



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

ADN de *Chlamydia trachomatis* en leucocitos de sangre periférica de neonatos



Marcela López-Hurtado^{a,b}, Karla N. Cuevas-Recillas^{a,b},
Verónica R. Flores-Salazar^{a,b} y Fernando M. Guerra-Infante^{a,b,*}

^a Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Perinatología, México D.F., México

^b Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México D.F., México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de abril de 2014

Aceptado el 11 de septiembre de 2014

On-line el 20 de diciembre de 2014

Palabras clave:

Chlamydia trachomatis

Neonatos

Neumonía

Sangre

Reacción en cadena de la polimerasa

Gen *ompA*

R E S U M E N

Introducción: El diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* es difícil en recién nacidos; sin embargo, este se realiza mediante el cultivo celular o por la detección de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis* (anti-CT). La detección de ADN de *C. trachomatis* en leucocitos de sangre mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser una mejor herramienta para el diagnóstico de infección por este patógeno.

Material y métodos: Se analizaron 44 recién nacidos, todos ellos prematuros y con peso menor de 2.500 g. De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre y de lavado nasofaríngeo. El ADN de los leucocitos fue obtenido mediante la técnica de fenol-cloroformo. La detección de *C. trachomatis* fue llevada a cabo mediante la amplificación del gen *ompA* utilizando el PCR de punto final. Además, se realizaron las pruebas de cultivo celular y la detección de anticuerpos IgM anti-CT mediante la técnica de microinmunofluorescencia.

Resultados: Veinte pacientes fueron PCR-positivo (45,5%), y la prueba se asoció significativamente con la presencia de neumonía (RR = 2,28; IC 95%: 1,01-5,17; p = 0,035). El cultivo celular de lavado nasofaríngeo solo fue positivo en 7 muestras y no hubo asociación significativa con algún dato clínico o de laboratorio. El título de anticuerpos anti-CT asociado al PCR-positivo fue 1:32 (RR = 2,74; IC 95%: 1,21-6,23; p = 0,008); sin embargo, este título no se asoció a la presencia de neumonía.

Conclusión: La detección de ADN en leucocitos de sangre periférica podría ser útil para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis*.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Chlamydia trachomatis DNA in leukocytes of peripheral blood from neonates

A B S T R A C T

Introduction: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in newborns is difficult; however, this diagnosis is performed by cell culture or by detection of IgM antibodies against *C. trachomatis*. Detection of *C. trachomatis* DNA in peripheral blood leukocytes using polymer chain reaction (PCR) may be a better tool for the diagnosis of infection by this pathogen.

Material and methods: A total of 44 premature newborns, all weighing less than 2500 g, were included in the study. A blood sample and nasopharyngeal lavages were obtained from each newborn. Leukocyte DNA was obtained by phenol-chloroform extraction technique. Detection of *C. trachomatis* was performed by amplifying the *ompA* gene using the PCR endpoint. Cell culture tests and the detection of IgM antibodies against *C. trachomatis* by microimmunofluorescence assay were also performed.

Results: Twenty newborns were PCR-positive (45.5%), with this test being significantly associated with the presence of pneumonia (RR = 2.28; 95% CI: 1.01 to 5.17; P = .035). The cell culture of nasopharyngeal lavage

Keywords:

Chlamydia trachomatis

Neonates

Pneumonia

Blood

Polymer chain reaction

ompA gene

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fguerra.96@yahoo.com (F.M. Guerra-Infante).

was positive in only 7 samples and no significant association was observed with any clinical or laboratory data. The titer of IgM antibodies against *C. trachomatis* associated with PCR-positive was 1:32 (RR = 2.74; 95% CI: 1.21 to 6.23; $P = .008$), however this titer was not associated with the presence of pneumonia.

Conclusion: DNA detection in peripheral blood leukocytes could be useful for diagnosis of *C. trachomatis* infection.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Chlamydia trachomatis es considerada la bacteria que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones de transmisión sexual¹. En la mujer embarazada puede provocar embarazos ectópicos, partos pretérmino, rotura prematura de membranas, corioamnionitis, aborto espontáneo y mortalidad perinatal². El recién nacido puede adquirir la infección cuando pasa a través del canal de parto o durante la rotura prematura de membranas, y posiblemente también *in utero*³⁻⁵. Las manifestaciones clínicas más comunes en el recién nacido son la conjuntivitis o la neumonía, las cuales aparecen entre las 4 y las 11 semanas después del nacimiento^{3,5-7}. El diagnóstico de infección por *C. trachomatis* en el recién nacido es difícil y en algunas ocasiones tardío, y los métodos empleados con mayor frecuencia son la detección de anticuerpos IgM anti *C. trachomatis* mediante la prueba de microinmunofluorescencia (MIF)⁷⁻⁹ y la detección de antígeno mediante el cultivo celular e inmunofluorescencia directa^{10,11}. Se ha informado que uno o más órganos de los recién nacidos pueden ser colonizados por esta bacteria; esta infección generalizada posiblemente es mediante vía hematogena^{12,13}. Los monocitos son considerados como los susceptibles a la infección por esta bacteria, los cuales en el tejido se transformarán en macrófagos^{14,15}. Desde el año 2001 se ha detectado *Chlamydia trachomatis* y/o *Chlamydia pneumoniae* en leucocitos de sangre periférica de personas adultas y niños en edad preescolar y escolar^{15,16}. El objetivo de esta investigación fue determinar la utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN de *C. trachomatis* en sangre de recién nacidos con dificultad respiratoria.

Material y métodos

Pacientes y muestras

Cincuenta recién nacidos con datos clínicos de neumonía atípica o sepsis fueron evaluados para la detección de ADN de *C. trachomatis* en leucocitos de sangre periférica. Se extrajeron 500 μ l de sangre en tubos microtainer con EDTA mediante la punción de la vena basilica del dorso de la mano. De igual forma se obtuvieron muestras de lavado nasofaríngeo, las cuales fueron depositadas en medio de transporte 2 SP. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.000 $g \times 10$ min a 10 °C, posteriormente se recuperaron tanto la capa de células blancas (*Buffy coat*) como el plasma. Los leucocitos fueron utilizados para la extracción de ácidos nucleicos y la identificación de ADN de *Chlamydia* mediante PCR de punto final. El plasma fue guardado en tubos Eppendorf a -70 °C para determinar la presencia de anticuerpos IgM anti *C. trachomatis* mediante MIF. Las muestras de lavado nasofaríngeo fueron utilizadas para el diagnóstico de *C. trachomatis* mediante cultivo celular e inmunofluorescencia directa.

Obtención de ADN

Antes de la obtención del ADN de los leucocitos, se eliminaron los eritrocitos mediante 2 lavados con 1 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM, MgCl 5 mM y NaCl 10 mM) por

centrifugación a 1.500 $g \times 7$ min a temperatura ambiente. Ya eliminados los eritrocitos, los leucocitos fueron incubados con 200 μ l de la solución de lisis para glóbulos blancos (Tris base 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0,2%, pH 7,6 con 10 μ l de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml) en baño maría a 55 °C por 1 h. Posteriormente el ADN fue obtenido mediante la técnica de fenol-cloroformo.

Detección de *Chlamydia*

Se emplearon 2 técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para confirmar la presencia del ADN de *C. trachomatis*. La primera de ellas fue para amplificar un producto del gen *ompA* de 129 pb y la segunda, para obtener un producto del mismo gen de 1.142 pb. Los iniciadores empleados para la primer PCR fueron los reportados por Dutilh et al.¹⁷: Momp1 (5'-GCCGCTTGAGTTCGCTTCCTC-3'); Momp2 (5'-CCAAGTGGTGAAGGATCGCA-3'), y en la segunda PCR se utilizaron los iniciadores reportados por Yang et al.¹⁸: OMP1 (5'-GCCGCTTGAGTTCGCTTCCTC-3') y OMP2 (5'-ATTTACGTGAGCAGCTCTCTCAT-3'). En la mezcla de reacción se utilizaron las siguientes concentraciones: 1,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 25 pM de cada uno de los iniciadores, 2,5 U de Taq polimerasa (GoTaq® Flexi ADN polimerasa de Promega®, Madison, WI, EE. UU.) y 5 μ l del ADN de la muestra para un volumen final de 25 μ l. En la primera PCR, la mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95 °C para la desnaturalización, seguido de 2 min a 61 °C para la alineación y 1 min a 70 °C para la extensión. La elongación final fue de 5 min a 70 °C. La segunda PCR se realizó bajo las mismas condiciones, solo cambió el tiempo y la temperatura de alineación, las cuales fueron: 1 min a 59 °C (termociclador: MJ Research, Inc. Mod. PTC-100. Watertown, Mass, EE. UU.).

Detección de *Mycoplasma* spp.

Para la detección de *Mycoplasma* se utilizó la técnica de PCR descrita por Van Kuppeveld et al.¹⁹, y los iniciadores utilizados fueron: MGSO (5'-GCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3' y GPO-1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'). La mezcla y las condiciones de reacción fueron utilizadas tal como se describió previamente¹³.

Microinmunofluorescencia

La técnica de microinmunofluorescencia (MIF) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el instructivo de los proveedores (*Chlamydia pneumoniae* IgG/IgM Micro-IF Test kit, Ani Lab systems Ltd. Oy, Vantaa, Finlandia). La presencia de fluorescencia y la intensidad de esta se evaluaron mediante un microscopio de epifluorescencia Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Alemania).

Cultivo celular para *Chlamydia trachomatis*

Para el cultivo celular se emplearon células McCoy, y la detección de *Chlamydia trachomatis* se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa empleando el kit comercial Chlamydial Direct IF (BioMérieux SA, F-69280 Marcy l'Etoile, Francia); posteriormente se siguió el procedimiento tal y como se describió previamente²⁰.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3400812>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3400812>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)