nucleótidos cíclicos de AMPc y GMPc parece ser importantes. La condensación del cuerpo reticular en cuerpo elemental conlleva una disminución de tamaño con pérdida de fragmentos de membrana externa conteniendo lipopolidacàridos y compactación del la cromatina en un denso nucleoide. [Arango Álvaro, 2001].

Los cuerpos reticulados son el resultado de la diferenciación de los cuerpos elementales al ser fagocitados. Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse, tienen actividad metabólica y el ADN está disperso. La pared celular está compuesta por dos subunidades de 20 nm de diámetro. Poseen una frágil membrana que carece de los extensivos enlaces disulfuro característicos de los cuerpos elementales [Murray Patrick R, 2002; Fredlund Hans, 2004].

## 2.2 Ciclo de Vida

*Chlamydia trachomatis* tiene un ciclo de vida bifásico que se caracteriza por la formación de inclusiones intracelulares que pueden ser observadas microscópicamente, distinguiéndose dos estados: cuerpos elementales y cuerpos reticulares.

Este agente infeccioso utiliza moléculas de sulfato de heparano para adherirse a los receptores de glicosa-amino-glicano que están presentes en las células eucariotas. Después de la adhesión, el cuerpo elemental se introduce por fagocitosis a la célula huésped dentro de una vacuola derivada de la membrana superficial y puede evadir la función fagolisosomal. El endosoma formado es transportado a una región distal del aparato de Golgi e incorpora esfingolípidos dentro de la membrana de inclusión. [Arango Álvaro, 2001; Phillips Albert John; Murray Patrick R, 2002].

*Chlamydia trachomatis* es capaz de interceptar el tráfico vesicular de la célula del huésped para secuestrar lípidos y otros compuestos esenciales para su desarrollo, por lo tanto este agente es considerado un parásito energético porque carece de enzimas básicas en la cadena de electrones para obtener ATP y nutrientes, por lo que tiene que utilizar la maquinaria del huésped para su metabolismo y desarrollo [Arango Álvaro, 2001].

El ciclo evolutivo se inicia cuando la forma extracelular del microorganismo, el cuerpo elemental (CE), infecta a una célula susceptible induciendo su propia internación por un proceso de endocitosis en células del huésped como las epiteliales que son aptas para tal fenómeno. Una vez dentro de la célula del huésped, los cuerpos infectivos o elementales quedan unidos a la membrana de la vacuola que puede evadir la función fagolisosomal. El endosoma formado es transportado a una región distal del aparato de Golgi e incorpora esfingolípidos dentro de la membrana de inclusión. *Chlamydia trachomatis* es capaz de interceptar el tráfico vesicular de la célula del huésped para secuestrar lípidos y otros compuestos esenciales para su desarrollo. El cuerpo elemental se reorganiza en 6 - 8 horas en una forma no infectante denominada cuerpo reticulado (CR). [Arango Álvaro, 2001].

Dentro de la vacuola rodeada por una membrana, el cuerpo reticulado aumenta de tamaño y se divide varias veces por la fisión binaria. Con el tiempo toda la vacuola se encuentra llena de cuerpos elementales derivados por la fisión binaria de los cuerpos reticulados para formar una inclusión en el citoplasma de la célula huésped. Los cuerpos elementales recién formados pueden liberarse de la célula huésped para infectar nuevas células. El ciclo de reproducción dura de 24 a 48 horas [Morrison Richard P, 2003; Murray Patrick R, 2002; Fredlund Hans, 2004].

La célula huésped aparentemente no sufre daños hasta el final del ciclo, cuando comienza a producirse la función lisosomal y un fenómeno de extrusión de inclusiones intactas o un proceso parecido a la exocitosis.

La vesícula entonces se desintegra y libera miles de cuerpos elementales para comenzar nuevamente el ciclo.

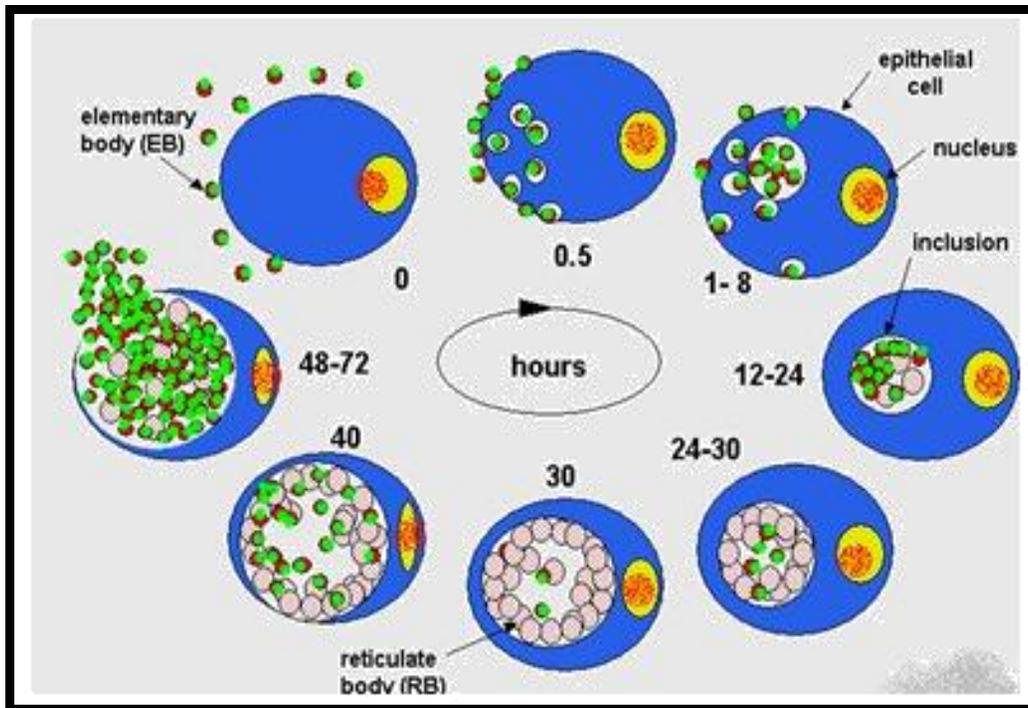


Figura 1 Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*

### 2.3 Patogenia e Inmunidad

La patogenia de *Chlamydia trachomatis* se debe a que los receptores para el cuerpo elemental se limitan a las células del epitelio cilíndrico no ciliado, cuboidal y de transición que se encuentran en las membranas mucosas de la uretra,

endocèrvix, endometrio, trompas de falopio, ano, recto, tracto respiratorio y conjuntiva [Murray Patrick R, 2002]. (Cuadro 1)

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por clamidias son: la destrucción directa de las células durante la replicación y la respuesta inflamatoria del organismo anfitrión. Este agente infeccioso logra acceder al huésped a través de mínimas abrasiones o laceraciones. [Murray Patrick R., 2002].

*Chlamydia trachomatis* también puede producir en el recién nacido otros procesos como rinitis, rinofaringitis, otitis, y vulvitis. También está asociado al síndrome de Reiter, y aunque no se ha aislado la clamidia del líquido sinovial se han observado cuerpos elementales en muestras de tejido de hombres con artritis reactiva adquirida por transmisión sexual y en líquido sinovial [Piñeiro Luis, 2009].

Cuadro 1 Enfermedades causadas por serotipos específicos de *Chlamydia trachomatis*

Serotipo	Enfermedad
L1,L2,L3	Linfogranuloma venéreo
A, B, Ba, C	Tracoma
D, E, F, G, H, I, J, K	Cervicitis mucopurulenta
	Uretritis no gonocócica, proctitis, epididimitis, conjuntivitis de inclusión (en adultos y recién nacidos) y neumonía (en recién nacidos).

\*Adaptado de Olga Lucia Ostos Ortiz, 2003

El linfogranuloma venéreo, enfermedad sistémica cuyo agente etiológico es *Chlamydia trachomatis* (serotipos L1, L2, L3), se replica en los fagocitos mononucleares, formándose lesiones en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de la infección primaria. La formación del granuloma es característica. Las lesiones se pueden volver necróticas, atraer a los leucocitos polimorfonucleares y producir un proceso inflamatorio que se extienda a los tejidos de alrededor. La posterior rotura de la adenopatía lleva a la formación de abscesos o de fístulas [Murray Patrick R, 2002].

Uno de los retos que existen en la actualidad no solo es conocer la enfermedad sino la aparición de cepas de *Chlamydia trachomatis* resistentes a los antimicrobianos. Históricamente se ha reportado sobre la sensibilidad de *Chlamydia trachomatis* a tetraciclina, macrólidos y fluoroquinolonas pero informes revelan un aumento en la resistencia *in vitro* a tetraciclina y eritromicina [Jones R.B. Van Der Pol B, 1990; Somani Jyoti, 2000].

Jyoti Somani et al [Somani Jyoti, 2000] describieron el caso de 2 pacientes de Estados Unidos con infecciones que persistieron después del tratamiento estándar a antibióticos e incluso se mencionaron sobre la resistencia a múltiples drogas como ofloxacina, azitromicina y doxiciclina. Otros estudios similares como el de Jones et al reportan el aislamiento de 5 cepas resistentes a doxiciclina, tetraciclina, eritromicina, y clindamicina pero sensibles a ofloxacina y ciprofloxacina.

Lefevre et al [Lefevre JC, 1997] reporta hallazgos de resistencia de *Chlamydia trachomatis* a tetraciclina en una mujer asintomática que padecía de inflamación cervical. El mecanismo de resistencia de *Chlamydia trachomatis* a los antibióticos todavía no está claro y con estos antecedentes expuestos y reportados se considera que esta bacteria podría ser considerada como un problema emergente para la Salud Pública de varios países [Somani Jyoti, 2000].

Otro aspecto a tomar en cuenta es la aparición de cepas de *Chlamydia trachomatis* con nuevas variaciones genéticas (nvCT) las cuales pasan inadvertidas con las técnicas de rutina que se utilizan para vigilar este agente infeccioso. En países de Europa como Suecia han reportado esta variante en proporciones de un 10% - 66% de todas las muestras positivas por *Chlamydia trachomatis* y recientemente se han reportado casos en Noruega y Finlandia [Unemo M, 2007]. En los Estados Unidos se han descrito estudios sobre mutaciones genéticas que pueden estar ubicados en las regiones constantes del gen *omp1*.

Estas mutaciones pueden afectar la estructura y la función de la proteína codificada por este gen [Dean Deborah ,1997]. Un ejemplo de esto es una mutación que da origen a cuatro variantes del genotipo E formando una nueva rama filogenética y sugiriendo que pueden haber variantes en las que se diferencian biológicamente.

Un estudio realizado en la Universidad de Washington describieron cepas de *Chlamydia trachomatis* que carecen de la proteína IncA en las membrana de inclusión, característica que le permite a las bacterias permanecer viables más tiempo en la célula del huésped sin lisis la célula infectada [Geisler William M, 2001].

De ahí la necesidad de fortalecer la vigilancia de este agente infeccioso apostando esfuerzos en implementar tecnología que permita entender aspectos importantes como los mecanismos de resistencia, mutaciones, reinfecciones o infecciones recurrentes.

#### **2.4 Importancia Clínica**

*Chlamydia trachomatis* se transmite fundamentalmente por contacto sexual a través de secreciones, sin embargo, la bacteria puede ser transportada de las secreciones genitales a las manos y causar tracoma. Infecta principalmente membranas mucosas tales como el cuello uterino, uretra y conjuntiva. Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, las manifestaciones clínicas, si están presentes, incluyen incremento en la secreción vaginal, ardor al orinar irritación en el área que rodea que rodea la vagina, cervicitis, uretritis, sangrado poscoital u ocasional y en infecciones más severas, endometritis, salpingitis y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) [Arràiz Nailet, 2008; Nascente Igansi, 2005].

Aproximadamente entre el 35% y el 50% de los casos de uretritis no gonocócicas son producidas por *Chlamydia trachomatis*; no son frecuentes las infecciones mixtas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Los síntomas de la infección por clamidias aparecen después del tratamiento satisfactorio de la gonorrea, ya que el período de incubación es más largo y el uso de antibióticos betalactámicos para tratar gonorrea es ineficaz frente a *Chlamydia trachomatis*. Aunque el exudado es menos purulento en los pacientes con infecciones uretrales por clamidias, a menudo se quejan de un “gota matinal”, a la cual va cediendo en el transcurso del día, estas infecciones no se pueden distinguir de una manera fiable de la gonorrea por lo que se deben llevar a cabo pruebas para ambos microorganismos [Murray Patrick R. 2002; Arango Álvaro, 2001].

*Chlamydia trachomatis* es un parásito intracelular del epitelio columnar por lo tanto no causa vaginitis, aunque la cervicitis es común. Muchas mujeres son asintomáticas, pero se cree que un tercio de ellas tiene infecciones vaginales e inflamaciones. El diagnóstico clínico de la cervicitis por este agente depende del alto índice de sospecha y de una cuidadosa exanimación del cérvix, también secreción mucopurulenta, hiperemia y edema son frecuentemente encontrados en las cervicitis [Arango Álvaro, 2001].

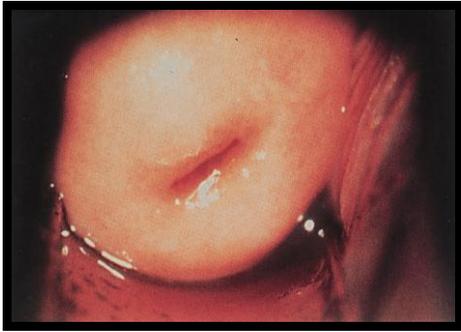


Figura 2 Cérvix normal  
[Morse Stephen A.1996].



Figura 3 Cervicitis por *Chlamydia trachomatis*  
[Morse Stephen A.1996].

## Tracoma

El tracoma es una enfermedad crónica producida por los serotipos A,B,Ba y C. Inicialmente los pacientes tienen una conjuntivitis folicular con inflamación difusa que afecta toda la conjuntiva .La conjuntiva va presentando cicatrices conforme progresa la enfermedad, haciendo que el párpado del paciente se retraiga. Las pestañas que crecen hacia dentro producen excoriaciones en la córnea y finalmente ocasionan una ulceración corneal, cicatrización, formación de pannus (invasión de los vasos de la córnea) y pérdida de visión. [Arràiz Nailet, 2008; Arango Álvaro, 2001; Cacho Juana, 2001; Cervantes G, 2009].

Es frecuente que el tracoma recurra después de una supuesta curación, probablemente debido a las infecciones subclínicas que se han documentado en los niños de las zonas endémicas y en los inmigrantes en USA, adquirieron el tracoma en sus países de origen durante la infancia [Arango Álvaro, 2001].

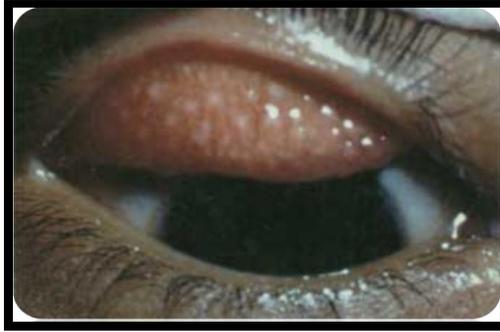


Figura 4 Tracoma por *Chlamydia trachomatis*  
STD/HIV Prevention Training Center University of Washington/Claire E. Stevens

### **Conjuntivitis de inclusión en los adultos**

En los adultos sexualmente activos se ha observado una conjuntivitis aguda folicular producida por las cepas de *Chlamydia trachomatis* que se asocian a infecciones genitales (A, B, Ba, D y K). La infección se caracteriza por la presencia de secreciones mucopurulentas, queratitis, infiltrados corneales y en algunos casos, un cierto grado de vascularización corneal. Se han observado cicatrices en los pacientes con infección crónica [Murray Patrick R., 2002].

### **Conjuntivitis neonatal**

Las infecciones oculares se producen también en los niños expuestos a *Chlamydia trachomatis* durante el parto. Después de una incubación de 5-12 días los párpados del niño se hincha, con hiperemia y abundante secreciones purulentas. Las infecciones no tratadas pueden durar hasta 12 meses durante los cuales se produce cicatrización y vascularización corneal.

Los niños que no se tratan o reciben únicamente un tratamiento tópico tienen riesgo de presentar una neumonía por *Chlamydia trachomatis*. [Arango Álvaro, 2001].



Figura 5 Conjuntivitis neonatal por *Chlamydia trachomatis*



Figura 6 Conjuntivitis por *Chlamydia trachomatis*

## **Neumonía del lactante**

El período de incubación de la neumonía del lactante es variable, pero suele comenzar entre 2 y 3 semanas después del nacimiento. Inicialmente se observa rinitis, apareciendo después una tos típica entrecortada. El niño permanece afebril durante la enfermedad clínica, la cual se prolonga varias semanas. Los signos radiológicos de la infección puede durar varios meses.

## **Síndrome de Reiters**

Es probable que una infección precedente dispare mecanismos desconocidos en el huésped que hacen que a pesar de la erradicación de la infección persistan los síntomas. [Arango Álvaro, 2001; Cervantes G, 2009]. La enfermedad es caracterizada por uretritis, conjuntivitis bilateral, artritis y lesiones mucocutáneas. Evidencias serológicas han demostrado que el 80% de los pacientes poseen anticuerpos contra *Chlamydia trachomatis*.

La conjuntivitis moderada se observó en un 50%, la artritis afecta básicamente rodillas y tobillos. La mayoría de los episodios de Reiter curan entre 2 y 6 meses, pero algunas tardan en recuperarse hasta un año [Arango Álvaro, 2001; Cervantes G, 2009].

## **Linfogranuloma Venéreo**

Causa la enfermedad los serotipos L1, L2 y L3 de *Chlamydia trachomatis*. Se manifiesta en tres estadios. El agente infeccioso se disemina por vía hematogena alcanzando incluso el LCR y otros tejidos. La lesión primaria de inoculación aparece a algunos días después del contacto. La lesión es vesicular o herpetiforme que suele aparecer en el glande o en el prepucio. En las mujeres aparece en los labios, pared vaginal o cérvix. La lesión vesicular es no dolorosa, y se rompe dejando una úlcera poco profunda que autocura espontáneamente pero sin cicatrizar. La ausencia de dolor diferencia a estas úlceras de las que se observan en la sífilis o las infecciones de herpes simple. La fase siguiente es la invasión a los ganglios linfáticos, los inguinales en el hombre y los pélvicos en las mujeres se inflaman fuertemente y se tornan dolorosos. La tercera etapa se manifiesta con un síndrome urogenito-perineal, en las mujeres se producen cambios en el pene y el escroto y algunas veces se compromete el ano desarrollándose estenosis rectal [Rodríguez Cerdeira Carmen, 2008; Arango Álvaro, 2001; Murray Patrick R., 2002].

### **2.5 Interacción Huésped- Parásito**

La característica de la infección por *Chlamydia trachomatis* es el equilibrio que con frecuencia existe entre el huésped y el parásito, y que resulta en una infección prolongada persistente. La propagación de una especie a otra conduce con frecuencia a la enfermedad [Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

El huésped infectado regularmente produce anticuerpos a varios antígenos de *Chlamidia* que tienen escaso efecto protector contra la reinfección [Murray Patrick R, 2002; Somani Jyoti, 2000].

Las recurrencias pueden ser producidas por reinfecciones con un nuevo contacto sexual, por un tratamiento inadecuado o por la adquisición de una nueva cepa [Stamm Walter E, 2001; Dean Deborah, 2000]. Sin embargo es difícil determinar si el gran porcentaje de enfermedad recurrente puede ser debido a una reinfección o a una infección persistente con el mismo organismo.

## **2.6 Respuesta Inmunológica Humoral Durante la Infección**

La respuesta inmune que ocurre en el endocervix, uno de los sitios preferidos por *Chlamydia trachomatis* exhibe una respuesta celular donde predomina los linfocitos T CD4 y células secretoras de interferón gamma. Los leucocitos CD4 son los que actúan como moléculas efectoras para atacar la enfermedad [Ficarra Mercedes, 2008].

Las alteraciones inmunes inducidas por la clamidia pueden ayudar para su sobrevida en el huésped infectado e inducir infecciones persistentes. Por eso, la posibilidad de recaída o reinfección en un tercio de las mujeres, después y a pesar de un buen tratamiento, así como la formación de adherencias, oclusiones e inflamaciones tubáricas persistentes en otro grupo de mujeres. [Pacheco, 1999].

Este microorganismo estimula la infiltración de células polimorfonucleares y linfocitos, lo cual conduce a la formación de folículos y cambios fibróticos. Las manifestaciones clínicas son el resultado de la destrucción de las células y de la respuesta inflamatoria del huésped [Murray Patrick R, 2002].

La infección por *Chlamydia trachomatis* tanto en los modelos animales como en el humano induce una respuesta de anticuerpos específica. La infección cervical en mujeres induce la respuesta de anticuerpos IgG, IgM e IgA contra diferentes antígenos de la membrana externa. IgA: primer contacto debido a que está presente en grandes concentraciones en las membranas mucosas, particularmente en las paredes internas de las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal, como también en la saliva y las lágrimas. IgM: se eleva principalmente en caso de primo infección. IgG: anticuerpo más abundante en los líquidos corporales. Brinda protección contra bacterias e infecciones virales. La relación más importante entre el número de bacterias y los anticuerpos está dada con la IgA secretora. [López Hurtado Marcela, 2002].

Los dos componentes más importantes de este agente infeccioso que inducen la aparición inicial de la respuesta inmunológica humoral, son el LPS y la MOMP (*OMP1*). Ambas sustancias provocan la aparición de anticuerpos neutralizantes, de los cuales unos bloquearán el efecto tóxico del LPS y otros la adhesión de la bacteria a su célula huésped (anticuerpo anti MOMP) [Arango Alvaro 2001; Nascente Igansi ,2005].

Debido a las características estructurales del LPS, el cual consistente de un lípido A de una región central constituida por heterooligosacàridos (denominada core) y del antígeno O (unidades oligosacaridas) lo hacen ser un antígeno tóxico y timo independiente [López Hurtado Marcela, 2002]. Es tóxico, porque induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF, las cuales en grandes cantidades producen caquexia en el individuo; y es timo independiente, porque puede estimular directamente a los linfocitos B, induciendo su diferenciación y producción de anticuerpos, esto debido principalmente a las unidades repetitivas de oligosacàridos, que presentan el antígeno O [López Hurtado Marcela, 2000,].

En el caso de de la MOMP, los antisueros y los anticuerpos monoclonales obtenidos de la inmunización de animales, han demostrado que existen diferentes dominios antigénicos en esta proteína, lo que ha generado que estos anticuerpos tengan una gran utilidad tanto en el diagnóstico como en la serotipificación, ya que éstos han identificado 18 serovariedades diferentes de *Chlamydia trachomatis*, que han sido clasificadas con letras de la A-L y los cuales están asociados a los diversos padecimientos clínicos que produce este microorganismo [López Hurtado Marcela, 2000].

Los genes que codifican para la proteína (*OMP1*) muestran un gran polimorfismo alèlico que al parecer ocurre frecuentemente debido a las mutaciones puntuales y por eventos recombinantes [Arràiz Naillet, 2008].

Este tipo de polimorfismo puede representar un mecanismo de evasión por parte de la bacteria a respuesta inmune humoral ya que el cambio de un solo aminoácido en la MOMP puede evadir la acción de los anticuerpos neutralizantes, lo que tienen implicaciones importantes para el desarrollo de vacunas y que no ha sido analizado aún en modelos animales [Arràiz Nailet, 2008; López Hurtado Marcela, 2000].

Las células T CD4 son activadas por los antígenos de Chlamydia, que derivan del contenido de las vacuolas, y se relacionan con las moléculas de clase II del sistema HLA, que se exponen en las células infectadas como macrófagos, dendritas y células endoteliales; el reconocimiento de los antígenos producirá la secreción de citoquinas. Éstas activan los macrófagos y las células B para producir anticuerpos (Stratton, 1998). El resultado de la respuesta inmunológica frente a *C. pneumoniae* puede ser de protección y desarrolla una respuesta dominante para las células T CD4, las cuales parecen ser el primer mecanismo de defensa, aunque existe una contribución por células T CD8. Las células T CD8 cuando son activadas por antígenos, pueden responder produciendo IFN- $\gamma$  (Stratton, 1998).

El IFN- $\gamma$  inhibe la replicación de los patógenos intracelulares estrictos, por inducción de la producción de indol-amina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO degrada el triptófano a quineurina y N-formilquineurina, privando al patógeno de triptófano. Como resultado, el crecimiento bacteriano puede ser restringido.

Los anticuerpos antiproteína de choque térmico (hsp) de 60 kDa de *Chlamydia trachomatis* (Chsp60) se ha observado en mujeres con enfermedad pélvica inflamatoria presentando anticuerpos contra la Chsp60, de igual manera se han evidenciado estos anticuerpos en mujeres que presentan infertilidad por factor tubárico o embarazos ectópicos. [Arango Álvaro 2001]. Esto demuestra que esta proteína participa de manera importante en el desarrollo del fenómeno inflamatorio y probablemente en el desarrollo de una autoinmunidad órgano específico que se manifiesta posiblemente con el progreso de una obstrucción tubárica o la formación de adherencia [Dean Deborah,2008].

Durante el curso de la infección por *Chlamydia trachomatis* la producción de anticuerpos específicos contra LPS y la MOMP son primero de isotipo IgM, estos se presentan aproximadamente de dos a tres semanas después del contacto con la bacteria y se mantienen de uno a dos meses para después inducir la producción de anticuerpos del tipo IgG.[Arango Alvaro 2001; Arràiz Naillet, 2008].

Sin embargo este tipo de respuesta depende del serotipo de *Chlamydia trachomatis*, localización y gravedad de la infección y del individuo infectado [Arràiz Naillet, 2008]. Uno de los problemas importantes para el desarrollo de anticuerpos es que *Chlamydia trachomatis* es un microorganismo intracelular que va liberando antígenos de acuerdo con su ciclo de vida que es de 48 a 72 horas.

Otro problema es que el microorganismo puede infectar a la célula vecina mediante la formación de puentes intracitoplasmáticos, sin que se exponga la bacteria al espacio extracelular. La inmunidad humoral juega un papel importante en la resolución de la infección y en la protección contra una reinfección esto es debido a una mayor producción de anticuerpos, a diferencia de lo que ocurre en una infección primaria. [Nascente Igansi,2005].

## **2.7 Anticuerpos de Reacción Cruzada con otros Microorganismos**

El diagnóstico de infecciones por microorganismos intracelulares o bacterias de difícil crecimiento, frecuentemente se basa en la presencia de anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión, sin embargo las pruebas serológicas deben de interpretarse con ciertas reservas debido a la posible reactividad cruzada con otros patógenos [Rodríguez Cerdeira Carmen, 2008].

Desde finales de los años setenta se describió la reactividad cruzada entre el género *Chlamydia* y *Acinetobacter calcoaceticus* variedad anitratus, la cual está dada por la similitud que existe entre le LPS de ambas bacterias, principalmente en la región de “core” Años después se reportó la reactividad cruzada con el LPS de mutantes rugosas de *Salmonella* sp. En los últimos años se han reportado contra el género *Bartonella*, *Yersinia enterocolitica* y *Proteus OX-19*, en donde los sueros de pacientes con infección por estos microorganismos también muestran niveles elevados de anticuerpos contra el género *Chlamydia*.

Aunque cuando estos sueros son absorbidos con estas bacterias, los títulos de anticuerpos contra el género *Chlamydia* se ven disminuidos y en algunos casos llegan a ser negativos[López Hurtado Marcela, 2002]. El análisis por Western Blot de los sueros de pacientes con *Chlamydia pneumoniae* contra un extracto de *Bartonella quintana*, ha evidenciado que estos sueros reconocen proteínas de *Bartonella quintana* con pesos moleculares que van de 34.9 a 84 kDa. También se ha descrito la existencia de otros antígenos que pueden mostrar reactividad cruzada con el género *Chlamydia*, como es la hsp60 de *Chlamydia trachomatis* que tiene alta homología con la hsp60 de *E coli*, de ahí de la importancia de caracterizar los antígenos de reactividad cruzada entre el género *Chlamydia* y otros patógenos cuando el diagnóstico se realiza por serología, esto, con el objetivo de evitar el uso de antígenos que muestran gran reactividad cruzada y dar resultados falsos positivos en aquellos pacientes que no presentan la infección por *Chlamydia trachomatis* [Cervantes G, 2009].

## **2.8 Factores Genéticos de Chlamydia trachomatis**

*Chlamydia trachomatis* se ha clasificado en 18 serotipos, todos ellos relacionados con infecciones; las serovariedades A, B, Ba, y C causan el tracoma las serovariedades D, E, F, G, H, I, J, y K se asocian a infecciones del tracto genital, conjuntivitis, y neumonía infantil, y los serovariedades L1, L2 y L3 producen el linfogranuloma venéreo (LGV) [Lima Haleta E, 2007].

### **2.8.1 Características Fenotípicas**

La caracterización fenotípica de *Chlamydia trachomatis* está basada en el análisis de la proteína principal de la membrana externa que es rica en cisteína (MOMP) y se expresa en la envoltura del cuerpo elemental y constituye el 60% del total de las proteínas de la membrana externa. Esto se hace utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales de esta membrana [Van Duynhoven Y.T.H.P, 1998; Dean Deborah, 2009].

#### **Proteínas de membrana externa (OMP)**

Al género *Chlamydia* se le considera como bacterias gramnegativas, ya que presentan una membrana externa y una pared celular que carece de ácido murámico. [Lopez Hurtado Marcela, 2002]. La estructura única de la pared celular de clamidia puede contribuir a la virulencia debido a sus interacciones con receptores de las células eucariotas y su capacidad para inhibir la fusión de los endosomas a los lisosomas.

La estructura de la pared celular contiene una membrana externa de lipopolisacáridos, pero carecen de peptidoglicanos. La estructura consiste en proteínas de membrana externa entrecruzadas con puentes disulfuro y proteínas ricas en cisteína (PRC) que pueden ser los equivalentes funcionales de los peptidoglicanos.

Esta estructura única confiere a estos organismos la capacidad de sobrevivir extracelularmente y de dividirse en el medio intracelular. La proteína mayor de membrana externa (MOMP) representa el 60 % del total de las proteínas de la membrana externa y son altamente conservadas en miembros de la misma especie, está codificada por el gen *Omp1*, con un peso molecular de 40kDa.

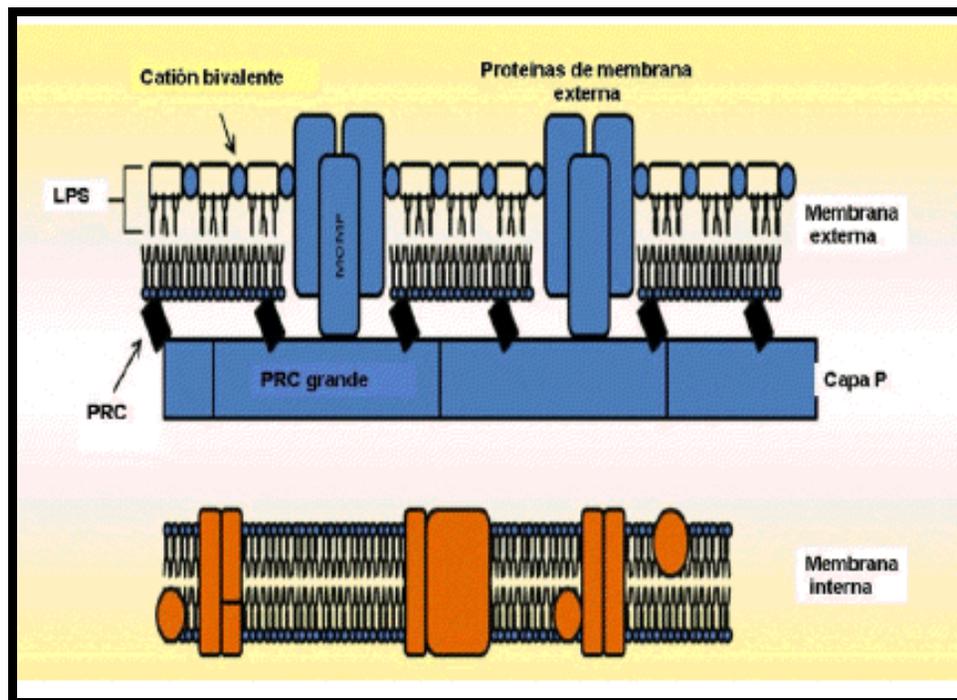


Figura 7 Modelo de la envoltura celular de *Chlamydia trachomatis*

La neutralización de las MOMP con anticuerpos monoclonales disminuye la infectividad de *Chlamydia trachomatis* en ratón, por lo cual se les ha atribuido un papel importante en la interacción con células eucariotas.

Igualmente se ha demostrado que las proteínas ricas en cisteína se expresan abundantemente en la superficie de los cuerpos elementales, pero no en los cuerpos reticulados, por lo cual se ha sugerido que participan en la entrada de *Chlamydia trachomatis* en las células.

Se ha propuesto que algunas adhesinas, particularmente de 18 y 32 Kd también participan en la interacción con receptores de células eucariotas, debido a disminución de la infectividad al utilizar anticuerpos monoclonales con estas adhesinas. No hay resultados concluyentes sobre el papel de algunos lipopolisacáridos de superficie en la unión o entrada de *Chlamydia trachomatis* a la célula. [Arraiz Nailet, 2008].

La MOMP presenta diversas funciones entre las que se encuentran: la integridad estructural de la membrana, la acción de porina y la de adhesión. Además esta proteína es inmunogénica, ya que presenta epitopos inmunodominantes (específicos de especie), por lo que se ha considerado como una proteína útil para el desarrollo de vacunas, excepto para el caso de *Chlamydia pneumoniae* ya que esta proteína no está expuesta sobre la superficie de la membrana externa, por lo que su detección mediante técnicas de Western Blot es difícil.

Las proteínas de 60 kDa y 12 kDa (codificadas por los genes *Omp2* y *Omp3*) son proteínas ricas en cisteínas y se encuentran solamente en los cuerpos elementales. La proteína de 60 kDa ha sido considerada como el sitio de unión

por el cual se une el heparán sulfato, sintetizado por el microorganismo y que está involucrado en la unión de la célula del huésped.

La MOMP contiene cuatro dominios variables (DVs) que son flanqueados e interespaciados por cinco dominios constantes. Tres de los cuatro DV (DV1; DV2; y DV4) se encuentran en la superficie y contienen epítopos antigénicos que son sitio blanco para la serotipificación [Fredlund Hans, 2004].

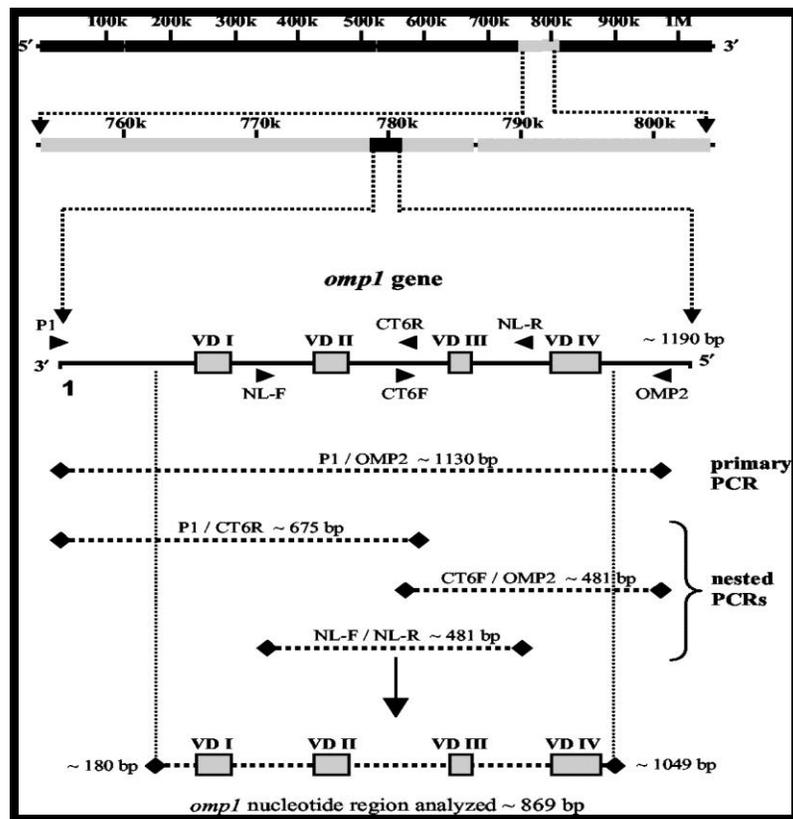


FIG. 8 Representación esquemática del genoma de *Chlamydia trachomatis*

## 2.8.2 Características Genotípicas

La caracterización se realiza por el análisis de RFLP (Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica) del previamente amplificado *gen Omp1* que codifica para la MOMP [Piñeiro Luis, 2009; Jalal Hamid, 2007].

## 2.8.3 Genoma de *Chlamydia trachomatis*

El genoma cromosómico de *Chlamydia trachomatis* tiene 1.042.519 pares de bases (pb - 58.7% de A-T) y contiene un plásmido críptico de 7,493pb. Este genoma codifica para 875 proteínas de las cuales 70 son exclusivas de *Chlamydia trachomatis*. [Vílchez Glenda, 2009]

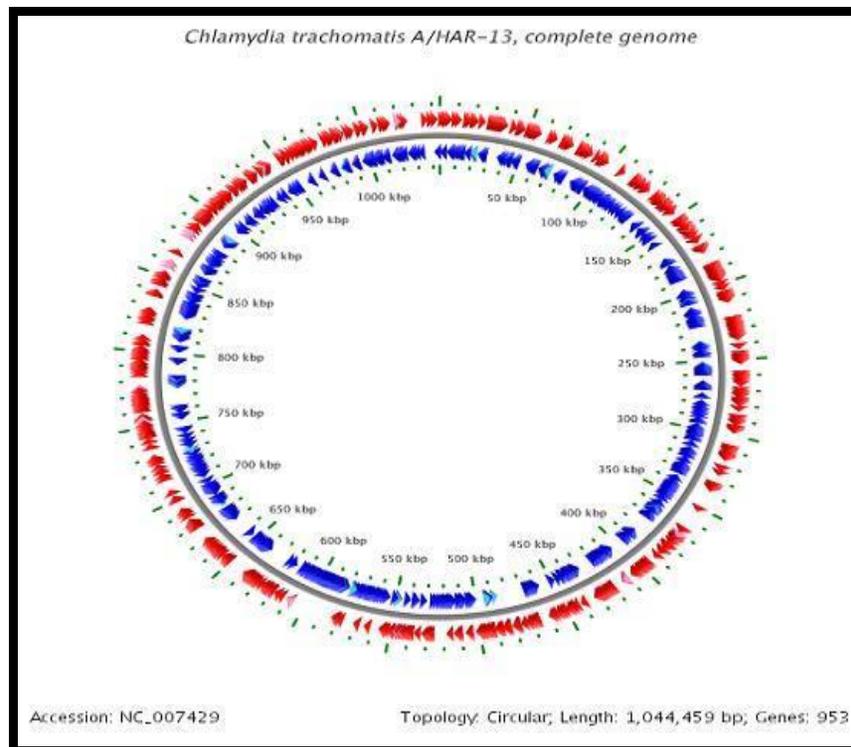


Figura 9

Genoma de *Chlamydia trachomatis*

Es importante considerar que en la región cercana al origen de la replicación del cromosoma clamidial es donde existe la mayor diversidad genética. En esta región existen genes que controlan la síntesis del triptófano y su utilización se ha relacionado con el interferón gamma en el desarrollo de la infección persistente. [Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

In vitro, el tratamiento de células infectadas con IFN-g limita la replicación de la clamidia, desarrollándose formas atípicas de clamidia con menos antígenos de proteína de membrana externa y lipopolisacáridos, pero con alta y continua producción de proteína de choque de calor clamidiásica HSP60. *In vivo*, la persistencia de tales células infectadas podría servir como acúmulo de antígeno HSP60 capaz de inducir inflamación crónica.

Si se realiza un análisis de la transcripción de genes en la infección activa por *Chlamydia trachomatis* versus la infección persistente este sugiere como lo menciona Olga Ostos et al [Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003] que en la fase de infección activa la energía requerida es derivada del ATP de la célula huésped mientras que en la infección persistente la fuente de energía no es producida por el huésped.

Esto es importante ya que se cree que *Chlamydia trachomatis* es un parásito energético porque importa ATP de la célula del huésped pero al realizar el análisis de la secuencia de su genoma se han encontrado genes que probablemente participen en la síntesis de ATP.

## 2.9 Epidemiología

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* se pueden encontrar en diferentes países de todo el mundo. La enfermedad es más común en grupos socioeconómicos bajos y gente que vive en áreas urbanas, entre el 70%- 75 % de las infecciones ocurren en mujeres que son asintomáticas. [Martínez Angélica M, 2009].

Hay tres especies de clamidias que infectan a humanos, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, y *Chlamydia pneumoniae* [Everett KD, 1999]. *Chlamydia trachomatis* puede causar: 1) tracoma y 2) linfogranuloma venéreo (LGV).

Hay múltiples serotipos de *Chlamydia trachomatis* de los cuales A, B, Ba y C causan tracoma, mientras los serotipos D - K son transmitidos sexualmente y causan las infecciones genitales, respiratorias y oculares [Jones R.B. Van Der Pol B, 1990; Wang SP, 1963]. Los serotipos del LGV (L1, L2 y L3) están fuertemente asociados a áreas del mundo con condiciones sanitarias pobres y pueden llevar a complicaciones a largo plazo [Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

Cuando la mujer está infectada puede transmitir la enfermedad a su pareja durante contacto oral, vaginal o anal y si está embarazada puede infectar al recién nacido produciendo conjuntivitis neonatal y neumonía. Se ha estimado que del 8%- 44% de los neonatos expuestos al nacer desarrollan conjuntivitis y 17% neumonía [Martínez Angélica M, 2009].

Otra vía de transmisión de conjuntivitis por este agente infeccioso en países del tercer mundo, son las moscas ya que estas pueden diseminar la bacteria a un niño sano obtenido de la cara de un niño infectado. Sin embargo la infección puede ser diseminada por contacto con la ropa o contacto de mano. Esta infección esta diseminada mundialmente en el Medio Oriente, África, el sur de Asia y China existen aproximadamente 90 millones de nuevas infecciones cada año y el número de personas con tracoma que desarrollaran ceguera para el año 2020 es de 12 millones lo que la Organización Mundial de la Salud ubica esta enfermedad dentro de su lista de intervención. [Dean Deborah, 2008].

En países donde existen zonas endémicas por tracoma se ha implementado una estrategia para prevenir la ceguera llamada por sus siglas en ingles SAFE (S cirugía, A: antibióticos orales para tratar *Chlamydia trachomatis*, F: limpieza facial y E: mejoramiento de las condiciones del medio ambiente), en la mayoría de los casos solo los componentes S y A son adoptados y por la falta de éxito de esta estrategia la infección y la enfermedad vuelven a reemerger en un año o dos [Dean Deborah, 2008].

En la mayoría de los casos *Chlamydia trachomatis* es asintomática y no solo puede ocasionar ceguera en el huésped (conjuntivitis), sino que cuando existe una infección de transmisión sexual aparecen secreciones anormales del pene o vagina y dolor durante la micción de orina. Si la infección no se trata oportunamente esta puede causar inflamación en el recto, enfermedad pélvica

inflamatoria en mujeres e inflamación del testículo en hombre [Martínez Angélica M, 2009].

En el mundo las tasas de prevalencia de *Chlamydia trachomatis* es alta sobretodo en países en vías de desarrollo como Martinica 26.7%, Senegal 14.6%, en contraste con lo que ocurre en los países desarrollados Portugal 4.6%, Italia 6.4%, Francia 7.1%, y Grecia 7.5%. [López Hurtado Marcela, 20028]. Los datos publicados sobre la incidencia a nivel mundial en mujeres son: 2.3% en Norteamérica, 3.2% Europa Occidental, 0.2 % Australia, 5.1 %en América Latina, y Caribe, 8.4% en África subsahariana y 2.9 Europa del este y Asia Central [Machado Ana C.S., 2011].

Estudios epidemiológicos han demostrado que patógenos transmitidos sexualmente, incluyendo agentes no ulcerativos como *Chlamydia trachomatis* pueden servir como cofactor biológico para la seroconversión del virus de la Inmunodeficiencia humana [Ramírez Katharine Sturm, 2000].

En muchas áreas el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* se realiza en grupos seleccionados como las poblaciones vulnerables y en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico se basa con la presencia de síntomas clínicos, por tal motivo es importante considerar el alto número de infecciones por *Chlamydia trachomatis*, particularmente en mujeres asintomáticas en las cuales pueden estar en riesgo de adquirir una infección por VIH y otras ITS [Ramírez Katharine Sturm, 2000].

Estudios han mencionado el rol potencial de la infección por *Chlamydia trachomatis* como un cofactor en el desarrollo de cáncer cervical por el Virus del Papiloma Humano. [Tabora Nelba, 2005]. Estudios realizados en Honduras en mujeres jóvenes universitarias en donde se investigó la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y el Virus de Papiloma Humano se obtuvo una prevalencia de 6 % de *Chlamydia trachomatis* en las cuales ninguna de las mujeres positivas habían manifestado infecciones anteriores por este agente etiológico, solo 2% de ellas tenían leucorrea y 4% presentaron infecciones mixtas con HPV. También se pudo observar una significativa asociación estadística entre la detección del ADN del Papiloma Virus Humano en los raspados cervicales y positividad por el antígeno de *Chlamydia trachomatis* [Tabora Nelba, 2005].

En la actualidad existe escasa información sobre la distribución de genotipos de *Chlamydia trachomatis* en infecciones asintomáticas y se desconoce si los genotipos difieren de acuerdo al riesgo que representan después de contraer una infección por VIH [Ramírez Katharine Sturm, 2000].

## Distribución de Genotipos de *Chlamydia trachomatis* en diferentes Partes del Mundo

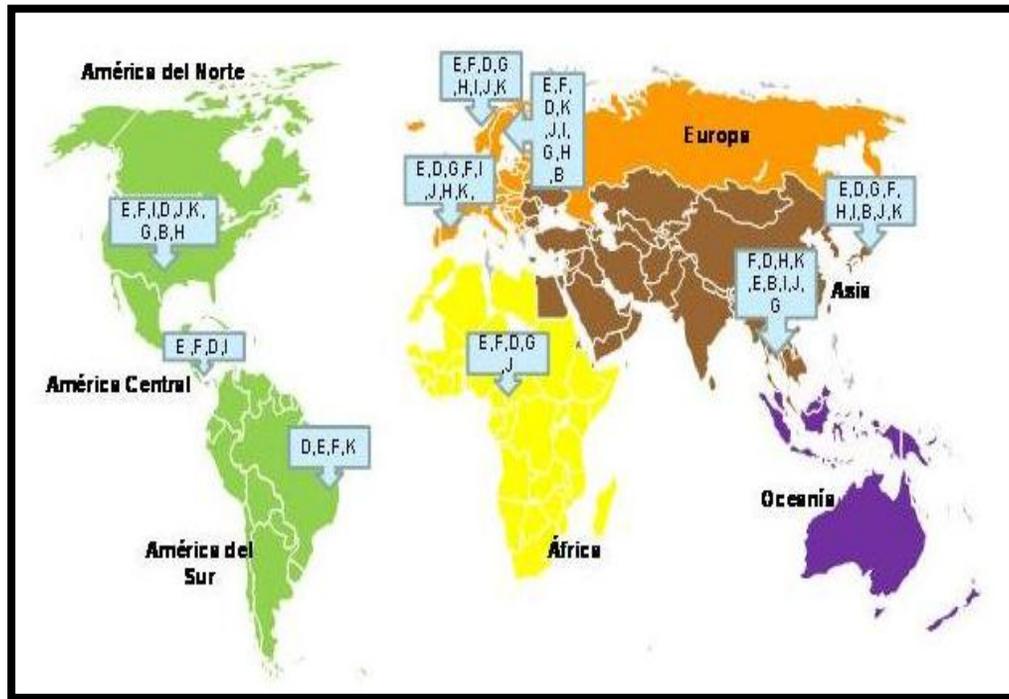


Figura 10 \*Hans Fredlund, 200, Carolina Porras, 2008 , Haleta e. Lima, 2007

En Honduras no existen datos sobre los genotipos de *Chlamydia trachomatis* que circulan en el país ya que la Secretaría de Salud la vigilancia se basa en la prevalencia de la infección en grupos vulnerables.

Estudios realizados en diferentes regiones de Europa han reportado una distribución similar de genotipos de *Chlamydia trachomatis*. En Suecia se investigaron 237 muestras urogenitales, de las cuales el genotipo más prevalente fue el E (47%), seguido del F (17%) [Jurstrand Margaretha, 2001].

En un estudio mas grande en el mismo país de 678 muestras el genotipo mas frecuente fue el E( 39%),seguido de F(21%), G (11%),D y K (ambos 9%), J (7%), H (2%) y B (1%) [Machado Ana C.S., 2011]. En España se genotiparon 177 muestras de los cuales los más frecuentes fueron E( 45.3%), el D (15.3%), G (10.2%)y el F(9.6%)[Piñeiro Luis, 2009]. En el continente Africano se encuentran los genotipos E, F, D y en el continente asiático se encuentran los genotipos F en un 25%, D en un 23%, H y K con un 11% [Fredlund Hans, 2004].

Es importante considerar que el genotipo G de *Chlamydia trachomatis* está relacionado con cáncer cervical y en el continente africano y asiático es la principal causa de ceguera. El Linfogramuloma Venéreo (LGV) ocurre con baja frecuencia en Norteamérica y Europa pero es común en África, Asia y Sudamérica [Ostos Ortiz Olga Lucia, 2003]

En las mujeres las infecciones genitales con *Chlamydia trachomatis* ocasiona una amplia gama de manifestaciones clínicas variando de infecciones asintomáticas localizadas a infecciones ascendentes como la enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad y embarazo ectópico [Stamm Walter E, 2001]. Diferencias específicas en la virulencia en las cepas de *Chlamydia trachomatis* debe ser relacionadas con la diversidad de las manifestaciones clínicas.

En investigaciones realizadas se han relacionado los genotipos de *Chlamydia trachomatis* F y G con manifestaciones clínicas como dolor abdominal. En mujeres con secreción anormal estas están relacionadas con los genotipos I o K

la friabilidad cervical con los genotipos I, J, y K [Van Duynhoven Y.T.H.P, 1998 ] y en infecciones urogenitales los genotipos que predominan son D, E y F.

La epidemiología molecular es una disciplina que permite abordar los estudios a través de la utilización de técnicas moleculares, combinando la epidemiología analítica con métodos avanzados de laboratorio [Vílchez Glenda, 2009] facilitando así conocimientos sobre genotipos, mutaciones y hasta de mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Los avances en la caracterización molecular de *Chlamydia trachomatis* permitirá el desarrollo de vacunas para el control y erradicación de las patologías causadas por este agente. Así mismo aportará el conocimiento de las cepas que causan enfermedad contribuyendo al desarrollo de estudios epidemiológicos, filogenéticos y de bioinformática como herramienta para la determinación de tasas de mutación [Sylvan Staffan P.E, 2007].

Estos estudios también son importantes para poder relacionar genéticamente las cepas con el huésped, conocer aspectos de transmisión, patogénesis, determinar diferencias en las manifestaciones clínicas y características demográficas en pacientes infectados, realizar análisis de cepas almacenadas por largos periodos de tiempo para hacer estudios taxonómicos y poder obtener una distribución geográfica y aportar información útil para el desarrollo de vacunas [Van Duynhoven Y.T.H.P, 1998; Vílchez Glenda 2009; Ostos Ortiz Olga Lucía, 2003].

## **2.10 Técnicas Diagnósticas**

Una de las limitaciones para el control de infecciones por *Chlamydia trachomatis* es que no se disponen de una estrategia diagnóstica sensible, específica y rápida, que permita indicar un tratamiento antimicrobiano adecuado para la paciente y proporcionar las bases para estudiar la prevalencia de esta agente infeccioso en la población. [Arràiz Nailet, 2008].

Existen varios métodos para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* los cuales podemos clasificar en: examen microscópico, procedimientos de cultivo celular, métodos serológicos para detección de anticuerpos, técnicas para detección de antígenos, métodos de hibridación de ácidos nucleicos y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos [Cervantes G, 2009].

### **2.10.1 Examen Microscópico**

El examen microscópico directo de muestras endocervicales para buscar inclusiones citoplasmáticas o los cuerpos elementales típicos. Generalmente, el estudio microscópico directo del tejido muestra baja sensibilidad (52%-85%) por lo que no se recomienda para diagnóstico o investigación [Cervantes G, 2009].

Todas las tinciones se fundamentan en la presencia de glucógeno de las inclusiones citoplasmáticas clamidiales y de las células epiteliales a partir de las cuales se toman las muestras también tienen glucógeno, lo que pueden llevar a

obtener falsos positivos al teñir con Giemsa o con anticuerpos fluorescentes [Arràiz Nailet, 2008].

### **2.10.2 Procedimiento de Cultivo Celular**

Es el procedimiento de mayor especificidad para el diagnóstico de clamidia (100%) y una sensibilidad de 70-85%, considerado la prueba de oro para el diagnóstico de infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* del tracto genital tanto en hombres como en mujeres, las muestras indicadas son las uretrales de hombres y mujeres asintomáticas, la nasofaríngeas, rectales, vaginales de niñas prepùberes y en casos de sospecha de abuso sexual. Pero por su baja sensibilidad, complejidad y requerimientos técnicos no se recomienda implementarla como técnica diagnóstica [George Joyee A, 2003].

EL cultivo celular es utilizado para la observación de inclusiones intracitoplasmáticas en células teñidas con anticuerpos monoclonales fluorescentes. [Arràiz Nailet, 2008]. Los cultivos celulares más utilizados son líneas celulares de ratón células McCoy (fibroblastos de ratón) HeLa 229 (carcinoma humano), células BHK-21(células de ovario de hámster) y las células BGMK. El aislamiento también puede realizarse por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollos embrionados de 6-8 días de edad. Las líneas celulares se tratan con irradiación, dextràn, ciclohexamida para aumentar la sensibilidad del aislamiento.

Antes de inocular la muestra, ésta se puede sonicar para romper las células del huésped y permitir que los cuerpos elementales se separen [Cervantes G, 2009]. Una vez tratada la línea celular con ciclohexamida el cultivo se propaga en una monocapa sobre un cubreobjetos inoculado con las muestras, si hay suficiente número de cuerpos elementales ellos infectarán las células y crecerán en forma de inclusiones citoplásmicas, luego de ser infectadas, las inclusiones pueden observarse después de 48-72 horas de incubación y teñidas con anticuerpos marcados con fluoresceína que se ligan al LPS de la clamidia, otros reconocen específicamente la proteína de membrana externa, la observación directa de las inclusiones que posee una morfología distintiva contribuye al 100% de especificidad [Cervantes G, 2009].

La condición de parásito obligatorio que presenta *Chlamydia trachomatis*, trae como consecuencia que no se le pueda cultivar en cultivos convencionales, requiriendo sistemas de cultivo celular, condiciones de transporte rigurosas y personal especializado debido a su complejidad técnica [Black Carolyn, 1997; Cervantes G, 2009].

La desventaja del cultivo es que puede ser susceptible a diferentes condiciones que reducen su sensibilidad, como son la calidad de la muestra, el sistema de transporte que puede comprometer la viabilidad de la bacteria y puede brindar resultados falsos negativos, el sistema de cultivo celular del laboratorio, el tipo de tinción utilizado en la identificación etc. [Cacho Juana , 2001].

El cultivo celular había sido considerado por mucho tiempo el “gold estándar” para el diagnóstico de este agente infeccioso y se utilizaba frecuentemente en los países desarrollados con el motivo de estudios médico- legales debido a su especificidad, sin embargo ser comparado con ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, se ha reportado que su sensibilidad puede ser de un 50%-60% dependiendo del laboratorio [Arràiz Naillet, 2008].

### **2.10.3 Métodos Serológicos**

Las pruebas serológicas generalmente no son útiles en el diagnóstico de infección del tracto genital por *Chlamydia trachomatis* debido a varias razones:

Aunque en décadas pasadas los métodos serológicos no han sido totalmente satisfactorios para el diagnóstico de este agente infeccioso aún existe controversias sobre la utilidad, debido a que los niveles de anticuerpos IgG producidos durante una infección por *Chlamydia trachomatis* se encuentran elevados por mucho tiempo, por lo que una prueba de anticuerpos positiva no distingue una infección anterior de una infección actual [Black, CM, 1997].

A pesar de esto, el análisis de muestras de suero de pacientes en fase de convalecencia muestra que el título de anticuerpos se incrementa cuatro veces, siendo éstos predictores de una infección activa. Sin embargo, se requiere de al menos un mes o más para llegar a estos títulos de anticuerpo. [Arango Alvaro, 2001].

La presencia de anticuerpos IgM es un marcador inexacto de infección aguda en adolescentes y adultos ya que este anticuerpo a menudo no está presente presumiblemente porque estas personas han sido infectivas previamente con *Chlamydia trachomatis* u otra especie de *Chlamydia* como *Chlamydia pneumoniae*, generando así una respuesta anamnésica a una exposición reciente, por un lado y por el otro en 70% de los pacientes la infección cursa asintomática, por lo que los anticuerpos IgM ya no se encuentran presentes cuando se realiza el diagnóstico de infección. [López Hurtado Marcela, 2002].

Sin embargo, dos excepciones han sido descritas en cuanto a la utilidad que muestran los anticuerpos IgM en el diagnóstico: la primera es en el caso de recién nacidos con neumonía por *Chlamydia trachomatis* y la segunda en pacientes con Linfogramuloma venéreo (LGV). Los pacientes con LGV desarrollan una infección sistémica con una alta respuesta de anticuerpos comparada con los pacientes que muestran infección genital localizada [Rodríguez Cerdeira Carmen, 2008].

A pesar de esto las pruebas serológicas han tenido mayor utilidad en la detección de pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria o infertilidad por factor tubárico (adherencias u obstrucción tubo-ovárica), ya que estos padecimientos se encuentran asociados en un alto porcentaje con la infección previa por *Chlamydia trachomatis* [López Hurtado Marcela, 2002].

El primer método serológico empleado para el diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* fue la prueba de fijación de complemento, que fue utilizada ampliamente en los años setenta por su alta sensibilidad en infecciones sistémicas [López Hurtado Marcela, 2002]. Sin embargo ésta cayó en desuso por su baja sensibilidad en infecciones locales y fue sustituida en infecciones locales y fue sustituida por la microinmunofluorescencia (MIF). La MIF fue desarrollada a principios de los años setenta como herramienta útil en los estudios epidemiológicos de infección por *Chlamydia*, gracias a que cuenta con una serie de características tales como: a) es la prueba serológica más sensible y es la única capaz de detectar la respuesta especie específica y serovar – específica. b) es el método de elección para detectar anticuerpos IgM anti *Chlamydia trachomatis* en neonatos con neumonía C) es la prueba de mayor exactitud para detectar la presencia de anticuerpos IgG en cualquier tipo de paciente infectado con diferentes serovariedades de *Chlamydia trachomatis*. [Black, CM, 1997].

La desventaja de este método es que es una prueba laboriosa que emplea antígenos costosos que no están disponibles en el comercio. [Black, CM, 1997; López Hurtado Marcela, 2002 Nascente Igansi, 2005].

Aunque la prueba de microinmunofluorescencia (MIF) no está disponible en el comercio, existen otras pruebas que miden la presencia de anticuerpos, ya sea por el método de ELISA o por inmunofluorescencia indirecta (IFA).

La primera muestra una sensibilidad de 91% y la segunda de 97% con respecto a la técnica de MIF, pero su utilidad se limita solamente a detectar anticuerpos IgG o IgA [Black, CM, 1997].

La técnica de ELISA detecta anticuerpos contra antígenos específicos de género o lipopolisacáridos de cuerpos elementales o reticulares. A través del tiempo esta técnica ha mostrado avances sobre el tipo de antígeno que debe ser empleado para evitar la detección de anticuerpos de reactividad cruzada con otros patógenos [Murray Patrick R., 2002]. Debido al conocimiento de la estructura molecular MOMP y de las hsp, se han diseñado métodos de ELISA que emplean péptidos sintético que evitan la detección de anticuerpos de reacción cruzada. En el caso de la detección de anticuerpos IgM anti *Chlamydia trachomatis* de recién nacidos con neumonía, aún está en controversia si el método de ELISA puede ser útil, ya que éste es menos sensible que la prueba de microinmunofluorescencia [López Hurtado Marcela, 2002].

La técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene mayor sensibilidad que la prueba de ELISA ya que puede detectar cuerpos elementales o reticulares o toda la inclusión y es muy parecida a la prueba de microinmunofluorescencia ya que su evaluación consiste en detectar el título de anticuerpos, en donde aún hay fluorescencia [López Hurtado Marcela, 2002].

Debido a que el 70% de las infecciones pélvicas ocurren de manera asintomática la prueba de inmunofluorescencia indirecta ha sido utilizada como una prueba no

invasiva para determinar el daño ginecológico provocado por la infección previa con *Chlamydia trachomatis* y la detección de anticuerpos anti *Chlamydia* es considerado como un método simple para la detección de infertilidad por factor tubárico (IFT) y el desarrollo de adherencias. [Cacho Juana, 2001].

La inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales Es una técnica rápida de diagnóstico pero la observación microscópica es cansada y por ello no es adecuada para el procesamiento continuo de gran número de muestras [Chalker V.J, 2005].

#### **2.10.4 Ensayos de Hibridación de Ácidos Nucleicos**

Las pruebas determinan la presencia de secuencias específicas de especies de ARN ribosomal. La ventaja de estas pruebas radica en la eliminación de la necesidad de amplificar los ácidos nucleicos [Murray Patrick R, 2002].

Dentro de los formatos de los macroarreglos se encuentra el LiPA (Line Probe Assay), un sistema de detección multiparamétrico. Este sistema utiliza tiras cubiertas con sondas específicas que son hidratadas con los productos de amplificación obtenidos a partir de la muestra analizada. El sistema presenta la ventaja que en un solo análisis pueden amplificarse distintas partes de un gen, diferentes genes o ADN de diversos organismos, lo cual convierte a esta aproximación metodológica en una herramienta útil en epidemiología. [M. Angélica, 2009].

## GEN - PROBE PACE 2 COMPLETE

La prueba de hibridación del ácido nucleico está basada en la habilidad de alinear específicamente las hebras de ácido nucleico complementario para formar los complejos estables de doble hebra. El sistema de GEN-PROBE PACE 2C usa sondas de ADN de una sola hebra con marcadores quimioluminiscentes que son complementarios al ARN ribosomal del microorganismo.

Después de que el ARN ribosomal es liberado de los microorganismos, la sonda del el ADN marcada se combina con el ARN ribosomal del organismo para formar híbridos ADN: ARN estables. Los híbridos ADN: ARN marcados están separados de las sondas no hibridizadas y son medidos por el Luminómetro del lector GEN-PROBE.

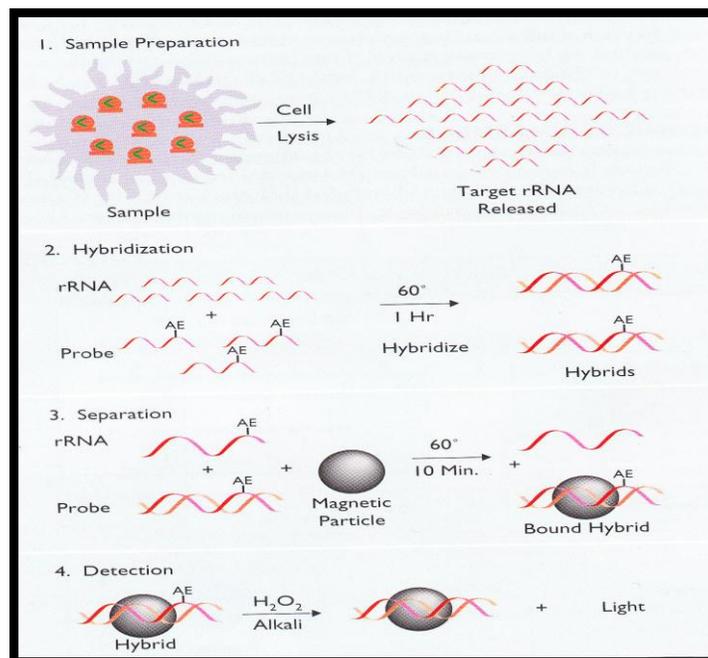


Figura 11 Técnica de PACE 2 de GENPROBE [Morse Stephen A.1996].

### **2.10.5 Técnica de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAAT)**

La utilización de técnicas antes exclusivas a la investigación básica es, probablemente, una de las características más sobresalientes en la medicina actual. Una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma y que de todas las técnicas disponibles para la amplificación de ácidos nucleicos es la más utilizada. [Diazaraque, 2002].

Estas técnicas permiten amplificar secuencias de ácidos nucleicos específicos del organismo que se pretende detectar. Permiten detectar escasas copias de ADN O ARN [Sylan SPE, 2009].

Las NAAT son los procedimientos de elección para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* por su sensibilidad y especificidad y porque no requieren de la toma de muestras invasivas para su ejecución.

El proceso se lleva a cabo de forma cíclica en un termociclador y cada uno de los ciclos consta de tres fase [Diazaraque, 2002].

En la primera fase sucede una desnaturalización, tras la extracción de ADN de la muestra biológica, éste se calienta a 95 – 98 ° C durante 30-90 segundos, de tal modo que la sensibilidad del ADN a temperaturas elevadas se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidad las dos hebras del ADN y éstas se separan.

Después viene la fase de acoplamiento de los cebadores, que son moléculas de ADN monocatenario previamente diseñadas, se unen al lugar complementario de la hebra del ADN diana desnaturalizado previamente. Esta fase tiene lugar a una temperatura entre 45 y 65°C durante 30-90 segundos y precisa de los cebadores porque todas las polimerasas necesitan un fragmento de cadena doble de ADN que les indique donde comenzar a incorporar nucleótidos. [Murray Patrick R., 2002].

Una vez acoplados los cebadores del ADN diana, la ADN polimerasa comienza actuar incorporando los nucleótidos presentes en la mezcla y sintetizando así una copia de cada una de los dos hebras del ADN diana. Esta última fase del proceso tiene lugar a 70-75°C durante 30-180 segundos. [Diazaraque, 2002].

Este proceso se repite varias veces de tal manera que en condiciones ideales se obtendrían copias de la región adyacente a la zona complementaria a los cebadores. Una vez terminada la serie de ciclos es preciso detectar e identificar el ADN producto de la reacción, lo cual se logra por medio de una electroforesis [López Hurtado Marcela, 2002].

Estas técnicas detectan entre el 17 y 28% más de infecciones comparadas con otros procedimientos de diagnóstico [Martínez Angélica M, 2009]. Existen varias tecnologías comerciales de NAAT siendo las más conocidas: Reacción de Polimerasa en cadena (PCR), reacción de ligasa en cadena (LCR), amplificación

mediada por transcripción (TMA) y la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA).[Gaydos Charlotte A, 2004; White Rachel, 2004].

La técnica de PCR presenta ventajas como los límites de detección tan bajas de apenas 1-10 cuerpos elementales por lo que alcanza una sensibilidad de casi de 99%. Otra de las ventajas de los métodos moleculares es la ausencia de cultivos, requerimientos especiales de transporte y rapidez en la obtención de resultados en 6 horas [Arango Álvaro, 2001].

Nombre del Ensayo (Laboratorio)	Técnica de Laboratorio
AMPLICOR (ROCHE)	PCR (Polymerase Chain Reaction)
LCx (ABBOT)	LCR (Ligase Chain Reaction)
APTIMA (GenProbe)	TMA (Transcription-Mediated Amplification)

Cuadro 2 Ensayos NAAT comercializados [SPE Sytan 2009, V.J.Chalker 2005, N.A. Lister, 2004].

Incluso actualmente existen test dúplex que pueden detectar simultáneamente ADN de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* a partir de un solo espécimen clínico. PCR y LCR ofrece sensibilidades entre el 89% al 100% de espécimen cervicales, uretrales y orinas de hombres como de mujeres con uretritis no gonocócica (UNG) sintomática [Dean Deborah, 2008].

También es importante mencionar las desventajas de esta técnica como ser su elevada sensibilidad ya que no sólo amplifica el genoma diana sino también lo hace con cualquier genoma producto de una contaminación de la muestra. Además dada a su capacidad para amplificar cantidades insignificantes de ácidos nucleicos no siempre es posible distinguir un resultado clínicamente significativo de aquel que no lo es y tampoco distingue aquellos casos de infección activa de una latente. Por ello previo a la interpretación del PCR es preciso establecer la cifra a partir de la cual un resultado es relevante desde el punto de vista práctico [FREDLUND HANS, 2004].

Otro inconveniente del PCR es su alto costo, no sólo a causa de la técnica en sí y del alto precio del equipamiento que exige, sino también debido a la necesidad de disponer de un espacio en el laboratorio para prevenir la contaminación de la muestra y es preciso que las distintas fases del proceso se realicen en lugares físicamente separados entre sí [FREDLUND HANS, 2004].

A pesar que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más costoso son más eficaces por los beneficios que otorga en el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en mujeres asintomáticas por las secuelas de infertilidad, EPI y embarazo ectópico. No obstante parece estar todavía muy lejos de nuestro alcance que en los países en vías de desarrollo se puedan implementar rutinariamente las metodologías moleculares por su alto costo de infraestructura y reactivos [Arango Álvaro, 2001].

## **PCR Tiempo Real**

Es un tipo de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original. El PCR tiempo real elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. Esta clase de PCR permite la ejecución de la técnica en un tiempo muy reducido, alrededor de 30 minutos. [Prats, 2006]. A diferencia del PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación de ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con PCR-RT esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada [Jalal Hamid, 2007].

El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia [Arango Álvaro, 2001].

El sistema utiliza los mismos ingredientes que un PCR convencional, sin embargo, a diferencia de aquella, la muestra no se coloca en un tubo convencional, sino en un tubo o un capilar, que permiten cambiar de temperatura en un tiempo muy inferior al de los instrumentos convencionales. El fragmento amplificado suele ser más corto que en la técnica convencional. Todo ello acelera la reacción. El termociclador y el lector han de ser específicos para esta prueba [Prats, 2006].

Las ventajas de PCR Tiempo Real es la rapidez, la precisión en la cuantificación, de los amplicones presentes en la muestra, la ausencia de post PCR ya que la identificación y el recuento de los amplicones se hacen simultáneamente en el mismo tubo o capilar. Mediante fluorocromos intercalados (SYBR Green) o la tecnología FRET y el menor riesgo de contaminaciones. La rapidez se debe fundamentalmente a mejoras instrumentales [Prats, 2006].

En la actualidad los métodos moleculares son una herramienta que complementan a los métodos convencionales y cuando son utilizados en investigaciones nos brindan una gama de información que puede ser utilizada para fortalecer la vigilancia epidemiológica.

## **2.11 Medidas de Prevención y Control**

Es necesario implementar estrategias efectivas para prevención y control que permitan realizar el diagnóstico correcto y oportuno, impartir consejería e intervenciones de comportamiento que ayudan a prevenir la adquisición de la infección por *Chlamydia trachomatis* y otras ITS haciendo énfasis en el cambio de comportamiento sexual [Rogers Susan M, 2002] y la utilización del condón.

Un requisito fundamental en el control y prevención de las ITS es un sistema de vigilancia nacional, puesto que provee datos estadísticos estimados cuantitativos de su incidencia y prevalencia que sirvan como herramienta en la evaluación de los esfuerzos de control.

Los métodos de diagnósticos actuales, permiten el establecimiento de sistemas multigradales y multifocales de vigilancia de la enfermedad. El nivel es local, estatal y nacional, el multifocal incluye grupos de riesgo, síndromes clínicos de particular importancia y la población en general. Un sistema de vigilancia a nivel nacional, requerirá que el estado emita leyes/normas que brinden apoyo a las actividades de prevención. La emisión de estas normas promueven el involucramiento de las autoridades del sistema de salud pública, asegurando un manejo adecuado de cada individuo, incluyendo la referencia de las parejas sexuales y puede facilitar actividades como la educación. La información de casos provee una base de informe para la descripción de la extensión y rumbo de la enfermedad.

Un manejo efectivo para las infecciones por *Chlamydia trachomatis* es la consejería a los pacientes. Tal consejería debe orientarse para influenciar un comportamiento específico que contribuya a una terapia exitosa, intervención y prevención de la enfermedad. Los folletos diseñados para su fácil comprensión son un medio eficiente de reunir información básica.

Las parejas sexuales de pacientes con infecciones por *Chlamydia trachomatis* deben ser referidas para atención médica a través del paciente o por el médico de la clínicas UMIETS. Aunque esta última opción requiere de tiempo, es muy efectiva. Esta referencia de las parejas por los pacientes es más práctica en términos de recursos humanos, pero su efectividad en la práctica no ha sido evaluada entre los pacientes con *Chlamydia trachomatis*.

De todos los intentos por controlar este agente etiológico el éxito en prevenir la infección inicial sigue siendo el más efectivo. La educación del público y a los profesionales de la salud es esencial para la prevención en todos los niveles especialmente ante la ausencia de una vacuna efectiva.

Es necesario la educación al público para brindar un alto nivel de conocimientos sobre las infecciones por *Chlamydia trachomatis* y otras ITS e influenciar a las personas a conocer y comunicar acerca de la prevención, reconocimiento de síntomas y tratamiento, apoyará los esfuerzos de control y reducir el riesgo de adquirir o transmitir la infección.

El entrenamiento al personal que suministra cuidados en salud, pueden jugar un rol importante en reducir la incidencia de *Chlamydia trachomatis* y sus complicaciones. El diagnóstico facultativo oportuno y el adecuado tratamiento de las infecciones por este agente infeccioso prevendrán su transmisión reduciendo el riesgo de efectos secundarios para el individuo infectado.

## CAPITULO 3

### METODOLOGIA

#### 3.1 Tipo y Universo del Estudio

El presente fue un estudio transversal, con consentimiento informado, dirigido a trabajadoras sexuales que acudieron a control a la Unidad de Manejo de las ITS (UMIETS). El universo de estudio estuvo comprendido por todas las trabajadoras sexuales que dieron su consentimiento de participación, mayores de edad que asistieron a control en las UMIETS (Centro de Salud Miguel Paz Barahona en San Pedro Sula y Centro de Salud Las Crucitas en Tegucigalpa) donde la Secretaría de Salud ha implementado con apoyo del Centro de Control de Enfermedades (CDC) la estrategia de Vigilancia Centinela de las ITS (VICITS).

La selección de la población se determinó por conveniencia y la investigación se realizó dentro de una logística implementada en las unidades de manejo de las ITS de la Secretaría de Salud facilitando así la captación de las muestras.

#### 3.2 Tamaño de Muestra

El tamaño de la muestra se estimó por conveniencia, esto fue recolectando la mayor cantidad de muestras posibles y basadas en los resultados de prevalencia obtenidos dentro del programa vigilancia centinela de las ITS para la genotipificación de las muestras positivas por *Chlamydia trachomatis*.

El tiempo comprendido para la recolección de las muestras fue de Marzo a Junio del 2011.

### **3.3 Criterio de Inclusión de Participantes**

El criterio de inclusión de participante fue: ser trabajadora sexual, mayor de edad y que asistió a control a las unidades de manejo de las infecciones de transmisión sexual ya sea por primera vez o reconsulta.

### **3.4 Consideraciones Éticas**

Se respetaron los códigos internacionales de ética en la investigación con seres humanos entre los que se destacan: El principio de respeto por las personas, el principio de confidencialidad, el principio de autonomía, el principio de beneficencia y el principio de justicia.

La participación fue voluntaria y por ende el participante llenó un consentimiento informado. Este proceso incluyó una entrevista estructurada para la explicación clara del estudio, donde se garantizó a cada mujer una información completa de la investigación, especialmente sobre los objetivos y se explicó de la necesidad de recolectar una segunda muestra endocervical adicional a la considerada en la rutina para el control y se aseguró la privacidad durante todo el proceso del estudio en el cual ella estuvo involucrada.

Se respetó la decisión de las personas que decidieron no participar en el estudio así como la posibilidad de retirarse cuando este haya comenzado o anular el consentimiento en cualquier momento que la persona lo decida, cumpliendo así con el principio de autonomía.

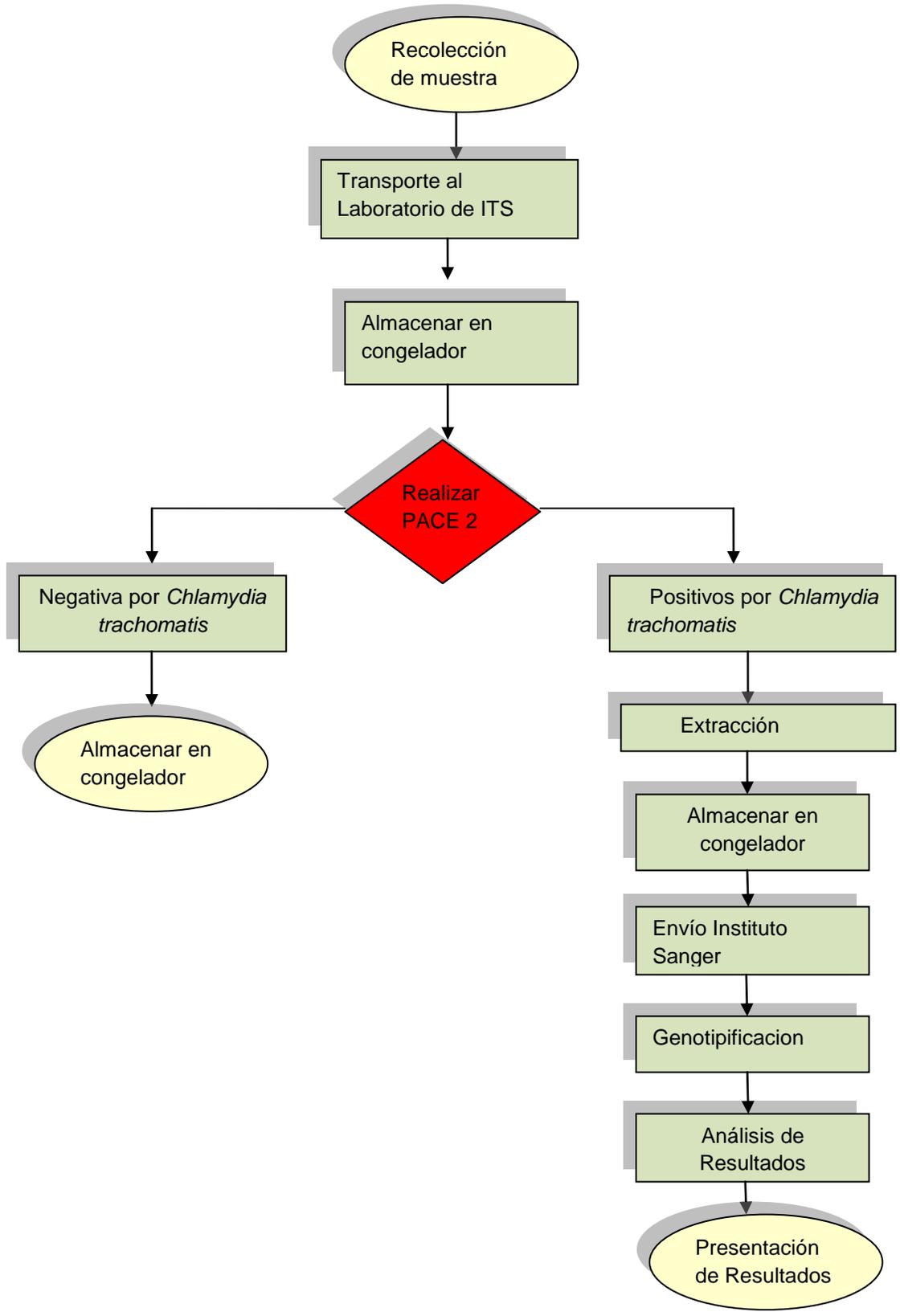
Se garantizó a cada participante la confidencialidad de la información en todo el proceso de la investigación, se utilizaron códigos y la información se manejó no ligada al participante. Para este proyecto el protocolo se sometió a consideración ante un Comité de Ética en donde realizaron sus consideraciones y recomendaciones.

### **3.5 Consideraciones de Bioseguridad**

Como los laboratorios conforman ambientes de trabajos especiales que pueden presentar riesgos químicos, físicos o biológicos se cumplieron con las Normas de Bioseguridad para trabajar *Chlamydia trachomatis* en un nivel de bioseguridad tipo II. Los procedimientos están descritos en los POES sobre “Manejo Almacenamiento y Transporte de Muestras” (anexos).

El estudio también fue sometido al comité de bioseguridad de la maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Universidad Autónoma de Honduras para la revisión y aprobación de las medidas de bioseguridad con respecto a recolección, manejo y transporte de muestras.

# Flujograma de Trabajo



## Procedimientos y Técnicas a Utilizar

### *Procedimiento de reclutamiento de participantes*

Basado en el criterio de inclusión, se reclutaron las trabajadoras sexuales que asistieron a control a la UMIETS de San Pedro Sula y Tegucigalpa. El médico les preguntó si aceptaban participar en la investigación, brindándoles la información necesaria y a las que aceptaron a participar se les leyó el consentimiento informado explicándoles la necesidad de la recolección de una segunda muestra de hisopado cervical, tal como se describe el POEs (anexos) sobre recolección de muestras cervicales. Las muestras se almacenaron y se transportaron al laboratorio de ITS según el procedimiento descrito en POEs (anexos) sobre manejo y transporte de muestras.

A todas las muestras se les hizo la técnica de PACE 2 Complete según procedimiento descrito en el POEs. A las muestras positivas por PACE 2 se procedió a realizar la técnica de GEN-PROBE *Chlamydia trachomatis*, y las positivas por esta técnica se reportó según lo establecido en la estrategia de vigilancia centinela de ITS y se procesó el segundo vial de la misma paciente realizando una extracción de ADN según procedimiento descrito en POEs (anexos). A las muestras positivas por clamidia se les realizó la técnica de PCR Tiempo Real para la genotipificación de *Chlamydia trachomatis* según el procedimiento descrito en POEs (anexos).

## CAPITULO 4

### RESULTADOS

#### Población en Estudio

A un grupo de 786 trabajadoras sexuales que asistieron a las UMIETS de San Pedro Sula y La Ceiba durante un período de 4 meses se les recolectaron muestras endocervicales con el objetivo de investigar *Chlamydia trachomatis*.

---

<b>UMIETS</b>	<b>Total de Muestras Recolectadas</b>	<b>Muestras Positivas por <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b>Porcentaje de Prevalencia</b>
MPB	366	35	9.6 %
Las Crucitas	420	26	6.2 %
<b>TOTAL</b>	<b>786</b>	<b>61</b>	<b>7.8%</b>

---

Cuadro 3 Total de Muestras Recolectadas y Porcentaje de Positivas por *Chlamydia trachomatis* según UMIETS

En el centro de salud Miguel Paz Barahona se recolectaron un total de 366 muestras de las cuales 35 fueron positivas por *Chlamydia trachomatis* (9.6 %) y 420 muestras recolectadas en Las Crucitas de las cuales 26 resultaron positivas por *Chlamydia trachomatis* (6.2 %) (Cuadro 3). De estas 786 muestras procesadas por la técnica de PACE 2 Complete de GENPROBE 61 (7.8%) resultaron positivas por *Chlamydia trachomatis*.

A todas las muestras positivas por *Chlamydia trachomatis* y un 10 % de las negativas fueron corridas por PCR para de determinación de  $\beta$  globina y ninguna inhibición fue detectada. Así mismo todas las muestras positivas por *Chlamydia trachomatis* diagnosticadas con la técnica PACE 2 de GENPROBE utilizada por la Secretaria de Salud en la estrategia VICITS fueron procesadas con la técnica de PCR Tiempo Real obteniéndose un 100 % de concordancia en los resultados entre ambas técnicas.

<b>Genotipos</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>J</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>K</b>
<b>Total</b>	20	20	8	5	5	2	1	0
<b>Porcentaje Prevalencia</b>	(32.8%)	(32.8%)	(13.1%)	(8.2%)	(8.2%)	(3.3%)	(1.6%)	

Cuadro 4

Total de genotipos encontrados

Se obtuvieron un total de 61 muestras positivas por *Chlamydia trachomatis* de las cuales todas fueron genotipificadas. Se encontraron siete diferentes genotipos en la población en estudio: E (32.8 %), F (32.8 %), D (13.1%), J (8.2 %), I (8.2%), G (3.3 %), H (1.6 %) y K (0). (Cuadro 4).

Los genotipos encontradas en ambas ciudades son similares sin embargo la frecuencia entre ellas muestran algunas diferencias, en la ciudad de San Pedro Sula, el genotipo E (37.1 %) fue el más frecuente seguido de los genotipos F (28.6%), D (14.3 %), J (11.4%), I (5.7%), G y H (2.9%). La única diferencia respecto a Tegucigalpa fue la mayor frecuencia del genotipo F (38.5%), seguido de los genotipos E (27 %), D y I (11.5%), G y J (3.8%) (Grafico 1).

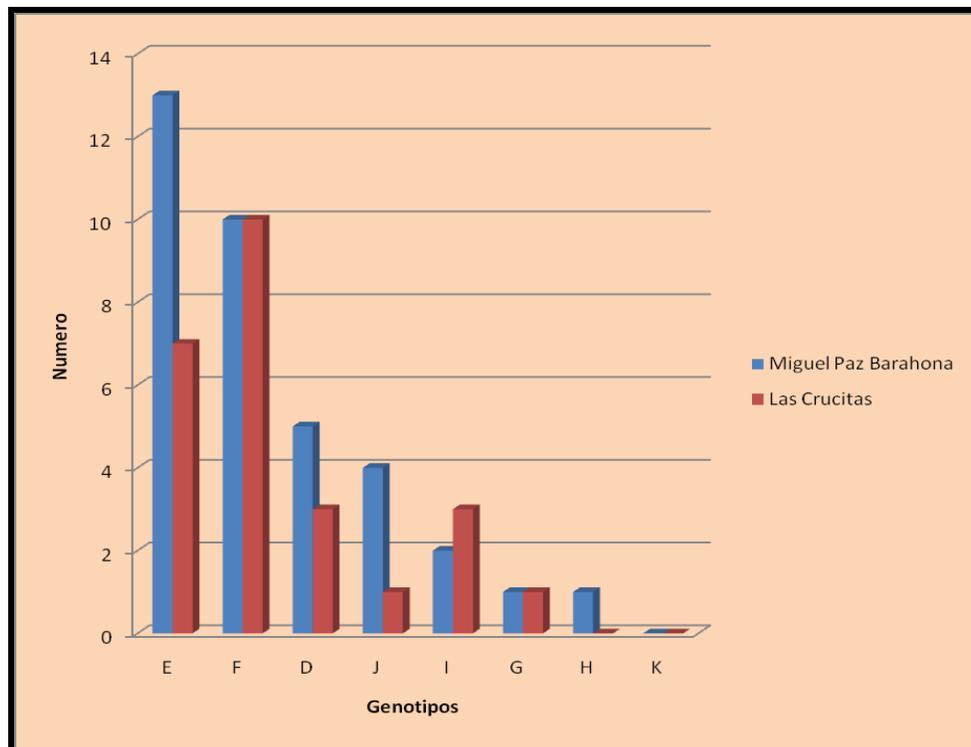


Grafico 1 Genotipos de *Chlamydia trachomatis* determinados en UMIET

## CAPITULO 5

### DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en el que se describen los genotipos circulantes de *Chlamydia trachomatis* en dos ciudades de Honduras en donde se encuentran sitios centinela para la vigilancia de las ITS en trabajadoras sexuales.

Los resultados de prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en Tegucigalpa (6.2%) y en San Pedro Sula (9.6%) nos demuestran que existe un problema frecuente en este grupo de población, por lo que es necesario lograr un mayor impacto en la reducción de este agente etiológico.

Realizando un análisis de la base de datos de VICITS durante los últimos tres años sobre el uso del condón en las trabajadoras sexuales se ha podido observar un incremento en la utilización del condón con clientes sin embargo es necesario fortalecer el uso del condón con parejas casuales y parejas estables. Así mismo esta base de datos demuestra que existe un 18 % de trabajadoras sexuales ambulantes lo que permite que estas emigren a otras partes del país lo que favorece la transmisión de *Chlamydia trachomatis* y a la vez permite que el control no sea constante.

En las dos ciudades de Honduras se encontraron siete diferentes genotipos en la población en estudio: E (32.8 %), F (32.8 %), D (13.1%), J (8.2 %), I (8.2%), G (3.3 %), H (1.6 %) y K (0).

Según asociaciones realizadas en otros países se observa que los genotipos D, E, y F prevalecen en infecciones urogenitales. Mujeres con genotipo F y G manifiestan dolor abdominal bajo y los grupo H y J producen síntomas de disuria y secreciones uretrales. Es importante considerar que el genotipo G de *Chlamydia trachomatis* está relacionado con cáncer cervical [Van Duynhoven Y.T.H.P, 1998].

Por el diseño del estudio no se pudo hacer ninguna relación entre los genotipos encontrados y las manifestaciones clínicas de las participantes en el momento de la recolección de las muestras. Esto hubiera podido ayudar a entender un poco más acerca de la epidemiología y patogénesis de las infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis*.

Estudios realizados en otras regiones del mundo reportan genotipos similares a los encontrados en las dos ciudades de Honduras, la diferencia radica en la frecuencia entre ellos. Los genotipos reportados en Costa Rica prevalece el genotipo E en un (4.3%) seguido del F (3.0%), D (2.9%) I (2.1%) [Porrás Carolina, 2008].

En Brasil se encontraron nueve diferentes genotipos: E (39.3%), F (16.6%), D (15.9 %), I (8.6%), J (7.4%), G (4.9%), K (3.1%) y H (2.4%) [Machado Ana, 2011]. La frecuencia reportada en una investigación en Estados Unidos se encuentra el genotipo E con mayor prevalencia (30%), seguido del genotipo F con (19%), los I y D con un (14%) [Fredlund Hans, 2004].

Este estudio de genotipificación de *Chlamydia trachomatis* sirve de base para estudios posteriores en donde se puede adquirir más conocimientos de caracterización molecular de este agente infeccioso contribuyendo así a la implementación de mejores métodos para el control, métodos diagnósticos y el diseño de tratamientos oportunos y efectivos para su erradicación.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

- Los genotipos de *Chlamydia trachomatis* encontradas en las ciudades de San Pedro Sula y Tegucigalpa son similares, sin embargo la frecuencia entre ellas muestran algunas diferencias.
- Los genotipos de *Chlamydia trachomatis* determinados en las dos ciudades de Honduras son similares a los encontrados en el Continente Americano en donde el genotipo E, F y D son los más prevalentes.
- Se encontró una prevalencia más alta de la infección por *Chlamydia trachomatis* en San Pedro Sula (9.6%) que en Tegucigalpa (6.2%).
- Hubo un 100% de concordancia entre las muestras positivas por *Chlamydia trachomatis* diagnosticadas por PACE 2 de GENPROBE y el PCR Tiempo Real, demostrando que el PACE 2 es una buena opción para el diagnóstico etiológico de *Chlamydia trachomatis*.

## CAPITULO 7

### RECOMENDACIONES

- Diseñar estudios en los que se pueda asociar los genotipos con manifestaciones clínicas y factores como edad, procedencia de las participantes, ampliando el tiempo de recolección de muestras.
- Realizar estudios sobre prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y otros ITS en población general .
- Diseñar estrategias que ayuden a disminuir la prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales que asisten a control al Centro de Salud Miguel Paz Barahona.

## CAPITULO 8

### REFERENCIAS

- Akers Johnny C TM. 2006. Molecular Mechanism of Tryptophan-Dependent Transcriptional Regulation in *Chlamydia trachomatis*. Journal of Bacteriology 188, N°12:4236-4243.
- Albert John P. Chlamydial Infections. Current Clinical Practice: Sexually Transmitted Diseases:127-130.
- Arango Alvaro MS, Virbal Jorge,. 2001. *Chlamydia trachomatis*:Aspectos Microbiològicos.Clìnicos y Epidemiològicos. MVZ-CORDOBA 6:87-96.
- Arràiz Naillet MR, Urdaneta Baldimiro,Colina Sonia,Romero Zoila. 2008. Diagnòstico Molecular en la evaluaciòn de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. Revista Obstetricia Ginecologica Venezolana 68:195-201.
- Beni Behrouz Taheri MH, Ardakani Roayaei. 2010. Genotyping of the prevalent *Chlamydia trachomatis* strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. Journal of Medical Microbiology 59:1023-1028.
- Black Carolyn M. 1997. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. Clinical microbiology 10:160-184.
- Cacho Juana SF, Blanco Maria Antonia. 2001. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: necesidad urgente de detecciòn y tratamiento en mujeres. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica 19, N°9:419-421.
- CDC DdIVSdISdSy. 2008. Encuesta Centroamericana de Vigilancia de Comportamiento Sexual y Prevalencia de VIH e ITS en Poblaciones Vulnerables: Trabajadoras Sexuales.3- 38
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. MMWR 42:1-39.

- Cervantes G Estrella. 2009. Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*.  
Revista Facultad Medica UNAM la Sociedad Venezolana de Microbiología  
52 N°1:18-22.
- Chalker V.J VH, Patel P, Rossouw A, Seyedzadeh H, Gerrard K, James V. L. A.,  
2005. External Quality Assessment for Detection of *Chlamydia trachomatis*  
Journal of Clinical Microbiology 43 N° 3:1341-1347.
- Chen Cheng-Yen CK-H, Alexander Sarah, Martin Iona M.C, Liu Hsi, Ison Cathy A,  
Ballard Ronald C. . 2007. The Molecular Diagnosis of Lymphogranuloma  
Venereum: Evaluation of a Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction  
Test Using Rectal and Urethral Specimens. Sexually Transmitted Diseases  
34 N°7:451-455.
- Dean Deborah MK. 1997. Molecular and Mutation Trends Analyses of *omp1*  
Alleles for Serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Journal Clinical Investigation  
99:475-483.
- Dean Deborah BWJ, Wan Raymond, Gomes Joao P, Devignot Stéphanie, Mehari  
Tigist, de Vries Henry J.C, Morré Servaas A, Myers Garry, Read Timothy D,  
Spratt Brian G. 2009. Predicting Phenotype and Emerging Strains among  
*Chlamydia trachomatis* Infections. Emerging Infections Diseases 15:1385-  
1394.
- Dean Deborah KPR, Adhikari K. Him, Hessel Tracey. 2008. Multiple  
Chlamydiaceae Species in Trachoma: Implications for Disease Pathogenesis  
and Control. Plos Medicine 5(1):57-66.
- Dean Deborah SRJ, Stamm Walter E. 2000. Evidence for Long-Term Cervical  
Persistence of *Chlamydia trachomatis* by *omp1* Genotyping. The Journal of  
Infectious Diseases 182:909 - 916.
- Departamento de ITS/VIH/SIDA de la Secretaria de Salud C. 2008. Encuesta  
Centroamericana de Vigilancia de Comportamiento Sexual y Prevalencia de  
VIH e ITS en Poblaciones Vulnerables: Trabajadoras Sexuales. 3- 38.

- Diazaraque RPRyRJC. 2002. Reacciòn en Cadena de la Polimerasa. Fundamentos y Aplicaciòn en Medicina Interna. Revista Clinica Española 5:272-274.
- Everett KD BR, Andersen AA,. 1999. 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 genjus and five new species and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol:415-440.
- Falk Lars. 2009. Anogenital *Chlamydia trachomatis* Infection Including Lymphogranuloma Venereum. Forum for Nord Derm Ven vol 14 N° 4:101-103.
- Ficarra Mercedes IJSA, Poretta Constance, Ma Liang, Myers Leann, Taylor Stephanie N , Greene Sheila, Smith Barbara, Hagensee Michael,Martin David H, Quayle Alison J 2008. A Distinct Cellular Profile is Seen in the Human Endocervix During *Chlamydia trachomatis* Infection. Am J Reprod Immunol 60 (5):415-425.
- Fredlund Hans FL, Jurstrand Margaretha,Unemo Magnus. 2004. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions AMPIS 112:771-784.
- Gaydos Charlotte A TM, Dalesio Nicholas, Wood Billie Jo, Quinn Thomas C. 2004. Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens. Journal of Clinical Microbiology 42 N° 7:3041-3045.
- Geisler William M SRJ, Rockey Daniel D, Stamm Walter E,. 2001. Epidemiology and Clinical Manifestations of Unique *Chlamydia trachomatis* Isolates That Occupy Nonfusogenic Inclusions. The Journal of Infectious Diseases 184:879 - 884.
- Geisler William M WC, Morrison Sandra G, Black Carolyn M, Bandea Claudiu, Hook III Edward W,. 2008. The Natural History of Untreated *Chlamydia trachomatis* Infection in the Interval Between Screening and Returning for Treatment. Sexually Transmitted Diseases 35 N° 2:119-123.
- George Joyee A PTS, Paramasivan Rajendran,Balasubramanian Sowmya, Chakrapani Venkatesan, Murugan Ganapathy. 2003. Evaluation of Diagnostic Efficacy of PCR Methods for *Chlamydia trachomatis* Infection in Genital and Urine Specimens of Symptomatic Men and Women in India. Jpn J Infect Dis 56:88-92.

- Jalal Hamid SH, Curran Martin D, Burton Janet, Bradley Michelle, Carne Christopher. 2006. Development and Validation of a Rotor-Gene Real Time PCR Assay for Detection, Identification and Quantification of *Chlamydia trachomatis* in a Single Reaction. *Journal Clinical Microbiology* 44:206-213
- Jalal Hamid SH, Alexander Sarah, Carne Christopher, Sonnex Christopher. 2007. Development of Real- Time PCR Assays for Genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 45, N°8:2649 - 2653.
- Jones R.B. Van Der Pol B MD, Shepard MK. Partial 1990. Partial Characterization of *Chlamydia trachomatis* Isolates Resistant to Multiple Antibiotics. *Journal Infectious Diseases* 162:1309-1315.
- klint Markus FH-H, Goldkuhl Röstlinger Renée, Skarin Hanna, Rutemark Christian, Andersson Siv G. E, Persson Kenneth, Herrmann Björn 2007. High-Resolution Genotyping of *Chlamydia trachomatis* Strains by Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 45 N° 5:1410-1414.
- LefevreJC LJ, GuionD, Bei S. 1997. Tetracycline resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse , France. *Pathology Biology* 45:376-378.
- Lima Haleta E OMB, Valente Brenda G, Afonso Daniela A.F, Darocha Wanderson D, Souza Maria Do Carmo, Alvim Tulio C, Barbarosa-Stancioli Edel F, Motta Noronha Fátima Soares. 2007. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* From Endocervical Specimens in Brazil. *Sexually Transmitted Diseases* 34 N° 9:709 - 717.
- Lister N.A TSN, Fairley C.K, Garland S. 2004. Validation of Roche COBAS Amplicor Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Rectal and Pharyngeal Specimens by an *omp1* PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 42 N°1:239-241
- Martínez Angèlica M. 2009. Diagnòstico Microbiològico de las Infecciones Transmisiòn Sexual (ITS). Parte 1 ITS no virales *Clinical Infectology* vol. 26:529 -539.
- Morrison Richard P. 2003. New insights into a persistent problem-chlamydial infeccions. *The Journal of Clinical Investigation* 111 1647-1649.
- Moulder JW. 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro, . *microbiology* 55:143-190.

- Murray Patrick R RKS, Kobayashi George S, Pfaller Michael A, editor. 2002. Microbiologia Mèdica, Cuarta Ediciòn. Cuarta Ediciòn ed. 405-413 p.
- Ostos Ortiz Olga Lucia SRM. 2003. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. NOVA PUBLICACIÒN CIENTÌFICA 1 N° 1 81-93.
- Petrovay Fruzsina BE, Nèmeth István and Gõnczol Éva. 2009. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from the endocervical specimens of high-risk women in Hungary. Journal of Medical Microbiology 58:760-764.
- Piñeiro Luis MM, Gil-Setas Alberto, Camino Xabier, Echeverria Maria Julia, Cilla Gustavo. 2009. Genotipado de *Chlamydia trachomatis* en un àrea del norte de España. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica 27, N°8:462-464.
- Porras Carolina SM, González Paula, Hildesheim Allan, Silva Sandra, Schiffman Mark, Rodríguez Ana Cecilia, Wacholder Sholom, FQuint Koen, Bratti Concepción, Espinoza Albert, Cortes Bernal, Herrero Rolando. 2008. Epidemiology of Genital *Chlamydia trachomatis* Infection Among Young Women in Costa Rica. Sexually Transmitted Diseases 35 N° 5:461-468.
- Phillips Albert John. Chlamydial Infections. Current Clinical Practice: Sexually Transmitted Diseases:127-130.
- Rank R. 1999. Models of immunity, Chlamydia intracellular biology, pathogenesis and immunity. ASM Press:239-296.
- Rogers Susan M MHG, Miller William C, Zenilman Jonathan M, Turner Charles F, . 2002. NAAT-Identified and Self- Reported Gonorrhea and Chlamydial Infections. Sexually Transmitted Diseases 29 N° 10:588-596.
- Somani Jyoti BVB, Workowski Kimberly A, Farshy Carol E, Black Carolyn M. 2000. Multiple Drug-Resistant Chlamydia trachomatis Associated with Clinical Treatment Failure. The Journal of Infectious Diseases 181:1421-1427.
- Stamm Walter E. 2001. *Chlamydia trachomatis*- The Persistent Pathogen. Sexually Transmitted Diseases 28 N° 12:684-688.

- Sylan SPE HJ. 2009. Efficacy of partner notification for *Chlamydia trachomatis* among young adults in youth health centres in Uppsala County, Sweden. Journal European Academy of Dermatology and Venerology:1-5.
- Sylvan Staffan P.E KGV, Tiveljung A, Siwerth Britt-Marie, Henriksson Lisbeth, Norén Lena, ASP Anna- Karin, Grillner Lena. 2002. Screening and Genotyping of Genital Chlamydia trachomatis in Urine Specimens From Male and Female Clients of Youth-Health Centers in Stockholm County. Sexually Transmitted Diseases. p 379-385.
- Unemo M OP, Stadling I Agnè, Feldt A, Jurstrand M, Herrmann B, Persoon K , Nilsson P , Ripa T, Fredlund H 2007. Experiences With the New Genetic Variant of Chlamydia Trachomatis in Örebro County , Sweden - Proportion , Characteristics and Effective Diagnostic Solutuion in an Emergent Situation EUROSURVEILLANCE 12(3-6):142-144.
- Van Duynhoven Y.T.H.P OJM, Derksen-Nawrocki R.P, Van der Meijden W.I, Van de Laar M.J.W,. 1998. *Chlamydia trachomatis* Genotypes:Correlation with Clinical Manifestations of Infection and Patients` Characeristics. Clinical Infectious Diseases 26 314 - 322.
- Vilchez Glenda AG. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29:6-12.
- Wang SP GJ. 1963. Classification of trachoma virus strains by protection of mice from from toxic death. Journal Clinical Investigation 90:849-856.
- White Rachel PK. 2004. *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid Amplification Tests(NAATs):Review of evaluation literature. MHRA: 1-10.
- Zelaya Ada Argentina, editor. 2009. Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico. 61 p

## ANEXOS

### Anexo 1: Convenio de Consentimiento Informado

#### INFORMACION GENERAL

En la Unidad de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual (UMIETS) se va a realizar un proyecto piloto de investigación sobre la "Genotipificación de *Chlamydia trachomatis* en Trabajadoras Sexuales en Honduras".

Se les está haciendo una invitación a las trabajadoras sexuales que asisten a control a las UMIETS a participar en dicho estudio. Su participación es voluntaria y pueden tomarse el tiempo que desee para reflexionar si quiere participar o no. Le daremos una información general sobre la investigación y si no comprende alguna información sienta la libertad de preguntar.

La infección por *Chlamydia trachomatis* es un problema significativo de Salud Pública y puede ser el agente causal de varias infecciones como tracoma, linfogranuloma venéreo, cervicitis y otras manifestaciones genitales. {G., 2009 #25}

La infección por *Chlamydia trachomatis* es difícil ya que hay un gran número de de casos que son asintomáticos y puede pasar desapercibido.

Es muy frecuente en mujeres jóvenes sexualmente activas y en edad fértil las cuales son las que se ven más afectadas. En embarazadas aumenta el riesgo de parto prematuro y de endometritis posparto. {Martínez, 2009 #8}

Este estudio será una herramienta valiosa para la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad y así poder diseñar estrategias de intervención para disminuir la incidencia y prevalencia de la infección, especialmente en la población de mujeres.

Si decide participar en este estudio se recolectará una muestra de secreción cervical adicional a la que le recolectamos normalmente en el control la cual se procesará para establecer el genotipo de *Chlamydia trachomatis*.

Todos los resultados del genotipo serán estrictamente confidenciales y solamente podrá conocerlo los investigadores de este proyecto. Respetamos su decisión al respecto.

### **BENEFICIOS AL PARTICIPAR:**

Si usted participa en el estudio tienen la opción de los siguientes beneficios:

Recibirá información amplia, independientemente de su raza, edad, clase social, escolaridad y religión, sobre las Infecciones de transmisión sexual especialmente la causada por *Chlamydia trachomatis*. Además, ayudara a los investigadores de este estudio a entender la problemática de estas enfermedades que circulan en el país ayudando a determinar como solucionarlas.

El examen que se realizara será gratuito.

### **RIESGOS:**

Están relacionados especialmente a los aspectos que tienen que ver con la incomodidad de la recolección de una segunda muestra, y la inversión de tiempo para participar en el estudio.

Los riesgos físicos son mínimos ya que el médico recolecta la muestra con todas las precauciones del caso.

¿Tiene usted alguna pregunta acerca de la información que se le acaba de explicar?

En caso de que usted presente algún problema relacionado con este estudio debe comunicarse personalmente con la Dra. Suyapa Mendoza al teléfono 99804064 o si prefiere con el doctor que le brinda atención médica.

### **DECLARACIÓN DE LA PARTICIPANTE**

Código:

He leído o se me ha leído el contenido de este documento. Se me han brindado amplias explicaciones en cuanto a mi participación en esta investigación y se me ha dado la oportunidad de hacer cualquier pregunta, las cuales han sido contestadas a mi entera satisfacción; se me garantiza que toda la información

relacionada a mi participación en este estudio es estrictamente privada y me reservo el derecho a abandonar el estudio en cualquier momento; mi decisión de abandonarlo o permanecer en el, no afectará los otros servicios de atención que recibo en este centro de salud.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación.

Deseo recibir los resultados de la misma  SI  No

Firma o huella digital \_\_\_\_\_

Tarjeta de identidad \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

#### Declaración del Proveedor de Salud

Yo, el/la abajo suscrita, he explicado a la usuaria, en lenguaje comprensible, los procedimientos, beneficios y riesgos que implica participar en esta investigación.

Firma de Proveedor de Salud \_\_\_\_\_

No de Tarjeta de Identidad \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**Anexo 2: Boleta de solicitud y Resultado de PACE 2**





Secretaría de Salud de Honduras  
Departamento Laboratorio Nacional - VICITS

**Solicitud de Exámen para investigar Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis, PACE 2**

No. Hist Clínica: \_\_\_\_\_ Apellido paterno: \_\_\_\_\_ Apellido materno: \_\_\_\_\_ Nombres: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

VICITS: \_\_\_\_\_

Muestra  
 Recuento

Prueba	
PACE 2	<input type="checkbox"/>

\_\_\_\_\_  
Firma Del Médico o Enfermera

Forma LAB-ITS 10 b





Secretaría de Salud de Honduras  
Departamento Laboratorio Nacional - VICITS

**Resultado de Exámen para investigar Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis, PACE 2**

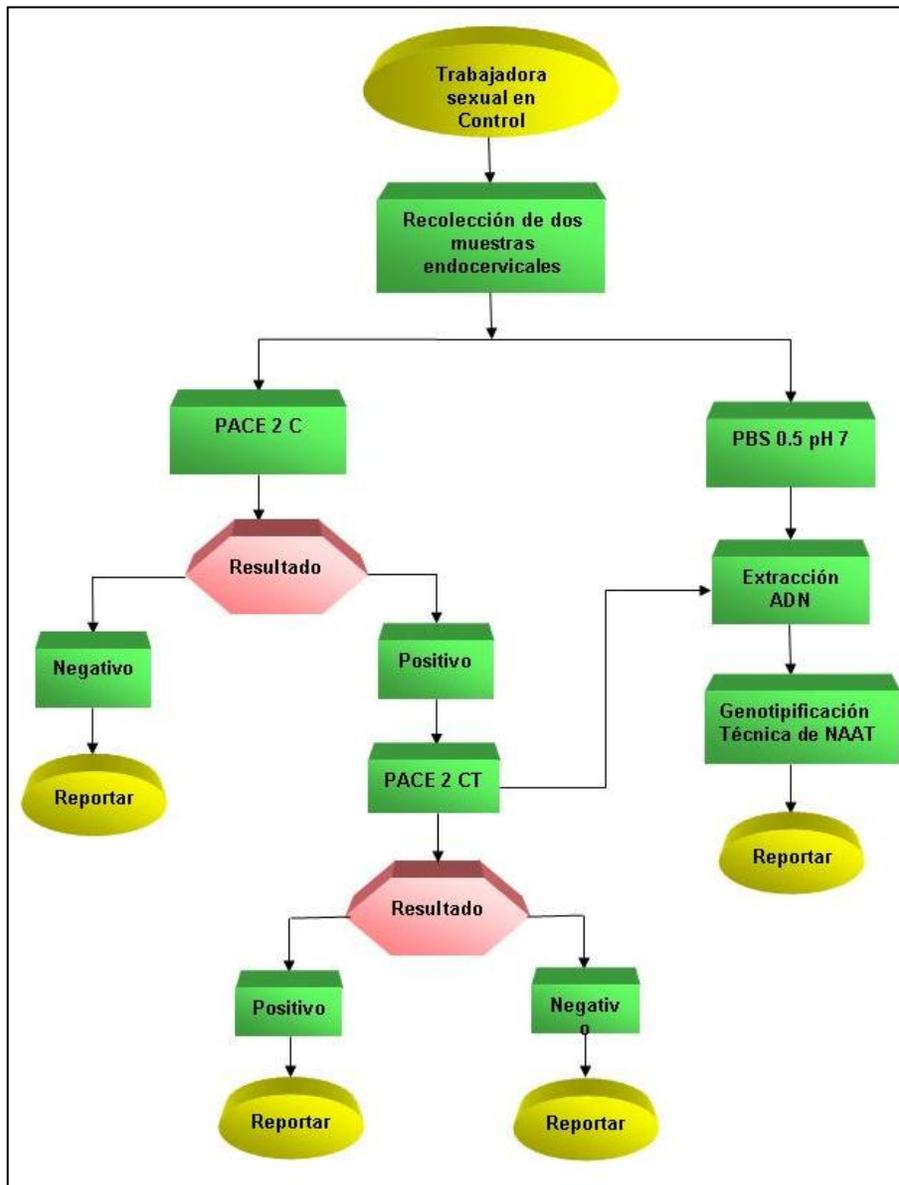
Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

PACE 2		
Microorganismo	Positivo	Negativo
Neisseria gonorrhoeae	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Chlamydia trachomatis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

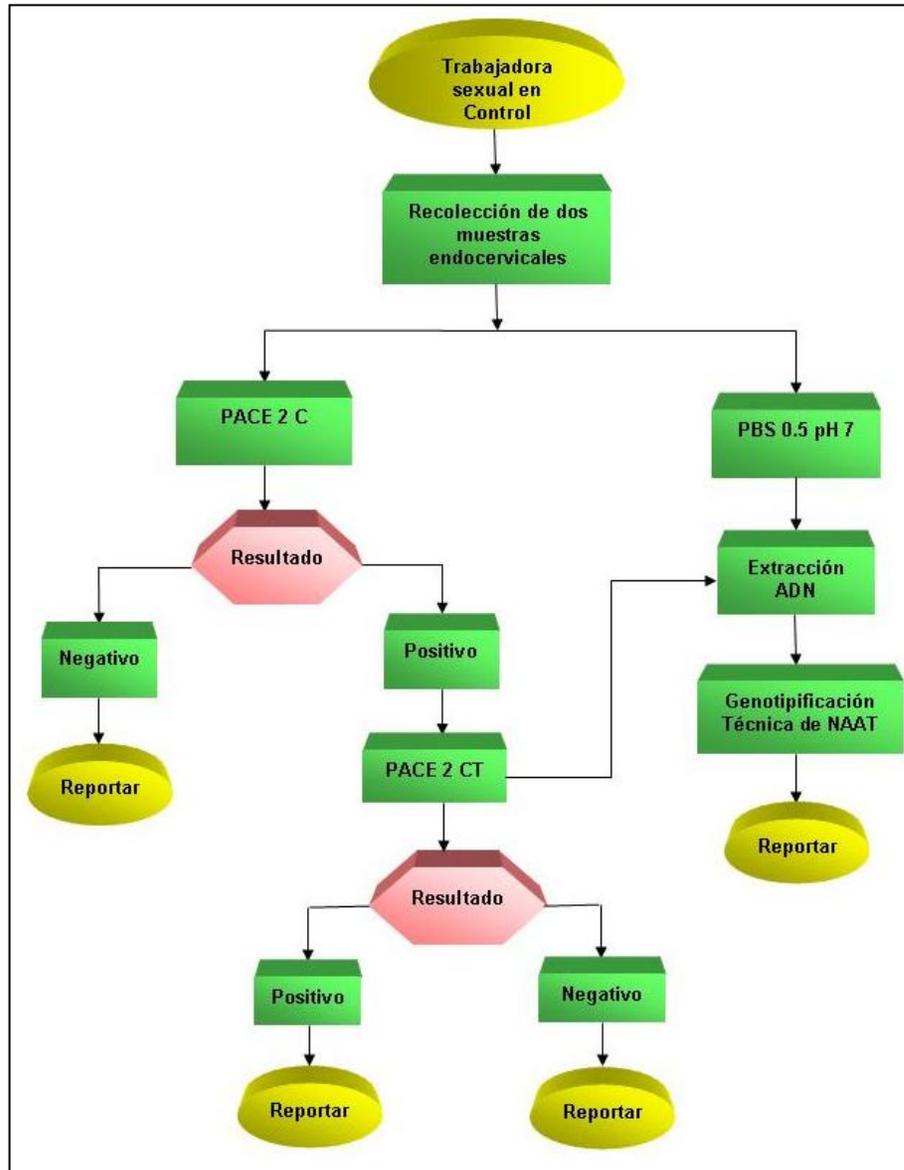
\_\_\_\_\_  
Firma Del Microbiólogo o Técnico De Laboratorio

Forma LAB-ITS 10 b

Anexo 3: Flujograma de Recolección, Manejo y Transporte

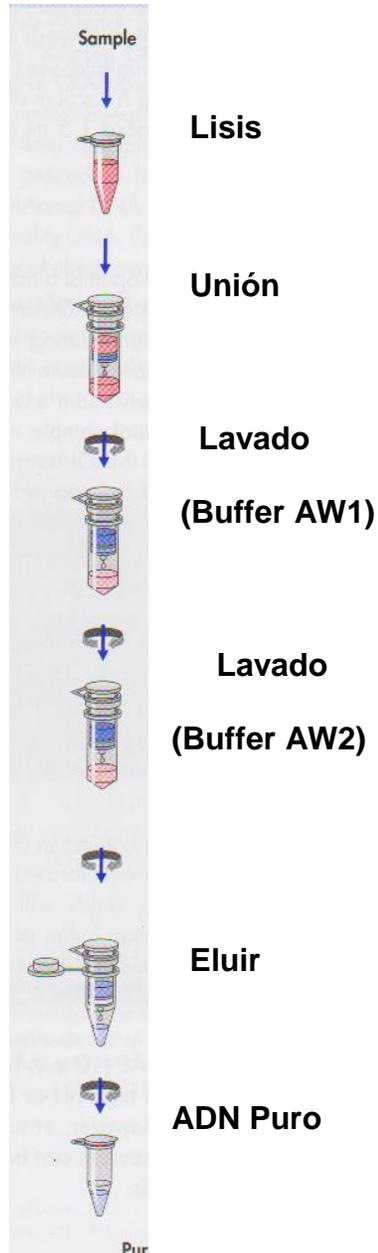


Anexo 4: Flujograma de Manejo de Muestras



**Anexo 5:**

**Proceso de Extracción**



**Anexo 6: Procedimientos Estándar Operativos**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar Para la Recolección, Transporte  
y Almacenamiento de Muestra Cervical para la investigación de  
*Chlamydia trachomatis***

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 5 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
	Portada	1
	Índice	2
I.	OBJETO	3
II.	ALCANCE	3
III.	RESPONSABILIDADES	3
IV.	DEFINICIONES	3
V.	PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	3
VI.	PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	4
VII.	INTERFERENCIAS	4
VIII.	CALIFICACION DEL PERSONAL	5
IX.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	5
X.	PROCEDIMIENTOS	5
	1. Recolección de muestra	5
	2. Transporte	6
	3. Identificación de Hieleras	7
	4. Almacenamiento	9
XI.	ANEXOS	10
	Anexo 1: Solicitud de Examen para investigar Chlamydia trachomatis PACE 2	10
	Anexo 2: Hoja de Consentimiento informado	11
	Anexo 3: Diagrama para la recolecta de muestra endocervical	13
XII.	REFERENCIAS	16

## **I. OBJETO**

Con este procedimiento se describe el proceso detallado para la recolección, transporte, manejo y preservación de muestras de hisopado endocervical para la investigación de genotipos de *Chlamydia trachomatis*.

## **II. ALCANCE**

Este procedimiento será el utilizado por el personal médico, microbiólogos de Centro de salud y del Laboratorio Central de ITS para realizar la recolección, transporte manejo y preservación de muestras de hisopado endocervical para el trabajo de investigación de “Genotipificación de *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales en Unidades de Manejo Integral de las ITS (UMIETS) de Honduras.

## **III. RESPONSABILIDADES**

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para el personal médico y microbiólogos involucrados en el trabajo de investigación.

## **IV. DEFINICIONES**

**PBS** Peptone Buffer Solution

## **V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD**

1. Lavado adecuado de las manos antes y después de la recolección y manejo de muestras.
2. Es obligatorio el uso de gabacha manga larga para protección personal.
3. Se utilizarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y rostro de salpicaduras.
4. No se utilizará ningún dispositivo o prendas de protección fuera del laboratorio (cafeterías, oficinas, sala para el personal, baño etc.)
5. En el sitio de recolección de muestra estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos, peinarse, manipular lentes de contactos.
6. En el laboratorio estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en la refrigeradora donde se almacenarán las muestras.

## **En caso que se produzca derrame de muestra**

1. Utilizar guantes y ropa protectora, e incluso protección facial y ocular.
2. Cubrir el derrame con paños o papel absorbente para contenerlo.
3. Verter un desinfectante apropiado sobre el papel absorbente y la zona inmediatamente circundante en general, son apropiadas las soluciones de lejía al 5%.
4. Aplicar el desinfectante en círculos concéntricos, comenzando por el exterior de la superficie del derrame y procedimiento hacía el centro.
5. Después de 30 minutos retirar todos los materiales.
6. Limpiar y desinfectar la zona afectada por el derrame.
7. Colocar el material contaminado en un recipiente para desechos a prueba de fugas y perforaciones.

## **VI. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN**

1. Usar guantes para la colecta y el manejo de la muestras
2. En el tubo que contiene el PBS este deberá estar a temperatura ambiente.
3. Asegurarse que los tubos de PACE 2 y los viales de PBS, una vez tomada las muestras queden bien tapados antes de transportarlos y almacenarlos
4. Las muestras para PACE 2 deben ser examinadas en un lapso de 7 días a partir de la fecha de recolección.

## **VII. INTERFERENCIAS**

Es importante que antes de recolección de muestra cervical, el médico no debe utilizar antisépticos, anestésicos, ni lubricantes, ya que esos productos pueden causar interferencias al momento de investigar la presencia de algún patógeno.

En el momento de la recolección de la muestra cervical evitar el contacto con la mucosa de la vagina.

## **VIII. CALIFICACION DEL PERSONAL**

El personal responsable para la recolección de este tipo de muestra es el médico que atiende las Unidades donde hay sitio centinela.

Para el manejo y transporte de la muestra son responsables los Microbiólogos jefes de laboratorios de las UMIETS y microbiólogos en servicio social.

En ambos casos el personal debe estar debidamente capacitado para realizar estas operaciones.

## **IX. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

1. Espéculos
2. Camilla ginecológica
3. Lámpara de ganso
4. Kit recolección de muestra de PACE 2
5. Guantes estériles
6. Viales con PBS 0.5 pH 7,
7. Tubos de PACE2
8. Gradillas
9. Bolsas tipo Ziploc
10. Hieleras con paquetes refrigerantes
11. Hisopos plásticos

## **X. PROCEDIMIENTOS**

### **1. Recolección de muestra**

1.1. Antes de realizar la recolección de muestra el médico tiene que rotular un vial con PBS y un tubo de PACE 2 con el nombre del participante y/o número de expediente, así mismo llenar la hoja de consentimiento informado (Anexo 2) donde el participante accede a la segunda recolección de muestra cervical y la Solicitud de Examen para investigar Chlamydia trachomatis PACE 2 (Anexo 1)

1.2. Remover el exceso de moco del cérvix utilizando uno de los hisopos del kit de recolección de muestra.

- 1.3. Insertar el espéculo no lubricado de modo que se vea el cérvix.
- 1.4. Recolectar la muestra del canal endocervical, introduciendo un hisopo estéril, hasta 2cm. en el interior del conducto cervical, haciéndolo girar y moviéndolo suavemente de lado a lado durante 10-30 segundos para asegurarse de obtener una buena muestra.
- 1.5. Retirar el hisopo cuidadosamente y evitar contacto con la mucosa.
- 1.6. Introducir el hisopo inmediatamente en el tubo de PACE 2.
- 1.7. Con otro hisopo estéril repetir el paso que se describe en 1.4 e introducirlo en el vial que contiene el PBS.

## 2. Transporte de muestras

- 2.1. Las muestras recolectadas en los viales de PBS y los tubos de PACE2 se hacen llegar el mismo día al final de la jornada al laboratorio del Centro de Salud.
- 2.2. El personal del laboratorio del Centro de Salud, recibe los viales y tubos de las muestras, revisa su identificación y almacena en refrigeración los tubos de PACE 2 y en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  los viales de PBS.
- 2.3. En el término no mayor de 7 días, las muestras deben ser transportadas al Laboratorio Central de ITS.
- 2.4. Colocar en una hielera los viales y tubos bien tapados, preferiblemente en una gradilla para evitar derrame.
- 2.5. Si no cuenta con una gradilla coloque el tubo en una bolsa que contenga papel absorbente en cantidad suficiente de manera que absorba la totalidad de la muestra en caso de derrame o rotura del tubo.



- 2.6. Esta bolsa sellada debe colocarse dentro de una hielera con paquetes refrigerantes (Ice Pack).



2.7. Asegurar que el tiempo de transporte no sea mayor de 24 horas.

### **3. Identificación de Hieleras**

El personal de Laboratorio del centro de Salud elabora 2 etiquetas para colocar afuera de la hielera:

- a. La primera etiqueta debe contener la información del receptor de las muestra.

**Dra. Suyapa Mendoza, Sección  
de ITS Laboratorio Nacional  
Tercer Piso**

**Centro de Salud Alonso Suazo**

**Teacucialpa. Honduras. C.A.**

- b. La segunda etiqueta debe contener el nombre y dirección del que envía la muestra.

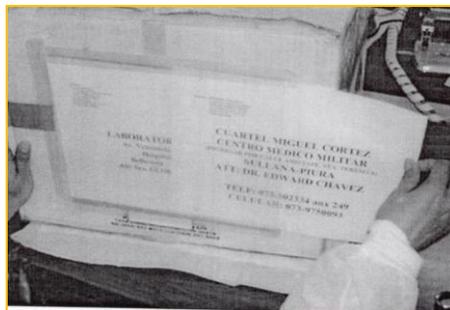
Ej.



- c. Ambas etiquetas deberán ser colocadas y adheridas en la hielera dentro de una bolsa plástica para protección.



- d. Para devolver el termo o hielera a la unidad de Salud que envió las muestras sacará la etiqueta del receptor y solo se deberá mostrar la etiqueta con el nombre y dirección del que envió las muestras.



#### 4. Almacenamiento de muestras

- 4.1. Las muestras son recibidas por el personal de microbiología del Laboratorio Central de ITS, corroborando su correcta identificación y luego son clasificadas
- 4.2. En el laboratorio de ITS inmediatamente el tubo de PBS se congelará a -20°C. y el tubo de PACE en refrigeración hasta su procesamiento.
- 4.3. Se apartarán las muestras de PBS que resulten positivas por *Chlamydia trachomatis* por la técnica de PACE 2 para continuar su procesamiento.
- 4.4. Semanalmente se realizará la extracción de ADN en las muestras positivas que se encuentran en PBS, en el Laboratorio de la MEIZ.  
(Ver POE de Extracción de muestra cervical)

**XI. ANEXOS**

**Anexo 1: Solicitud de Examen para investigar Chlamydia trachomatis  
PACE 2**

**SECRETARÍA DE SALUD**  
Honduras

**CDC**

**Secretaría de Salud de Honduras**  
Departamento Laboratorio Nacional - VICITS

**Solicitud de Exámen para Investigar Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis, PACE 2**

No. Hist Clínica:

Apellido paterno:

Apellido materno:

Nombres:

Fecha:  /  /

**VICITS**

Nueva

Reconsulta

**Prueba**

PACE 2

\_\_\_\_\_  
Firma Del Médico o Enfermera

Forma LAB-ITS 10 b

## Anexo 2

### CONVENIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### INFORMACION GENERAL

En la Unidad de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual (UMIETS) se va a realizar un proyecto piloto de investigación sobre la "Genotipificación de *Chlamydia trachomatis* en Trabajadoras Sexuales en Honduras".

Se les está haciendo una invitación a las trabajadoras sexuales que asisten a control a las UMIETS a participar en dicho estudio. Su participación es voluntaria y pueden tomarse el tiempo que desee para reflexionar si quiere participar o no. Le daremos una información general sobre la investigación y si no comprende alguna información sienta la libertad de preguntar.

La infección por *Chlamydia trachomatis* es un problema significativo de Salud Pública y puede ser el agente causal de varias infecciones como tracoma, linfogranuloma venéreo, cervicitis y otras manifestaciones genitales.

La infección por *Chlamydia trachomatis* es difícil ya que hay un gran número de de casos que son asintomáticos y puede pasar desapercibido.

Es muy frecuente en mujeres jóvenes sexualmente activas y en edad fértil las cuales son las que se ven más afectadas. En embarazadas aumenta el riesgo de parto prematuro y de endometritis posparto.

Este estudio será una herramienta valiosa para la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad y así poder diseñar estrategias de intervención para disminuir la incidencia y prevalencia de la infección, especialmente en la población de mujeres.

Si decide participar en este estudio se recolectara una muestra de secreción cervical adicional a la que le recolectamos normalmente en el control la cual se procesara para establecer el genotipo de *Chlamydia trachomatis*.

Todos los resultados del genotipo serán estrictamente confidenciales y solamente podrá conocerlo los investigadores de este proyecto. Respetamos su decisión al respecto.

### **BENEFICIOS AL PARTICIPAR:**

Si usted participa en el estudio tienen la opción de los siguientes beneficios:

Recibirá información amplia, independientemente de su raza, edad, clase social, escolaridad y religión, sobre las Infecciones de transmisión sexual especialmente la causada por *Chlamydia trachomatis*. Además, ayudara a los investigadores de este estudio a entender la problemática de estas enfermedades que circulan en el país ayudando a determinar como solucionarlas.

El examen que se realizara será gratuito.

### **RIESGOS:**

Están relacionados especialmente a los aspectos que tienen que ver con la incomodidad de la recolección de una segunda muestra, y la inversión de tiempo para participar en el estudio.

Los riesgos físicos son mínimos ya que el médico recolecta la muestra con todas las precauciones del caso.

¿Tiene usted alguna pregunta acerca de la información que se le acaba de explicar?

En caso de que usted presente algún problema relacionado con este estudio debe comunicarse personalmente con la Dra. Suyapa Mendoza al teléfono 99804064 o si prefiere con el doctor que le brinda atención médica.

### **DECLARACIÓN DE LA PARTICIPANTE**

Código:

He leído o se me ha leído el contenido de este documento. Se me han brindado amplias explicaciones en cuanto a mi participación en esta investigación y se me ha dado la oportunidad de hacer cualquier pregunta, las cuales han sido contestadas a mi entera satisfacción; se me garantiza que toda la información

relacionada a mi participación en este estudio es estrictamente privada y me reservo el derecho a abandonar el estudio en cualquier momento; mi decisión de abandonarlo o permanecer en el, no afectará los otros servicios de atención que recibo en este centro de salud.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación.

Firma o huella digital \_\_\_\_\_

Tarjeta de identidad \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Declaración del Proveedor de Salud

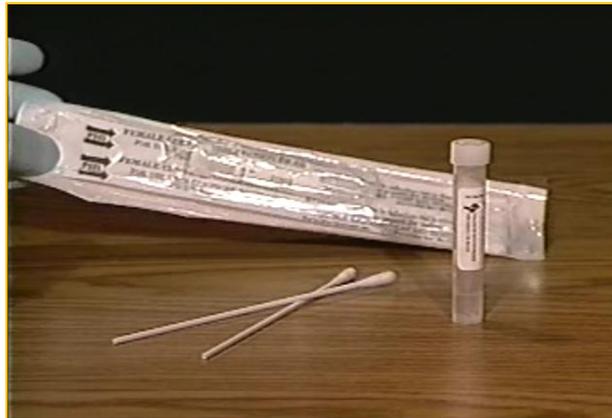
Yo, el/la abajo suscrita, he explicado a la usuaria, en lenguaje comprensible, los procedimientos, beneficios y riesgos que implica participar en esta investigación.

Firma de Proveedor de Salud \_\_\_\_\_

No de Tarjeta de Identidad \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

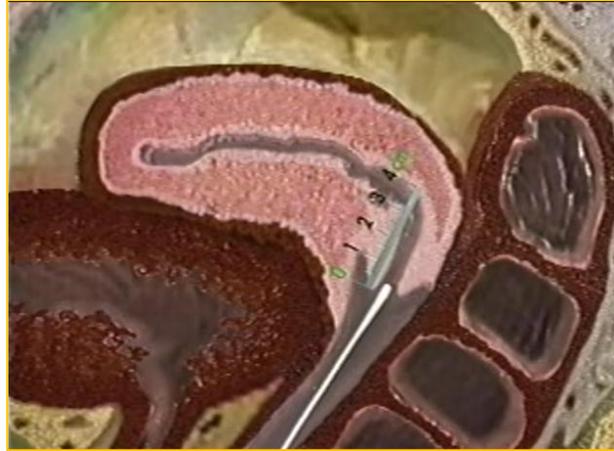
### Anexo 3 Diagrama de recolecta de muestra endocervical



### Material para la toma de muestra endocervical



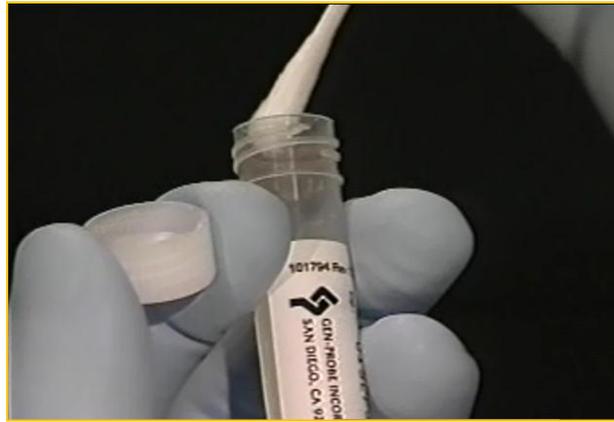
1. Limpiar con un hisopo el exocérnix para remover la mucosidad y las secreciones del orificio cervical, deseche este hisopo.



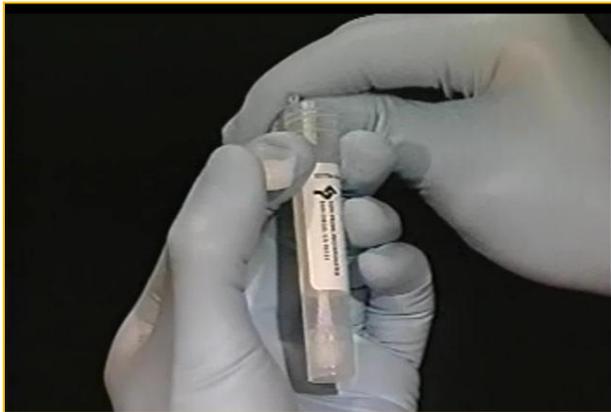
2. Recolectar la muestra del canal endocervical, introduciendo un hisopo estéril, hasta 2cm. en el interior del conducto cervical,



3. Hacer girar y moviéndolo suavemente de lado a lado durante 10-30 segundos para dar tiempo que absorba el exudado, no deseche este hisopo



4. Introducir el hisopo inmediatamente en el tubo de PACE 2



5. Quiebre el palito del hisopo en la señal de la línea al tamaño del tubo, hágalo con cuidado para no salpicarse con el contenido. Cierra el tubo correctamente.
6. Repetir los pasos 2 y 3 y luego introducir el hisopo en el vial de PBS.

## **XII. REFERENCIAS**

1. Membreño Hilda, Manual de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos, Laboratorio Nacional ,Secretaria de Salud, Primera Edición 2009.
2. Zelaya Ada Argentina . Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico. Universidad Autónoma de Honduras, 2009.
3. Mendoza Suyapa, Procedimientos Operativos Estándar para Recolección, Manejo y Transporte de Muestras , Laboratorio Nacional, Secretaria de Salud., 2008.
4. Mendoza Suyapa, Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico Laboratorial de las Infecciones de Transmisión Sexual., 2003.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar para la extracción de ADN de  
Chlamydia trachomatis de hisopado cervical**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 10 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
	Portada	1
	Índice	2
XIII.	OBJETO	3
XIV.	ALCANCE	3
XV.	RESPONSABILIDADES	3
XVI.	DEFINICIONES	3
XVII.	PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	4
XVIII.	PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	5
XIX.	INTERFERENCIAS	5
XX.	CALIFICACION DEL PERSONAL	5
XXI.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	6
XXII.	PROCEDIMIENTO	7
XXIII.	ANEXOS	9
	Anexo 1: Proceso de Extracción	9
XXIV.	REFERENCIAS	10

### **XIII. OBJETO**

Este procedimiento describe un método rápido y fácil para la purificación de ADN total de *Chlamydia Trachomatis* a partir de muestras de hisopado endocervical para la realización de la técnica de PCR tiempo Real.

### **XIV. ALCANCE**

Este procedimiento es el que utiliza el laboratorio para la investigación del proyecto de tesis de maestría para la Genotipificación de *Chlamydia trachomatis* en Trabajadoras Sexuales en Unidades de Manejo Integral de las Infecciones de Transmisión Sexual (UMIETS) de Honduras.

Se utilizara la técnica de amplificación QIAamp de la casa QIAGEN

### **XV. RESPONSABILIDADES**

Personal encargado de realizar las extracciones de ADN de los hisopados cervicales.

### **XVI. DEFINICIONES**

ADN      Ácido Desoxirribonucleico

PCR      Reacción en Cadena de la Polimerasa

### **XVII. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD**

1. Antes y después del análisis desinfectar el mesón de trabajo con una solución de Alcohol Etilico.
2. Lavado adecuado de las manos antes y después del procesamiento de muestras con un jabón bactericida.
3. Es obligatorio el uso de gabacha para protección personal.
4. Es obligatorio la utilización de guantes sin talcos desechables

5. Se debe utilizar dispensadores plásticos o dispensadores automáticos para pipetear. Nunca pipetear con la boca para evitar la ingestión de muestras o contaminación de las mismas.
6. No agregar cloro al recipiente de desechos o soluciones ácidas directamente al sobrante de la preparación de la muestra ya que contiene hidrocloruro de guanidina de los Buffers AL y AW1 el cual puede formar componentes altamente reactivos cuando se combina con cloro.
7. Si hay derrames de reactivos limpiar con detergente y agua. Si el líquido derramado contiene agentes infecciosos limpiar primero el área afectada con detergente y agua y después con hipoclorito de sodio al 1% (v/v).
8. Utilice mascarillas y protectores para los ojos y cara durante procedimientos que pueden generar gotas de suero, plasma, o aerosoles de material infeccioso.
9. Tape los tubos al momento de centrifugar, ya que la producción de aerosoles durante la centrifugación puede contribuir a diseminar algunas enfermedades infecciosas.
10. Descontamine todo material de vidrio que se sospeche contiene material infeccioso, preferiblemente en autoclave antes de ser lavado.

## **XVIII. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN**

Antes de iniciar a trabajar tiene que tomar en cuenta los siguientes aspectos:

1. Mantener la muestra estén a temperatura ambiente (15 - 25° C).

2. Calentar el baño maría a 56°C para el paso 4.
3. Mantener el Buffer AE o agua destilada a temperatura ambiente para la elución en paso 11.
4. Asegurar que el Buffer AW1 y Buffer AW2 sean utilizados en el orden correcto del protocolo
5. Verificar que los Buffer AW1 y Buffer AW2 sean diluidos con volúmenes correctos de etanol puro, no utilizar alcohol desnaturalizado
6. Si un precipitado se forma en el Buffer AL, disuelva incubándolo a 56°C.
7. Todos los procedimientos de centrifugación se llevará a cabo a temperatura ambiente (15-25°C).

## **XIX. INTERFERENCIAS**

1. Si no se utiliza guantes puede darse contaminación cruzada.
2. El talco del guante puede ocasionar contaminación de la muestra.

## **XX. CALIFICACION DEL PERSONAL**

El personal que realiza este tipo de procedimientos es un Microbiólogo(a) con un entrenamiento previo en extracción de ADN en muestras de hisopado cervical.

## **XXI. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

### **1. Reactivos provistos por el Kit**

- a) Buffer AL (Hidrocloruro de Guanidina)

- b) Buffer ATL
- c) Buffer AW1 (Hidrocloruro de Guanidina)
- d) Buffer AW2 (Azida de Sodio)
- e) Buffer AE
- f) QIAGEN Proteasa
- g) Solvente de Proteasa (Azida de Sodio)
- h) Proteinasa K

### **Preparación de Reactivos**

- Buffer AW1

Agregar la cantidad de etanol al 96-100% según lo indica el frasco

- Buffer AW2

Agregar la cantidad de etanol al 96-100% según lo indica el frasco

## **2. Insumos provistos por el Kit**

- a) QIAamp Columnas Mini spin
- b) Tubos de recolección de 2ml

## **3. Insumos no provistos por el Kit**

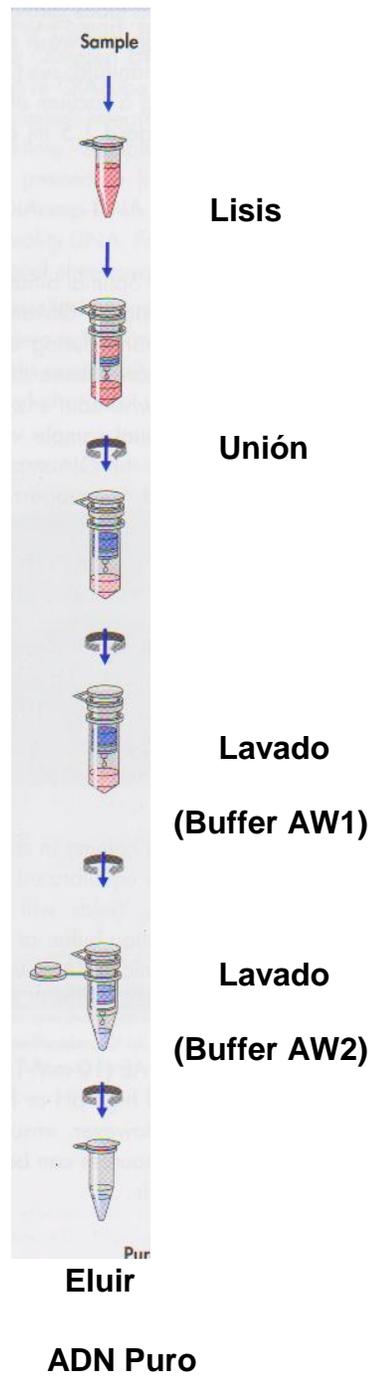
- a) Microcentrífuga (con rotor para tubos de 2 ml)
- b) Puntas para pipetas con barrera para aerosol
- c) Contenedores con desinfectantes
- d) Guantes de látex, protectores de ojos y gabacha
- e) Vortex
- f) Baño María

## XXII. PROCEDIMIENTO

1. Pipetear 20ul de QIAGEN Proteasa en el microtubo de 1.5ml.
2. Agregar 200ul de la muestra al microtubo
3. Agregar 200ul de Buffer AL a la muestra . Colocar en el vortex por 15 seg.
4. Incubar a 56°C por 10 min.
5. Centrifugar brevemente el microtubo de 1.5 ml para remover las gotas de las paredes internas.
6. Agregar 200ul de etanol (96-100%) a la muestra , mezclar denuevo en el vortex por 15 seg. Despues de mezclar centrifugar el microtubo para remover las gotas internas.
7. Cuidadosamente trasladar la mezcla del paso 6 a la columna .Cerrar la tapa y centrifugar a 6000X g (8000 rpm ) por 1 min. Colocar el la columna en un tubo limpio de 2ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
8. Abrir cuidadosamente la columna del mini spin y agregar 500ul del Buffer AW1, cerrar el vial y centrifugarlo a 6000xg (8000 rpm) por 1 min. Colocar la columna mini spin QIAamp en un tubo de recoleccion de 2ml, limpio y descartar el tubo que contiene el filtrado.
9. Abrir la columna del minispin y agregar 500ul de BufferAW2 . Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (20,000xg; 14,000rpm)por 3 minutos.
10. Colocar la columna del minispin en un nuevo microtubo de 2ml y descarte el tubo que contiene el firtrado. Centrifugar a velocidad máxima de 1 min.
11. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml ( no provisto por el kit) y descarte el tubo que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna y agregar 200ul del Buffer AE o agua destilada. Incubar a a temperatura ambiente por 1 min. Y luego centrifugar a 6000 xg (8000rpm) por 1 min.
12. Obtener ADN de la muestra y almacenar a -20°C.

**XXIII. ANEXOS**

**Anexo 1 Proceso de Extracción**



#### **XXIV. REFERENCIAS**

QIAGEN, QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Second Edition.  
November 2007.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar para el Control de Derrames en el Laboratorio**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 14 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. Ada Zelaya Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
	Portada	1
	Índice	2
I.	OBJETO	3
II	ALCANCE	3
III	RESPONSABILIDADES	3
IV	DEFINICIONES	3
V	PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	4
VI	PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	4
VII	INTERFERENCIAS	5
VIII	CALIFICACION DEL PERSONAL	5
IX	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	5
X	PROCEDIMIENTOS	6
XI	Procedimiento para derrames grandes	6
XII	Procedimiento para derrames pequeños	7
XIII	Procedimiento para derrames en personas	8
XIV	Procedimiento para derrames en la campana de seguridad	8
XV	Procedimiento de limpieza	9
XVI	ANEXOS	11
	Anexo 1: Registro de Derrames	11
	REFERENCIAS	12

## **I OBJETO**

El propósito de este documento es describir en forma detallada los procedimientos para el control y limpieza de diferentes tipos de derrames en el laboratorio

## **II. ALCANCE**

Este procedimiento es dirigido a todo el personal de laboratorio y provee los diferentes métodos de control y limpieza de derrames de laboratorio.

## **III. RESPONSABILIDADES**

Es responsabilidad de todo el personal de laboratorio conocer los procedimientos a seguir para el manejo de derrames

El Responsable de Bioseguridad debe capacitar a todo el personal de laboratorio en el control de derrames

## **IV. DEFINICIONES**

- 1. Desinfectante:** Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos pero no necesariamente esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.
- 2. Descontaminación:** Es el método de elección para el tratamiento de material infeccioso y en el que se utiliza el autoclave de vapor.
- 3. Desinfección:** Medio físico o químico capaz de matar microorganismos pero no necesariamente esporas. Consigue reducir el número pero no la destrucción total

## **V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD**

1. Lavado adecuado de las manos antes y después de la descontaminación y descarte del material contaminado.
2. Se utilizarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y rostro de salpicaduras.
3. Utilizar guantes y ropa protectora, e incluso protección facial y ocular.

4. No se utilizará ningún dispositivo o prendas de protección fuera del laboratorio (cafeterías, oficinas, sala para el personal, baño etc.)
5. En el sitio donde se realiza la descontaminación estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos, peinarse, manipular lentes de contactos.

## **VI PRECAUCIONES DE OPERACIÓN**

5. Se debe utilizar desinfectantes con comprobada actividad germicida,
6. Asegurarse de que los materiales contaminados entre en contacto con el desinfectante el tiempo necesario antes de su descarte.
7. Todo material contaminado debe ser sometido a descontaminación o desinfección antes de ser lavados en el caso de los reusables y eliminados en el caso de los desechables.
8. Asegurarse de que sean alcanzados el tiempo y la presión del autoclave en el proceso de descontaminación.
9. Los derrames y accidentes que deriven a los materiales infecciosos deben informarse de inmediato al responsable de Bioseguridad.

## **VII INTERFERENCIAS**

Asegurarse que cuando se use más de un desinfectante, no se produzca interferencia entre ellos que afecte su acción.

## **VIII. CALIFICACION DEL PERSONAL**

Todo el personal de laboratorio tendrá que haber recibido entrenamiento sobre manejo y limpieza de Derrames.

## **IX. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

### **1. t Básico para Derrames de Sustancias Biológicas**

Es recomendable que el kit contenga:

- a) Una solución de cloro como desinfectante estándar.
- b) Botella de spray para la solución de cloro.
- c) Pinzas, tenazas, una escoba o cepillo que pueda autoclavar.
- d) Toallas de papel para material absorbente.
- e) Bolsas de bioseguridad para recoger el material contaminado.

- f) Guantes industriales y los de uso de laboratorio.
- g) Equipo de protección personal (gafas, mascarilla, y careta).



## X PROCEDIMIENTOS

Los accidentes ocurren dentro del laboratorio, pero es responsabilidad del personal limpiarlos de manera correcta así como de alertar y avisar a los demás del derrame ocurrido.

Cuando limpie un derrame dentro del laboratorio, debe tomar las precauciones y seguir los pasos que se detallan en este procedimiento así como llevar todo el equipo de protección personal necesario para protegerse cuando lo esté limpiando.

### 1. Procedimiento para derrames grandes

#### a. Paso 1: Contener el derrame

- Si ocurre fuera del gabinete de seguridad, utilice un obstáculo para contener derrames de gran volumen.
- Aísle el área del derrame si el organismo tiene un riesgo de producir aerosoles. Deje pasar 30-40 minutos mientras el aerosol se despeja.
- Colocar señales de peligro durante este tiempo para advertir al personal del derrame.
- Utilice el equipo de protección personal.

*b. Paso 2: Descontaminando el derrame*

- Toallas colocadas sobre el derrame son suficiente para prevenir aerosoles al añadir el descontaminante y ayudan a limpiar
- Permitir, como mínimo, 20 minutos de contacto con el desinfectante.
- Deseche el material utilizado en la descontaminación.
- Use equipo de protección de personal (guantes dobles, gabacha, lentes, etc.)
- Coloque el material absorbente alrededor del derrame
- Limpie de afuera hacia adentro
- El material de limpieza debe ir en la basura biopeligrosa y proceder como lo establece el Procedimiento de Manejo de Desechos POEMD.
- Lávese las manos al terminar de limpiar

*c. Paso 3: Reportando el derrame*

Los detalles del accidente deben ser reportados inmediatamente al Encargado de Bioseguridad en el Registro correspondiente (Anexo 1)

## **2. Procedimiento para derrames pequeños**



- a) Usar ropa protectora (guantes dobles)
- b) Si ocurre sobre una mesa, evacue el laboratorio por suficiente tiempo para que los aerosoles se estabilicen o sean removidos por el sistema de ventilación, aproximadamente 20 a 30 minutos.
- c) Evitar acceso al área, colocando rótulos y cerrando puertas.
- d) Reportar al encargado de Bioseguridad
- e) Descontaminar todas las superficies expuestas con un desinfectante adecuado. Los desinfectantes deben estar disponibles en el laboratorio todo el tiempo, para su uso inmediato.
- f) Proceder conforme al Procedimiento de Limpieza descrito en el inciso 5.

### **3. Procedimiento para derrame en una persona**



- a) Remover la ropa contaminada
- b) Lavar con mucho agua (2-3 minutos).
- c) Revisar el agua de enjuague y la piel para ver si es necesario repetir.
- d) Si hay heridas, buscar atención médica.

### **4. Procedimiento para derrame en la campana de seguridad**

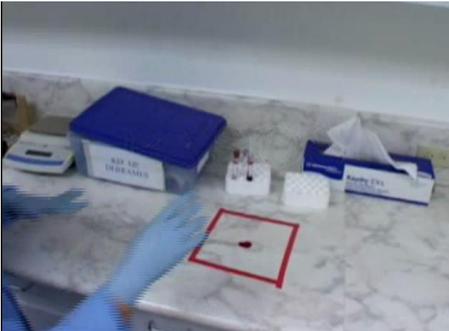


- a) Cuando se produzca un derrame de material de riesgo biológico dentro de una Campana de Seguridad, debe procederse de inmediato a su limpieza, mientras la cámara sigue en funcionamiento.
- b) Dejar encendida la ventilación (10-15 minutos).
- c) Debe utilizarse un desinfectante eficaz y aplicarse de modo que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles.
- d) Todos los materiales que entren en contacto con el agente derramado deben desinfectarse o tratarse en autoclave.
- e) Proceder conforme al Procedimiento de Limpieza descrito en el inciso 5.

#### **5. Procedimiento de limpieza**

- a) Cubrir el derrame con material absorbente.
- b) Cubrir completamente con solución desinfectante (Cloro 0.5%)
- c) Agregar desinfectante de las orillas hacia dentro del derrame.
- d) Dejar actuar por 20-30 minutos.
- e) Recoger el material absorbente contaminado y depositarlo en una bolsa plástica y proceder conforme al procedimiento de tratamiento de desechos.
- f) Descartar en bolsas de bioseguridad todo el material usado.
- g) Quitarse los guantes y descartarlos en la bolsa plástica roja, luego lavarse las manos.

- h) Los detalles del accidente deben ser reportados inmediatamente al Responsable de Bioseguridad del laboratorio.



Utilice equipo de protección personal y el material absorbente.

Kit para derrames



Cubrir el derrame con



Cubrir completamente con solución  
desinfectante (Cloro 0.5%)



Dejar actuar por 20-30 minutos



**Recoja con material absorbente y limpiar  
las áreas adyacentes**

## ANEXOS

### Anexo 1: Registro de Derrames

<b>INFORME DE ACCIDENTE EN LABORATORIO</b>	
Fecha: _____	Hora: _____ Lugar: _____
Tipo: (derrame de sustancias, incendio, etc) _____	
Consecuencia: tipo de daño a persona, equipo y otro recurso) _____	
<b>PERSONA AFECTADA</b> (si fue más de una persona, proporcione los datos atrás de esta hoja)	
Nombre: _____	
Técnico <input type="checkbox"/> Auxiliar <input type="checkbox"/> Conserje <input type="checkbox"/> Profesional <input type="checkbox"/> Otro: _____	
Forma en que fue afectado: (quemadura, fractura, etc): _____	
Medidas tomadas: _____	
<b>EQUIPO O RECURSO AFECTADO</b> (Si fue más de un equipo o recurso, escriba atrás)	
Descripción del equipo o recurso: _____	
Forma en que fue afectado: _____	
Medidas tomadas: _____	
<b>COMENTARIOS</b> (Indique las causas probables del accidente y cualquier comentario adicional que considere conveniente.) _____ _____ _____	
_____ Nombre y Firma de quien hace el reporte	

## REFERENCIAS

- I. Curso de Bioseguridad en el Laboratorio, CDC, UVG, 2009.
- II. Curso de Gestión de Calidad y Buenas Prácticas de Laboratorio, Modulo 11, Bioseguridad, OPS , 2009
- III. Membreño Hilda Manual de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. Laboratorio Nacional, Secretaria de Salud, Primera Edición 2009.
- IV. Ada Argentina Zelaya Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico. Universidad Autónoma de Honduras, 2009.
- V. Organización Mundial de la Salud, Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, tercera edición, año 2005.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar para el Manejo de Desechos**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 11 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. Ada Zelaya Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

Contenido	Pagina
Portada	1
Índice	2
I.OBJETO	3
II.ALCANCE	3
III.RESPONSABILIDADES	3
IV.DEFINICIONES	3
V.PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	4
VII.PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	4
VIII.INTERFERENCIAS	5
IX.CALIFICACION DEL PERSONAL	5
X.MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	5
XI.PROCEDIMIENTOS	5
XII.Tratamiento de Desechos	5
ANEXOS	8
Anexo 1: Flujograma de Tratamiento de Desechos	8
REFERENCIAS	9

## **I. OBJETO**

El propósito de este documento es describir en forma detallada el procedimiento a seguir para el tratamiento adecuado de los desechos que se producen en el laboratorio.

## **II. ALCANCE**

Este procedimiento es dirigido a todo el personal responsable del manejo de desechos que se generen en los procesos de toma y procesamiento de muestras, desarrollo de técnicas de extracción y pruebas de identificación genotípica de *Chlamydia trachomatis*

## **III. RESPONSABILIDADES**

Personal médico es responsable de la disposición final del material de recolecta de muestras

El personal de laboratorio es responsable de manejo y disposición final de los desechos y materiales que se producen durante el procesamiento de las muestras y la realización de las técnicas de análisis.

## **IV. DEFINICIONES**

- 1. Desecho:** Se considera desecho todo aquello que debe descartarse.
- 2. Descontaminación:** Es el método de elección para el tratamiento de material infeccioso y en el que se utiliza el autoclave de vapor.

## **V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD**

1. Lavado adecuado de las manos antes y después de la descontaminación y descarte del material contaminado.
2. Se utilizarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y rostro de salpicaduras.
3. Utilizar guantes y ropa protectora, e incluso protección facial y ocular.
4. No se utilizará ningún dispositivo o prendas de protección fuera del laboratorio (cafeterías, oficinas, sala para el personal, baño etc.)
5. En el sitio donde se realiza la descontaminación estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos, peinarse, manipular lentes de contactos.

## **VI. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN**

1. Se debe utilizar desinfectantes con comprobada actividad germicida,
2. Asegurarse de que los materiales contaminados entre en contacto con el desinfectante el tiempo necesario antes de su descarte.
3. Todo material contaminado debe ser sometido a descontaminación o desinfección antes de ser lavados en el caso de los reusables y eliminados en el caso de los desechables.
4. Asegurarse de que sean alcanzados el tiempo y la presión del autoclave en el proceso de descontaminación.

## **VII. INTERFERENCIAS**

Asegurarse que cuando se use más de un desinfectante, no se produzca interferencia entre ellos que afecte su acción.

## **VIII. CALIFICACION DEL PERSONAL**

Los Microbiólogos analistas deben estar capacitados en la disposición adecuada de los materiales y desechos contaminados.

El personal encargado de la desinfección de material contaminado tendrá que haber recibido entrenamiento sobre manejo y desinfección de desechos contaminados.

## **IX. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO**

1. Autoclave
2. Guantes
3. Alcohol Etílico al 70%
4. Gabacha

## **X. PROCEDIMIENTO**

### **A. TRATAMIENTO DE DESECHOS**

Todos los desechos con material infeccioso que se generan en los procesos de recolección, procesamiento de muestras, prueba de PACE 2, extracción del ADN y técnica de PCR para la identificación genotípica de *Chlamydia trachomatis*, son sometidos a tratamiento adecuado, previo a su disposición final, tomando en cuenta las normas de bioseguridad establecidas.

Los materiales infecciosos se dividen en dos tipos:

### **1. Material Reusable**

Se considera material reusable aquel que después del tratamiento adecuado es utilizado nuevamente, por ejemplo pipetas de volumen fijo, cristalería en general, etc.

El procedimiento a seguir puede ser:

- a. *Desinfección:* Que consiste en la utilización de desinfectantes líquidos como alcohol etílico, cloro, etc. Este procedimiento es utilizado especialmente con materiales y equipos que no resisten altas temperaturas.

Las pipetas de volumen fijo ajustable se desinfectaran externamente con alcohol etílico al 70%.

- b. *Descontaminación.*

El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación.

- a) Colocar el material a descontaminar en bolsas plásticas rojas resistentes al calor, dejar flojos los cierres para que permitan la entrada del vapor.
- b) Coloque el material de manera que el vapor llegue a tocar las superficies y circule libremente.

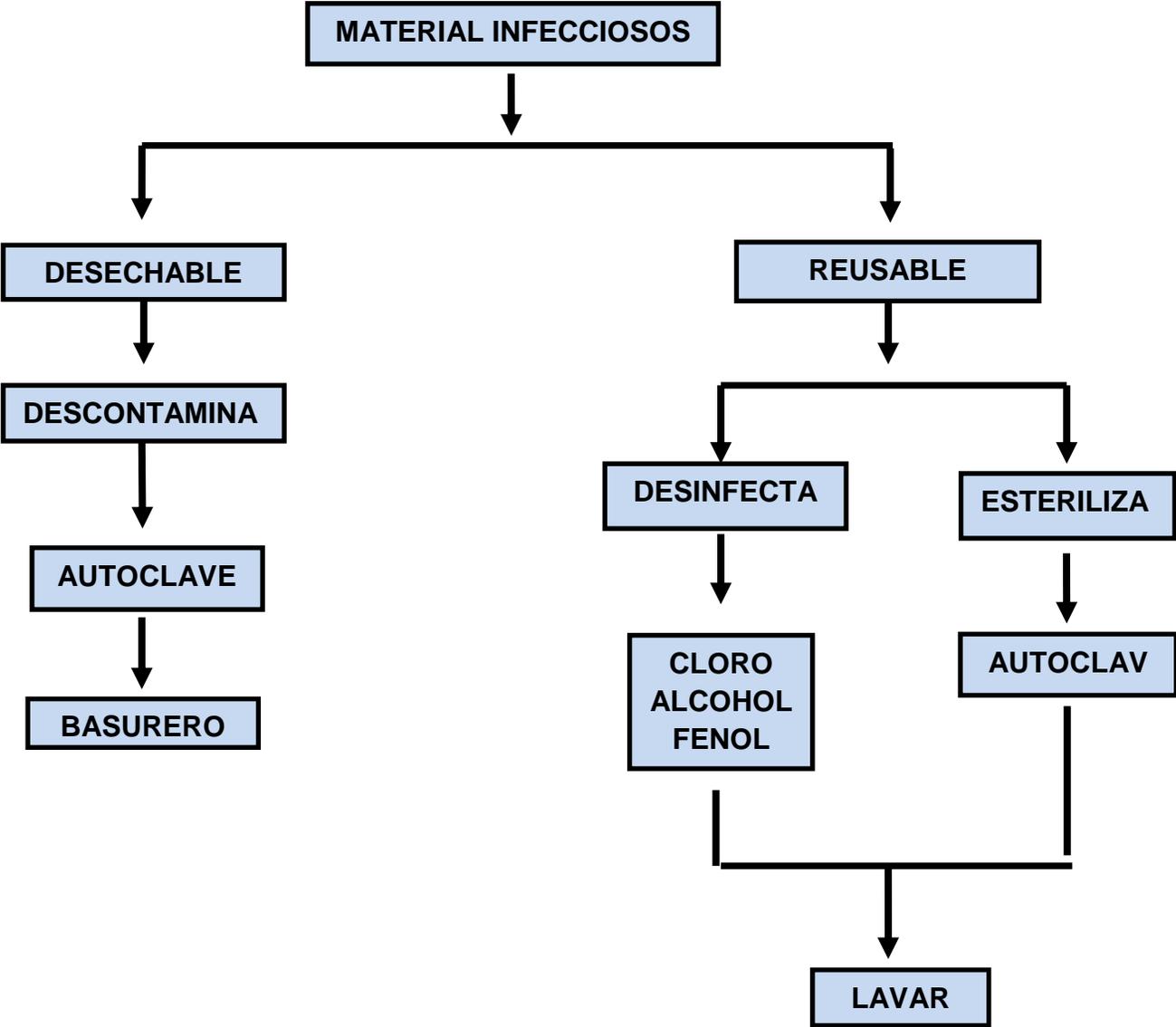
- c) Esterilizar por 30 minutos a 121°C y a presión de 15 lbs./pulg. cuadrada.
- d) Se inicia a contar el tiempo hasta que el autoclave llegue a la temperatura y presión correctas.
- e) Esperar a que la presión baje a cero antes de abrir el autoclave
- f) Eliminar el material descontaminado.

## **2. Material desechable**

- a) Entre el material desechable se cuenta las puntas de pipetas, hisopos de muestra, tubos de Pace 2, viales de PBS, tubos de columnas de spin, material absorbente de limpieza de derrames, etc.
- b) Este material debe ser sometido a proceso de descontaminación previo a su disposición final en el basurero municipal.
- c) El material destinado a la descontaminación se introducirá en bolsas plásticas rojas resistentes al tratamiento en autoclave y después se procederá a su eliminación.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Flujograma Tratamiento de Desechos



## **XII. REFERENCIAS**

1. Membreño Hilda Manual de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. Laboratorio Nacional, Secretaria de Salud, Primera Edición 2009.
2. Organización Panamericana de la Salud, Curso de Gestión de Calidad y Buenas Prácticas de Laboratorio, Modulo 11, Bioseguridad, año 2009.
3. Organización Mundial de la Salud, Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, tercera edición, año 2005.
4. CDC, UVG Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Año 2009

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar Para el Transporte Aéreo de  
Muestras Cervicales para la Investigación de Genotipos de  
Chlamydia trachomatis**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 1 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. Ada Zelaya Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
	Portada	1
	Índice	2
	I. OBJETO	3
	II. ALCANCE	3
	III. RESPONSABILIDADES	3
	IV. DEFINICIONES	3
	V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	3
	VI. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	4
	VII. INTERFERENCIAS	4
	VIII. CALIFICACION DEL PERSONAL	4
	IX. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	4
	X. PROCEDIMIENTO	5
	ANEXOS	6
1	Anexo 1 Procedimiento de Embalaje de Muestra	6
2	Anexo 2: Instrucción de Embalaje 650	8
3	Anexo 3: Etiquetas Requeridas para el Embalaje de Muestras Diagnosticas o Sustancia Biológica Categoría B.	9
4	Anexo 4 Descripción de las Etiquetas Requeridas en un Embalaje de Sustancia Biológica Categoría B.	10
	REFERENCIAS	11

## **I OBJETO**

Este procedimiento tiene como propósito orientar sobre las medidas correctas para el transporte de muestras consideradas como “Sustancia Biológica, Categoría B” según lo establecen las normas IATA.

## **VI. ALCANCE**

Este procedimiento será utilizado para el personal que realice el embalaje de las extracciones de las muestras cervicales positivas por *Chlamydia trachomatis*.

## **III. RESPONSABILIDADES**

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para el personal que se encargue de realizar el embalaje de las muestras.

## **IV. DEFINICIONES**

**IATA:** Asociación Internacional de Transporte Aéreo

## **V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD**

1. Lavado adecuado de las manos antes y después del procedimiento del embalaje de las muestras.
2. Es obligatorio el uso de gabacha manga larga para protección personal.
3. Es obligatorio el uso de guantes para protección personal durante el embalaje de las muestras.

## **VI. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN**

- Los recipientes primarios pueden contener hasta 500 ml cada uno, el volumen total en el paquete externo de envío no puede exceder los 4L.
- Las etiquetas de sustancias infecciosas y la declaración de artículos peligrosos del remitente no son requeridas para los especímenes diagnósticos o sustancia biológica categoría B.

## **VII. INTERFERENCIAS**

No colocar toda la documentación requerida según lo establece la norma de IATA, así como no embalar correctamente las muestras. Esto ocasiona que el paquete sea retenido en aduana sin los requerimientos de almacenamiento adecuados, dañando así las muestras.

## **VIII CALIFICACION DEL PERSONAL**

Es necesario que el personal responsable de realizar el embalaje tenga un entrenamiento sobre las normas de IATA.

## **IX. MATERIALES Y EQUIPO**

1. Caja plástica o de cartón para almacenar viales
2. Bolsa plástica protectora para material infecto contagioso
3. Sobre externo certificado para el transporte de muestras
4. Etiquetas de dirección con la información requerida
5. Icepacks
6. Guantes
7. Envase Exterior con las etiquetas necesarias para el transporte de sustancia biológica, categoría B.

## **PROCEDIMIENTO**

1. Reúna los materiales necesarios para empacar y las muestras a enviar.
2. Asegurarse que los viales estén correctamente cerrados.
3. Asegurarse que los viales de las muestras tengan el código correspondiente.
4. Colocar las muestras en cajas para congelar y cerrar la caja correctamente.
5. Introducir la caja en una bolsa plástica certificada para el transporte de muestras. Colocar dentro de la bolsa papel absorbente por si hay derrame de alguna muestra.
6. Colocar la bolsa plástica que contiene la caja con las muestras dentro de un sobre certificado para el transporte de muestras
7. Rotular el sobre con el tipo y número de muestras que se están enviando.
8. Antes de colocar el sobre con las muestras en un paquete externo se debe ubicar ice packs en el fondo de este paquete. Una vez que se coloque el sobre dentro del paquete externo se coloca ice packs alrededor y encima del sobre, de manera que los ice packs cubran el sobre.
9. Cerrar el paquete o embalaje externo rígido y verificar que tenga la información requerida según instrucción de embalaje 650 de las normas IATA. Ver Anexo 2.

## **ANEXOS**

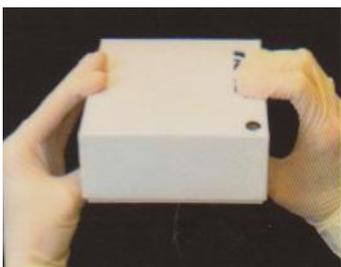
### **Anexo 1: Procedimiento de Embalaje de Muestras**



**1. Reunir los materiales necesarios**



**2. Verificar que los viales estén cerrados y rotulados**



**3. Colocar las muestras en las cajas**  
**Verificar que la caja esté bien cerrada.**



**4. Rotular la caja con tipo de muestra**



**5. introduzca la caja en una bolsa plástica protectora para material infecto contagioso**



**6. Introducir la caja con el protector plástico de un sobre .**



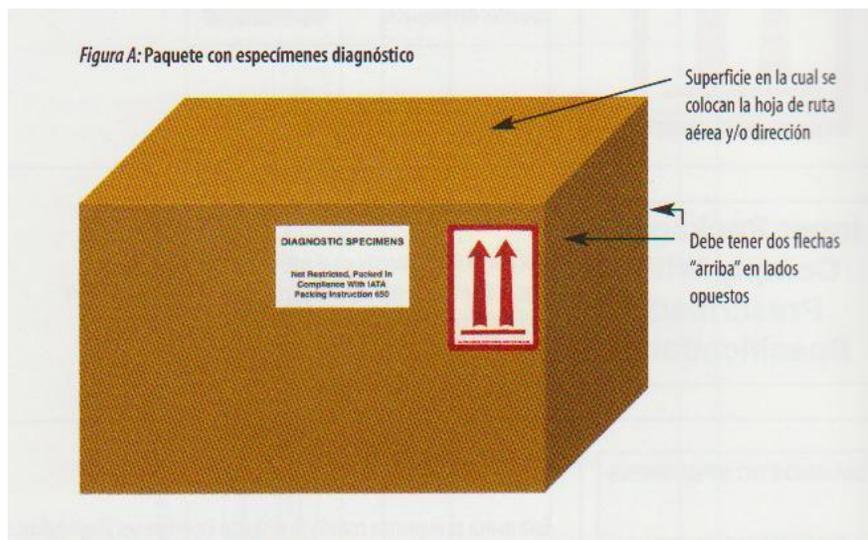
**7. Rotular el sobre exterior con el tipo de muestra**

**8. Colocar en hieleras con ice-packs.**

## Anexo 2: Instrucción de Embalaje 650

Marcas	Etiquetas	Embalaje	Documentos
Nombre Apropriado y numero UN		Triple	Guía Área
1. Nombres/ Direcciones de Expedidor y Remitente  2. Nombre y teléfono de persona responsable		Embalaje externo con mínimo 1 superficie diámetro mínimo de 100mm x100mm	

### Anexo 3: Etiquetas Requeridas para el Embalaje de Muestras Diagnósticas o Substancia Biológica Categoría B.



**Anexo 4: Descripción de las Etiquetas Requeridas en un Embalaje de Sustancia Biológica Categoría B**

	<p>Esta etiqueta de orientación debe marcar claramente cuál lado es “Arriba”. Se requieren dos etiquetas en cada caja, cada una en lados opuestos del paquete.</p>
	<p>Esta marca es requerida cuando se embalan Especímenes Diagnósticos.</p>

## REFERENCIAS

1. Membreño Hilda Manual de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. Laboratorio Nacional, Secretaria de Salud, Primera Edición 2009.
2. Ada Argentina Zelaya Manual de Bioseguridad Laboratorio Clínico. Universidad Autónoma de Honduras, 2009.
3. Curso de Gestión de Calidad y Buenas Prácticas de Laboratorio .OPS, Segunda Edición. Washington, D.C 2009.
4. Organización Mundial de la Salud, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo. Año 2004.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Microbiología**

**Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas**

**Procedimiento Operativo Estándar Para PCR Tiempo Real para la  
Genotipificación de *Chlamydia trachomatis***

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Dra. Suyapa Mendoza 1 de Febrero de 2011	Dra. María E. Botazzi Febrero de 2011	Dra. Ada Zelaya Febrero de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

## INDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
	Portada	1
	Índice	2
	I. OBJETO	3
	II. ALCANCE	3
	III. RESPONSABILIDADES	3
	IV. DEFINICIONES	3
	V. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD	3
	VI. PRECAUCIONES DE OPERACIÓN	4
	VII. INTERFERENCIAS	4
	VIII. CALIFICACION DEL PERSONAL	4
	IX. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO	4
	X. PROCEDIMIENTO	5
	ANEXOS	6
1	Anexo 1 Procedimiento de Embalaje de Muestra	6
2	Anexo 2: Instrucción de Embalaje 650	8
3	Anexo 3: Etiquetas Requeridas para el Embalaje de Muestras Diagnosticas o Sustancia Biológica Categoría B.	9
4	Anexo 4 Descripción de las Etiquetas Requeridas en un Embalaje de Sustancia Biológica Categoría B.	10
	REFERENCIAS	11

## **I OBJETO**

Este procedimiento tiene como propósito orientar sobre las medidas correctas para el transporte de muestras consideradas como “Sustancia Biológica, Categoría B” según lo establecen las normas IATA.

## **II. ALCANCE**

Este procedimiento será utilizado para el personal que realice el embalaje de las extracciones de las muestras cervicales positivas por *Chlamydia trachomatis*.

## **III. RESPONSABILIDADES**

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para el personal que se encargue de realizar el embalaje de las muestras.

## **IV DEFINICIONES**

**IATA:** Asociación Internacional de Transporte Aéreo

















