

AISLAMIENTO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y RESPUESTA INMUNE EN DIFERENTES POBLACIONES

MARTA T. ZAPATA, FABIANA AHUMADA, CECILIA G. CUFFINI, PATRICIA CORDOBA,
SERGIO L. GRUTADAURIA

Laboratorio de Inmunología, Instituto de Virología J. M. Vanella, Universidad Nacional de Córdoba

Resumen Se estudió la presencia de IgG específica para *C. trachomatis* en diferentes grupos de pacientes adultos y la presencia de IgM en los neonatos y se relacionaron con el aislamiento de la bacteria en cultivos celulares. Se empleó un método de IFI sobre células McCoy infectadas con el serotipo L₂434/Bu de *C. trachomatis*. El método demostró ser específico, sensible y reproducible, utilizando las placas de plástico de 24 pozos para hacer crecer las células. Encontramos IgG específica para *C. trachomatis* en el 27% de las mujeres con síntomas clínicos, en el 40% de las que concurrieron al control ginecológico, en el 60% de las que consultaron por esterilidad y en el 10% de las embarazadas. Con un test de hipótesis para comparar proporciones se demostró que los valores de la presencia de IgG específicas es altamente significativa ($p < 0,0001$) para las estériles con respecto a las embarazadas. De la relación del aislamiento de la bacteria con la presencia de IgG específica se formaron 4 grupos de pacientes, 7 de 10 tuvieron aislamiento e IFI positivo, 5 de 8, aislamiento positivo e IFI negativo; 25 de 28 (grupo de embarazadas), aislamiento negativo e IFI positivo y 63 de 76 dieron negativo en las 2 pruebas. El test de McNemar indica que la presencia de IgG tiene un alto grado de significación en las mujeres estériles con respecto a los otros grupos con una $p < 0,001$. En los neonatos se detectó *C. trachomatis* por aislamiento en un 20%, y presencia de IgM específica en un 10%. En los neonatos, habría un mejor diagnóstico combinando las 2 técnicas. Nuestros resultados sugieren que la detección de la IgG específica no es un criterio suficiente para el diagnóstico, debiendo acompañarse con el aislamiento de la bacteria. Sólo habría presencia de IgG con valores diagnósticos en mujeres estériles con antecedentes de *C. trachomatis*. Estos resultados señalan la importancia de la detección de *C. trachomatis* en jóvenes para evitar la infertilidad, y en embarazadas para prevenir la infección neonatal y la posibilidad de nacimientos prematuros y bajo peso al nacer de los niños.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es uno de los patógenos bacterianos más importantes en la producción de las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) en países desarrollados. En los subdesarrollados no se conoce con exactitud; aún sigue siendo muy importante *N. gonorrhoeae*. En la mujer produce infección del tracto urogenital, que

sin tratamiento, puede causar cervicitis, uretritis, endometritis o salpingitis crónica. La complicación más seria de la infección genital femenina, es la Enfermedad Inflamatoria Pelviana cuyas secuelas más severas son la esterilidad por daño tubario y la predisposición a embarazos ectópicos^{1,2}. En el hombre, un reservorio de esta infección, puede causar uretritis no gonocócica y postgonocócica. *C. trachomatis* produce en ambos sexos infecciones asintomáticas (aproximadamente 50% en las mujeres y 25% en los hombres) y enfermedades como el tracoma cuyas cepas

Recibido: 1-III-1996

Aceptado: 10-IX-1996

Dirección postal: Dra. Marta T. Zapata, Instituto de Virología, Universidad Nacional de Córdoba, San Lorenzo 561, 5000 Córdoba, Argentina

A,B,Ba y C producen cegueras hiperen-démicas; y las cepas L₁, L₂ y L₃ que producen linfogranuloma venéreo³.

A pesar que desde la década del 70 se comenzó con el estudio acelerado de la *C. trachomatis* como una importante causa de ETS, son escasos los trabajos de respuesta inmune en humanos que permitan distinguir con claridad las funciones de los diferentes tipos de anticuerpos. Recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre los diferentes antígenos de la bacteria y el tipo de anticuerpos que producen⁴. Otros de los hechos que se han observado es la importancia de las reinfecciones en la patogénesis de las enfermedades causadas por *C. trachomatis*.

El diagnóstico puede realizarse para dar respuesta a una inquietud individual o para preparar programas de prevención en políticas de salud; en ambos casos es necesario poner en evidencia la bacteria o sus antígenos, y estudiar la respuesta inmune⁵.

El diagnóstico de elección en el adulto, es el aislamiento de la bacteria^{6,7}. Otros métodos de diagnóstico incluyen la detección de antígenos por enzimoinmunoensayo (ELISA) o por IF directa usando anticuerpos monoclonales⁸, o la determinación de su ADN por PCR o LCR en materiales urogenitales u orina⁹⁻¹⁴. Esto implica una correcta toma de la muestra, y una selección de la prueba más conveniente a utilizar. La determinación de IgM específica¹⁵ se utiliza como marcador diagnóstico de *C. trachomatis* en neonatos de hasta 6 meses de edad con conjuntivitis o neumonía del recién nacido. Esta infección es transmitida en curso del parto por la madre positiva en el último trimestre de embarazo.

La serología para *C. trachomatis* tiene poco valor para el diagnóstico de las infecciones del tracto genital⁹. Las pruebas serológicas no deberían ser usadas en diagnóstico pues no se pueden diferenciar entre inmunidad producida por una infección en el pasado y una infección reciente. Se supuso que relacionando los resultados de los aislamientos por cultivos celulares y respuesta de IgG específica podríamos obtener algunos valores orientadores.

Poco se sabe sobre la respuesta inmune protectora en adultos. Hay numerosos estudios sobre los antígenos del cuerpo elemental y de los cuerpos reticulares^{4,16}. Estos estudios están obteniendo resultados que hacen pensar, que no se

puede trabajar con la bacteria total como antígeno en pruebas de medición de anticuerpos, sino que sería necesario separar y purificar los antígenos y trabajar con ellos por separado.

El objetivo de este trabajo fue conocer la respuesta humoral tipo IgG, en adultos, e IgM específica en neonatos, mediante una inmunofluorescencia indirecta (IFI) y relacionarla con los aislamientos de la bacteria, en diferentes grupos de pacientes.

Materiales y métodos

Población estudiada

Se estudiaron 122 pacientes adultos, 100 mujeres y 22 varones. De las 100 mujeres, 28 eran embarazadas y fueron consideradas control de las 25 mujeres que consultaron por esterilidad con antecedentes de ETS; 37 que consultaron por síntomas compatibles con *C. trachomatis* y 10 que lo hicieron por control ginecológico. Los 22 varones consultaron por síntomas o eran pareja de las mujeres que habían realizado una consulta. Los datos fueron anotados en una planilla que fue diseñada para el estudio.

A todos ellos se les extrajo una muestra de sangre para la determinación de anticuerpos y una muestra urogenital. En las mujeres se realizó un raspado endocervical, y en los hombres, un raspado uretral, con un hisopo de acero inoxidable, como se describió anteriormente⁷. Las muestras fueron colocadas en medio de transporte y luego de eliminar los hisopos se realizó la congelación a -70°C hasta el aislamiento de la bacteria, no más de 20 días después⁶. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero guardado a -30°C hasta la determinación de IgG e IgM por IFI.

También se estudiaron 20 neonatos que pertenecían a un Servicio de neonatología del Hospital Universitario, con diagnóstico clínico de neumonía o conjuntivitis neonatal, con edades entre recién nacido y 5 meses. Se obtuvo aspirado nasofaringeo, hisopado conjuntival y una muestra de suero. En los aspirados y los hisopados se intentaron los aislamientos de la bacteria.

Aislamiento por cultivo sobre células McCoy

Se emplearon monocapas de células McCoy en microplacas de 96 pozos como se describió anteriormente⁶. Brevemente, las células McCoy se crecieron en medio MEMHepes (Gibco) suplementado con L-glutamina, gentamicina, vancomicina y SFB al 10% (Gibco). Se sembraron 0,1 ml, en cada pozo, de una suspensión 5×10^5 ml de células, y las placas se colocaron en estufa con atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C durante 16 hs. Luego

de inocular las muestras las placas se centrifugaron a 1800 x g 60 min, y se incubaron en estufa de CO₂ al 5% por 2 hs. Se removió el inóculo y se agregó a cada pozo el mismo medio de crecimiento más 1 ug/ml de ciclohe-ximida. Las placas fueron luego incubadas por 72 hs en estufa bajo las mismas condiciones de CO₂ y temperatura. Cada material se sembró por cuadruplicado para poder realizar un pasaje ciego; la prueba se reveló por coloración de lodo o IFI con sueros policlonales anti *C. trachomatis* de ratón, preparados en el laboratorio.

Técnica de IFI para dosaje de anticuerpos tipo IgG e IgM sobre células McCoy

Se sembraron células McCoy en placas de plástico de 24 pozos (Costar), una placa se utilizó directamente y en forma paralela, a otra placa se le colocó cubreobjetos redondos en el fondo de los pozos. Se utilizó la cepa de *C. trachomatis* L₂ 434/Bu con aproximadamente 60 UFI/ml como inóculo. La infección se realizó con la misma técnica que se realiza el aislamiento de la bacteria⁶. Luego de 72 hs de incubación en la estufa con atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C, se descartó el medio de las placas, se lavaron con PBS tres veces y se fijaron con metanol a 4°C, 45 minutos. Los controles se realizaron del mismo modo con PBS como inóculo. Las placas así fijadas se mantuvieron a -70°C durante 1 mes o se utilizaron inmediatamente.

En los sueros de los neonatos se probó la presencia de factor reumatoideo (FR), por reacción con partículas de látex cubiertas con IgG (Wellcome). En los casos positivos se eliminó por precipitación con adsorbente de FR (anti IgG humana Behringwerke A.G. Marburg Germany), y centrifugación a 10.000 x g y luego se realizó la separación de las fracciones IgG e IgM a través de una columna de QAE Sephadex A-50 y recién se tituló IgM específica en la fracción correspondiente¹⁷. El suero fue agregado a los pozos de la placa que tenían las células infectadas, en dilución factor 2 y por duplicado. Se incubó 1 hora, en el caso de la titulación de IgG y 1 hora 30 minutos en el caso de la titulación de IgM, a 37°C en cámara húmeda. Luego se agregó la dilución óptima (obtenida por titulación en bloque) de Anti IgG (Serolab) o Anti IgM humana (Dako, Copenhagen, Denmark) marcada con isotiocianato de fluoresceína. En algunos experimentos paralelos se utilizó IgG antihumana marcada con peroxidasa (KPL) y se reveló con 4 α Cloro naftol. Se dejó a 37°C durante 1 hora. Luego de los lavados se agregó 0,5% de una solución al 1% de Azul de Evans. Se dejó secar a temperatura ambiente y luego se agregó la solución de buffer glicerina pH 8,5 por 5 minutos, se descartó y se leyó al microscopio de faz invertida con un aumento de 250 X para IF y un aumento de 400 X para inmuno-peroxidasa. Los controles que se realizaron fueron células sin infectar y células infectadas con sueros negativos.

Se colocaron en la prueba, para conocer su comportamiento, 5 sueros positivos para *C. psittaci* que fueron muestras convalescentes de pacientes con epidemiología y clínica compatibles probados en FC, con antígenos enviados por CDC de Atlanta y títulos mayores a 1/32.

En 12 sueros, 8 positivos, y 4 negativos probados por una Elisa comercial para *C. trachomatis* (Inmunocombs) se compararon los títulos de las IgG específicas por IFI realizada sobre células infectadas crecidas sobre cubreobjetos y células directamente crecidas, sobre el fondo de la placa de plástico.

Los títulos de IgG positiva y los negativos coincidieron en un 100% en las placas con cubreobjetos y sin ellos; y todos los sueros de pacientes con diagnóstico de *C. psittaci* dieron negativos. Por este motivo todos los experimentos de IFI se desarrollaron en células McCoy crecidas sobre las placas.

Análisis estadístico: Los datos presentados en la tabla 1 se analizaron con un test de hipótesis para comparar proporciones de grupos independientes y en la tabla 2 los datos fueron analizados con el test de hipótesis para proporciones apareadas de McNemar.

Resultados

Los resultados de adultos y niños se analizaron por separado. En el caso de los adultos se relacionó la presencia de materiales urogenitales positivos o negativos con la IgG específica en sus respectivos sueros. En el caso de los materiales de los neonatos se relacionó el aislamiento de la bacteria en los aspirados nasofaríngeos, con la presencia de IgM específica en suero.

Un hecho práctico para resaltar, es la posibilidad de hacer crecer directamente las células McCoy en placas de plástico de 24 pozos¹⁸ para realizar la IFI. En ambos casos se probaron 12 sueros que eran positivos y negativos para *C. trachomatis* por Elisa y los sueros de *C. psittaci*. Hubo total correlación entre estos sueros probados en los dos sistemas; con cubreobjetos o sin ellos. La única diferencia fue la posibilidad de utilizar un aumento mayor para la lectura de la IFI realizada sobre los cubreobjetos. Sin embargo, el menor tiempo requerido para realizar la prueba en placas sin cubreobjetos, obteniéndose el mismo resultado nos inclinó a usar este último sistema. Se consideraron valores positivos a partir de la dilución 1/5, ya que a esta dilución no había fluorescencia de fondo. La IFI que se observó fue clara y nítida y las lecturas en el microscopio de inmunofluorescencia se realizaron a cie-

gas. Los sueros de *C. psittaci* dieron todos negativos en la prueba de IFI con células infectadas con la cepa de *C. trachomatis*, L₂ 434/Bu indicando que la prueba podría utilizarse para medir anticuerpos antichlamydia con ayuda de los antecedentes clínicos y epidemiológicos³. Se eligieron 28 mujeres embarazadas, para usarlas como controles de los casos de esterilidad estudiados.

La tabla 1 muestra la relación de la presencia de IgG en 100 sueros de mujeres y 22 de hombres con respecto al motivo de las consultas. De las 37 pacientes que asistieron por síntomas clínicos compatibles, 10 fueron positivas para IgG específica, un 27%; de 10 que asistieron por control ginecológico 4 fueron positivas, un 40%; en las 25 que asistieron por esterilidad, 15 fueron positivas, un 60%; y de las 28 embarazadas, el 10% fue positivo. El test de hipótesis para comparar proporciones de grupos independientes se aplicó con los dos últimos grupos. En el análisis de los resultados tuvimos en cuenta solamente a

las mujeres. Considerando el aislamiento de la bacteria y la presencia de IgG específica, formamos cuatro grupos (tabla 2). El primer grupo (mujeres con cultivo positivo e IFI positiva) estuvo formado por 7 pacientes, de las cuales 5 presentaban síntomas compatibles por infección por *C. trachomatis* y 2 eran estériles. Las 5 pacientes del segundo grupo (cultivo positivo e IFI negativa) tenían síntomas clínicos. Las restantes 88 pacientes (con aislamiento negativo, e IFI positiva o negativa) se distribuyeron en el tercer y cuarto grupo y fueron las que concurrieron a la consulta por esterilidad, las que asistieron a controles ginecológicos, y 25 de las 28 embarazadas seleccionadas como controles. De los 100 casos, 32 pacientes presentaron IFI positiva (con aislamiento positivo o negativo), y 68 presentaron IFI negativa (con aislamiento positivo o negativo). Aplicando el test de hipótesis para proporciones apareadas (test de McNemar) se observa que la diferencia entre el aislamiento positivo y la IFI

TABLA 1.— Porcentaje de anticuerpos tipo IgG detectados en sueros por IFI en mujeres y hombres en relación a la consulta que hicieron al laboratorio

Motivo de consulta	Nº pacientes femeninas	I.F.I. positivos	I.F.I. negativos	Relación positivo/total	Porcentaje % (+)
síntomas clínicos compatibles	37	10	27	10/37	27
control					
ginecológico	10	4	6	4/10	40
esterilidad	25	15	10	15/25	60
embarazadas	28	3	25	3/28	10
Total: 100		32	68		
Motivo de consulta	Nº pacientes masculinos	I.F.I. positivos	I.F.I. negativos	Relación positivo/total	Porcentaje %(+)
síntomas clínicos compatibles	22	3	19	2/22	14
Total: 22		3	19		

Z = 3,76 p < 0,0001

* El test de hipótesis para comparar proporciones de grupo independientes se realizó solamente entre las pacientes del grupo de esterilidad y embarazadas.

TABLA 2.— Resultados obtenidos, relacionando el aislamiento de la bacteria y los títulos de anticuerpos tipo IgG específico con las 100 muestras de las pacientes mujeres

Aislamiento por cultivo	I.F.I	Número de pacientes mujeres total	Grupo
(+)	(+)	7	I
(+)	(-)	5	II
(-)	(+)	25	III
(-)	(-)	63	IV
total		100	

Z = 3,65 p < 0,001

positiva o negativa y los aislamientos negativos e IFI positiva o negativa es altamente significativa ($p < 0,001$). Este resultado sugiere que la presencia de anticuerpos tipo IgG tendría algún grado de significación solamente en aquellas mujeres que consultaron por esterilidad, con antecedentes clínicos de *C. trachomatis*.

Con respecto a los recién nacidos, con los materiales de 20 niños, se encontró un 20% de aislamiento positivos en los aspirados nasofaríngeos y se pudo determinar que el 10% de los sueros poseían IgM específica en títulos significativos. Estos sueros se habían controlado para presencia de FR y títulos altos de IgG específica, que podrían afectar los resultados obtenidos para IgM¹⁹.

Con algunos sueros se realizó un Dot Blot utilizando antígeno de *C. trachomatis* semipurificado, pegado a una membrana de PVDF (Millipore), indicando que la metodología tiene más especificidad que la IFI y la inmuno-peroxidasa (datos no mostrados).

Discusión

Ya en 1980 Schachter and Caldwell²⁰ remarcaban la diferencia entre enfermedad e inmunidad luego de la infección con *C. trachomatis*, dependiendo de la interacción entre el patógeno y el sistema inmune del paciente, como sucede con otras bacterias intracelulares.

Estudios detallados de infección en humanos^{4, 16, 20-22} y animales²³, con diferentes cepas concluyen que la infección induce inmunidad específica de cepa, y que la reinfección no se produce con la cepa homóloga, sino con una heteróloga. Se ha sugerido que antígenos específicos de tipo confieren inmunidad específica de cepa a la infección de *C. trachomatis*, y que el antígeno específico de género induciría lesión del tejido en un huésped que ya tuvo un primer contacto con la bacteria. Es así que habría antígenos que producen inmunidad protectora y otros que causan daño mediado por inmunidad^{4, 16}. La proteína mayor de membrana (MOMP) de *C. trachomatis* produce anticuerpos neutralizantes en cultivos celulares y protectores en modelos animales de experimentación. Anticuerpos monoclonales reconocen epitopos lineales y conformativos dentro de la secuencia variable de esta proteína. El antígeno de género, hsp60, es un potente antígeno durante la infección por *C. trachomatis* y en la respuesta inmune en ratón es genéticamente controlado, en parte, por genes del locus de Complejo Mayor de Histocompatibilidad. La respuesta inmune correlaciona con las secuelas de la enfermedad en humanos infectados y causa marcada reacción inflamatoria en modelos animales de infección experimental con *C. trachomatis*. Por eso, se ha propuesto que este antígeno, hsp60, podría romper la tolerancia e inducir daño inflamatorio autoinmune o ser el promotor de daño inmune mediado por células, durante la infección crónica. Estos mecanismos todavía son desconocidos.

En nuestro laboratorio^{6, 7} demostramos que en Córdoba había diferentes porcentajes de infección por esta bacteria en población de diferente riesgo y por aislamiento de la bacteria. El número de parejas sexuales, la edad y los antecedentes de ETS influyeron en los porcentajes de recuperación de *C. trachomatis*. En el grupo A de alto riesgo integrado por hombres que concurrieron a un Servicio de ETS, el porcentaje de aislamiento fue del 50%; en el grupo B, constituido por hombres que concurrieron a un Servicio de Urología se obtuvo un 20,7% de positivos; en el grupo C, constituido por mujeres que concurrieron a un Servicio de Ginecología general, se obtuvo un 13,3% de aislamiento y en el grupo D, integrado por mujeres cuyo motivo de consulta fue la este-

rilidad, se obtuvo un valor de 4,3% de aislamiento. Este último hecho, y el poco conocimiento del valor de la respuesta inmune protectora que se tiene a la infección por *C. trachomatis* en adulto, nos llevó a asociar el aislamiento de la bacteria con la respuesta de IgG específica en diferentes grupos de pacientes. Esta fue medida por IFI sobre células McCoy infectadas con la cepa L₂ 434/Bu de *C. trachomatis*. La técnica descripta tiene un buen grado de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad para ser usada en la determinación de anticuerpos antichlamydia. El antígeno que se puede utilizar son cuerpos elementales de cepa L1 o L2 de *C. trachomatis* crecida en saco de la yema de huevos embrionados de gallina o lisados de células infectadas²⁴.

Es innegable que los métodos de excelencia para poner de manifiesto antígenos de *C. trachomatis* son PCR, LCR, Nested PCR, y aún usando muestras de orina y no material urogenital⁸⁻¹⁴. Sin embargo, es necesario conocer la respuesta inmune humoral para determinar si ésta es o no protectora. Ya no es una imposibilidad la utilización de cultivos celulares en los laboratorios de microbiología, y aunque la utilización de éstos como sustratos en inmunofluorescencia ha ido abandonándose, la imposibilidad de contar todavía con antígenos específicos para otras pruebas, nos llevó a utilizar este tipo de sustrato. Con un buen control de la infectividad, de aproximadamente 50% de las células McCoy, se obtienen buenos sustratos de células infectadas para utilizar en la IFI. En el desarrollo de otras IF observamos que cuando se utilizaban las placas de plástico para hacer crecer las células se obtenían buenos resultados¹⁸. Los valores negativos obtenidos con sueros positivos para *C. psittaci* realizado por cuadruplicado, nos permite hablar de cierta especificidad y la realización de todas las pruebas por duplicado, de buena reproducibilidad. Los títulos de IgG obtenidos en nuestro laboratorio fueron más bajos que los descriptos por otros investigadores^{15, 25}; sin embargo como los reactivos fueron titulados antes de ser utilizados y en las pruebas se usaron las diluciones óptimas, consideramos que la dilución 1/5 fue positiva. Además, esta dilución de suero fue controlada con células sin infectar, como sustrato para observar su «background». La recíproca de los títulos obtenidos variaron de 5 a 80. El TM de los títulos obtenidos fue 20.

Algunos autores⁴ sugieren que una segunda infección con un diferente serotipo de *C. trachomatis* se puede reconocer por la presencia de IgM específica, con presencia de IgG de la primera infección, resultados que estamos analizando. Los resultados del presente trabajo no indican prevalencia o incidencia porque todos son casos seleccionados de cuadros clínicos compatibles con *C. trachomatis* o con antecedentes de posible infección.

En la tabla 1 se observa los resultados obtenidos de asociar el motivo de consulta de los pacientes con la presencia de IgG específica. Las que consultaron por sintomatología clínica compatible, un 27% tenían IgG y las que lo hicieron por control ginecológico general tenían un 40%. Aunque el número de casos estudiados fue muy bajo, de los resultados obtenidos se puede inferir que las mujeres que tuvieron infección en el pasado tienen IgG específica. No se obtuvieron datos concordantes para realizar otro tipo de análisis. Es interesante destacar que la diferencia de porcentaje de los anticuerpos tipo IgG, entre el grupo de mujeres con antecedentes de esterilidad (60%), y embarazadas (10%), es muy grande. Con un test de comparación de proporciones, en dos grupos independientes se pudo demostrar que esta diferencia es altamente significativa, con una $p < 0,0001$. Sería necesario estudiar la cinética de la respuesta inmune humoral a los diferentes antígenos de la bacteria y la función que ésta cumple con respecto a la infección. La utilización de sueros y muestras genitales de embarazadas como controles negativos, fue una elección en base a considerar que si estaban embarazadas no habían tenido infecciones profundas o crónicas con cepas de *C. trachomatis*. Se puede observar que en el grupo de embarazadas que fue estudiado como control, también se encontraron 3 casos positivos para IgG específica. Estas mujeres no indicaron haber tenido antecedentes, hecho que no es llamativo por las infecciones asintomáticas producidas por *C. trachomatis*.

Hay una gran variación en la prevalencia de la respuesta de anticuerpos a antígenos específicos definidos serológicamente, como las heat shock protein (hsp), las proteínas de membrana, la MOMP y los LPS. De éstos, los más importantes serían la MOMP, que sería responsable de la inmunidad humoral protectora, y el antígeno, que

fue identificado como homólogo de una Gro-EI, de las hsp60 que es un antígeno común del género Chlamydia y estaría involucrado en la patogénesis. Muchos trabajos de investigación básica en modelos de animales y patogénesis, e investigación clínica de inmunopatogénesis en humano avalan este hecho^{4, 25}. Por lo tanto, al tener valores de anticuerpos totales tipo IgG, sólo podemos observar tendencias de presencia de IgG específica en los casos de esterilidad, sin poder expresar valores de protección o relación con infección y enfermedad.

El hecho de que el grupo de hombres muestre presencia de IgG específica sólo en el 4% de los casos, puede deberse a que los hombres consultan menos que las mujeres en caso de sintomatología urogenital. Nuestros datos concuerdan con los comunicados por Videla y col.,²⁵ para mujeres con obstrucción tubaria y otras sintomatologías, con diferencias de 75% para pacientes estériles y el 20% para pacientes embarazadas, con una frecuencia de detección de IgG significativamente mayor para mujeres estériles que para embarazadas.

Como se observa, es mucho todavía el trabajo a realizar, para poder contribuir a los diferentes aspectos de la respuesta inmune protectora, o la agresión y enfermedad debida a la infección con esta bacteria. Los resultados obtenidos más los antecedentes publicados nos llevaron a plantear el estudio de la respuesta inmune con los antígenos por separado y proponer pruebas para medir correctamente inmunidad humoral protectora y métodos para obtener especificidad de cepa (trabajo en desarrollo).

Carballal y col.²⁶ demostraron en 19 niños menores de 3 meses de 255 estudiados residentes en Buenos Aires, evidencia serológica de infección reciente por *C. trachomatis*. Por seroconversión de IgM específica en sueros agudo y convaleciente y título elevado por Elisa y MicrIFI.

Los datos obtenidos con los neonatos, concuerdan con los valores que se encontraron en años anteriores en nuestro laboratorio (8%) solamente realizando aislamiento a partir de aspirados nasofaríngeos; en este caso relacionando aislamiento y determinación de IgM específica podemos concluir que la combinación de ambas técnicas, sería más conveniente. Aunque Schachter¹⁵, trabajando con la MIF, no encuentra problemas con la presencia de FR, creemos que este

control es necesario en la IFI con células como sustrato¹⁸, como así también controlar la IgG específica en altos títulos; que podría haber pasado a través de la placenta de la madre infectada¹⁵, y competir en la unión del antígeno con la IgM del suero dando falsos negativos.

Hay múltiples líneas de evidencia que indican que las infecciones del tracto genital²⁷, en las mujeres embarazadas, y entre ellas la infección producida por *C. trachomatis*, son un factor de riesgo y producen nacimientos prematuros, bajo peso del niño al nacer, conjuntivitis del recién nacido o neumonía, lo que se puede prevenir si a la madre en el tercer trimestre de embarazo se le hace un control de la presencia de la bacteria o sus antígenos. En caso positivo se recomienda el antibiótico específico. En las reinfecciones sin tratamiento adecuado, existe la posibilidad de la producción de enfermedad y como consecuencia esterilidad por esta causa en un alto porcentaje de mujeres. La principal estrategia de prevención es evitar la salpingitis y sus secuelas, y con mayor énfasis en embarazadas y personas jóvenes⁵. Esto requiere programas de prevención y realización de diagnósticos correctos en adultos y neonatos para recomendar el tratamiento terapéutico correspondiente.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con un subsidio de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT U.N.C.) del año 1994-1995.

Summary

Isolation of Chlamydia trachomatis and immune response in different populations

We studied the presence of *C. trachomatis*-specific IgG and IgM in adults and newborns, respectively, and attempted isolation of the bacteria in cell culture. The determination of antibodies was carried out by an IFA on *C. trachomatis* infected (*L*₂434/Bu serotype) McCoy cells, cultured in 24-well plastic plates.

We found *C. trachomatis*-specific IgG in 27% of women with clinical symptoms, in 40% of women being attended for periodic gynecological control, in 60% of infertile women and in 10% of pregnant women. A proportion comparison test revealed the presence of specific IgG as highly significative for the group of infertile women as compared to the group of pregnant women ($p < 0.0001$).

We divided the patients into four groups, in relation to the results of the tests for specific IgG and *C. trachomatis* isolation. Seven out of 10 had positive isolation and negative IFA, 5 out of 8 had positive isolation and negative IFA. Twenty five out of 28 pregnant women had negative isolation and positive IFA, finally, 63 out of 76 had both tests negative. Statistical analysis using the McNemar proportion-comparison test suggests that IgG's presence is highly significant in pregnant women with respect to other groups ($p < 0.001$).

Our results suggest that the demonstration of IgG is not enough for diagnostic purposes, except in infertile women with a previous history of infection with *C. trachomatis*.

We isolated *C. trachomatis* in 20% of the newborns tested and 10% were also positive for IgM IFA. The diagnosis was improved by combining both techniques.

These results show the importance of the detection of *C. trachomatis* in youngsters to avoid infertility and in pregnant women to prevent newborn infections and the possibility of premature births and low weight babies.

Bibliografía

1. Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1771-81.
2. Faro S. Chlamydia trachomatis: Female pelvic infections. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1767-70.
3. Schachter J. Chlamydial. In: Rose NR et al (eds) Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1992, 661-6.
4. Brunham RC, Peeling RN. Chlamydia trachomatis antigens: Role in immunity and pathogenesis. *Infec Agents Dis* 1994; 3: 218-33.
5. C.D.C. Recommendations for the prevention and management of Chlamydia trachomatis infections. 1993; *MMWR*, 42 (Nº RR-12): 1-5.
6. Giovannini N, Suárez de Basnec M del C, Zapata M. Aislamiento de Chlamydia trachomatis en población con diferentes riesgos de infección. *Rev Arg Microbiol* 1991; 23: 146-54.
7. Giovannini N, Suárez de Basnec M del C, Zapata M. Influencia del tipo de hisopo en el aislamiento de Chlamydia trachomatis. *Rev Arg Microbiol* 1991; 23: 175-8.
8. Cles LD, Bruch K, Stamm WE. Staining characteristics of six commercially available monoclonal immunofluorescence reagents for direct diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1735-7.
9. Le Bar N, Herschman B, Jemal C, Pierz Chala J. Comparison of DNA probe, monoclonal antibody enzyme immunoassay, and cell culture for the detection of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 826-8.
10. Chernesky MA, Castricano S, Sellors J, et al. Detection of Chlamydia trachomatis antigens in urine as an alternative to swabs and cultures. *J Infect Dis* 1990; 161: 124-6.
11. Domeika M, Bassin M, Mardh P-A. Diagnosis of genital chlamydia trachomatis infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2350-2.
12. Anestad G, Badal DP, Scheel O, et al. Screening urine samples by leukocyte esterase test and ligase chain reaction for chlamydial infections among asymptomatic men. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2483-4.
13. Herbrink P, van de Munckhof HAM, Niasterds HGM, et al. Solid Phase C1q-Directed Bacterial Capture followed by PCR for detection of Chlamydia trachomatis in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 283-6.
14. Lee HH, Chernesky MA, Schachter J. Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet* 1995; 345: 213-6.
15. Schachter J, Grosman M, Azimi PH. Serology of chlamydia trachomatis in infants. *J Infect Dis* 1982; 146: 530-5.
16. Birkeland S. The molecular biology and diagnostic of chlamydia trachomatis. Thesis. Aarhus Universitat. 1992.
17. Córdoba P, Nates S, Zapata MT. Kinetic of specific IgM response in postnatal rubella infection by ion exchange chromatography - HAI. *J Virol Meth* 1991; 34: 37-43.
18. Zapata M, Chernesky MA, Mahony J. Indirect immunofluorescence staining of Chlamydia trachomatis inclusions in microculture plates with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 937-9.
19. Zapata M, Márquez A. Métodos inmunológicos de detección de antígeno e IgM específica en el diagnóstico virológico rápido. *Adelantos en Microbiología y Enfermedades Infecciosas* 1985; 4: 84-108.
20. Schachter J, Caldwell HD. Chlamydiae. *Am Rev Microbiol*. 1980; 34: 285-309.
21. Cui Z-D, Tristram D, Lascolea LJ, et al. Induction of antibody response to Chlamydia trachomatis in the genital tract by oral immunization. *Infect Immunol* 1991; 59: 1465-9.
22. Jawets E, Rose L, Hanna L, Thygeson P. Experimental inclusions conjunctivitis in man. *JAMA* 1965; 194: 150-62.
23. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991; 55: 143-90.
24. Wang SP, Grayston JT. Human serology in Chlamydia trachomatis infection with microimmuno-fluorescence. *J Infect Dis* 1974; 130: 388-97.
25. Videla C, Carballal G, Kekilian G, et al. Chlamydia trachomatis y esterilidad por obstrucción tubaria. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 6-12.
26. Carballal G, Mahony JB, Videla C, et al. Chlamydial antibodies in children with lower respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 68-71.
27. Andrews WW, Goldenberg RL, Hanth Preterus Labor JC. Emerging role of genital tract infections. *Infec Agents Dis* 1995; 4: 196-211.