

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES  
CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN UNA  
REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.**

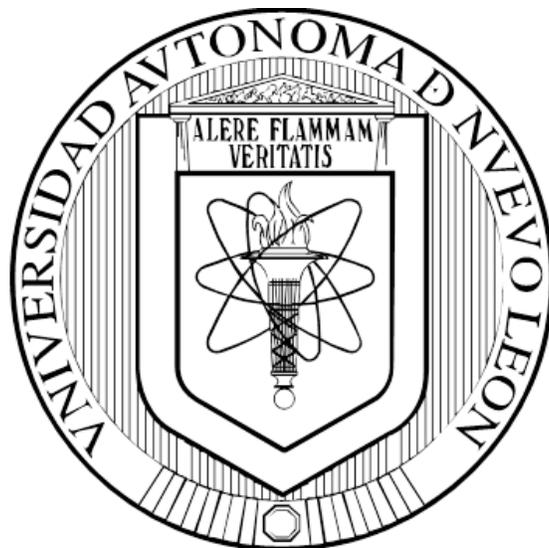
**POR**

**MARTHA JAQUELINE MARTÍNEZ TAMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**AGOSTO 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES  
CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN UNA  
REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.**

**POR**

**QCB. MARTHA JAQUELINE MARTÍNEZ TAMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**AGOSTO 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES  
CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN UNA  
REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.**

**POR**

**QCB. MARTHA JAQUELINE MARTÍNEZ TAMEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**AGOSTO 2016**

DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES  
CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN  
UNA REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.

**Comité de Tesis**

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Presidente

---

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto  
Secretario

---

Dra. Guadalupe Gallegos Ávila  
Vocal

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Vocal

---

Dr. Salomón Álvarez Cuevas  
Vocal

DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES  
CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN  
UNA REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.

**Dirección de Tesis**

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Director

---

Dr. Salomón Álvarez Cuevas  
Asesor externo

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a **DIOS** por brindarme vida y salud para seguir preparándome académicamente.

A **CONACYT** por el apoyo económico personal y académico.

A mi Asesora la **DRA. NORMA HEREDIA** por brindarme su tiempo, dedicación y guía para que este proyecto fuera posible.

Al **DR. JOSÉ SANTOS** por permitirme ser parte de su honorable grupo de posgrado de Microbiología, así como la calidez brindada por parte del **Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos**.

A la **DRA. GUADALUPE GALLEGOS** por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y apoyar la realización de la tesis.

A la **DRA. LUISA SOLÍS** por ser parte de mi comité de tesis y siempre aportar críticas positivas para mejorar este proyecto.

A mi Asesor Externo, **DR. SALOMÓN ALVAREZ** por tomar este proyecto, ser mi guía, y llenarme experiencias que me hicieron crecer como profesionista y como persona, pero sobre todo por su amistad.

Agradezco al **DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA** de la facultad de Medicina por ser mi segundo hogar y por la calidez brindada por cada uno de los integrantes de este Departamento.

A la **QCB. CLAUDIA, TANIA FLORES Y JOEL BARRERA** por compartir sus conocimientos, su tiempo y lo más valioso, su amistad. **FABIÁN, PIÑA, VENANCIO, GERARDO** por apoyarme y además generar un ambiente cálido y alegre en el laboratorio.

A la familia **TORRES PRADO** por ser parte importante de este trabajo, por su tiempo, esfuerzo y dedicación, sin ustedes no hubiera sido posible trabajar en ese hermoso lugar de Tabasco, infinitas gracias.

A mis compañeros y amigos de Maestría, **LINDA, JOEL, LAIJU y FÁTIMA**, gracias por las experiencias compartidas, gracias por hacer ameno el camino y por su sincera amistad.

A mi **FAMILIA, AMIGOS y C24**, por siempre estar conmigo, por darme fuerzas cuando creí ya no tenerlas, por seguir mis locuras y por su amor.

## **DEDICATORIA**

**A DIOS.**

A mis padres **MARTÍN e IRAZEMA**, con todo mi corazón para ustedes.

A mi **FAMILIA** que son mis pilares, mi aliento y apoyo.

A **MÍ**, por mi esfuerzo, sacrificio y dedicación.

Al **AMOR** que encontré en cada experiencia vivida.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Enfermedades respiratorias	1
1.1.1 Enfermedades respiratorias agudas	1
1.1.2 Enfermedades respiratorias crónicas	2
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Infecciones respiratorias	3
2.1.1 Epidemiología	4
2.2 <i>Chlamydia</i> spp. en las infecciones respiratorias	5
2.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
2.2.2 <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	9
2.2.3 <i>Chlamydomphila psittaci</i>	12
2.3 Enfermedades respiratorias causadas por otros microorganismos atípicos	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	17
<b>4. HIPÓTESIS</b>	18
<b>5. OBJETIVOS</b>	19
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	20
6.1 Casos en el estudio	20
6.2 Toma de muestra	20
6.3 Procesamiento y preparación inicial de las muestras	22
6.4 Análisis de las Muestras	23
6.4.1 Análisis del cuadro clínico del grupo de pacientes estudiados	23
6.4.2 Evaluación de los hallazgos citomorfológicos empleando las técnicas citológicas de CIFAR-CF y Citología teñida con Giemsa.	23
6.4.3 Técnicas Moleculares para la detección microbiológica de <i>Chlamydia</i> spp.	25

---

6.4.4 Establecer parámetros clínicos y citológicos asociados a la infección por <i>Chlamydia</i> spp. mediante la correlación del cuadro clínico con los hallazgos citológicos y la prueba de PCR	32
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
7.1 Descripción de la población objeto de estudio	46
7.2 Resultados demográficos	48
7.3 Resultados clínicos	50
7.4 Resultados citológicos	51
7.5 Resultados microbiológicos mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR)	56
7.6 Comportamiento clínico y microbiológico en los grupos <i>Chlamydia</i> spp. positivos y negativos mediante CIFAR-CF	60
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>12. RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	<b>85</b>

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
Tabla 7.1	Rangos de edad de los pacientes.	49
Tabla 7.2	Resultados citológicos presuntivos para <i>Chlamydia</i> spp.	51
Tabla 7.3	Resultados citológicos de las muestras respiratorias.	55
Tabla 7.4	Resultados comparativos citológicos entre los grupos positivos y negativos mediante la técnica CIFAR-CF.	60
Tabla 7.5	Resultados clínicos comparados entre los grupos positivos y negativos de <i>Chlamydia</i> spp. mediante la técnica CIFAR-CF.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 6.1	Alumnos de la UVM procesando muestras.	22
Figura 6.2	Procesamiento de las muestras por CIFAR.	24
Figura 7.1	Condiciones de vivienda de la región estudiada.	47
Figura 7.2	Estado de Tabasco y localización del muestreo.	48
Figura 7.3	Sexo de los pacientes.	49
Figura 7.4	Gráfico de signos y síntomas manifestados por los pacientes.	50
Figura 7.5	CIFAR- Rojo Neutro. Células epiteliales con inclusiones presuntivas de <i>Chlamydia</i> spp.	51
Figura 7.6	CIFAR- Eosina Y. Células epiteliales con inclusiones presuntivas de <i>Chlamydia</i> spp.	52
Figura 7.7	Citologías teñidas con Giemsa.	52
Figura 7.8	CIFAR. Levaduras y pseudohifas.	53
Figura 7.9	CIFAR. Detritus celulares y células epiteliales en placas.	54
Figura 7.10	CIFAR. Células epiteliales con inclusiones no presuntivas de <i>Chlamydia</i> spp.	54
Figura 7.11	Resultados de la amplificación de para el gen de la $\beta$ -globina.	56
Figura 7.12	Resultados de la amplificación para <i>Chlamydia</i> spp.	57
Figura 7.13	Resultados de la amplificación para <i>C. trachomatis</i> .	58
Figura 7.14	Resultados de la amplificación para <i>C. pneumoniae</i> .	59

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\mu\text{M}$	Micromol
$\mu\text{l}$	Micro litro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>C. abortus</i>	<i>Chlamydophila abortus</i>
<i>C. caviae</i>	<i>Chlamydophila caviae</i>
<i>C. felis</i>	<i>Chlamydophila felis</i>
<i>C. gallinacea</i>	<i>Chlamydophila gallinácea</i>
<i>C. ibidis</i>	<i>Chlamydophila ibidis</i>
<i>C. muridarum</i>	<i>Chlamydia muridarum</i>
<i>C. pecorum</i>	<i>Chlamydophila pecorum</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>
<i>C. suis</i>	<i>Chlamydia suis</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades. (Centers for Disease Control and Prevention)
CeNSIA	Organización de Salud de la Infancia y la Adolescencia
CIFAR-CF	Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución en Capa Fina
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERC	Enfermedad Respiratoria Crónica
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IRAs	Infecciones Respiratorias Agudas
LGV	Linfogranuloma Venereo
Mb	Megabase
mm	Milímetro
MOMP	proteína principal de la membrana externa
mQ	Agua desionizada

n/N	Número de muestra entre la población total
OMS	Organización Mundial de la Salud
P=	Probabilidad
Pb	Pares de Bases
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Svedberg. Coeficiente de Sedimentación.
sp.	Especie
spp.	Especies
TBE	Buffer de Tris, borato y EDTA
UV	Ultra violeta
UVM	Universidad del Valle de México
Mm	Micrómetros

---

**RESUMEN**

Los procesos infecciosos de las vías respiratorias superiores constituyen la causa más común de consulta médica pediátrica y de hospitalización. Se tiene conocimiento de la asociación entre la infección por *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, las dos últimas son casi exclusivamente causantes de enfermedad en el humano, mientras que *C. psittaci* se considera que se adquiere por zoonosis. En México las Infecciones respiratorias constituyen un importante problema de salud pública y representan la morbilidad más alta del país, así como la primera causa de consulta en los centros de salud. La incidencia global de las infecciones respiratorias agudas en México es de 22.96%, pero no existen datos referentes a infecciones respiratorias crónicas en el país. Objetivos: Determinar la incidencia de *Chlamydia* spp. en infantes con infecciones crónicas de las vías respiratorias altas. Metodología: Se evaluaron 151 pacientes (menores de 18 años) que recibieron consulta general en diversos centros hospitalarios de Tabasco. Se recabaron datos clínicos de infecciones respiratorias crónicas, De cada paciente se tomaron muestras de exudado faríngeo y lavado nasofaríngeo que se estudiaron por Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución en Capa Fina (CIFAR) y tinción de Giemsa para el diagnóstico de Chlamydia. Posteriormente se aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar las especies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* o *Chlamydophila psittaci*. Los datos se analizaron por estadística descriptiva y estadística inferencial para establecer la relación entre el cuadro clínico y la presencia del microorganismo durante la enfermedad. Resultados: Por la técnica de CIFAR resultaron 10.6% (16/151) de muestras presuntas positivas, en tanto que con la técnica de Giemsa resultaron 20.5 % (31/151) de muestras positivas; en ambas técnicas se reportaron como positivas al observar presencia de cuerpos de inclusión en las células epiteliales presentes en las muestras. Al realizar análisis molecular no se obtuvieron muestras positivas para *Chlamydia* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, y *Chlamydophila psittaci*. Conclusiones: De acuerdo a las citologías, se presentó una incidencia del 10.6% con la técnica de CIFAR, mientras que por la técnica de Giemsa se presentó un 20.5%. En lo que corresponde a la técnica molecular, no se encontró ADN de las bacterias del género *Chlamydia* analizadas, sin embargo, la presencia de cuerpos de inclusión presuntivos en las citologías, puede indicar sospecha de algunas otras bacterias similares a *Chlamydia* que poder ser las responsables de las infecciones respiratorias presentadas por los pacientes.

**ABSTRACT**

Infectious processes of the upper respiratory tract are the most common cause of pediatric medical consultation and hospitalization. It is aware of the association between infection with *C. psittaci*, *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*, the latter two are almost exclusively causing disease in humans, while *C. psittaci* is considered to be acquired by zoonosis. In Mexico respiratory infections are a major public health problem and represent the highest morbidity in the country, and the first cause of consultation in health centers. The overall incidence of acute respiratory infections in Mexico is 22.96%, but no data concerning chronic respiratory infections in the country. Objective: To determine the incidence of *Chlamydia* spp. in infants with chronic infections of the upper respiratory tract. Methodology: 151 patients (under 18 years) receiving general consultation in various hospitals in Tabasco were evaluated. Clinical data of chronic respiratory infections, from each patient were collected samples of throat swab and washing were taken nasopharyngeal that were studied by Cytology Fresh High Contrast and High Resolution Thin Layer (CIFAR), Giemsa for diagnosis of *Chlamydia*. Subsequently, was applied Polymerase Chain the Reaction (PCR) to determine the species *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pneumoniae*. Data were analyzed by descriptive and inferential statistics to establish the relationship between the clinical data and the presence of the organism during illness. Results: By the CIFAR technique 10.6% (16/151) of samples resulted positive, while the Giemsa technique 20.5% (31/151) of samples were positive; both techniques are reported as positive by observing the presence of inclusion bodies in the epithelial cells present in samples suspected. By performing molecular analysis no positive samples for *Chlamydia* spp. *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydophila psittaci* were obtained. Conclusions: According to cytology, an incidence of 10.6% with CIFAR technique was introduced, while the technique was presented Giemsa 20.5%. As relates to molecular technique, DNA from bacteria of the genus *Chlamydia* analyzed was no found however, the presence of bodies of presumptive inclusion in cytology may indicate suspected some other similar to *Chlamydia* bacteria to be responsible of those presented by patients respiratory infections.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedades Respiratorias

A pesar de los grandes avances médicos de las últimas décadas, las enfermedades respiratorias siguen representando un serio problema de salud pública (Álvarez 2005); está reportado que más de la mitad de las consultas diarias corresponden a infecciones del tracto respiratorio (Llor *et al.* 2011), causando una gran ausencia escolar y laboral (Díez *et al.* 2007), además de ser una importante causa de morbilidad y mortalidad en todas las edades (Álvarez 2005).

Las infecciones respiratorias se consideran un proceso inflamatorio complejo de las vías aéreas y de origen multifactorial donde las infecciones ocasionadas por virus, están relacionados con la patogénesis del asma, sobre todo en el paciente pediátrico; y que existe una estrecha relación entre las infecciones respiratorias agudas altas y la obstrucción bronquial, aunque desafortunadamente no es posible establecer el agente etiológico por limitaciones técnicas o por la implicación de otros factores causales (Conrado y Cobos 2007).

La mayoría de estas infecciones son autolimitadas y la efectividad de los antibióticos es marginal como en el caso de catarro común, la faringitis, la bronquitis aguda, la otitis media y la rinosinusitis (Llor *et al.* 2011).

Este tipo de infecciones pueden afectar al tracto respiratorio superior y/o al tracto respiratorio inferior, se clasifican en infecciones agudas e infecciones crónicas. Son causadas por virus y bacterias principalmente, afectando a todos los grupos de edad, siendo más frecuentes en niños y en adultos mayores (Secretaría de Salud 2012).

#### 1.1.1 Enfermedades Respiratorias Agudas

Las enfermedades respiratorias agudas, o bien conocidas como infecciones respiratorias agudas (IRAs) son afecciones del tracto respiratorio, generalmente de etiología viral o bacteriana, que pueden producir un espectro que comprende desde infecciones asintomáticas o leves hasta enfermedades graves, e incluso fatales,

dependiendo del patógeno causante, factores ambientales y del huésped (Secretaría de Salud 2012).

La Organización de Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA) define a las infecciones respiratorias agudas como enfermedades que afectan desde oídos, nariz, garganta hasta los pulmones, generalmente se autolimitan y no suelen durar más de 15 días. Se considera que algunos factores de riesgo para padecer estas enfermedades son el bajo peso al nacer, la lactancia materna ineficaz, la desnutrición, y el hacinamiento, así también como la exposición a humo y claramente si hay esquemas de vacunación incompletos (CeNSIA 2010).

### 1.1.2 Enfermedades Respiratorias Crónicas (ERCs)

De acuerdo a la OMS, las ERCs son enfermedades de las vías respiratorias y otras estructuras del pulmón que persisten mucho tiempo o bien que son para toda la vida. Algunas de las enfermedades respiratorias crónicas incluyen al asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alergias respiratorias y la hipertensión pulmonar. Los factores de riesgo para este tipo de enfermedades son el tabaquismo, contaminación del aire en espacios cerrados, contaminación exterior, y la hipersensibilidad a diversos alérgenos en el caso de la exposición a ciertos polvos y productos químicos que puede representar un riesgo ocupacional. Cerca de 235 millones de personas padecen de asma en el mundo, el 90% de las muertes por EPOC se producen en países de bajos y medianos ingresos, reportándose que 3 millones de personas murieron a causa de esta en el 2005 (OMS 2015).

Debido a esto es necesario realizar un diagnóstico de enfermedades respiratorias crónicas, así como atender a tiempo los signos y síntomas que se presenten en el paciente, para evitar la cronicidad y complicaciones.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Infecciones Respiratorias

Los procesos infecciosos de vías respiratorias superiores constituyen la causa más común de consulta médica pediátrica y de hospitalización; siendo de las enfermedades que mayor ausencia escolar y laboral producen (Ciria *et al.* 2011). Los cuadros clínicos más frecuentes que afectan a las vías aéreas superiores incluyen faringitis, síndromes laríngeos, otitis y sinusitis (Díez *et al.* 2007).

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) constituyen un grupo importante de alta morbilidad y baja mortalidad, siendo las enfermedades que mayor utilización de servicios de salud, ingresos hospitalarios y prescripción farmacológica requieren (Naghypour *et al.* 2007; Ciria *et al.* 2011).

Una proporción muy alta (60% aproximadamente) de las infecciones agudas inician como infecciones virales, las cuales de no controlarse, se pueden complicar con bacterias lo cual agrava el cuadro clínico (Naghypour *et al.* 2007).

En los países desarrollados, los virus representan una considerable proporción asociada con IRAs, siendo el virus sincitial el más frecuente en esta patología. Sin embargo existen IRAs asociadas a infecciones causadas por bacterias, la causante más común es *Streptococcus pneumoniae* (Xuan *et al.* 2012). Además de esta, existen otras bacterias causantes de neumonía atípica, entre las que podemos mencionar a *Mycoplasma pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *Legionella pneumophila* (Cho *et al.* 2011).

En México, las IRAs constituyen un importante problema de salud pública y representan la morbilidad más alta del país, así como la primera causa de consulta en los centros de salud.

Las IRAs que afectan el tracto respiratorio inferior son una de las principales causas de mortalidad en niños alrededor del mundo, particularmente en países en

desarrollo, causando aproximadamente un tercio de todas las muertes estimadas en niños menores de 5 años. El promedio de episodios de infección respiratoria al año en niños menores de 5 años es de 7, y aproximadamente 3 en adultos (Herrera *et al.* 2007).

Las IRAs de las vías bajas fueron la sexta causa de muerte en México durante 2008, con 13.6 defunciones por 100 000 habitantes (de la Vara *et al.* 2011).

Las infecciones de las vías respiratorias bajas son altamente prevenibles y se consideran un indicador del grado de avance en la provisión de servicios, del éxito en la promoción de la salud e incluso del nivel de desarrollo humano alcanzado. Por ello se asocian con las zonas rurales y más marginadas del país (de la Vara *et al.* 2011).

### **2.1.1 Epidemiología**

La incidencia de neumonía en el mundo varía por país, sexo y edad, lo que afecta en los registros relacionados a la epidemiología, etiología, morbilidad, mortalidad, tasa de resistencia a antibióticos y costo económico de la enfermedad. La edad es un determinante importante de la frecuencia de enfermedades respiratorias, ya que las personas más afectadas son los niños y los adultos mayores (Jokinen, *et al.* 1993).

De acuerdo a la OMS en el año 2012, las infecciones respiratorias fueron el primer lugar en causas de defunción en los países de ingreso bajo, tercer lugar en países de ingreso mediano bajo y el sexto lugar en países de ingreso mediano alto y alto, mientras que enfermedad pulmonar obstructiva crónica fue la tercera causa de defunciones en el mundo del año 2000 al 2012 (OMS 2015).

El Continente Americano no queda exento de estos resultados estadísticos, pues estas infecciones representan del 30 al 50 % de las consultas pediátricas y del 20 al 40 % de las hospitalizaciones (Tamayo *et al.* 2015).

La incidencia global de las infecciones respiratorias agudas en México es del 22.96%. (22965.92 por cada 100 000 habitantes), sin embargo no existen datos que indiquen la situación en cuanto a infecciones respiratorias crónicas (Dirección General de Epidemiología 2015).

En un estudio de poblaciones indígenas del sureste de México se reportó que la mayoría de los episodios de IRAs se presentan en el hogar, y son las madres de familia, quienes en primera instancia interpretan, diagnostican y atienden la sintomatología de los episodios. Sin embargo, las madres, en muchas ocasiones no están capacitadas para detectar oportunamente la gravedad que expresan los signos y síntomas de las IRAs, lo cual pone en riesgo la vida del menor. Además, el proceso salud-enfermedad-atención del núcleo familiar está condicionado por el sistema de creencias y valores culturales de cada comunidad, lo que implica que las concepciones populares de las enfermedades van a diferir de las explicaciones otorgadas por los médicos (Romero *et al.* 2004).

## **2.2 *Chlamydia* spp en las infecciones respiratorias**

Desde hace varias décadas, se tiene conocimiento de la asociación que existe entre las enfermedades respiratorias y las distintas especies del género *Chlamydia*, acuñándose el concepto de “infecciones respiratorias Chlamydiales” (Becker 1978).

El género *Chlamydia* está compuesto por un grupo grande de microorganismos que sólo pueden replicarse en el citoplasma de células animales vivas, propiedad que semeja al parasitismo intracelular obligado de los virus. Otras características de las clamidias es que semejan propiedades virales debido a su tamaño relativamente pequeño (2µm) y su inhabilidad para replicarse en células tratadas con linfocinas. Las clamidias son organismos procarióticos y su entidad celular se mantiene durante su ciclo de replicación. Se dividen por fisión binaria, contiene ADN y ARN, ribosomas 70s, actividades enzimáticas y capacidad de síntesis macromolecular; contiene una pared celular rígida con membrana externa similar a la envoltura de las bacterias Gram

negativas, poseen plásmidos, y son susceptibles a la acción de algunos antibióticos incluyendo tetraciclinas, cloranfenicol, etitromicina y penicilina (Becker 1978).

El género *Chlamydia* incluye a las especies *C. trachomatis* (humanos), *C. suis* (cerdos) y *C. muridarum* (ratón y hámster), en tanto que para el género *Chlamydophila* se reporta *C. psittaci* (aves y otras especies), *C. gallinacea* (aves de corral), *C. felis* (gatos), *C. abortus* (ovejas, cabras y ganado bovino), *C. caviae* (cobayas), *C. pecorum* (ovejas y ganado bovino), *C. ibidis* (sagrado ibises) y *C. pneumoniae* (hombre y otras especies). Aunque la mayoría de estos microorganismos son muy específicos de huésped, *C. pneumoniae* y *C. psittaci* tienen una amplia variedad de hospedadores. Se ha observado que *C. psittaci* afecta no solo a las aves y al ser humano, sino también al ganado vacuno, a las ovejas, a los cerdos, a los caballos y a otros animales (Sachse *et al.* 2009).

Con respecto a enfermedades respiratorias causadas por estos microorganismos, se evidenció la asociación entre la infección por *C. psittaci* y pacientes que tenían contacto con aves (Bourke *et al.* 1989), así mismo, se observó una alta incidencia de infecciones respiratorias en neonatos ocasionadas por *C. trachomatis*, además está comprobado que un alto número de infecciones respiratorias fueron provocadas por *C. pneumoniae* (Weiss *et al.*, 1986; Wheeler *et al.* 1990).

Dentro del orden *Chlamydiales* se han descubierto algunas familias y linajes de otras bacterias muy relacionadas con *Chlamydia*. Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se presentan en diversos hospederos del reino animal. Muchos de estos microorganismos viven en estrecha asociación con las amebas de vida libre y son capaces de infectar mamíferos, aves, reptiles peces, insectos y crustáceos. Por lo tanto, bacterias relacionadas con *Chlamydia* pueden ser adquiridas en partículas de aerosoles de un reservorio ambiental o animal. La mayoría de estas bacterias están relacionadas con enfermedades respiratorias humanas, esto de acuerdo a diagnóstico serológico y molecular (Niemi *et al.* 2011).

Las bacterias relacionadas con *Chlamydia*, posiblemente asociadas con enfermedades respiratorias de humanos pueden incluir a *Parachlamydia acanthamoebae*, *Protochlamydia* spp. *Rhabdochlamydia* spp. *Simkania negevensis* y *Waddlia chondrophila*; siendo *Parachlamydia* spp y *Waddlia chondrophila*, involucradas en abortos involuntarios en seres humanos (Niemi *et al.* 2011); incluso, un análisis reciente sugiere que especies del género *Rhabdochlamydia* podrían afectar la morbilidad y mortalidad en los recién nacidos prematuros, sin embargo su papel en la infección de vías respiratorias se desconoce (Lamoth *et al.* 2011).

### 2.2.1 *Chlamydia trachomatis*

*C. trachomatis* es ampliamente reconocida como causa de la enfermedad de transmisión sexual bacteriana más común, y a pesar de que es nativa de climas tropicales y subtropicales, actualmente se encuentra diseminada por todo el mundo. De acuerdo a la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *C. trachomatis* es la enfermedad de transmisión sexual notificada con más frecuencia en los Estados Unidos (CDC 2015).

A pesar de que habitualmente se considera que éste microorganismo como parte de los patógenos de los órganos genitales, existe la enfermedad extragenital y el contagio no sexual. *C. trachomatis* puede ingresar por cualquier mucosa húmeda, infecta preferentemente el epitelio columnar de las mucosas de los ojos, las vías respiratorias y los genitales. Esta infección induce inmunidad, persistiendo durante meses o años, si el paciente no recibe tratamiento.

*C. trachomatis* ingresa al organismo por inoculación directa de objetos contaminados o por contacto directo de secreciones infectadas: principalmente los dedos, moscas, toallas y gotas de fúge de estornudo y tos. Tanto por la vía de transmisión sexual como por la no sexual, la expansión de la infección por *C. trachomatis* en la población puede ser vertical de padres a hijos y horizontal, entre los miembros de la comunidad; factores como el hacinamiento, hábitos deficientes de higiene sexual y corporal, medio

ambiente insalubre así como condiciones socioeconómicas bajas, aumentan considerablemente la propagación de la enfermedad (Crichton *et al.* 2015).

En el tracto respiratorio inferior, la colonización crónica y reincidente de bacterias patógenas induce una respuesta inflamatoria crónica con daño pulmonar secundario. Esta hipótesis, denominada “teoría de círculo vicioso”, involucra múltiples mecanismos por medio de los cuales los agentes infecciosos podrán generar inflamación crónica de la vía respiratoria inferior (Cole 1989). Una teoría similar podría aplicarse a los casos de rinosinusitis y faringoamigdalitis crónicas.

Se ha demostrado que, microorganismos que son considerados colonizadores, liberan productos extracelulares como proteínas, lipopoligosacáridos y peptidoglicanos, capaces de disparar procesos inflamatorios y se ha establecido una relación importante entre el conteo bacteriano de muestras obtenidas por broncoscopía de pacientes con EPOC estable y marcadores de inflamación crónica (Hill *et al.* 2000).

En la mujer las infecciones asintomáticas u oligosintomáticas de las trompas de Falopio provocan inflamación crónica y desestructuración de las mismas que puede acabar ocasionando infertilidad. La etiopatogenia de este proceso no es bien conocida, aunque se cree que podría estar relacionada con una reacción autoinmune desencadenada por determinadas proteínas del microorganismo. En los países desarrollados, alrededor del 20% de mujeres gestantes presenta cervicitis por *C. trachomatis*, generalmente asintomática pero fácilmente detectable mediante el examen vaginal (Roca 2007).

El recién nacido puede adquirir la infección por *C. trachomatis* en el útero o al pasar por el canal de parto, pudiendo posteriormente manifestarse con síntomas oculares y compromiso del tracto respiratorio (Gallo *et al.* 2010). Aproximadamente del 50 al 75% de los recién nacidos de madres infectadas por *C. trachomatis*, adquieren la infección por dicho patógeno en uno o más sitios anatómicos, incluyendo conjuntiva, región nasofaríngea, recto y vagina. De éstos, la conjuntiva y región nasofaríngea son los sitios más comúnmente afectados (Chen *et al.* 2007). Otras entidades nosológicas de niños y

adultos que son también de elevada prevalencia, como las infecciones respiratorias del recién nacido (Principi 2001), las conjuntivitis, otitis (Soriano 1997) y faringitis de repetición, la artritis reactiva o aséptica (Villarreal 2002), las meningitis que permanecen catalogadas como “abacterianas”, “inespecíficas” o “de causa no conocida”, también pueden ser infecciones de relación causal con *C. trachomatis* y *Mycoplasma* sp. (Taylor Robinsson 2002).

### 2.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

*C. pneumoniae* es una bacteria cosmopolita, más del 50% de los adultos presentan anticuerpos contra este microorganismo y en la mayoría de las ocasiones se presenta de forma asintomática (Yamasaky *et al.* 1999). Recientemente se ha tomado interés sobre este microorganismo por su posible relación etiopatogénica en las lesiones aterosclerosas arteriales, aunque aún se encuentra en debate (Saikku *et al.* 1988; Grayston 1993; Thom *et al.* 1992; Gloria *et al.* 1997; Ridker *et al.* 1999; Altman *et al.* 1999; Izadi *et al.* 2012). Estudios iniciales en Escandinavia sugerían que la infección respiratoria se adquiría en la adolescencia, sin embargo, estudios posteriores en otros países como Japón o España mostraban que hasta el 40% de los niños a los 10 años eran seropositivos (Normann *et al.* 1998; McMillan 1998).

*C. pneumoniae* está siendo reconocida cada vez más como causa importante de neumonía adquirida en la comunidad y como factor de riesgo para EPOC, asma y aterosclerosis (Blasi 2009; Pino e Hincapié 2008).

Este microorganismo se disemina en la población a través de infecciones del tracto respiratorio y probablemente a través de fomites (Normann *et al.* 1998). Es el agente causal de la neumonía atípica en pacientes hospitalizados y en niños pequeños (American Academy of Pediatrics 1997). La neumonía por *C. pneumoniae* no presenta ninguna característica particular, más que acompañarse frecuentemente de disfonía, con un periodo de incubación de aproximadamente 1 mes (Grayston 1989). Se ha involucrado como

agente causal del síndrome coqueluchoide, otitis media, faringitis, sinusitis y bronquitis, incluso ha causado epidemias en algunos lugares del mundo. La edad pico de presentación de la enfermedad es de los 5 a los 15 años de edad (American Academy of Pediatrics 1997).

La neumonía y la bronquitis son las enfermedades más frecuentemente asociadas con *C. pneumoniae*, sin embargo, observar la infección asintomática o no diagnosticada es un aspecto que se presenta regularmente (Kuo *et al.* 1986). La enfermedad con un cuadro de síntomas leves es el resultado más común de la infección por esta bacteria. En una serie de estudios aproximadamente el 10% y 5% de los casos de neumonía y bronquitis y sinusitis respectivamente han sido atribuidos a este microorganismo (Aldous *et al.* 1992; Wang y Grayston 1990).

Los seres humanos son el único reservorio conocido de *C. pneumoniae* y la transmisión se cree que es de persona a persona a través de las secreciones de las vías respiratorias. Esta transmisión parece ser relativamente ineficiente. Cuando los contactos de pacientes con infección por *C. pneumoniae* son investigadas, pocos casos de transmisión secundaria se detectan (Grayston 1986; Conklin *et al.* 2013) El periodo de incubación de *C. pneumoniae* es de varias semanas, más tiempo que la de otros patógenos respiratorios (Mordhorst 1994).

La infección de *C. pneumoniae* inicia en las vías aéreas altas y el microorganismo en muchas personas permanece allí indefinidamente. En algunos pacientes *C. pneumoniae* se desplaza, probablemente a través de la sangre, a otros lugares del organismo. Una proteína de la membrana de este microorganismo es capaz de inducir una respuesta autoinmune pudiendo atacar a diversos tejidos del organismo (Roca 2007).

No existe un consenso de los aspectos clínicos, signos y síntomas que se pueden observar en la infección por *C. pneumoniae*; sin embargo, diversas características del cuadro clínico pueden ayudar a distinguir el proceso infeccioso por esta bacteria. Es común observar una sintomatología vaga e inespecífica en el proceso agudo de esta

infección la cual tiende a volverse crónica induciendo un proceso típico de bronquitis o síndrome de neumonía. La tos crónica es muy común y generalmente se presenta por periodos prolongados de tiempo (Jama-Kmiecik *et al.* 2015).

Además *C. pneumoniae* se ha asociado con otras enfermedades agudas y crónicas. Esta bacteria ha sido aislada de pacientes con sinusitis purulenta (Hashigucci 1992) y con otitis media. También ha sido descrita en pacientes con faringitis primaria; sin embargo, es importante destacar que no existe claridad de la incidencia real de estas patologías. Existen reportes que discrepan en la incidencia de esta bacteria y su asociación con la faringitis, mientras que en países nórdicos se reporta en 8%, mientras que la incidencia en países anglosajones parece ser menor (Huovinen 1989).

La enfermedad respiratoria crónica severa ha sido presuntamente asociada con la infección por *C. pneumoniae*. Pacientes con infección respiratoria por esta bacteria han mostrado ser más propensos al desarrollo de bronquitis asmática, subsecuente a su enfermedad respiratoria, esto sugiere que *C. pneumoniae* es un factor importante en el desarrollo de asma o en la exacerbaciones asmáticas (Hahn *et al.* 1991).

Algunos autores han relacionado la infección por *C. pneumoniae* como desencadenante de las crisis en los niños con asma (Bone 1991; Emre *et al.* 1991; Korppi y Leionen 1995). Se ha encontrado que existe relación entre los anticuerpos específicos de *C. pneumoniae* con la sintomatología del asma (Bjömsson *et al.* 1996; Johnston 1997). Inclusive, se ha demostrado la presencia de IgE anti- *C. pneumoniae* en 85.7% de los niños con cultivo positivo y sibilancias, en contraste con 9% de los pacientes con cultivo positivo y neumonía sin sibilancias (Emre *et al.* 1995). Por otro lado, Cook *et al.* (1998), no encontraron relación entre la infección por este germen y la sintomatología aguda del asma, mostrando un papel más importante como promotor más que como causa de las exacerbaciones.

### **2.2.3 *Chlamydophila psittaci***

La clamidiosis aviar es una enfermedad de las aves causada por la bacteria intracelular *C. psittaci*. En los humanos, esta enfermedad se denomina psitacosis. Se puede denominar clamidiosis aviar o psitacosis en aves psitácidas; aunque el término clamidiosis aviar se utiliza en general, para otras especies de aves (Arraiz *et al.* 2012).

Las infecciones son particularmente comunes entre las aves psitácidas y las palomas, aunque probablemente sean susceptibles la mayoría o todas las especies de aves. Algunas aves portan este organismo siendo asintomáticas. En otros casos se enferman de manera leve a grave, ya sea en el momento o después de estar bajo presión. Se pueden observar pérdidas económicas significativas en los pavos y los patos, y puede existir un alto grado de mortalidad en las aves psitácidas clínicamente afectadas (Verminnen *et al.* 2008).

*C. psittaci* puede dividirse en serotipos/serovares o alternativamente, en genotipos. Las cepas aviarias relacionadas con la clamidiosis aviar pertenecen a la especie *C. psittaci*. A la fecha, se han diferenciado claramente nueve genotipos distintos en base al gen ompA que codifica para la principal proteína de la membrana externa (MOMP). Siete de estas “serovariedades clásicas” se considera que tienen lugar principalmente en un orden o clase específicos de aves y dos en hospedadores no aviarios, es decir, el genotipo A en aves psitácidas, el B, en palomas, el C en patos y gansos, el D en pavos, el E en palomas, patos y otras aves, los E/B en patos, pavos y palomas, el F en periquitos, el WC en ganado vacuno, y M56 en roedores (CFSPH 2009). La mayoría de los genotipos aviarios también se han identificado esporádicamente en cepas aisladas de casos de transmisión zoonótica al ser humano, sobre todo A, B y E/B (Gaede *et al.* 2008; Heddema *et al.* 2006; Vanrompay *et al.* 2007). Mientras tanto, se han introducido subgrupos para tres de los genotipos más heterogéneos, es decir, AVS1, A-6BC, A-8455, EB-E30, EB-859, EB-KKCP, D-NJ1 y D-9N, y se han sugerido seis nuevos genotipos provisionales para cubrir las cepas que previamente no eran tipificables, siendo estos el, 1V, 6N, Mat116, R54, YP84, y CPX0308, de tal forma que el número total de genotipos asciende a 15 (Sachse *et al.* 2009).

La especie *C. psittaci* incluye algunos pero no todos los organismos que anteriormente se denominaban *C. psittaci*. En 1999, las *Chlamydiaceae* fueron reorganizadas, según los análisis de ARN ribosómico. Se estableció el nuevo género *Chlamydophila*, y todas las cepas aviares de *Chlamydia psittaci* fueron reasignadas a *Chlamydophila psittaci* (Everet *et al.* 1999). La mayoría de las cepas de mamíferos de *Chlamydia psittaci* fueron reclasificadas como *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* o *Chlamydophila caviae*, pero dos cepas de mamíferos, WC y M56, fueron ubicadas en *Chlamydophila psittaci*. WC fue aislado de una epizootia en ganado bovino, y se encontró M56 durante un solo brote en ratas almizcleras (Andersen 1991; Vanrompay *et al.* 1997).

*C. psittaci* es una bacteria también cosmopolita. Este organismo es particularmente común en aves psitácidas de la región tropical y subtropical, puede transmitirse entre las aves por la inhalación de polvo o partículas aerógenas infecciosas como las plumas, y por la ingestión de material infeccioso, tales como cadáveres en descomposición (Miyairi *et al.* 2010). En las heces de las aves se excretan grandes cantidades de este organismo pudiendo convertirse en partículas aerógenas cuando la materia fecal se seca. También se encuentra en secreciones respiratorias y orales. Algunas aves portan este organismo sin presentar síntomas, y pueden eliminarlo de manera intermitente durante períodos prolongados. Además, puede transmitirse por fomites tales como los alimentos o el agua contaminados. Los mosquitos, los ácaros y los piojos pueden estar involucrados en la transmisión mecánica (Beekman y Vanrompay 2009).

Los humanos se infectan generalmente después de inhalar polvo, plumas o secreciones y excreciones en aerosol contaminados. El contacto directo con aves infectadas, incluidas las mordeduras, puede propagar la enfermedad. Se han informado casos inusuales de transmisión de persona a persona, posiblemente a través de la propagación en aerosol durante la existencia de tos paroxística (Beekman y Vanrompay 2009).

Una vez en el hombre *C. psittaci*, a partir de las vías respiratorias, puede llegar a la sangre y finalmente localizarse en los alvéolos pulmonares y en las células del sistema reticuloendotelial del bazo y el hígado. La presencia del microorganismo provoca una reacción inflamatoria linfocitaria, que en los pulmones hace que los alvéolos se llenen de productos inflamatorios. En ocasiones en los tejidos afectados se observan macrófagos con inclusiones citoplásmicas característicos (inclusiones de Levinthal-Coles-Lillie) (Roca 2007). El periodo de incubación puede extenderse hasta un mes; la mayoría de las infecciones se tornan sintomáticas en 5-14 días (Beeckman y Vanrompay 2009).

El comienzo de la psitacosis puede ser agudo o sutil. La enfermedad varía de una enfermedad leve similar a la gripe con fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, anorexia, malestar, dolor de garganta y/o fotofobia, con o sin síntomas respiratorios, a neumonía atípica grave con disnea. Algunos pacientes presentan tos seca, que puede volverse mucopurulenta. También se han informado signos gastrointestinales, artralgia, inflamación de las articulaciones y erupción no específica. En general, en infecciones no complicadas, la enfermedad dura aproximadamente 7-10 días y puede ser autolimitante. En algunos casos se producen complicaciones. Las mujeres embarazadas pueden tener un parto prematuro y es posible que muera el producto. También se pueden observar endocarditis, miocarditis, enfermedad renal, hepatitis, anemia y signos neurológicos tales como encefalitis, meningitis y mielitis. Es posible la presencia de insuficiencia multiorgánica (Voigt *et al.* 2012).

El riesgo de psitacosis es más alto en las personas que están expuestas a las aves o sus tejidos. Este grupo incluye dueños de aves, veterinarios, trabajadores de laboratorios, empleados de negocios de mascotas y personas que trabajan con aves de corral (incluidos los que trabajan en plantas procesadoras). Desde 1996, a nivel mundial se han reportado casos de psitacosis que oscilan desde menos de 10 a más de 200 por año; se cree que se producen casos adicionales no diagnosticados o no informados. La incidencia anual fluctúa debido a los brotes. Actualmente, en los Estados Unidos se informan menos de 50 casos confirmados por año (Dickx *et al.* 2010).

Las infecciones en humanos son relativamente comunes después de la exposición a aves infectadas. En un brote, el 31% de los hogares que recibió aves domésticas de una bandada infectada se enfermó o desarrolló anticuerpos contra *C. psittaci*. Muchas infecciones han sido asociadas con aves domésticas, aviarios o palomares (Arraiz *et al.* 2012).

### **2.3 Enfermedades respiratorias causadas por otros microorganismos atípicos**

Los estudios han demostrado que una amplia gama de patógenos puede causar neumonía. Entre ellos se encuentra *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Legionella pneumophila* que son los causantes más comunes de neumonía atípica, estas representan aproximadamente el 15% de los casos de neumonía adquirida. La principal bacteria causante de neumonía es *Streptococcus pneumoniae*, seguida de *Mycoplasma pneumoniae* (Paul *et al.* 2009).

*M. pneumoniae* es un agente infeccioso común de las vías respiratorias y se transmite de persona a persona a través de aerosoles. La infección por este patógeno se produce en todos los grupos de edad, aunque los niños mayores y adultos jóvenes se ven afectados con mayor frecuencia que los otros grupos. Las manifestaciones clínicas van desde casos leves de traqueobronquitis hasta la neumonía atípica grave y puede ser seguido por un amplio espectro de complicaciones extrapulmonares (Dumke *et al.* 2015).

Las cepas de *M. pneumoniae* pueden dividirse en subtipos y variantes de acuerdo con las diferentes secuencias en el gen que codifica para la adhesina P1 inmunodominante principal. Debido a que los mycoplasmas no tienen pared celular, no son susceptibles a los antibióticos betalactámico, y macrólidos que son generalmente aceptados como agentes de primera elección para el tratamiento, especialmente en los niños. Sin embargo, las mutaciones en el locus 23S rRNA de MP se ha demostrado que da lugar a resistencia a los macrólidos (Dumke *et al.* 2015).

Por otra parte *Legionella* spp, son bacterias Gram-negativas con estrictos requisitos de crecimiento, crecen en diversos medios selectivos y no selectivos y tienen una apariencia de vidrio esmerilado. Las enfermedades legionarias son neumonías atípicas que podrían clínicamente asemejarse a neumonías neumocócicas o de otras bacterias. Los resultados iniciales parecen indicar un síndrome clínico distinto, sin embargo algunos estudios prospectivos han demostrado que las enfermedades de *Legionella* y la neumonía neumocócica podrían tener algunos hallazgos clínicos y radiografías similares (Lettinga *et al.* 2003).

Los síntomas van desde una enfermedad leve a una neumonía grave que requiera de ingreso hospitalario. Puede causar síntomas tales como dolor de cabeza, mialgia, astenia y anorexia. La fiebre suele estar presente, excepto en algunos pacientes inmunocomprometidos, y por lo general acompañado por bradicardia relativa. La presencia de manifestaciones gastrointestinales y neurológicas en pacientes con neumonía debe sugerir la enfermedad del legionario (Cunha *et al.* 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias crónicas de la vía superior, son una de las causas más frecuentes de morbilidad en infantes menores de 18 años de edad, en la gran mayoría de los casos no se logra llegar al diagnóstico del agente causal, lo que ocasiona que este tipo de infecciones se vuelvan recurrentes.

Está ampliamente descrito en la literatura que microorganismos de comportamiento biológico atípico están asociados con estas infecciones, tal es el caso de algunos géneros de la familia *Mycoplasmataceae* y de la familia *Chlamydiaceae*.

Respecto a la familia *Chlamydiaceae*, la gran mayoría de los estudios se han enfocado a investigar la asociación de estas infecciones con *C. pneumoniae*, dejando de lado la búsqueda de algunas otras especies que se han referido como posible causa de infecciones respiratorias, tal es el caso de *C. psittaci* y *C. trachomatis*.

En México la incidencia global de las infecciones respiratorias agudas en México es de 22.96%, más no existen estudios de prevalencia de las infecciones respiratorias crónicas. Estas pudieran ser más frecuentes en la población rural que se encuentra al margen de la atención médica especializada y está expuesta a infecciones transmitidas por animales domésticos con los que convive cotidianamente.

En regiones de clima tropical y subtropical del país, pudieran existir infecciones respiratorias por microorganismos atípicos nativos de este clima, con mayor frecuencia que en otras poblaciones.

Esta investigación, permitirá conocer la incidencia real de *Chlamydia* spp. en la población infantil de una región del sureste de México que presenta cuadros infecciosos crónicos o persistentes de la vía respiratoria superior.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existe una alta prevalencia de *Chlamydia* spp. en infantes de una región del sureste de México que presentan infecciones crónicas de tracto respiratorio superior

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de *Chlamydia* spp. en niños de una región del sureste de México que padecen infecciones respiratorias crónicas y recurrentes de las vías respiratorias altas y correlacionarla con el cuadro clínico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los hallazgos morfológicos y citopatológicos presuntivos de la infección por *Chlamydia* spp. en muestras de lavado nasofaríngeo, bucofaríngeo y exudado faríngeo empleando las técnicas citológicas de CIFAR-CF y citología teñida con Giemsa.
2. Determinar la presencia de *Chlamydia* spp. mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR).
3. Establecer parámetros clínicos y citológicos asociados a la infección por *Chlamydia* spp. mediante la correlación del cuadro clínico con los hallazgos citológicos y la prueba de PCR.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Casos incluidos en el estudio

Para este trabajo se incluyeron 151 infantes (menores de 18 años) que acudieron a consulta general en Centros de Atención Médica Comunitaria pertenecientes a la Secretaría de Salud del estado de Tabasco, México, por patologías respiratorias reincidentes o con signos y síntomas que indicaban cronicidad del proceso respiratorio. Se excluyeron los pacientes de los cuales no se obtuvo la firma de consentimiento informado por parte de sus padres o tutor.

Se recolectaron muestras de lavado nasofaríngeo, bucofaríngeo y exudado faríngeo de cada uno de los pacientes, la metodología se explica ampliamente en las secciones siguientes.

El muestreo se realizó en 2 etapas, en Mayo del 2015 se recolectaron 90 muestras de población pertenecientes al Ejido La Isla, municipio de Tenosique y posteriormente en Junio del 2015 se recolectaron 60 muestras de población perteneciente al municipio de Huimanguillo, en la región llamada La Venta.

### 6.2 Toma de muestra

*Exudado faríngeo:* Para la toma de este tipo de muestra, se les indicó a los padres o tutores que el paciente debería asistir sin aseo bucal y sin haber ingerido alimentos antes del muestreo.

Se le explicó brevemente al paciente y a los padres y/o tutores cómo se realizaría la toma de la muestra, (es decir abrir la boca diciendo “ahh” y con un abatelenguas estéril tocar la lengua presionándola suavemente para abajo, se introdujo el hisopo estéril

tocándose las paredes y techo de la cavidad faríngea, se le indicó además, que este procedimiento no causaría ningún malestar).

Se preparó el paquete con 3 hisopos (PROTEC<sup>MR</sup>) y se le pidió al paciente que abriera la boca y dijera “ahh”, con ayuda del abatelenguas se presionó ligeramente para tener acceso a la parte posterior de la garganta. Con el hisopo se frotó la pared de la garganta (utilizando un hisopo para la parte izquierda, otro para la parte derecha y tercer hisopo para la parte posterior de la garganta), evitando tocar dientes y/o lengua con los hisopos antes o después de la toma de la muestra. Al final se colocaron los 3 hisopos en un tubo estéril de plástico de 10 ml (Fisherbrand).

**Lavado nasofaríngeo:** Para la toma de este tipo de muestra, se le indicó al padre o tutor del paciente, que éste no debía limpiarse o sacudirse la nariz antes del procedimiento, además de no ingerir agua ni alimentos.

Se les explicó brevemente además, cuál sería el procedimiento de la toma de muestra: *“Con una jeringa sin aguja se le irrigará agua estéril por cada una de las fosas nasales, evite tragarla y trate de recuperarla por la boca, o bien, recupérela por la otra fosa nasal”*. Para lograr esto, se tomó una jeringa estéril y se retiró la aguja, se recogieron 10 ml de solución salina estéril. Se colocó al paciente con la cabeza ligeramente hacia atrás; se vaciaron 5 ml de la solución estéril por una fosa nasal presionando ligeramente la otra fosa nasal por unos segundos para que no saliera la solución que se estaba irrigado. Se recogió el líquido irrigado liberado por las fosas nasales o bien por la boca en una pomadera o frasco de plástico estéril; se realizó el mismo procedimiento con la otra fosa nasal agregando los 5 ml de solución salina restante.

En caso que el paciente no lograra realizar el procedimiento antes descrito, se realizaba un lavado faríngeo para lo cual el paciente debía hacer “gárgaras” con 10 ml de la solución salina estéril y se recolectaban en la misma pomadera donde se recogió el lavado nasofaríngeo).

### **6.3 Procesamiento y preparación inicial de las muestras**

El procesamiento inicial de las muestras se realizó en la Universidad del Valle de México (UVM) campus Villahermosa en el estado de Tabasco y posteriormente se enviaron al Laboratorio de Patobiología del Departamento de Patología la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En la UVM se inició el procesamiento de las muestras de lavado nasofaríngeo (**Fig.6.1**), esto consistió en la concentración de las muestras a un volumen determinado mediante centrifugación, para tal efecto se realizó el procedimiento que a continuación se describe:



**Fig.6.1** Personal de la UVM Área de la Salud, procesando las muestras en el laboratorio.

Como paso inicial, se vertió el contenido del contenedor estéril a un tubo de plástico de 15 ml, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado (concentrado celular) se resuspendió aproximadamente en un volumen final de 1.5 ml de muestra el cual fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Se colocaron las muestras en refrigeración a 4°C hasta su envío para su procesamiento citomorfológico y microbiológico final.

Al llegar al Laboratorio de Patobiología de la Facultad de Medicina de la UANL se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min y se retiró 1ml de sobrenadante, concentrando la muestra a un volumen final de 500  $\mu$ l.

El tipo de muestra que se procesó inicialmente fueron las muestras de exudado faríngeo, donde los 3 hisopos se resuspendieron en 500  $\mu$ l de amortiguador PBS estéril en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó el resuspendido a 3500 rpm por 10 min y se retiraron 200  $\mu$ l de sobrenadante, quedando un volumen final de 300  $\mu$ l por muestra.

Como procesamiento final, se realizó una mezcla con las muestras de lavado nasofaríngeo o bucofaríngeo y las muestras de exudado faríngeo de cada uno de los pacientes, ambas muestras se colectaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se homogenizaron en un equipo vortex, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos (Centrífuga refrigerada: LABNET, Modelo: PrismR) y se concentraron a un volumen final de 500  $\mu$ l.

## **6.4 Análisis de las Muestras**

### 6.4.1 Análisis del cuadro clínico del grupo de pacientes estudiados.

Se evaluó a los pacientes clínicamente y se llenó un formato de entrevista clínica, el cual incluyó los parámetros más relevantes de la evaluación diagnóstica.

**Nota:** La entrevista fue llenada por el médico, y fue respondida por los padres o tutor del menor (Indexada al final de esta sección).

### 6.4.2 Evaluación de los hallazgos citomorfológicos empleando las técnicas citológicas de CIFAR-CF y Citología teñida con Giemsa.

Las muestras respiratorias (exudado faríngeo y lavado nasofaríngeo/bucofaríngeo) se almacenaron a 4°C hasta el momento de la realización de las pruebas citológicas y microbiológicas. A continuación se describe detalladamente cada uno de los procesamientos de las muestras para la realización de la técnica citológica:

### Técnica Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución en Capa Fina (CIFAR-CF)

Se realizó como primer paso la resuspensión del contenido celular empleando para tal efecto tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en los cuales se agregaron 500  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4) estéril al contenido celular.

Posteriormente cada tubo se llevó a agitación de baja intensidad con vortex para evitar daños a las estructuras celulares hasta que se resuspendiera el paquete celular. Para recuperar el contenido celular, se centrifugó a 3000 rpm y el precipitado obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ l de amortiguador PBS estéril para la realización de las pruebas citológicas y microbiológicas.

Posteriormente, en 1 portaobjetos se colocaron 3 gotas separadas de 10  $\mu$ l de la suspensión celular y a cada uno de ellos se agregaron 10  $\mu$ l de rojo neutro, 10  $\mu$ l de eosina amarillenta y 10  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos respectivamente (**Fig. 6.2**). Se mezclaron los reactivos con el contenido celular y se colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm. En seguida se llevaron a observación a 400 y 1000 aumentos empleando un microscopio de campo claro (Marca: Carl Zeiss. Modelo: Axiostar) Los datos fueron registrados en un diario de captura de resultados y posteriormente en una base de datos diseñada para tal efecto.

Nota: El contenido celular sobrante fue congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior en otras pruebas.



**Fig. 6.2.** Imagen que ilustra el procesamiento de las muestras respiratorias para la realización de la Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución.

Como resultados, se reportaron las observaciones de cuerpos de inclusión presuntivos de *Chlamydia* spp intracelulares de localización perinuclear (color marrón reacción con el rojo neutro y color rojo claro reacción con la eosina “y”), presencia de bacterias, presencia de células epiteliales y presencia de detritus celulares.

### Tinción de Giemsa

Para esto, del concentrado celular obtenido anteriormente se tomaron 10 µl con los que se realizó un frotis en un portaobjetos previamente identificado y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la muestra se procedió a su fijación utilizando como medio fijador el alcohol etílico al 70% (Marca: CTR) durante 10 min al cabo del cual de nuevo se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la tinción, sumergiendo la preparación en el colorante de Giemsa (solución alcohólica al 0.4%) durante un lapso de 10 min, posterior al cual, las laminillas se lavaron en agua destilada con un proceso de 10 inmersiones y se dejaron secando. En seguida se llevaron a observación a 400 y 1000 aumentos empleando un microscopio de campo claro (Marca: Carl Zeiss. Modelo: Axiostar) Los datos fueron registrados en un diario de captura de resultados y posteriormente en una base de datos diseñada para tal efecto

Como resultados se reportaron las observaciones de cuerpos de inclusión positivos de *Chlamydia* (cuerpos basófilos intracelulares de localización perinuclear), presencia de bacterias, presencia de células epiteliales y presencia de detritus celulares.

### 6.4.3 Técnicas moleculares para la detección microbiológica de *Chlamydia* spp.

#### Extracción de ADN

Del concentrado celular obtenido previamente se tomaron 200 µl de muestra, para realizar la extracción de ADN. Como método de extracción se empleó el método comercial Nucleospin® Blood (Machery – Nagel GmbH & Co., Germany), realizando el proceso de extracción de acuerdo a la técnica recomendada por el fabricante (a continuación se describe):

Primeramente se colocó amortiguador BE a 70°C en la incubadora para utilizarlo cuando la técnica lo indique. La muestra se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml añadiéndose 1ml de amortiguador PBS. Cabe mencionar que cuando la muestra provenía de un lavado faríngeo no se agregó el amortiguador PBS. Se homogenizó con vortex por

1 min posterior al cual el hisopo fue desechado. La solución fue centrifugada a 3500 rpm por 10 min al final del cual el sobrenadante fue decantado dejando solo el paquete celular al que se le agregó 200  $\mu$ l de amortiguador PBS, 200  $\mu$ l de amortiguador B3 y 25  $\mu$ l de Proteinasa K, se homogenizó con vortex por 1 min y se incubó a 70°C, por 15 min.

Posteriormente se agregaron 210  $\mu$ l de etanol absoluto y se homogenizó con vortex por 1 min. Se recuperó el volumen total del tubo y se vació en una columna de extracción con su tubo colector lo cual fue centrifugado a 11000 rpm por 1 min pasado esto se desechó el tubo colector y se traspasó la columna a un tubo nuevo donde se agregó a la columna 500  $\mu$ l de amortiguador BW y se centrifugó a 11000 rpm por 1 min. De nuevo se desechó el tubo colector y se traspasó la columna a un tubo nuevo donde se agregaron 600  $\mu$ l de amortiguador B5 a la columna y se centrifugó a 11000 rpm por 1 min. Se desechó el contenido del tubo colector y volvió a centrifugar a 11000 rpm usando el mismo tubo. De la misma manera se desechó el tubo colector y se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregó a la columna 50  $\mu$ l de amortiguador BE (amortiguador a una temperatura de 70°C) incubándose 1 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar la columna con su tubo de recuperación a 11000 rpm por 1 min y se desechó la columna de extracción. Finalmente se almacenó el tubo de recuperación con el ADN extraído en el congelador a -20°C hasta su uso.

Como control de calidad del proceso se realizó la amplificación del gen endógeno de  $\beta$ -globina

Debido a que el gen de  $\beta$ -globina está presente en el ADN humano, se utilizó como control de nuestras pruebas para verificar que la extracción se hubiera realizado con éxito, esto fue obteniendo un producto de 408 pb.

Para determinarlo, se esterilizó la superficie de trabajo de la cámara de amplificación mediante luz UV por 20 min. y se descongelaron las muestras a procesar además de los reactivos. Una vez esterilizada el área de trabajo, se introdujeron los

materiales y reactivos en la cámara de amplificación. Primeramente se realizó un mix de reacción según el número de muestras que se agregó en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos: 12.5 µl de Master mix, 2 µl de PrimerMix 10 µM (mezclar 2.5 µl de cada primer en 20 µl de H<sub>2</sub>O mQ), 8 µl de H<sub>2</sub>O, todo lo anterior multiplicado por el número de muestras a procesar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron: Forward β-globina 1: 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' y Reverse β-globina 2: 5' GGA AAA TAG AAA ATA GGC AG 3'. En seguida se alicuotaron volúmenes de 22.5 µl en tubos de 200 µl y se agregó 2.5 µl de ADN templado a cada reacción para completar un volumen final de 25 µl. Para el control negativo se agregó 2.5 µl H<sub>2</sub>O mQ en lugar de muestra y para el control positivo se agregó 2.5 µl de ADN de β-globina control. Las reacciones se colocaron en el termociclador (Agilent Technologies SureCycler 8800) y se comenzó con el programa de amplificación predeterminado donde las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos de amplificación comprendiendo el paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 53°C por 1 min y elongación a 70°C por 1 min finalizando con 1 ciclo de elongación final a 70°C por 10 min.

Los productos resultantes de la amplificación fueron teñidos y separados en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y sometido a 150V (Thermo SCIENTIFIC EC 300XL) por 120 min (THERMO SCIENTIFIC OWL EASYCAST B2). Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV en un transiluminador (Benchtop UV- UVP).

Determinación de la presencia de *Chlamydia* spp mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR)

Para la determinación de bacterias del género *Chlamydia* se amplificó la región génica correspondiente al dominio III y IV gen ompA de *Chlamydia* spp, obteniéndose un amplicón de 576 pb.

Primeramente, se esterilizó la superficie de trabajo de la cámara de amplificación mediante luz UV por 20 min. y se descongelaron las muestras a procesar además de los reactivos. Una vez esterilizada el área de trabajo, se introdujeron los materiales y reactivos en la cámara de amplificación. Primeramente se realizó un mix de reacción según el número de muestras que se agregó en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos: 12.5 µl de Master mix, 2 µl de PrimerMix 10 µM (mezclar 2.5 µl de cada primer en 20 µl de H<sub>2</sub>O mQ), 8 µl de H<sub>2</sub>O, todo lo anterior multiplicado por el número de muestras a procesar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron: Forward 191CHOMP: 5' GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC 3' y Reverse CHOMP 371: 5' TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG 3'. En seguida se alicuotaron volúmenes de 22.5 µl en tubos de 200 µl y se agregó 2.5 µl de ADN templado a cada reacción para completar un volumen final de 25 µl. Para el control negativo se agregó 2.5 µl H<sub>2</sub>O mQ en lugar de muestra y para el control positivo se agregó 2.5 µl de ADN de *C. trachomatis* control. Las reacciones se colocaron en el termociclador (Agilent Technologies SureCycler 8800) y se comenzó con el programa de amplificación predeterminado donde las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min seguido de 40 ciclos de amplificación comprendiendo el paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 30 seg y elongación a 72°C por 1 min finalizando con 1 ciclo de elongación final a 72°C por 10 min.

Los productos resultantes de la amplificación fueron teñidos y separados en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y sometido a 150V (Thermo SCIENTIFIC EC 300XL) por 120 min (THERMO SCIENTIFIC OWL EASYCAST B2). Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV en un transiluminador (Benchtop UV- UVP).

Determinación de la presencia de *C. pneumoniae* mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR)

Para la detección del ADN de *C. pneumoniae* se amplificó la región génica correspondiente al gen *rpoB* de *C. pneumoniae*, obteniéndose un amplicón de 474 pb.

Primeramente, se esterilizó la superficie de trabajo de la cámara de amplificación mediante luz UV por 20 min. y se descongelaron las muestras a procesar además de los reactivos. Una vez esterilizada el área de trabajo, se introdujeron los materiales y reactivos en la cámara de amplificación. Primeramente se realizó un mix de reacción según el número de muestras que se agregó en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos: 12.5 µl de Master mix, 2 µl de PrimerMix 10 µM (mezclar 2.5 µl de cada primer en 20 µl de H<sub>2</sub>O mQ), 8 µl de H<sub>2</sub>O, todo lo anterior multiplicado por el número de muestras a procesar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron: Forward HL1: 5´ GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT 3´ y Reverse HR1: 5´ TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT 3´. En seguida se alicuotaron volúmenes de 22.5 µl en tubos de 200 µl y se agregó 2.5 µl de DNA templado a cada reacción para completar un volumen final de 25 µl. Para el control negativo se agregó 2.5 µl H<sub>2</sub>O mQ en lugar de muestra y para el control positivo se agregó 2.5 µl de ADN de *C. pneumoniae* control. Las reacciones se colocaron en el termociclador (Agilent Technologies SureCycler 8800) y se comenzó con el programa de amplificación predeterminado donde las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 7 min seguido de 32 ciclos de amplificación comprendiendo el paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1.30 s y elongación a 72°C por 1.45 min finalizando con 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7 min.

Los productos resultantes de la amplificación fueron teñidos y separados en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y sometido a 150V (Thermo SCIENTIFIC EC 300XL) por 120 min (THERMO SCIENTIFIC OWL EASYCAST B2). Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV en un transiluminador

(Benchtop UV- UVP). Al corroborar la amplificación del primer amplicón mediante el análisis en geles de agarosa, se procedió a realizar la PCR anidada a partir de este primer producto de amplificación, con esta segunda PCR anidada se amplifica una región interna de la secuencia génica previamente amplificada generando un segundo amplicón de 128 pb.

Se esterilizó la superficie de trabajo de la cámara de amplificación mediante luz UV por 20 min. y se descongelaron las muestras a procesar además de los reactivos. Una vez esterilizada el área de trabajo, se introdujeron los materiales y reactivos en la cámara de amplificación. Primeramente se realizó un mix de reacción según el número de muestras que se agregó en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos: 12.5 µl de Master mix, 2 µl de PrimerMix 10 µM (mezclar 2.5 µl de cada primer en 20 µl de H<sub>2</sub>O mQ), 8 µl de H<sub>2</sub>O, todo lo anterior multiplicado por el número de muestras a procesar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron: Forward N1: 5'AGT TGA GCA TAT TCG TGA GG 3' y Reverse N2: 5' TTT ATT TCC GTG TCG TCC AG 3'. En seguida se alicuotaron volúmenes de 20 µl en tubos de 200 µl y se agregó 5 µl de amplificado previamente con HL1 y HR1 a cada reacción para completar un volumen final de 25 µl. Para el control negativo se agregó 5 µl H<sub>2</sub>O mQ en lugar de muestra y para el control positivo se agregó 0.5 µl de ADN de *C. pneumoniae* más 4.5 µl de H<sub>2</sub>O mQ. Las reacciones se colocaron en el termociclador (Agilent Technologies SureCycler 8800) y se comenzó con el programa de amplificación predeterminado donde las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 7 min seguido de 32 ciclos de amplificación comprendiendo el paso de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1.30 seg y elongación a 72°C por 1.45 min finalizando con 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7 min.

Los productos resultantes de la amplificación fueron teñidos y separados en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y sometido a 150V (Thermo SCIENTIFIC EC 300XL) por 120 min (THERMO SCIENTIFIC OWL EASYCAST B2). Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV en un transiluminador (Benchtop UV- UVP).

Determinación de la presencia de *C. trachomatis* mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR).

Para la detección de la bacteria *C. trachomatis* se amplificó una región génica del plásmido críptico de *C. trachomatis*, obteniéndose un amplicón de 241 pb.

Primeramente, se esterilizó la superficie de trabajo de la cámara de amplificación mediante luz UV por 20 min. y se descongelaron las muestras a procesar además de los reactivos. Una vez esterilizada el área de trabajo, se introdujeron los materiales y reactivos en la cámara de amplificación. Primeramente se realizó un mix de reacción según el número de muestras que se agregó en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos: 12.5 µl de Master mix, 2 µl de PrimerMix 10 µM (mezclar 2.5 µl de cada primer en 20 µl de H<sub>2</sub>O mQ), 8 µl de H<sub>2</sub>O, todo lo anterior multiplicado por el número de muestras a procesar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron: Forward K11: 5' TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA 3' y Reverse K12: 5' AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT 3'. En seguida se alicuotaron volúmenes de 22.5 µl en tubos de 200 µl y se agregó 2.5 µl de DNA templado a cada reacción para completar un volumen final de 25 µl. Para el control negativo se agregó 2.5 µl H<sub>2</sub>O mQ en lugar de muestra y para el control positivo se agregó 1 µl de ADN de *C. trachomatis* genotipo LGV más 1.5 µl de H<sub>2</sub>O mQ. Las reacciones se colocaron en el termociclador (Agilent Technologies SureCycler 8800) y se comenzó con el programa de amplificación predeterminado donde las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min seguido de 30 ciclos de amplificación comprendiendo el paso de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min finalizando con 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7 min.

Los productos resultantes de la amplificación fueron teñidos y separados en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (0.5µg/ml) y sometido a 150V (Thermo SCIENTIFIC EC 300XL) por 120 min (THERMO SCIENTIFIC OWL

EASYCAST B2). Finalmente se visualizó el gel bajo luz UV en un transiluminador (Benchtop UV- UVP).

#### 6.4.4 Establecer parámetros clínicos y citológicos asociados a la infección por *Chlamydia* spp. mediante la correlación del cuadro clínico con los hallazgos citológicos y la prueba de PCR

Estadística Descriptiva: Se resumieron las variables cualitativas, mediante el cálculo de las frecuencias absolutas y relativas en % y los Intervalos de Confianza (IC) al 95%. Las variables cuantitativas se resumieron mediante el cálculo de medidas de tendencia central media y/o mediana y, medidas de dispersión desviación estándar y/o recorrido de la variable. Para el cálculo del IC se determinó el error típico de la media.

Estadística Inferencial: Para comparar las variables cualitativas entre grupos, se utilizó la prueba Chi Cuadrada (corrección de Yate). Para el caso particular de tablas de contingencia de 2X2 se aplicó la prueba exacta de Fisher.

En el caso de comparar variables cuantitativas entre grupos (positivos vs negativos), en primer lugar se aplicó una prueba para estudiar si la variable se ajusta a la distribución normal o no (Kolmogorov-Smirnov). En aquellos supuestos donde la variable presentó una distribución normal, para evaluar las posibles diferencias inter-grupos se utilizó bien la prueba t de Student o el Análisis de Varianzas de uno o más factores. Para solucionar el problema de las comparaciones múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni.

Cuando las variables no tuvieron distribución normal se realizaron pruebas de hipótesis no paramétricas (U Mann-Wihtney, Kruskal-Wallis), para las comparaciones múltiples se ajustó el valor de p por el método de Bonferroni.

Los cálculos se realizaron con el programa SPSS versión 17. Para todos los análisis se aplicaron los criterios de  $\alpha \leq 0.05$ ,  $1-\beta = 80\%$  y pruebas de dos colas.

1. Entrevista clínica

**Entrevista Clínica:**

“Diagnóstico de *Chlamydia* spp. en niños con infecciones crónicas del tracto respiratorio superior que acuden a consulta de pediatría en una región de Tabasco”

**Paciente:**

---

Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombres
------------------	------------------	---------

**Fecha:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/    **Sexo:** Hombre ( ) Mujer ( )    **Fecha de Nacimiento:**

---

**Lugar de nacimiento:**

---

**Lugar y tiempo de residencia actual:**

---

**Lugar (es) de residencia anterior (es):**

---

**Teléfonos:**

---

**Le han diagnosticado o tratado:**

1. **Rinitis**                      Si ( )      No ( )

Hace cuánto tiempo:

---

Causa aparente:

---

2. **Sinusitis**                      Si ( )      No ( )

Hace cuánto tiempo:

---

Causa aparente:

---

3. **Faringoamigdalitis**      Si ( )      No ( )

Hace cuánto tiempo:

---

Causa aparente:

---

4. **Conjuntivitis**                      *Si ( )*      *No ( )*

Hace cuánto tiempo:

---

Causa aparente:

---

5. **Asma bronquial**                      *Si ( )*      *No ( )*

Hace cuánto tiempo:

---

Causa aparente:

---

**¿Alguien de su familia presenta o ha presentado alguna de estas enfermedades?**

*Si ( )*      *No ( )*

*Quien (es)?*

---

*Cual (es)?*

---

*Hace cuánto tiempo?*

---

**RINITIS O RINOSINUSITIS**

Presenta alguno o varios de los siguientes síntomas:

1. **Obstrucción nasal:**                      *Si ( )*      *No ( )*  
*Matutina ( )*                      *Nocturna ( )*                      *Limita sus actividades: Si ( )*      *No ( )*

2. **Escurrimiento nasal:**                      *Si ( )*      *No ( )*  
*Escaso ( )*      *Abundante ( )*  
*Moco cristalino ( )*      *Moco verde amarillento ( )*      *Moco café rojizo ( )*  
*Constante ( )*      *Matutino ( )*      *Vespertino ( )*      *Nocturno ( )*

3. **Sangrado nasal:**                      *Si ( )*      *No ( )*

4. **Lagrimeo:**                      *Si ( )*      *No ( )*

5. **Estornudo:**                      *Si ( )*      *Aislados ( )*      *En salva ( )*      *No ( )*

6. **Prurito nasal o faríngeo:** Si ( ) No ( )
7. **Ardor nasal o faríngeo:** Si ( ) No ( )
8. **Descarga retronasal:** Si ( ) No ( )  
(Carraspera)
9. **Tos:** Si ( ) Productiva ( ) No Productiva ( ) No ( )
10. **Dolor Facial:** Si ( ) No ( )
11. **Cefalea:** Si ( ) No ( )
12. **Ronquera:** Si ( ) No ( )
13. **Ronquido:** Si ( ) No ( )
14. **Disnea:** Si ( ) No ( )

Utiliza medicamentos para esta enfermedad? Si ( ) No ( )  
Cuáles?

---

Acude al médico: Si ( ) No ( ) Se auto medica: Si ( ) No ( )

¿Cuánto duran los síntomas de la enfermedad?

De 1 a 4 semanas ( ) De 4 a 8 semanas ( ) Más de 8 semanas ( )

¿Cuántas veces aparece al año?

2 veces al año ( ) 4 veces al año ( ) Más de 4 veces al año ( )

### **FARINGOAMIGDALITIS**

1. **Dolor/ardor faríngeo:** Si ( ) No ( )
2. **Descarga retronasal:** Si ( ) No ( )  
(Carraspera)
3. **Aspecto del Moco:** Color verde ( ) Amarillento ( ) Cristalino ( )  
Espeso ( ) Líquido ( )

4. **Tos:** Si ( ) No ( ) Productiva ( ) No Productiva ( )

5. **Fiebre:** Si ( ) Ligera ( ) Alta ( ) Constante ( ) Intermitente ( )  
No ( )

6. **Malestares generales:** Si ( ) No ( )  
Cansancio ( ) Dolor muscular ( ) Debilidad ( ) Falta de apetito ( )  
Dolores articulares ( ) Crisis de taquicardia en reposo ( )

Utiliza medicamentos para esta enfermedad? Si ( ) No ( )

Cuales \_\_\_\_\_

Acude al médico: Si ( ) No ( ) Se auto medica: Si ( ) No ( )

¿Cuánto duran los síntomas de la enfermedad?

De 1 a 4 semanas ( ) De 4 a 8 semanas ( ) Más de 8 semanas ( )

¿Cuántas veces aparece al año?

2 veces al año ( ) 4 veces al año ( ) Más de 4 veces al año ( )

### CONJUNTIVITIS

Presenta o ha presentado alguna de las siguientes molestias oculares

1. **Ardor/Comezón** Si ( ) No ( )
2. **Lagrimo** Si ( ) No ( )
3. **Ojo rojo** Si ( ) No ( )
4. **Ojo seco** Si ( ) No ( )
5. **Carnosidad** Si ( ) No ( )
6. **Secreción** Si ( ) No ( )

### ASMA BRONQUIAL

Hace cuanto padece la enfermedad \_\_\_\_\_

Que medicamento usa \_\_\_\_\_

Utiliza algún medicamento de rescate? Si ( ) No ( )

Especifique \_\_\_\_\_

Marque según la clasificación del Asma bronquial (GINA) en donde se encuentre

Síntomas/Diurnos	Síntomas/Nocturnos
<b>PASO 1</b> <b>Intermitente</b> ( )	< 1 vez a la semana Asintomático y PEF normal entre ataques
<b>PASO 2</b> <b>Leve Persistente</b> ( )	> 1 vez a la semana pero < 1 vez al día Los ataques pueden afectar la actividad
<b>PASO 3</b> <b>Moderado Persistente</b> ( )	Diarios Los ataques afectan la actividad
<b>PASO 4</b> <b>Severo Persistente</b> ( )	Continuos Actividad física limitada

**VIVIENDA**

Material de construcción de la casa:

---

Cuenta con: Agua Potable ( ) Drenaje ( ) Electricidad ( ) Otro: \_\_\_\_\_

Cuántas personas habitan en la casa: \_\_\_\_\_

Tiene o ha tenido contacto con animales:

Perros ( ) Cuántos? \_\_\_\_ En qué forma: Constante ( ) Esporádica ( )  
Tiempo: Más de 3 años ( ) Más de 6 meses ( ) Más de 4 semanas ( )

Gatos ( ) Cuántos? \_\_\_\_ En qué forma: Constante ( ) Esporádica ( )  
Tiempo: Más de 3 años ( ) Más de 6 meses ( ) Más de 4 semanas ( )

Aves de corral ( ) Cuántos? \_\_\_\_ En qué forma: Constante ( ) Esporádica ( )  
Tiempo: Más de 3 años ( ) Más de 6 meses ( ) Más de 4 semanas ( )

Aves silvestres ( ) Cuántos? \_\_\_\_ En qué forma: Constante ( )  
Esporádica ( )  
Tiempo: Más de 3 años ( ) Más de 6 meses ( ) Más de 4 semanas ( )

Tiene criadero de animales: Si ( ) No ( ) Cuáles? \_\_\_\_\_  
Tiempo: Más de 3 años ( ) Más de 6 meses ( ) Más de 4 semanas ( )

**HISTORIA CLINICA DE INFECCION GENITOURINARIA FEMENINA**

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD \_\_\_\_\_

Fecha del último

Papanicolaou: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

Fecha de última  
menstruación: \_\_\_\_\_

Método anticonceptivo en  
uso: \_\_\_\_\_

Número de  
embarazos: \_\_\_\_\_

Número de abortos: \_\_\_\_\_

Hijos  
vivos: \_\_\_\_\_

Edad del último  
hijo: \_\_\_\_\_

Número de parejas sexuales: \_\_\_\_\_

**PADECE O HA PADECIDO ALUNA DE LAS SIGUIENTES MOLESTIAS:**

Dolor o ardor al orinar

Sangrado fuera del periodo menstrual

Deseos de volver a orinar cuando  
acaba de orinar

Flujo vaginal (amarillo, verdoso o  
blanco)

Orinar frecuentemente o levantarse en  
la noche a orinar

Flujo café antes o después de la  
menstruación

Molestia en la relación sexual

Comezón o ardor vaginal

Sangrado después de la relación  
sexual

Dolor en el vientre (punzada o  
piquete aunque sea ocasional)

¿LA HAN OPERADO ALGUNA VEZ? \_\_\_\_\_ DE QUE \_\_\_\_\_

¿LA HAN TRATADO POR INFECCIÓN? \_\_\_\_\_ CUAL \_\_\_\_\_

¿QUÉ TRATAMIENTOS HA RECIBIDO? \_\_\_\_\_

¿LE HAN DIAGNOSTICADO ALGUNO DE LOS SIGUIENTES PADECIMIENTOS?

Cáncer o lesión maligna ( )

Displasia leve o ( )  
severa ( )

Virus del papiloma ( )

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

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

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

Herpes genital ( )

Condiloma o ( )  
verrugas ( )

Chlamydia ( )

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

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

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

—

—

—

Hongos vaginales ( Otros: \_\_\_\_\_ )

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

**ALGUNA DE SUS PAREJAS HA PADECIDO:**

- |  |                          |                         |                          |
|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Infección urinaria                                       | <input type="checkbox"/> | Dolor testicular        | <input type="checkbox"/> |
| Lesiones en genitales (ulceraciones, erupción, ampollas) | <input type="checkbox"/> |                         |                          |
| Prostatitis  |                          | Infección por chlamydia | <input type="checkbox"/> |
| Ardor al orinar  | <input type="checkbox"/> | Condilomas genitales    | <input type="checkbox"/> |
| Hongos   | <input type="checkbox"/> | Secreción uretral       | <input type="checkbox"/> |

ALGUNA DE SUS PAREJAS RECIBIÓ TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO \_\_\_\_\_

¿CUÁL? \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_ TIEMPO DE USO: \_\_\_\_\_

Médico que realizó la entrevista:

**Nombre y firma** \_\_\_\_\_

## CARTA DE CONSENTIMIENTO

Las infecciones respiratorias crónicas de la vía superior, son una de las causas más frecuentes de enfermedad en niños, sin embargo en la gran mayoría de los casos no se logra llegar al diagnóstico del agente causal, lo que ocasiona que este tipo de infecciones se vuelvan recurrentes. Está ampliamente descrito en la literatura que microorganismos de comportamiento biológico atípico podrían estar asociados con estas infecciones. Tal es el caso de algunos géneros de la familia *Mycoplasmataceae* y de la familia *Chlamydiaceae* (bacterias). En la familia *Chlamydiaceae* la gran mayoría de los estudios se ha enfocado a investigar la asociación de estas infecciones con *Chlamydophila pneumoniae*, dejando de lado la búsqueda de algunas otras especies que se han referido como posible causa de infecciones respiratorias, tal es el caso de *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydia trachomatis*. Esta investigación permitirá conocer la incidencia real de *Chlamydia* spp en la población infantil de una región del Sureste de México, que presenta cuadros infecciosos crónicos o persistentes de la vía respiratoria superior.

*Chlamydia trachomatis* es la principal bacteria de transmisión sexual. En los casos de infecciones respiratorias se ha observado predominantemente la afección de niños recién nacidos los cuales contraen la infección del tracto genital de la madre.

Aproximadamente de 50 a 75% de los recién nacidos de madres infectadas por *Chlamydia trachomatis*, adquieren la infección por dicho patógeno en uno o más sitios anatómicos, incluyendo conjuntiva, región nasofaríngea, recto y vagina. De éstos, la conjuntiva y región nasofaríngea son los sitios más comúnmente afectados, llegando a causar obstrucción de la vía aérea y en casos más severos causar asma.

*Chlamydophila pneumoniae*, causa enfermedades respiratorias que se caracterizan por un proceso inicial de faringitis y ronquera siguiendo con síntomas de infección respiratoria del tracto inferior. Esta bacteria causa la neumonía atípica en niños pequeños, puede ser transmitida de persona a persona por medio de las secreciones respiratorias

*Chlamydophila psittaci* tiene una amplia variedad de hospederos. Se ha observado que afecta no solo a las aves y al ser humano, sino también al ganado vacuno, a las ovejas, a los cerdos, a los caballos y a otros animales.

En los humanos, esta enfermedad se denomina psitacosis. Esta bacteria es un patógeno respiratorio, de hecho el término “infección respiratoria chlamydial” fue considerado como sinónimo de psitacosis (u ornitosis). Las infecciones son particularmente comunes entre los loros y las palomas, aunque probablemente sean susceptibles la mayoría o todas las especies de aves.

Mientras que *Chlamydomphila pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* son casi exclusivamente microorganismos causantes de enfermedad en el humano, *Chlamydomphila psittaci* causa una infección primaria en aves y en mamíferos domésticos pudiéndose ocasionar una infección zoonótica secundaria en humanos al inhalar polvo, plumas o secreciones y excreciones en aerosoles contaminados con esta bacteria. Sin embargo también la infección entre persona y persona es posible.

Si usted decide tomar parte de este estudio, será entrevistado(a) en este momento. Se le aplicará un cuestionario de selección múltiple sobre datos clínicos relacionados con la salud respiratoria de su hijo y datos ginecológicos y reproductivos de la madre, factores probables de riesgo, factores de protección, entre otras. La entrevista durará aproximadamente 20 minutos.

No existe costo o compensación por participar en este estudio. Anticipamos que no sufrirá riesgo o malestar durante la entrevista. Todo lo que aprendamos de usted en este estudio, será confidencial. Si publicamos los datos del estudio en una revista científica o en un libro, no se le identificará de manera alguna. La forma de consentimiento y el cuestionario serán almacenados en un gabinete bajo llave en el área de Investigación del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la UANL.

La decisión de tomar parte en este estudio es voluntaria. Usted es libre de elegir si participan o no en este estudio. Si decide participar, puede detener la entrevista en cualquier momento si se siente incómodo. Si decide no participar o suspender la entrevista esto no afectara la atención médica que reciban en este centro de salud.

Respecto a la toma de muestras, siéntase seguro que serán realizadas por personal del área médica (que previamente ha recibido instrucción y están calificadas para hacerlo), en un lugar con los medios adecuados de higiene, privacidad y comodidad y de forma única de los sitios ya informados.

-Exudado faríngeo: se realizará un leve raspado de la garganta mediante un hisopo (cotonete) estéril.

-Lavado nasofaríngeo: se irrigará solución salina estéril por cada fosa nasal con una jeringa sin aguja y se obtendrá por la boca en un frasco estéril.

### **NO CAUSA MOLESTIA NINGUNO DE LOS DOS PROCEDIMIENTOS**

Cada muestra será identificada con un número de registro y etiquetada con el nombre completo del paciente, el tipo de muestra y la fecha de la obtención.

YO \_\_\_\_\_

AUTORIZO que se practique una toma de exudado faríngeo con hisopo y lavado nasofaríngeo con solución estéril al menor \_\_\_\_\_ quien es mi \_\_\_\_\_ (hijo, sobrino, nieto, tutorado, etc.)

Lo anterior con fines de investigación, y/o tratamiento de padecimientos que afecta y puede constar en el expediente clínico (en caso de existir en la institución). Todo ello en los términos de los artículos 80, 81 y 83 del reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de servicio de atención médica en vigor. Se autoriza al personal de salud para la atención de contingencias derivadas del acto autorizado, atendiendo al principio de libertad prescriptiva.

Manifiesto que he sido informado claramente de los fines de este documento, el procedimiento diagnóstico y/o terapéutico que se propone, de los riesgos inherentes al mismo por lo cual declaro mi conformidad con la presente autorización.

---

Firma

---

Testigo

---

Testigo

---

Fecha y hora

**FORMATO DE RESULTADOS**

Nombre del Paciente: \_\_\_\_\_  
 Espécimen Biológico: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
 Método Citológico: \_\_\_\_\_ Folio: \_\_\_\_\_

**PARÁMETROS CITOLÓGICOS ASOCIADOS A INFLAMACIÓN**

<b>LEUCOCITOS:</b>	<b>MACRÓFAGOS:</b>	<b>CEL'S EPITELIALES:</b>
Activos:	Activos:	Inclusiones:
Inactivos:	Inactivos:	Autólisis:
Inclusiones:	Inclusiones:	Fagocitosis:
Autólisis:	Autólisis:	Bacterias:
Fagocitosis:	Fagocitosis:	Bact. Movimiento:
Bacterias:	Bacterias:	Detritus Celulaes:
Bact. Movimiento:	Bact. Movimiento:	Eritrocitos:

**0** = Ausente; **1** = Escaso (1-2/c); **2** = Moderado (3-5/c); **3** = Abundante (6-10/c)  
**4** = Muy abundante (>10/c)

**PRESENCIA DE BACTERIAS**

	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>	<b>Cocobacilos</b>	<b>Micrococos</b>	<b>Mycoplasma</b>	<b>Chlamydia CR</b>	<b>Chlamydia CE</b>	<b>Levaduras</b>
Numero/ campo								
Libres								
Con Movimiento								
Asociadas en PARES								
Asociadas en CADENAS								
Asociadas en RACIMOS								
Formación de PLACAS								
Adheridos a células Epiteliales								
Dentro a células Epiteliales								
Adheridos a Leucocitos								
Dentro de Leucocitos								
Adheridos a Macrófago								
Dentro de Macrófago								

**Observaciones:**

**INMUNOFLUORESCENCIA**

**Observaciones:**

	<b>CE</b>	<b>CI</b>
<i>Chlamydia spp.</i>		
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>		
<i>Chlamydophila psittaci</i>		

## 7. RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan, se obtuvieron cumpliendo con cada uno de los objetivos planteados, para tal efecto se analizó la base de datos creada para la captura de los resultados de cada una de las variables y que son producto del análisis clínico, citológico y molecular de las muestras de los pacientes incluidos en este trabajo.

En primer término, se presentan los resultados que describen la muestra de pacientes que fueron incluidos en este estudio y las localizaciones geográficas de las comunidades de la población participante, describiendo las características climatológicas y sociodemográficas presentes en estas comunidades y documentamos mediante imágenes las características de vivienda de los pobladores de las comunidades participantes, datos que nos ayudan a comprender y que justifican plenamente la selección de estas poblaciones como sujetos de estudio. Seguido de esto, presentamos las variables demográficas de la población estudiada. Como siguiente punto, presentamos los resultados clínicos más significativos obtenidos mediante una entrevista personal realizada a los padres o tutores de los infantes incluidos en este trabajo.

Posteriormente presentamos los resultados citológicos obtenidos mediante el análisis empleando las técnicas de Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución en Capa Fina (CIFAR-CF) y la Citología contrastada con el colorante de Giemsa, con estos resultados documentamos los cambios citomorfológicos, microbiológicos y de inflamación observadas en las muestras respiratorias obtenidas de los sujetos de estudio. En una siguiente sección se presentan los resultados del estudio molecular de la presencia de microorganismos perteneciente al género *Chlamydia* y en la última sección comparamos los hallazgos clínicos y citológicos de los grupos de pacientes positivos y negativos analizando si existe una correlación entre ellos.

### ***7.1 Descripción de la población objeto de estudio***

De acuerdo con el Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Tenosique es un municipio del estado mexicano de Tabasco. Está localizado en la región de los ríos, su cabecera municipal es la ciudad de Tenosique de Pino Suárez y cuenta con una división constituida, además, por 73 ejidos, 15 rancherías y 11 poblados. Su extensión es de 2,098.1 km<sup>2</sup>, los cuales corresponden al 7.55% del total del estado; esto coloca al municipio en el sexto lugar en extensión territorial del estado. Se encuentra regado por los ríos Usumacinta y San Pedro Mártir. El primero tiene raudales en la parte alta como el San José, Agua Azul, Anité y el de Colorado. El San Pedro Mártir proviene del Petén, Guatemala, se interna a territorio mexicano en éste municipio, desplazándose hacia el norte en busca del vecino municipio de Balancán donde se une al río Usumacinta. (INAFED, 2016)

Existen una gran cantidad de lagunas y arroyos entre los que destacan la laguna de Canitzán, El Puctén, Laguna Grande, Laguna Chica, El Mait y Ensenada, así como el arroyo Polevá. El municipio de Tenosique limita al norte con el municipio de Balancán, al sur y al este con la República de Guatemala, y al oeste con el municipio de Emiliano Zapata y con el estado de Chiapas. Este municipio, goza de un clima cálido-húmedo, el cual conlleva lluvias en todo el año, pero a la vez es altamente caluroso, en tiempo de marzo a junio el termómetro puede alcanzar los 37° C y hasta 47 °C, con lluvias mayormente de julio a diciembre, concordando con la época de huracanes, los cuales solo llegan vestigios de estos, ya que por sus elevaciones impiden el paso total de los mismos.

Se encuentran algunas áreas de selva media perennifolia, con árboles de más de 30 metros de altura; la vegetación ha sufrido una tala intensiva en favor de la ganadería. Constituye uno de los últimos refugios de la fauna tropical del país, ya que todavía sobreviven el venado, el tucán, la guacamaya, el loro, el faisán, la tutupana, el armadillo, el mono, el tepezcuintle y el puerco de monte, entre otras especies.

Así mismo, Huimanguillo es el municipio que se localiza en la región de la Chontalpa y tiene como cabecera municipal a la ciudad de Huimanguillo, ubicándose al

este del estado. Colinda al norte con el municipio de Cárdenas, al sur con los estados de Chiapas y Veracruz, al este con el estado de Chiapas y al oeste con el estado de Veracruz. Este municipio está irrigado por los ríos: Mezcalapa, proveniente del estado de Chiapas, que atraviesa todo el costado oriente del municipio pasando a un lado de la cabecera municipal; el Blasillo, localizado en la parte norte del municipio entre Villa La Venta y Blasillo, y que es brazo del río Tonalá; el Tancochapa, que sirve como límite con el estado de Veracruz y toma el nombre de río Tonalá al este de Villa La Venta. Tiene dos tipos de clima: el cálido húmedo con abundantes lluvias en verano con cambios térmicos en los meses de diciembre y enero, siendo en mayo su media mensual con 30.6°C; a la vez, la máxima y mínima absoluta alcanzan los 45°C y 14°C, respectivamente, el clima cálido húmedo con lluvias todo el año se da en la parte del sur y sureste del municipio. Cuenta con áreas de vegetación diversa, desde selva hasta sabanas. Su fauna es escasa en gran medida por la falta de vegetación, sin embargo, se pueden mencionar algunas especies como el saraguato, conejo, tepezcuintle, tortuga y gran variedad de pájaros (**Fig. 7.1**).

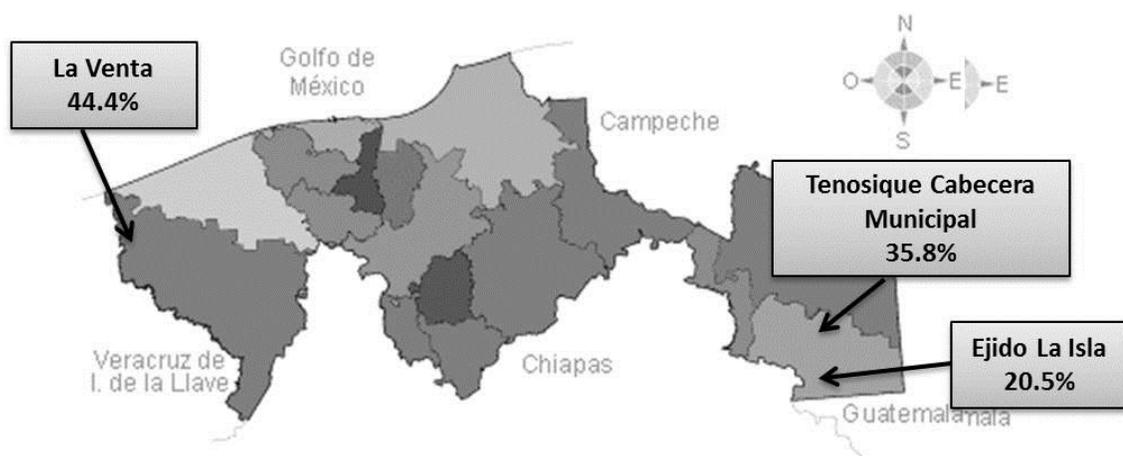


**Fig. 7.1.** Imagen en la que se documentan las condiciones de vivienda de habitantes de las comunidades seleccionadas para el presente estudio.

## 7.2 Resultados demográficos

En este estudio se incluyeron 151 infantes (<18 años) que asistieron a Centros de Atención de Salud pertenecientes a la Secretaría de Salud del Estado de Tabasco, cuya sintomatología presentada por el paciente se encontraban cuadros compatibles con infecciones respiratorias reincidentes. Las muestras fueron recolectadas en los meses de mayo y junio del 2015.

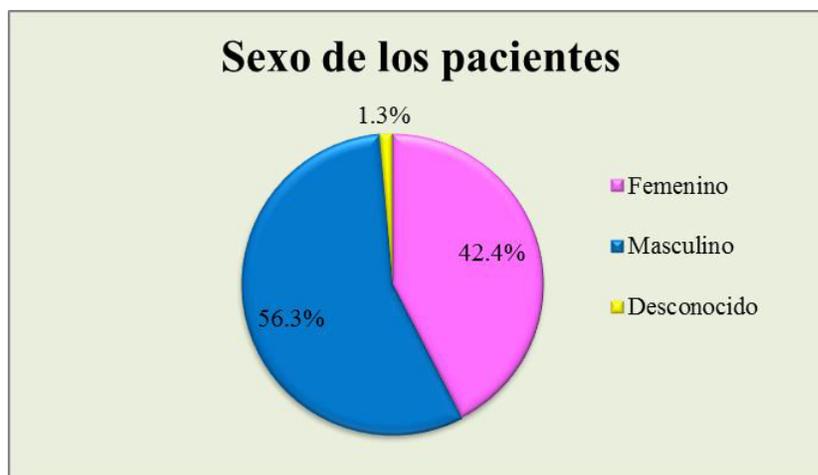
Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo al cumplimiento de los criterios de inclusión redactados en el capítulo de Material y Métodos de este trabajo, aquellos que no cumplieron con estas condiciones de inclusión fueron descartados de este proyecto. Las comunidades de las cuales se obtuvieron muestras fueron: la Ciudad de Tenosique de Pino Suárez, El Ejido La Isla el cual pertenece al Municipio de Tenosique de Pino Suárez y Comunidad La Venta perteneciente al municipio de Huimanguillo (**Fig. 7.2**).



**Fig. 7.2.** Imagen que esquematiza la división política del estado de Tabasco y la localización de los Centros de Salud Comunitarios en los cuales se realizó el muestreo.

El 20.5% (31/151) de los infantes residían en el Ejido la Isla, el 35.8% (54/151) en Tenosique de Pino Suárez, el 40.4% (61/151) de La Venta, Tabasco. El 3.3% (5/151) restante no indicaron su lugar de procedencia.

De los 151 infantes incluidos en el estudio, el 42.4% (64/151) fueron del género femenino, el 56.3% (85/151) del género masculino y de 2 infantes (1.3%) no se contó con esta información (**Fig. 7.3**).



**Fig. 7.3** Sexo de los pacientes.

Del total de pacientes incluidos en esta investigación, más del 86% eran menores de 10 años y de éstos, el 45% (68/151) eran menores de 4 años, mientras que el 41.1% (65/151) se encontraban entre el rango de 5 a 10 años de edad, y el 10.6% (13/151) entre los 10 y los 18 años, del 3.3% (5/151) no se contaba con la información de la edad (**Tabla 7.1**).

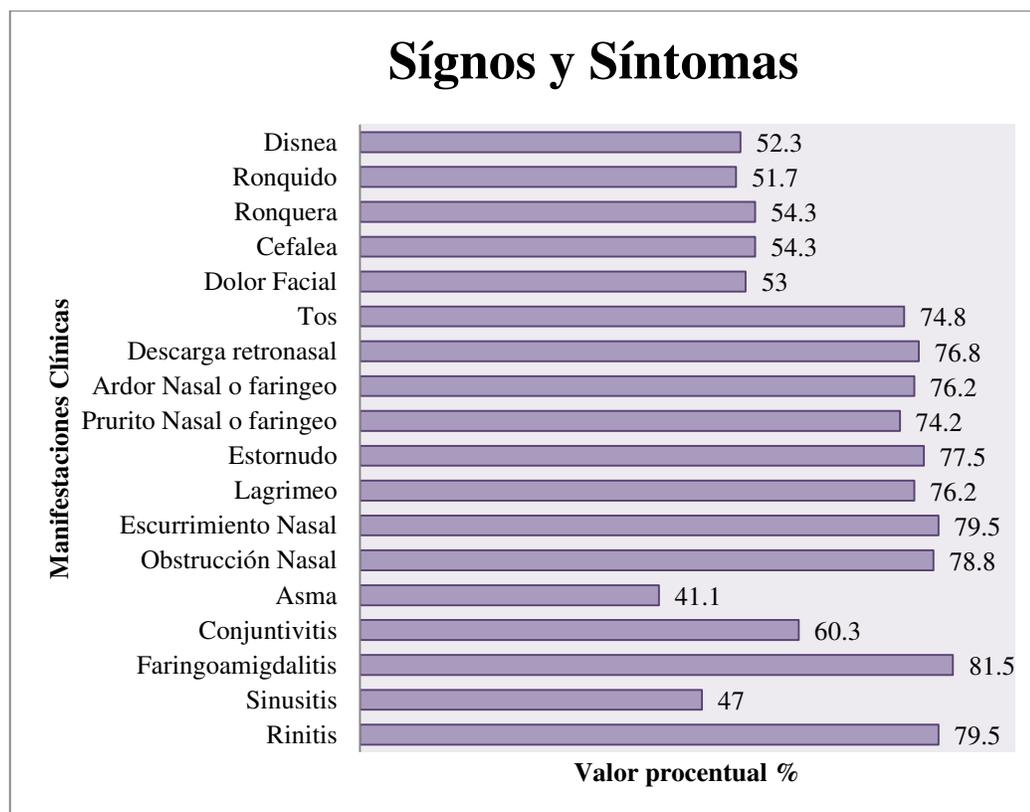
Edad (Rango)	% (n/N Total)
≤ de 4 años	45 (68/151)
5-10 años	41.1 (65/151)
10 a 18 años	10.6 (13/151)
Sin datos	3.3 (5/151)

**Tabla 7.1** Rangos de edad de los pacientes y su proporción.

### 7.3 Resultados clínicos

Entre los antecedentes clínicos que refirieron los pacientes (información proporcionada por los padres o tutores) se encontraban de manera significativa la rinitis,

en el 79.5% (120) de los pacientes, así mismo, el 47% (71) de los pacientes presentaban sinusitis, por otra parte, el 81.5% (123) refirieron presentar un cuadro de faringoamigdalitis, el 60.3% (91) presentaban conjuntivitis, el 41.1% presentaban cuadros compatibles con asma, el 78.8% (119) presentaban obstrucción nasal, el 79.5% (120) refirieron presentar escurrimiento nasal, el 76.2% (115) presentaban lagrimeo, el 77.5% manifestaron presencia de estornudos, el 74.2% de los pacientes presentaban prurito nasal o faríngeo, el 76.2% presentaban ardor nasal o faríngeo, el 76.8% manifestaban presentar descarga retronal, el 74.8% presentaban tos, el 53% manifestó presentar dolor facial, el 54.3% (82) presentaban cefalea, el 54.3% presentaba ronquera, el 51.7% presentó ronquido y el 52.3% (79) presentaron disnea (**Fig 7.4**).



**Fig. 7.4** Signos y síntomas manifestados por los pacientes y su proporción.

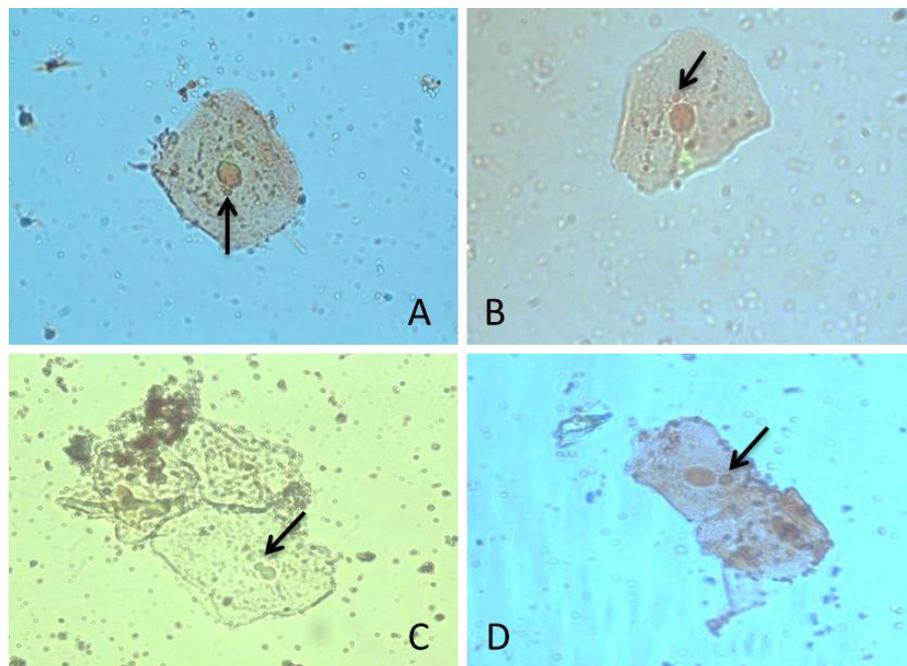
#### 7.4 Resultados citológicos

En la **Tabla 7.2** se presentan los resultados del análisis citológico con la técnica CIFAR-CF y de la citología contrastada con el colorante GIEMSA, de acuerdo a los datos

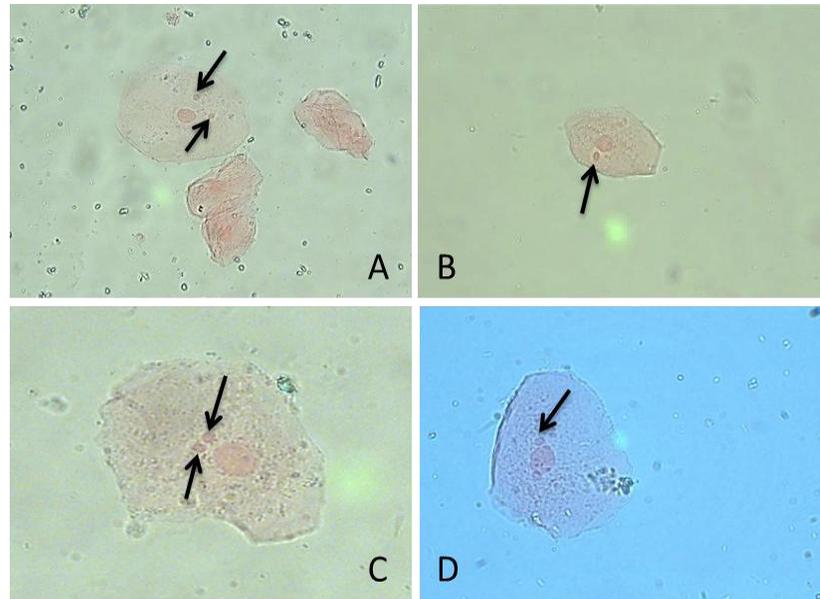
citológicos que obtuvimos por la técnica de CIFAR-CF, se encontró que el 10.6% (16/151) de muestras respiratorias presentaron inclusiones presuntivas para *Chlamydia* spp, mientras que el 89.4% (135/151) de las citologías fueron negativas (**Fig. 7.5 y 7.6**).

Citologías			
		n/N total	Porcentaje
CIFAR	Positivo	16/151	10.6
	Negativo	135/151	89.4
Giemsa	Positivo	31/151	20.5
	Negativo	120/151	79.5

**Tabla 7.2.** Resultados citológicos del análisis de la presencia de cuerpos de inclusión de *Chlamydia* spp.

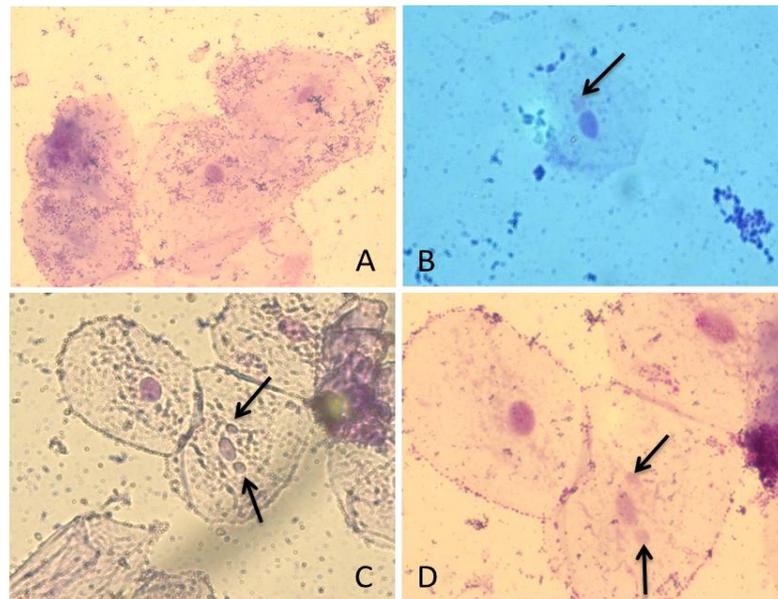


**Fig. 7.5** Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución. Células epiteliales con inclusiones citoplasmáticas de *Chlamydia* spp (←). Microscopía de campo claro 40x. Medio de contraste: Rojo Neutro



**Fig. 7.6** Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución. Células epiteliales con inclusiones citoplasmáticas de *Chlamydia* spp (←). Microscopía de campo claro 40x. Medio de contraste: Eosina Y

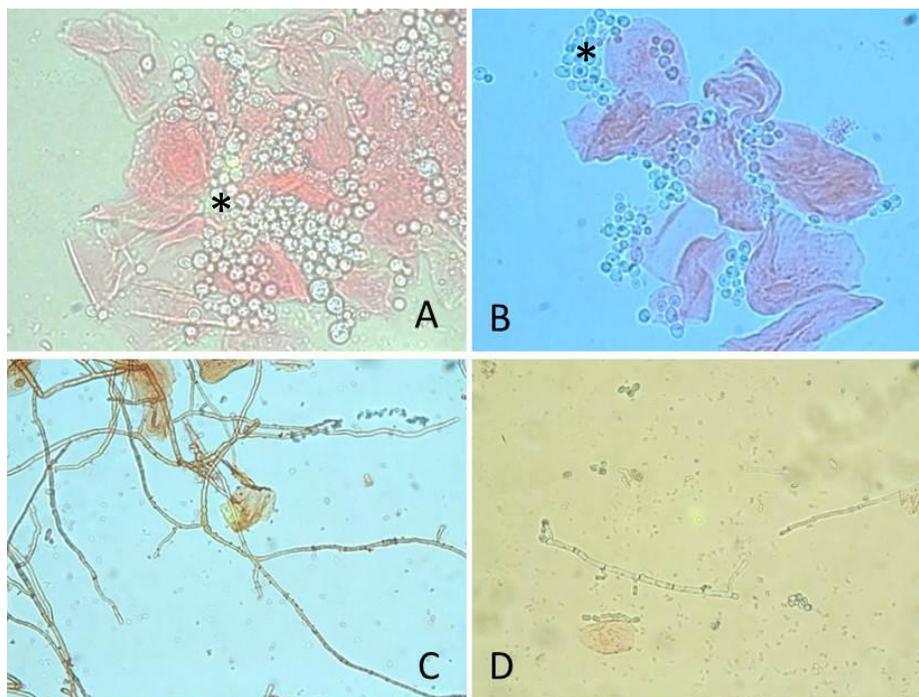
En el caso de los resultados realizando citología contrastada con Giemsa nos indicaron que el 20.5% de muestras presentaron inclusiones presuntivas para *Chlamydia* spp., mientras que el 79.5% de las muestras fueron negativas (**Fig. 7.7**).



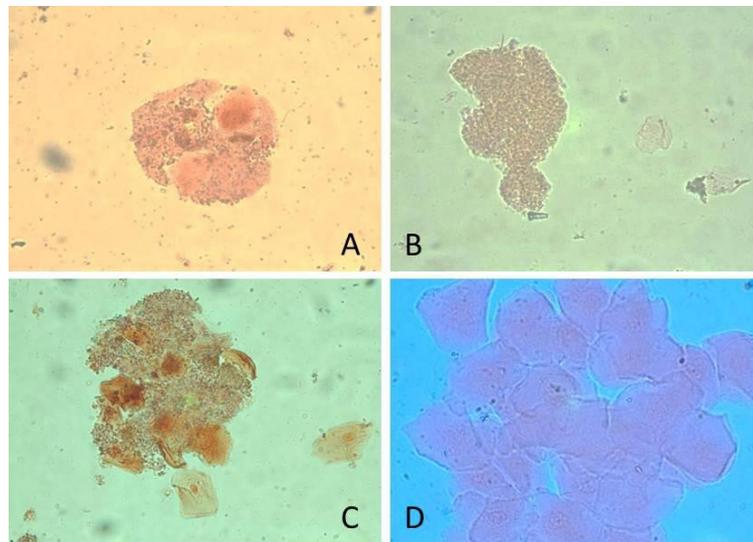
**Fig. 7.7** Células epiteliales con abundantes bacterias observadas por tinción de Giemsa. (A), y células epiteliales con inclusiones citoplasmáticas de *Chlamydia* spp (←). Microscopía de campo claro 40x (A-B Y C) 100x (D).

Al indagar la presencia de marcadores indicativos de un proceso inflamatorio como la presencia de leucocitos o algunos otros microorganismos como bacterias y levaduras, analizamos las muestras respiratorias del grupo de pacientes de este trabajo, encontrando prueba evidente de la presencia de un proceso inflamatorio (**Tabla 7.3**).

Los hallazgos citológicos más representativos y que se observaron en los especímenes clínicos evaluados incluyeron la presencia de células epiteliales, las cuales, en el 21.2% (32/151) fueron abundantes, en el 43.7% (66/151) fueron moderadas, en el 33.8% (51/151) fueron escasas mientras que solo en el 1.3% (2/151) de las muestras estuvieron ausentes (Fig. 7.8 y 7.9). Los *detritus* celulares estuvieron presentes de manera abundante en el 24.5% (37/151) de las muestras estudiadas, mientras que en el 47.7% (72/151) fueron moderados, en el 17.9% (27/151) estuvieron escasos y no se observaron en el 9.9% (15/151) (**Fig. 7.9 y Tabla 7.3**).

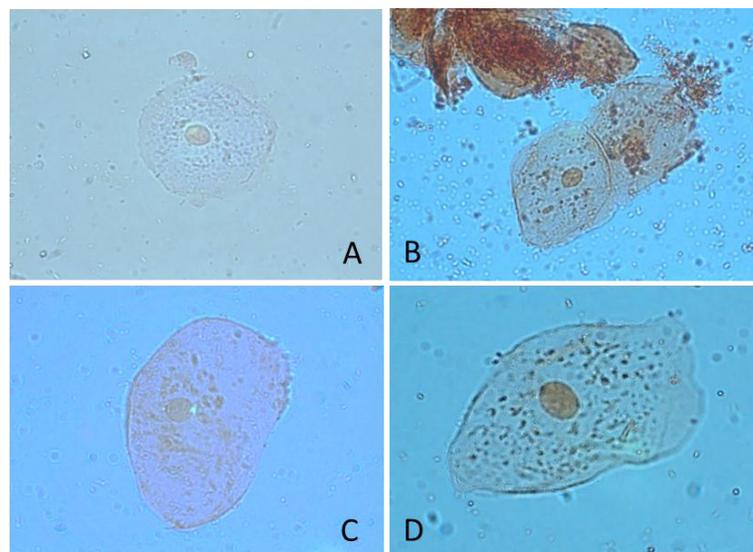


**Fig. 7.8** Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución. **A y B:** Células epiteliales formando placas con Levaduras (\*). (Medio de contraste: Eosina Y). **C y D:** Células epiteliales y pseudohifas (Medio de contraste: Rojo Neutro). Microscopía de campo claro 40x.



**Fig. 7.9** Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución. **A, B y C:** Placas de *debris* celulares. **D:** Células epiteliales formando placas. Microscopía de campo claro 40x. Medio contrastado con Rojo Neutro (A y C) y Eosina Y (B y D).

Las inclusiones celulares (no presuntivas de *Chlamydia* spp) estuvieron presentes de manera abundante en el 6% (9/151) de las muestras, mientras que fueron moderadas en el 21.2% (32/151), las encontramos presentes de manera escasa en el 22.5 % (34/151) y estuvieron ausentes en el 50.3% (76/151) (**Fig. 7.10**).



**Fig. 7.10** Citología en Fresco de Alto Contraste y Alta Resolución. Células epiteliales con inclusiones citoplasmáticas no presuntivas de *Chlamydia* spp. Microscopía de campo claro 40x (**A, B y C**.) 100X (D). Medio contrastado con Eosina Y (**A y C**) y Rojo Neutro (**B y D**).

Como parte de la evaluación citológica, también se indagó la presencia de microorganismos. Se observó la presencia de bacterias en el 1.3% (2/151) de manera abundante, en el 6.6 % (10/151) de los casos fueron moderadas, en el 8.6 % (13/151) estuvieron escasas y en el 83.4 % (126/151) estuvieron ausentes. Por otra parte, la presencia de levaduras fue abundante en el 7.3 % (11/151) de los casos, mientras que en el 15.2 % (23/151) fueron moderados, en el 27.2 % (41/151) escasos y en el 50.3 % (76/151) estuvieron ausentes (**Fig. 7.8**).

Se realizó el resumen de los resultados citológicos de las muestras respiratorias analizadas (**Tabla 7.3**), en donde se pudo observar el comportamiento en la presencia o ausencia de variables citológicas como células epiteliales, detritus celulares, inclusiones celulares (no compatibles con *Chlamydia* spp), y microorganismos como bacterias y levaduras.

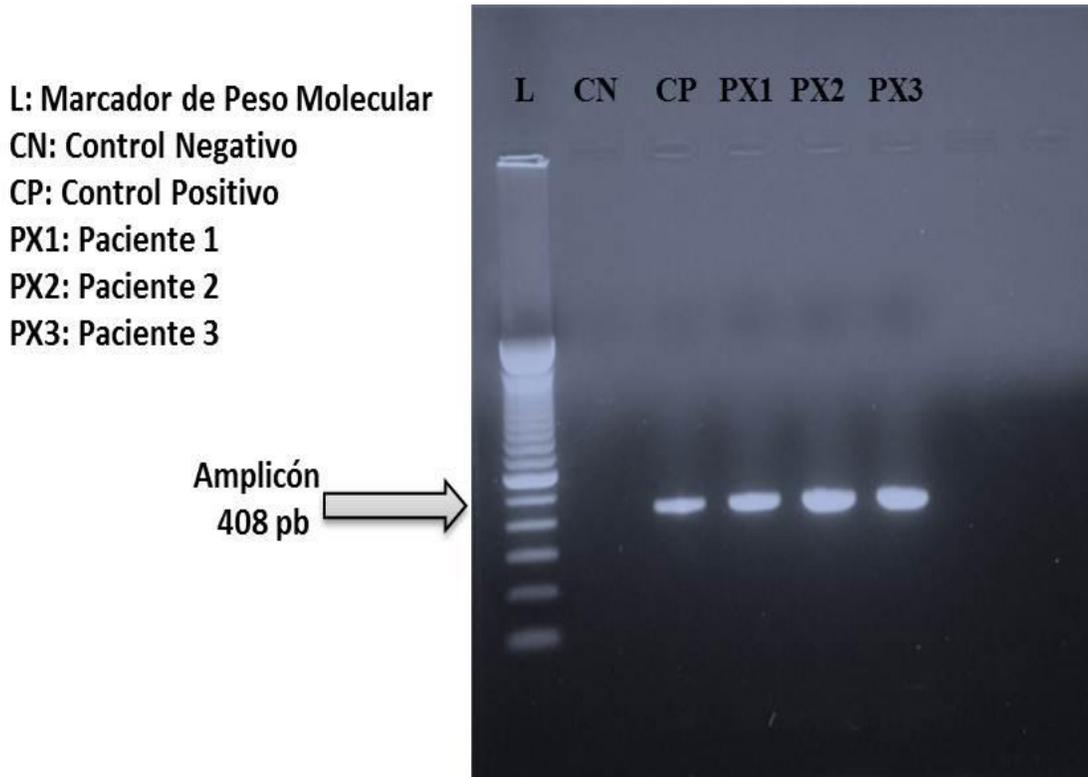
<b>Hallazgos citológicos en el grupo de pacientes incluidos en el estudio</b>				
	<b>Ausente</b>	<b>Escaso</b>	<b>Moderado</b>	<b>Abundante</b>
<b>Células Epiteliales</b>	<b>1.3 %</b> (2/151)	<b>33.8 %</b> (51/151)	<b>43.7 %</b> (66/151)	<b>21.2 %</b> (32/151)
<b>Detritus celulares</b>	<b>9.9 %</b> (15/151)	<b>17.9 %</b> (27/151)	<b>47.7 %</b> (72/151)	<b>24.5 %</b> (37/151)
<b>Inclusiones celulares</b>	<b>50.3 %</b> (76/151)	<b>22.5 %</b> (34/151)	<b>21.2 %</b> (32/151)	<b>6 %</b> (9/151)
<b>Bacterias</b>	<b>83.4 %</b> (126/151)	<b>8.6 %</b> (13/151)	<b>6.6 %</b> (10/151)	<b>1.3 %</b> (2/151)
<b>Levaduras</b>	<b>50.3 %</b> (76/151)	<b>27.2 %</b> (41/151)	<b>15.2 %</b> (23/151)	<b>7.3 %</b> (11/151)

\*muestra/total

**Tabla 7.3** Resultados citológicos de las muestras respiratorias del grupo de pacientes incluidos en el estudio.

### 7.5 Resultados microbiológicos mediante la reacción de amplificación de ácidos nucleicos (PCR)

Para la detección microbiológica mediante amplificación de ácidos nucleicos de *Chlamydia* spp, *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*, se realizó primeramente la detección del gen de  $\beta$ -globina lo que aseguró la presencia de ADN y por ende un proceso de extracción de calidad (**Fig. 7.11**).

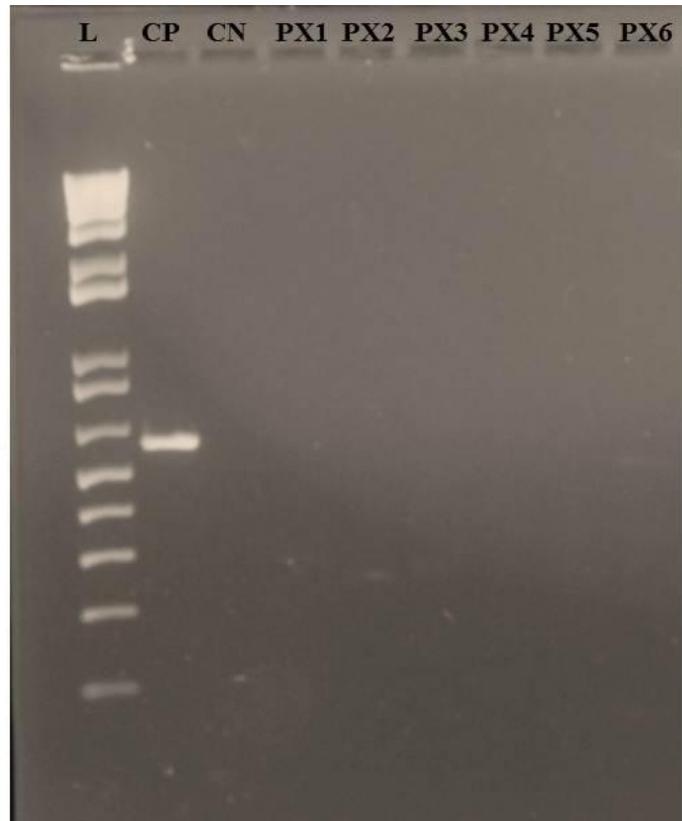


**Fig. 7.11** Imagen que muestra los resultados de la amplificación de una región génica para la detección del gen de la  $\beta$ -globina, empleada como control interno de extracción.

Para la detección de *Chlamydia spp* obtuvo un amplicón de 576 pb; de las 151 muestras analizadas no se observó la banda de amplificación en ninguna de ellas, lo que indica que no estaba presente el ADN de este género bacteriano (**Fig. 7.12**).

L: Marcador de Peso Molecular  
 CP: Control Positivo  
 CN: Control Negativo  
 PX1: Paciente 1  
 PX2: Paciente 2  
 PX3: Paciente 3  
 PX4: Paciente 4  
 PX5: Paciente 5  
 PX6: Paciente 6

Amplicón  
 576 pb →



**Fig. 7.12** Imagen que muestra los resultados de la amplificación de una región génica para la identificación de *Chlamydia spp*.

Para la detección de *C. trachomatis* obtuvo un amplicón de 241 pb; encontrando que tampoco se observó banda de amplificación en ninguna de las 151 muestras analizadas (Fig. 7.13)

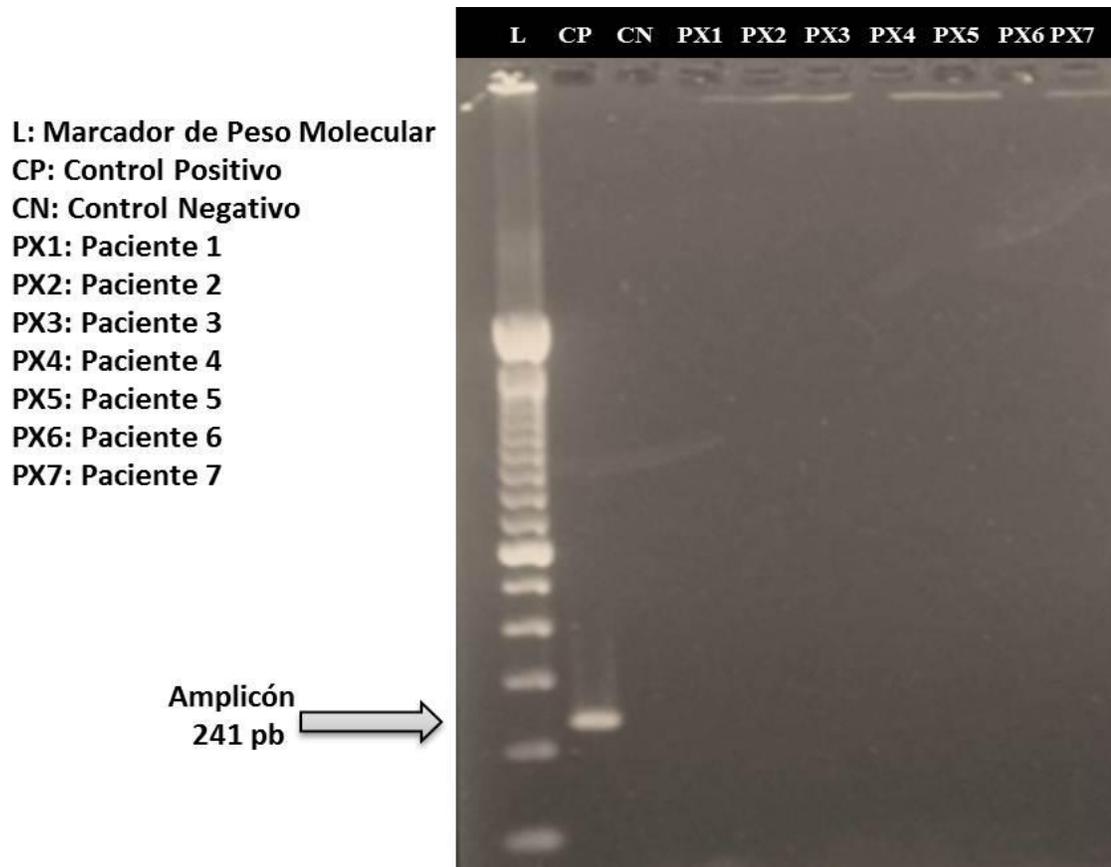
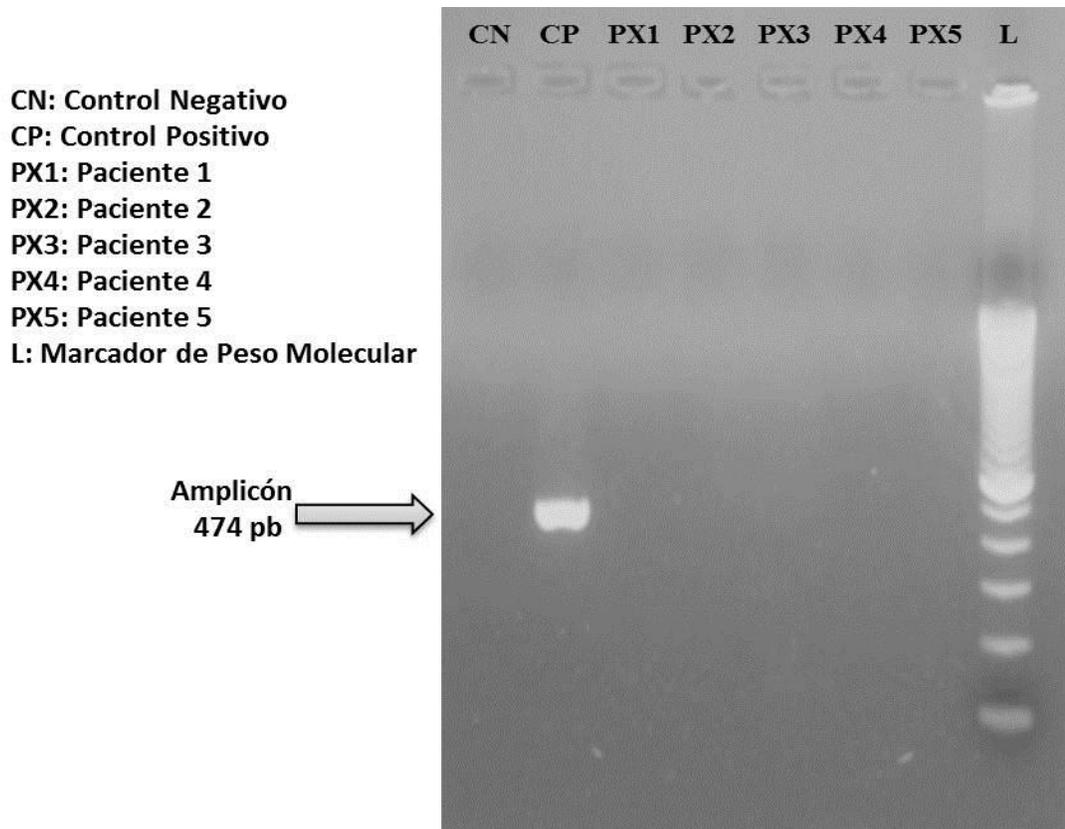


Fig. 7.13 Imagen que muestra los resultados de la amplificación de una región génica para la identificación de *C. trachomatis*.

Mientras que para *C. pneumoniae* se realizó la amplificación de una región génica que genera un amplicón de 474 pb; de las 151 muestras analizadas no se observó banda de amplificación en ninguna de ellas (**Fig. 7.14**).



**Fig. 7.14** Imagen que muestra los resultados de la amplificación de una región génica para la identificación de *C. pneumoniae*.

### 7.6 Comportamiento clínico y microbiológico en los grupos *Chlamydia* spp. positivos y negativos mediante la CIFAR-CF.

Con el propósito de encontrar indicadores clínicos y/o citológicos que fueran característicos del proceso infeccioso respiratorio en el grupo de infantes estudiados, se dividieron en dos grupos: grupo presuntivo positivo y grupo presuntivo negativo para *Chlamydia* spp mediante la evaluación citológica (**Tabla. 7.4**). La presencia de células epiteliales presentó diferencia significativa entre ambos grupos; se observó en el grupo presuntivo positivo un rango promedio de 90.21 mientras que el grupo presuntivo negativo presentó un rango promedio de 70.52 ( $p=0.080$ ), las variables de detritus celulares, inclusiones citoplasmáticas, bacterias y levaduras, no mostraron diferencia significativa al realizar el comparativo de resultados entre ambos grupos por la Prueba U de Mann Whitney.

<b>Hallazgos citológicos en los grupos presuntivos positivos y negativos de <i>Chlamydia</i> spp.</b>			
	Negativos N=109	Positivos N=42	Valor <i>p</i>
Células epiteliales	R.P.=70.52	R.P.=90.21	$p= 0.080^*$
Detritus celulares	R.P.=73.77	R.P.=81.80	$p= 0.273$
Inclusiones citoplasmáticas	R.P.=77.75	R.P.=71.45	$p= 0.389$
Bacterias	R.P.=76.99	R.P.=73.43	$p= 0.488$
Levaduras	R.P.=76.06	R.P.=75.83	$p= 0.975$

**Tabla 7.4** Tabla comparativa de los resultados citológicos entre los grupos positivos y negativos mediante la técnica CIFAR-CF.

Al realizar el comparativo de la presencia o ausencia de parámetros clínicos entre los grupos presuntivos empleando la técnica citológica de CIFAR-CF, observamos que la variable clínica RONQUERA presentó diferencia significativa al realizar el comparativo entre ambos grupos ( $p=0.049$ ), otro parámetro clínico en el que se observó una marcada tendencia a estar presente con mayor frecuencia en el grupo de presuntos positivos fue la faringoamigdalitis ( $p=0.192$ ), la obstrucción nasal fue una variable clínica que también se observó más acentuada en el grupo de presuntos positivos ( $p=0.207$ ), el escurrimiento nasal ( $p=0.285$ ), lagrimeo ( $p=0.550$ ), el prurito y el ardor nasal o faríngeo también se

vieron más acentuadas en el grupo presuntivo positivo, así mismo la descarga retronasal (Tabla 7.5).

Manifestaciones Clínicas en los grupos Positivos y Negativos presuntivos de <i>Chlamydia</i> spp.				
		Positivos	Negativos	Valor p
Rinitis	SI	33 (22.1%)	87 (58.4%)	0.433
	NO	9 (6%)	20 (13.4%)	
Sinusitis	SI	16 (11.4%)	55 (39.3%)	0.193
	NO	21 (15%)	48 (34.3%)	
Faringo-amigdalitis	SI	37 (24.8%)	86 (57.7%)	0.192
	NO	5 (3.4%)	21 (14.1%)	
Conjuntivitis	SI	22 (15.5%)	69 (48.6%)	0.164
	NO	17 (12.0 %)	34 (23.9%)	
Asma	SI	15 (10.9%)	47 (34.1%)	0.274
	NO	53 (38.4%)	23 (16.7%)	
Obstrucción nasal	SI	33 (26.6%)	86 (69.4%)	0.207
	NO	0 (0%)	5 (4%)	
Escurrecimiento nasal	SI	33 (26.6%)	87 (70.2%)	0.285
	NO	0 (0%)	4 (3.2%)	
Lagrimeo	SI	33 (26.6%)	82 (66.1%)	0.55
	NO	0 (0%)	9 (7.3%)	
Prurito nasal o faríngeo	SI	30 (24.4%)	82 (66.7%)	0.609
	NO	3 (2.4%)	8 (6.5%)	
Ardor nasal o faríngeo	SI	31 (25%)	84 (67.7%)	0.554
	NO	7 (5.6%)	2 (1.6%)	
Descarga retronasal	SI	31 (25%)	85 (68.5%)	0.640
	NO	2 (1.6%)	6 (4.8%)	
Dolor facial	SI	18 (14.6%)	62 (50.4%)	0.159
	NO	14 (11.4%)	29 (23.6%)	
Cefalea	SI	18 (14.6%)	64 (52%)	0.109
	NO	14 (11.4%)	27 (22%)	
Ronquera	SI	17 (13.8%)	65 (52.8%)	0.049*
	NO	26 (21.1%)	15 (12.2%)	
Ronquido	SI	17 (13.8%)	61 (49.6%)	0.117
	NO	15 (12.2%)	30 (24.4%)	
Disnea	SI	17 (13.7%)	62 (50%)	0.069
	NO	16 (12.9%)	29 (23.4%)	

**Tabla 7.5** Tabla comparativa de los resultados clínicos entre los grupos positivos y negativos de *Chlamydia* spp. mediante la técnica CIFAR-CF.

## 8. DISCUSIÓN

Las clamidias son un grupo especial de bacterias, poseen ADN y ARN siendo del grupo de bacterias con genomas más pequeños, que va de 1.04 a 1.23Mb (similares a los micoplasmas), se consideran bacterias Gram negativas ya que contienen una pared celular más compleja, la gran diferencia estriba en que poseen un ciclo de vida bifásico intracelular. Este ciclo de vida está dividido en dos fases, la forma contagiosa es conocida como cuerpo elemental y es capaz de sobrevivir de manera extracelular; al momento de entrar a un huésped se adhiere a la superficie de tejidos generalmente epitelios columnares o transicionales y penetra de manera de fagosoma. Dentro de la célula, al pasar algunas horas se convierte a cuerpo reticulado, experimentando divisiones binarias que es la forma de replicación de este tipo de microorganismos, hasta ocupar la mayor parte de la célula adoptando una morfología característica conocida como cuerpo de inclusión, la cual es resistente a la acción de diferentes enzimas como la contenida en los lisosomas. Después de algunas horas, los cuerpos reticulares dentro de la inclusión comienzan a transformarse a cuerpos elementales. Finalmente las inclusiones se rompen y se liberan los cuerpos elementales hacia las células adyacentes. De acuerdo a la especie de esta bacteria, dependerá si la célula es lisada o no para liberar los cuerpos elementales (Roca 2007).

Desde la antigüedad está documentado que *Chlamydia* es causante de diversas enfermedades en animales y humanos. Las especies patógenas para el humano son *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, siendo esta última causa de zoonosis ya que es común esta bacteria pero en aves psitácidas.

El diagnóstico de las infecciones causadas por clamidias a finales del siglo XX, era principalmente el cultivo celular, pero conforme la tecnología fue avanzando, los métodos de diagnóstico se fueron sustituyendo por técnicas más sencillas y rápidas que permitieran trabajar mejor. Así fue como aparecieron los primeros ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales y las técnicas de enzimo-inmunoensayo (EIA) que por su fácil manejo, llegaron a tener gran aceptación.

Posteriormente en los 90's apareció la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, la cual, por su elevada sensibilidad y especificidad ha desplazado al resto de las técnicas de referencia; pero fue hasta después del 2000 cuando comenzó a aprobarse esta técnica para el utilizarse como diagnóstico. Sin embargo, el diagnóstico de este microorganismo llega a ser un tanto complejo o confuso, ya que en múltiples estudios se ha demostrado poca correlación entre los resultados obtenidos por cultivo, por serología y por PCR, sin embargo podría ser solo a causa de que no se tiene una fase o tiempo concreto para la toma de muestra mientras se presenta la infección (Cerdena y Cantón 2012).

Este estudio se realizó en el estado de Tabasco debido a que cuenta con condiciones climatológicas húmedas, temperatura cálida incluso en invierno favoreciendo la sobrevivencia de *Chlamydia* spp. además de reportes o comentarios realizados por los médicos de las comunidades en los cuales se menciona la alta recurrencia de los pacientes con cuadros de infecciones respiratorias en prácticamente todo el año, acentuándose en temporadas de lluvia. Tenosique, municipio donde se realizó la recolección de muestras, cuenta con una gran cantidad de lagunas y arroyos ya que es regado por los ríos Usumacinta y San Pedro Mártir. Son abundantes las lluvias en verano con una media anual de temperatura de 30.5°C, sin embargo, en la sierra las lluvias se puede presentar durante la mayor parte del año. Además en estas regiones, es común encontrar aves exóticas o psitácidas como son los loros, guacamayas, tucanes entre otros; los cuales en reportes realizados en Argentina son portadores de *C. psittaci*. De acuerdo con el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) en el 2012 se reporta que los municipios de Tabasco con mayor porcentaje de población en pobreza fueron: Jonuta, Balancán, Tacotalpa, Huimanguillo y Tenosique; en donde más del 65% de la población se encontraba en situación de pobreza reportada como un grupo propenso a sufrir infecciones por el hacinamiento y falta de higiene en su vida diaria.

El número de muestras utilizadas para el estudio fueron seleccionados de acuerdo a la estadística realizada con datos obtenidos por el grupo de Gallegos *et al.* (2011), donde la presencia de *C. trachomatis* en muestras de secreciones faríngeas, conjuntivales y vía

genitourinaria osciló entre un 75.67% y 90.8%, siendo analizadas por IFD y citología en fresco de alta resolución por separado.

En el estudio, el sexo de los pacientes fue del 56.6% masculino y el 42.2% femenino, mientras que el 1.3% no se contó con la especificación del dato del menor. Nuestro resultado difiere con el estudio realizado por Ciria *et al.* (2011) en donde encontraron predominio del sexo femenino. Sin embargo, no se ha encontrado una diferencia significativa de los pacientes que presenten el cuadro clínico y el sexo.

Soler *et al.* (2013) realizaron un estudio en Cuba en el cual buscando la influencia de las infecciones respiratorias agudas altas con la aparición de asma bronquial en 342 pacientes (niños con infecciones respiratorias agudas que posteriormente desencadenaron asma bronquial). Se encontró que el grupo de edad que predominó (64.9%) estaba conformado por niños entre 1 a 4 años de edad. En nuestro estudio dividimos 3 grupos de edad, los cuales fueron de 0 a 4 años; 4 a 10 años; 10 a 17 años; del cual el grupo de edad predominante fue el de menores de 4 años.

Los resultados obtenidos en cuanto al cuadro clínico del paciente, en nuestro estudio obtuvimos que el signo más común entre los pacientes fue la faringoamigdalitis seguido por rinitis y escurrimiento nasal. Ciria *et al.* (2012) buscaron factores de riesgo para infecciones respiratorias altas recurrentes en niños preescolares, encontrando faringoamigdalitis, seguido por adenoiditis y en menor proporción otitis, rinofaringitis y sinusitis como los cuadros clínicos más predominantes. Incluso concluyen que la mayoría de los pacientes de su estudio que presentaron infecciones respiratorias agudas altas, presentaron posteriormente crisis agudas de asma bronquial, siendo esta observación importante en el diagnóstico y en el tratamiento de este síntoma en pacientes con antecedentes de problemas asmáticos, para evitar crisis asmáticas y problemas mayores.

Ramos *et al.* (2009) desarrollaron una prueba citológica para la detección de *Chlamydia* en preparados en fresco de secreciones conjuntivales, faríngeas y genitales. En su trabajo realizado analizaron 965 muestras de las cuales 489 fueron secreciones faríngeas y conjuntivales y el 75.67% resultaron positivas por IFD para *C. trachomatis*,

mientras que en las 431 muestras de secreciones de la vía genitourinaria la presencia de clamidias se detectó en el 90.8% por ésa misma técnica. El porcentaje global de pruebas positivas para clamidia fue de 83.24% con la técnica de IFD. En 565 muestras se pudo realizar también, el método de citología en fresco de alto contraste y alta resolución en capa fina, por el cual se detectó la presencia de clamidias en el 94.15%. El análisis estadístico comparativo concluyó que frente a la IFD, la prueba de citología en fresco en de alto contraste y alta resolución capa fina estudiada a 1000 aumentos, mostró un 95.97% de valor predictivo positivo, un 94.20% de valor predictivo negativo, una sensibilidad de 99.21% y una especificidad de 75.58%, concluyendo en su trabajo que la citología en fresco de alta resolución resultó ser una técnica de elevada sensibilidad un alto valor predictivo positivo, adecuada para la búsqueda de *Chlamydia* spp. en grandes poblaciones.

En datos citológicos con la técnica de CIFAR utilizada en este trabajo, obtuvimos un 10.6% de frecuencia como diagnóstico positivo para *Chlamydia* spp. Entre algunos otros hallazgos, se observaron bacterias y *destritus* celular indicativos del proceso de autólisis, propio del proceso inflamatorio, pero que también pudieran ser resultantes del tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y la realización de su estudio. Esta última situación podemos considerarla como una limitante de éste trabajo. Las células observadas principalmente correspondieron a células epiteliales de tejidos mucosos, mientras que los *destritus* celulares pudieron resultar de la destrucción de células, debido al manejo de las muestras, a los cambios de temperatura que pudieron sufrir las muestras y a su procesamiento en el momento de resuspender los botones de concentración.

Con las técnicas citomorfológicas aplicadas, también podríamos haber observado células blancas, que son el indicativo de un proceso inflamatorio, sin embargo estas células no fueron encontradas en las muestras analizadas, sin poder establecer que esto fuera secundario a la autólisis celular del propio proceso inflamatorio o a que la enfermedad estuviera en fase de remisión.

La presencia de bacterias en este tipo de muestras analizadas es debido a que en la cavidad bucal encontramos bacterias que forman parte de la flora normal. Sin embargo,

algo que no esperábamos observar de manera frecuente, fue la presencia de levaduras; estas estuvieron presentes en un 49.7% del total de las muestras. Guillén R. *et al.* (2012), realizaron cultivos de muestras respiratorias de pacientes que presentaban neumonía, encontrando entre otros microorganismos a *Cándida* sp. (15%). La candidiasis de cavidades húmedas como la bucofaríngea, se asocia a la alteración de la flora bacteriana o microbiota normal, que suele ser secundaria a la infección por otros microorganismos que alteran las condiciones fisiológicas normales, por ejemplo la presencia de la enzima Lysosima secretada por las glándulas de la zona en defensa de las infecciones bacterianas. Cambios fisiológicos como la hiperviscosidad de las secreciones son también provocados por algunos microorganismos, entre ellos las clamidias que generan un microambiente propicio para la infestación por gérmenes oportunistas.

Por la citología teñida con Giemsa la frecuencia de cuerpos de inclusión de *Chlamydia* spp. fue de un 20.5% de acuerdo con un estudio realizado por Mohammadzadeh *et al.* (2011) buscando *C. trachomatis* en mujeres sintomáticas con dolor pélvico abdominal, disuria, flujo vaginal anormal, entre otros, característicos de la infección de esta bacteria. No encontraron ninguna muestra positiva. La discrepancia de los datos puede deberse a que la muestra vaginal contenga flora contaminante al momento de realizar el frotis, por lo que es complicado observar cuerpos de inclusión de *Chlamydia*. Además el sitio de elección para el diagnóstico de éste microorganismo es el exfoliado del endocervix, más que la secreción vaginal.

Las pruebas de PCR realizadas a las muestras obtenidas de los infantes de Tabasco fueron negativas para *Chlamydia* spp., *C. pneumoniae*, *C. psittaci* y *C. trachomatis*. Los datos epidemiológicos varían de acuerdo al método de diagnóstico utilizado. Algunos autores reportan alta prevalencia de *C. pneumoniae* debido a que la mayoría de los estudios realizados utilizan como prueba diagnóstica inmunofluorescencia o alguna otra prueba serológica. Choroszy *et al.* (2014) publicaron que del 3-58% de las infecciones de las vías respiratorias altas eran causadas por *C. pneumoniae*. Kumar *et al.* (2007) reportaron porcentajes similares indicando una prevalencia que iba del 0 al 44% de *C. pneumoniae* en pacientes con la infección aguda del tracto respiratorio. Mientras que Normann *et al.*

(1998) utilizando la técnica de PCR encontraron en niños con infecciones agudas del tracto respiratorio a *C. pneumoniae* entre el 10 al 21% (niños menores de 2 años 10%; 19% en niños de 2 a 4 años, y un 21% en menores de 5 a 16 años). Esto concuerda con Al-Younes (2013) en donde observó una alta prevalencia de seropositividad en pacientes asintomáticos de Jordania; el estudio reportó que conforme aumenta la edad del paciente, aumenta el número de casos de seropositividad de anticuerpos anti-*C. pneumoniae*, esto debido porque conforme avanzan los años, se presenta mayor probabilidad de entrar en contacto con la bacteria.

Verani *et al.* (2013) publicaron un reporte de infecciones respiratorias agudas en Guatemala donde encontraron que *C. pneumoniae* causa solo el 0.6% de estas infecciones.

En Yucatán, Jiménez *et al.* (2002) publicaron que la frecuencia de seropositividad para *C. pneumoniae* en adultos llegó a ser del 40%; sin embargo, contrario con la publicación de Al-Younes, ellos mencionaron que conforme aumenta la edad, observaron un decremento de la seropositividad.

La importancia del diagnóstico de *C. pneumoniae* es debido a que esta bacteria cumple un papel importante en el desarrollo de las enfermedades respiratorias como cáncer de pulmón y asma, enfermedades cardiovasculares como infarto y arteroesclerosis e incluso enfermedades del sistema nervioso central como el Alzheimer. Por lo tanto un diagnóstico certero es de gran importancia para la prescripción de antibióticos apropiados que controlen el proceso infeccioso y eviten la presencia crónica de esta bacteria. (Guillén *et al.* 2012)

El diagnóstico de *C. trachomatis* en niños es un hecho polémico, ya que anteriormente se relacionaba exclusivamente a esta bacteria con infecciones contraídas durante relaciones sexuales, sugiriendo entonces que si el niño presentaba esta bacteria, había sido abusado sexualmente. Hoy en día, se conoce el modo de transmisión y esta bacteria puede transmitirse al niño desde el momento en el que nace, cuando su madre es portadora y al pasar por el canal de parto, le transmite el microorganismo, aumentando el

riesgo de causar conjuntivitis o neumonía al bebé. Sin embargo hay reportes que indican que cuando la madre presenta infección de *Chlamydia* y se realiza una cesárea, la ruptura prolongada de membranas podría ser causa de infección al feto. Por lo tanto, la prevalencia de *C. trachomatis* indica que hay probabilidad de contagio a los niños al momento de nacer.

En un estudio realizado en Paraguay encontraron 68.8% de prevalencia de *C. trachomatis* mediante inmunofluorescencia directa en recién nacidos y lactantes con dificultad para la ingesta de alimentos y dificultad respiratoria que asistieron a consulta. Se considera que *C. trachomatis* es responsable de 30-40% de las neumonías en edades inferiores a los 6 meses. En nuestro estudio no encontramos *C. trachomatis*, esto puede deberse a que los menores, al igual que con *C. pneumoniae* no se ha expuesto al menor a estas bacterias (Iramain *et al.* 2011).

Si la infección respiratoria se localizara en los senos paranasales la secreción puede escurrir por la pared posterior de la naso y orofaringe, la cual es más difícil de coleccionar por el reflejo nauseoso que despierta el procedimiento de hisopado. En el grupo de pacientes estudiados 116 (93.5%), de ellos refirieron descarga retranasal. Es posible que en la mayoría de esos casos la muestra no fuera por lo tanto representativa de la infección crónica de la vía respiratoria alta, que es uno de los sitios más comúnmente afectados por la *C. trachomatis*, que llega a las cavidades de los senos paranasales por escurrimiento a través del conducto nasolagrimal en los casos de conjuntivitis por *Chlamydia*.

*C. psittaci* es conocida por ser una zoonosis a causa de las aves psitácidas. Es considerada también como un agente bioterrorista Nivel III, ya que puede ser depositada en el ambiente y en comparación con *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*, es más resistente al medio ambiente.

En México, no existen datos epidemiológicos de *C. psittaci*, al contrario de los países Europeos, incluso en Estados Unidos; esto debido a que la CDC ha indicado que se trata de una enfermedad de declaración obligatoria.

Se han presentado algunos brotes como en Suiza (2013) en el que un paciente de la tercera edad fue internado por infección respiratoria, al realizarle el estudio dio positivo para *C. psittaci*, posteriormente, su hijo, algunas enfermeras y otro paciente fueron infectados. Este fue el primer caso publicado por Wallensten *et al.* (2014), en donde se confirmó la transmisión de esta bacteria persona a persona, ya que esto no era considerado anteriormente.

En el 2015, Dumke *et al.*, analizaron entre el 2011 y el 2012 la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia* spp. en pacientes con neumonía adquirida. Analizaron 794 pacientes de los cuales el 3.9% fueron positivos para *Chlamydia* spp., de los cuales el 2.1%, correspondía a *C. psittaci*. Por lo tanto concluyeron que es importante que para el diagnóstico de neumonía, se incluya en las pruebas la búsqueda no solo a *C. pneumoniae*, sino que también de *C. psittaci*.

Las muestras analizadas en nuestro trabajo fueron negativas para este microorganismo, esto posiblemente a causa de la toma de la muestra, que a pesar de que estuvo recolectada en Mayo, mes en que regularmente se observa mayor predominio de esta infección.

Comparando las técnicas de diagnóstico utilizadas, en la actualidad el “gold standar” para el diagnóstico de microorganismos es la PCR. Sin embargo para las clamidias, la prueba de “gold standard” en los 80’s eran las pruebas serológicas y el cultivo celular que posteriormente tenía que confirmarse con la observación de los cuerpos clamidiales en alguna citología o tinción específica.

El grupo que dirige la Dra. Guadalupe Gallegos Avila en el Departamento de Patología de la facultad de medicina ha realizado numerosos estudios basándose en técnicas citomorfológicas de alta resolución incluyendo la microscopía electrónica y el corte semifino, en las que ha confirmado la presencia de Mycoplasmas, Ureaplasmas y Clamidias en especímenes provenientes de los órganos genitales masculinos de parejas infértiles, en los que la correlación con los resultados de la IFD para *Chlamydia* y los

cultivos selectivos para Mycoplasmas y Ueaplasmas no dejan lugar a dudas de las características morfológicas de éstos microorganismos y su impacto en el daño espermático y su correlación con aspectos clínicos del problema, aún sin aplicar el recurso de la pruebas de PCR. (Ramos *et al* 2009).

La PCR realizada a las muestras colectadas para éste estudio resultaron negativas. Algunos factores que pudieron afectar esta técnica, incluyen la extracción del ADN bacteriano, y su degradación, y que la carga bacteriana haya sido insuficiente para la amplificación y visualización adecuada en un gel de agarosa.

En cuanto a las citologías realizadas, la técnica de CIFAR y de Giemsa fueron positivas en el 27.8% de las muestras. Esto puede deberse a que en esta técnica buscamos *Chlamydia* spp., de acuerdo a su morfología.

En los últimos años se ha reconocido la existencia de algunas otras bacterias relacionadas con las Clamidias tales como *Paraclamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Rhadbochlamydiaceae* y *Criblamydiacear*. Este grupo de bacterias descubiertas dentro del orden *Chlamydiales*, presentan el mismo ciclo de vida, es decir, que también cuenta con una morfología compatible con el cuerpo de inclusión.

Niemi *et al.* (2011) mencionaron que algunas bacterias relacionadas con *Chlamydia* que se asocian con enfermedades respiratorias en humanos incluyen a *Paraclamydia acanthamoebae*, *Protochlamydia* spp., *Rhadbochlamydia* spp., *Simkania negevensis* y *Waddlia chondrophila*. *Waddlia chondrophila* y *Paraclamydia* spp., se han visto involucradas en abortos espontáneos en humanos. Ellos analizaron 136 muestras respiratorias para *Rhadbochlamydia* spp. en donde fueron detectas 16 positivas correspondiendo al 11.8%. Las *Rhadbochlamydia* se pueden encontrar en el medio ambiente, y son capaces de sobrevivir en amebas, lo cual es de gran importancia epidemiológica; ya que las amebas se encuentran dispersas en el agua y el incremento del usos de varios sistemas a base de agua, tales como acondicionadores de aire y humidificadores, puedan exponer a los seres humanos a las amebas y a sus patógenos

relacionados. Por otra parte, la ameba puede servir como campo de entrenamiento para las bacterias resistentes a amebas que favorecen la selección de los rasgos de virulencia y que permitan a estas bacterias sobrevivir en otras células fagocíticas, por ejemplo, los macrófagos alveolares. A través de este trabajo se sugiere la importancia de *Rhbdochlamydia* en infecciones del tracto respiratorio.

Greub *et al.* (2001) encontraron a bacterias relacionadas con Clamidias; en 29 muestras de secreción nasofaríngea de pacientes con infección respiratoria (13 hombres, 16 mujeres; de 3 meses a 18 años); 2 fueron *Parachlamydia*, 11 *Rhbdochlamydia* y 1 para ambas en tanto que *Protochlamydia* no se encontró. En este estudio se reveló la alta prevalencia de muestras respiratorias positivas para especies de *Parachlamydia* y *Rhbdochlamydia*. Esta prevalencia fue similar a la reportada recientemente en neonatos con dificultad para respirar lo cual sugiere que las vías aéreas están colonizadas con bacterias relacionadas a clamidias. Su papel patogénico en está apoyado por el hecho de que estas bacterias no se recuperaron a partir de muestras respiratorias de pacientes sin evidencia de infección respiratoria y eran los únicos posibles agentes causales de neumonía en 12 de 14 casos.

En general, en la población estudiada, la rrisinosinusitis (82.5%), la conjuntivitis (50.7%) y la farimgoamigdalitis (35.9%), patologías comúnmente asociadas se presentaron indistintamente en el grupo con y sin *Chlamydia* identificada por la técnica CIFAR. En éste trabajo de investigación, la ronquera como síntoma recurrente y crónico se asoció a la presencia de *Chlamydia* diagnosticada por el método CIFAR ( $p=0.049$ ), se observaron con una marcada tendencia a estar presentes con mayor frecuencia en el grupo con *Chlamydia* detectada por ésta prueba. La faringoamigdalitis ( $p=0.192$ ), la obstrucción nasal ( $p=0.207$ ), el escurrimiento nasal ( $p=0.285$ ), el lagrimeo ( $p=0.550$ ), el prurito y el ardor nasal o faríngeo también se vieron más acentuadas en el grupo positivo por CIFAR, al igual que la descarga retronasal.

Tomando en cuenta lo descrito por Greub en 2001, podemos pensar que hay una probabilidad de que las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes de nuestro

estudio, pueden deberse a que este tipo de clamidias estén colonizando el tracto respiratorio, ya que pueden sobrevivir en parásitos del agua, y Tabasco es un lugar con gran humedad y en particular las zonas muestreadas cuentan con ríos, lagos y lagunas que se internan entre la región. Además, estos lugares son utilizados por la población como zonas de recreación, por lo que aumenta la probabilidad de estar en contacto con estos microorganismo; así también, los médicos de la región mencionan que las consultas por motivo de infecciones respiratorias aumentan, cuando se presentan lluvias en la región, esto hace sospechar que estas bacterias relacionadas con *Chlamydia* sean la causa del cuadro respiratorio.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados del presente trabajo, la técnica de CIFAR detectó en un porcentaje de las muestras analizadas, inclusiones citoplásmicas sugestivas de *Chlamydia*, a pesar de evidencias morfológicas de autólisis que disminuyen la certeza de las observaciones. Aunque las inclusiones observadas reunieron las características de las descripciones citomorfológicas clásicas, la PCR aplicada no confirmó la presencia de ADN clamidial, ante lo cual pudiera considerarse esos casos como falsos positivos, al menos para las especies de *Chlamydia* analizadas molecularmente. Deberá considerarse la posibilidad de que las bacterias con características morfológicas del género *Chlamydia* correspondieran a otras variantes descritas en asociación con infecciones respiratorias como las especies de *Parachlamydia* y *Rhabdochlamydia*. De la misma manera deberá tenerse en cuenta que la población es nativa de una región en la que variantes de *Chlamydia* no descritas hasta hoy pudieran existir.

En cuando al análisis de correlación que realizamos entre los datos clínicos y las pruebas de laboratorio, no se encontró ninguna asociación clara, y que requerirá un mayor número de casos positivos para establecer si existen síntomas específicos de la infección clamidial y necesariamente contra un grupo control considerado como sano. En éste aspecto habrá que considerar también, que las infecciones crónicas presentan episodios de remisión y exacerbación en los que la sintomatología y la presencia y cantidad de secreciones varía. Además la co-infección de enfermedad viral y por otras bacterias que

ocasionaran signos y síntomas inespecíficos, no fue considerada en éste estudio, lo cual deberá incluirse en estudios futuros.

## 9. CONCLUSIONES

1. Mediante la técnica de citología en fresco y de alta resolución en capa fina se estableció un diagnóstico basado en características morfológicas de la presencia de Clamidas en el 27.8% de las muestras analizadas.
2. Con las técnicas de PCR aplicadas no se logró demostrar la presencia de *Chlamydia* spp. en las muestras analizadas de exudado y lavado nasofaríngeo.
3. Es necesario investigar la presencia de otras bacterias relacionadas con *Chlamydia* descritas en casos de infecciones respiratorias, para descartar completamente la infección por este tipo de microorganismos.

## 10. PERSPECTIVAS

Como parte de las perspectivas de este proyecto podemos incluir en estudios posteriores:

**Primera:** Incluir el diagnóstico de otros patógenos que pudieran ser causantes de las infecciones respiratorias en la población de la región.

**Segunda:** Establecer una cadena de custodia que asegure la preservación de la muestra biológica hasta que se reciba en el sitio donde será estudiada.

**Tercera:** Incluir en futuros estudios el diagnóstico de algunas especies compatibles con *Chlamydias* relacionadas como *Protochlamydia* spp., *Rhadbochlamydia* spp. y *Parachlamydia* spp.; así como también diagnosticar la presencia de estas bacterias en algunas fuentes de contagio como lo son lagos, ríos y animales de vida silvestre.

---

**11. REFERENCIAS**

1. Aldous, M. B., J. T. Grayston, S.P. Wang, and. Foy, H. M. 1992. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966–1979. *J. Infect. Dis.* 166:646–649.
2. Altman, R., Rouvier, J., Scazziota, A. 1999. Lack of association between prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and acute or chronic coronary artery disease. *Clin Cardiol* 22: 85-90.
3. Álvarez, L. 2005. Enfermedades respiratorias. *Revista de enfermedades Infecciosas en Pediatría.* 18 (71). 7-10.
4. Andersen, AA. 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovarspecific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 29: 707–711.
5. Arraiz, N., Bermudez, V., Urdaneta, B., Mujica, E., Sanchez, MP., Mejía, R., Prieto, C., Escalona, C., Mujica, A. 2012. Evidence of zoonotic *Chlamydophila psittaci* transmission in a population at risk in Zulia state, Venezuela. *Rev Salud Pública (Bogota).* 14(2):305-14
6. Becker, Y. 1978. The *Chlamydia*: Molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryocytes. *Microbiol. Rev* 42:274-306
7. Beeckman, D. S. A. and D. C. G. Vanrompay. 2009. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection* 15:11-17.
8. Bjömsson, E., Hjelm, E., Janson, C. 1996. Serology of *Chlamydia* in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Scand Infect Dis* 28: 63-9.
9. Blasi, F., Tarsia, P., Aliberti, S. 2009. *Chlamydophila pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 15:29-35.
10. Bone, R. 1991. *Chlamydia pneumoniae* and asthma: A potentially important relationship. *JAMA* 266: 265.
11. Branley, JM., Weston, KM., England, J., Dwyer, DE., Sorrell, TC. 2014. Clinical features of endemic community-acquired psitacosis. *New Microbe New Infect.* 2. 7-12
12. Chen, CJ., Wu, KG., Tang, RB., Yuan, HC., Soong, WJ., Hwang, BT. 2007. Characteristics of *Chlamydia trachomatis* infection in hospitalized infants with lower respiratory tract infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 40(3):255-9.

13. Chen, Z., Ji, W., Wang, Y., Yan, Y., Zhu, H., Shao, X., Xu, J. 2013. Epidemiology and associations with climatic conditions of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* infections among Chinese children hospitalized with acute respiratory infections. *Italian Journal of Pediatrics*. 39. 34.
14. Cho, MC., Kim, H., An, D., Lee, M., Noh, SA., Kim, MN., Chong, YP., Woo, JH. 2012. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. *Ann Lab Med.*;32(2):133-8.
15. Choroszy, I., Frej, M., Sarowska, J., Jama, A., Gosciniak, G. 2014. Detection of *Chlamydomphila pneumoniae* Antigens in Children in the Lower Silesia Region in 2011. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 23 (3). 411-414.
16. Ciria, A., Caravia, F., Álvarez, M., Insua, C., Tamargo, T., Massip, J. 2012. Factores de riesgo para infecciones respiratorias altas recurrentes en niños preescolares. *Revista Alergia México*. 59 (3). 113-122.
17. Cole, P. 1989. Host-microbe relationships in chronic respiratory infection. *Respiration*. 55:5-8.
18. Concklin, L., Adjemian, J., Loo, J., Mandal, S., Davis, C., Parks, S., Parsons, T., McDonough, B., Partida, J., Thurman, K., Diaz, M., Benitez, A., Pondo, T., Whitney, C., Winchell, J., Kendig, N., Van Beneden, C. 2013. Investigation of a *Chlamydia pneumoniae* Outbreak in a Federal Correctional Facility in Texas. *CID*. 57. 639-647.
19. Conrado, R., Cobos, N. De la infección respiratoria al asma. *Revista APC*. Noviembre Diciembre 2007, 5 (6):11.
20. Cook, PJ., Tunnicliffe, W., Ayres, JG. 1998. *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax* 53: 254-9.
21. Crichton, J., Hickman, M., Campbell, R., Batista, H., Macleod, J. 2015. Socioeconomic factors and other sources of variation in the prevalence of genital chlamydia infections: A systematic review and meta-analysis. *BCM Public Health*, 15:729.
22. Cunha BA, Connolly J, Abruzzo E. Increase in pre-seasonal community-acquired Legionnaire's disease due to increased precipitation. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: e45–46.
23. de la Vara, J., Palacio, L., Oropeza, C., Hernández, M., Lazcano, E. 2011 Perfil epidemiológico de la mortalidad en el sureste de México. *Instituto Nacional de Salud Pública*. 79-107.

24. Dickx, V., Beeckman, D., Dossche, L., Tavernier, P., Vanrompay, D. 2010. *Chlamydophila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. *Journal of Medical Microbiology*. 59. 1348-1353.
25. Díez, O., Batista, N., Bordes, A., Lecuona, M., Lara, M. 2007. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 25 (6) 387-393.
26. Dumke, R., Scheneer, C., Pletz, MW., Rupp, J., Jacobs, E., Sachse, K., Rohde, G., CAPNETZ Study Group. 2015. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia spp.* Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany 2011-2012. *Emerging Infectious Diseases*. 21(3). 426-432.
27. Emre, U., Roblin, P., Gelling, M. 1994. The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airway disease in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 148: 727-32.
28. Emre, U., Sokolovskaya, N., Roblin, P. 1995. Detection of anti-*Chlamydia pneumoniae* IgE in children with reactive airway disease. *J Infect Dis* 172: 265-7.
29. Everett, KD., Bush, RM., 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 genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49 (Pt 2): 415–440.
30. Gaede, W., Reckling, K.F., Dresenkamp, B., Kenklies, S., Schubert, E., Noack, U., Irmscher, H.M., Ludwig, C., Hotzel, H. & Sachse K. 2008. *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses & Public Health*, 55, 184–188.
31. Gallo., L., Entrocassi, C., Corominas, A., Rodríguez, M. 2010. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. *BCM Research Notes*. 3:34.
32. Gloria, F., Meaney, E., Valero, G. 1997. La relación entre *Chlamydia pneumoniae* y las lesiones aterosclerosas aórticas. *Arch Inst Cardiol Mex* 67: 17-23.
33. Grayston, JT., Diwan, VK., Cooney, M., Wang, SP. 1989. Community and hospital-acquired pneumonia associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically. *Arch Intern Med* 149:169-73.
34. Grayston, JT., Kuo, C., Wang, SP., Altman, J. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *NEnglJMed* 315:161-8.

35. Grayston, JT., Kuo, C., Campbell, LA., Beditt, EP. 1993. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR and atherosclerosis. Eur Heart J 14(suppl): 66-71.
36. Grayston, J. T., M. B., Aldous, A., Easton, S.P., Wang, C.C., Kuo, L. A., Campbell, and Altman, J.. 1993. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. J. Infect. Dis. 168:1231–1235.
37. Guillén, R., Franco, R., Franco, L., Moraga, P., Ojeda, M., Russomando, G. 2012. Detección por PCR múltiple de gérmenes atípicos en pacientes con neumonía adquirida de la comunidad que concurren al INERAM. Memorias del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud. 10 (1). 24-35.
38. Hahn, D.L., Dodge, R.W., and Golubjatnikov, R. 1991. Association of *C. pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 266:225–230.
39. Hashigucci, K., H. Ogawa, T. Suzuki, and Y. Kazuyama. 1992. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. Clin. Infect. Dis. 15:570–571.
40. Heddema, E.R., Van Hannen, E.J., Duim, B., Vandembroucke-Grauls, C.M. & Pannekoek, Y. 2006. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1989–1990.
41. Herrera, D., Mariño C, Ramírez E, López Juan, Vélez C. 2007. Adenovirus en Niños Menores de Cinco Años. Patrones de Circulación, Características Clínicas y Epidemiológicas en Colombia, 1997-2003. Rev Salud Pública; 9: 420-9.
42. Hill, AT., Campbell, EJ., Hill, SL., Bayley, DL., Stockley, RA. 2000. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. Am J Med. 109(4):288-95.
43. Center for Disease Control and Prevention. 2016. Cdc.gov. CDC-Clamidia. Disponible en: <http://www.cdc.gov/std/spanish/clamidia/default.htm>
44. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. Censia.salud.gob.mx. 2016. Programa de Atención a la salud de la Adolescencia. Disponible en: [http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/principal/interm\\_principal.html](http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/principal/interm_principal.html)
45. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/>
46. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal INAFED. 2016. Tabasco. Inafed.go.mx Disponible en:

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM27tabasco/municipios/27017a.html>

47. Medicina.uanl.mx. XXV Congreso Nacional de Investigación Biomédica. 2016. Disponible en: <http://www.medicina.uanl.mx/congreso/memorias2009/htm/1069/255.htm>
48. Organización Mundial de la Salud. 2016. OMS | Enfermedades respiratorias crónicas. Who.int. Disponible en: <http://www.who.int/respiratory/es/>
49. Huovinen, P., R. Lahtonen, T. Ziegler, O. Meurman, K. Hakkarainen, A. Miettinen, P. Arstila, J. Eskola, and P. Saikku. 1989. Pharyngitis in adults: the presence and coexistence of viruses and bacterial organisms. *Ann. Intern. Med.* 110:612–616.
50. Iramain, R., Aquino, M., De Jesús, R., Bogado, N., Coronel, J. 2011 Infecciones respiratorias altas y bajas por *Chlamydia trachomatis* en recién nacidos y lactantes. Riesgos y resultados. *Pediatr.(Asunción)*. 38 195-190
51. Ito, I., Ishida, T., Mishima, M. 2002. Familial cases of psittacosis: posible person-to-person transmission. *Intern Med* 41: 580–583.
52. Izadi, M., Fazel, M., Akrami, M., Saadat, SH., Pishgoo, B., Nasser, MH., Dabiri, H., SafiAryan, R., Esfahani, AA., Ahmadi, A., Kazemi-Saleh, D., Kalantar-Motamed, MH., Taheri, S. 2013. *Chlamydia pneumoniae* in the atherosclerotic plaques of coronary artery disease patients. *Acta Médica Iranica*. 51 (12). 864-870.
53. Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak M., Goscinak, G., Sarowska, J. & Choroszy-Krol, I. 2015. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and Typical Bacteria in Patients with Chronic Cough. *Pulmonary Infection*, 857, 75-78.
54. Jiménez, B., Vado, I., Laviada, H., Zavala, J. 2002. Frecuencia de seropositividad para *Chlamydia pneumoniae* en adultos de Yucatán, México. *Revista Biomed.* 13. 9-13.
55. Johnston, SL. 1997. Influence of viral and bacterial respiratory infections on exacerbations and symptom severity in childhood asthma. *Pediatr Pulmonol suppl*; 16: 88-9.
56. Jokinen, C., Heiskanen, L., Juvonen, H., Kallinen, S., Karkola, K., Korppi, M., Kurki, S., Rönneberg, PR., Seppä, A., Soimakallio, S. 1993. Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in eastern Finland. *American Journal of Epidemiology*. 1;137(9):977-88
57. Korppi, M., Leionen, M. 1995. Chlamydial infection and reactive airway disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 149: 341-2

58. Kuo, CC., Chen, H., Wang, SP. And Grayston, JT. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. J. Clin. Microbiol. 24:1034–1037.
59. Lamoth, F., Jatou, K., Vaudaux, B., Greub, G. 2011. *Parachlamydia* and *Rhodocholemydia*: Emerging Agents of Community- Acquired Respiratory Infections in Children. Clinical Infectious Diseases. 53 (5). 500-501.
60. Lettinga, KD., Verbon, A., Nieuwkerk, PT. 2002. Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreak of Legionnaires disease. Clin Infect Dis. 35. 11–17.
61. Llor, C., Moragas, A., Hernández, S. 2011. Infecciones del tracto respiratorio. Actualización en Medicina de Familia. 7 (3). 124-135.
62. McMillan J. 1998. *Chlamydia pneumoniae* revisited. Pediatr Infect Dis J. 17: 1045-1048.
63. Miyairi, I., Laxton, JD., Wang, X., Obert, CA., Tatireddigari, VR., van Rooijen, N., Hatch, TP., Byrne, GI. 2011. *Chlamydia psittaci* genetic variants differ in virulence by modulation of host immunity. J Infect Dis. 204(4):654-63.
64. Mohammadzadeh, M., Amirmozafari, N., Shayanfar, N., Ranjbar, R. & Rahbar, M. 2011. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections in symptomatic women by polymerase chain reaction (PCR) immunofluorescence and Giemsa stain . African Journal of Biotechnology, 10 (34), 6601-6605.
65. Morales, O., Durango, H., González, Y. 2013. Etiología de las neumonías adquiridas en comunidad en la población infantil. Neumología Pediátrica. 8 (2). 53-65.
66. Mordhorst, C. H., S.-P. Wang, and J. T. Grayston. 1994. Transmission of *C. pneumoniae* (TWAR), p. 488–491. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy.
67. Naghipour, M., Cuevas, LE., Bakhshinejad, T., Mansour-Ghanaei, F., Noursalehi, S., Alavy, A., Dove, W., Hart, CA. 2007. Contribution of viruses, *Chlamydia* spp. and *Mycoplasma pneumoniae* to acute respiratory infections in Iranian children. Journal of Tropical Pediatrics. 53(3):179-84.
68. Niemi, S., Greub, G., Puolakkainen, M. 2011. *Chlamydia*-related bacteria in respiratory samples in Finland. Microbes and Infection. 13. 824-827.
69. Normann, E., Gnarp, J., Gnarp, H. 1998. *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. Acta Paediatrica. 1. 23-27.

70. Paul, M., García, C., Vega, L. 2009. Infección por *Mycoplasma pneumoniae*. Neumología pediátrica. 140-146. Disponible en: <http://www.neumologia-pediatria.cl/PDF/200723/InfeccionMycoplasma.pdf>
71. Peter G. 1997. American Academy of Pediatrics. *Chlamydia pneumoniae*. Ed. Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 24th ed. Elk Grove Village, IL 168.
72. Pilar, FJ., Casado, J., García, MA., Rodríguez, A., Quiroga, E., Cambra, F., Melendo, J., Ruiz, A., Sault, JA., Calvo, C., Teja, JL. 1998. Infecciones respiratorias agudas en unidades de cuidados intensivos pediátricos. Estudio prospectivo multicéntrico. 48 (2). 138-143.
73. Pino, L., Hincapié, G. 2008. A propósito de la etiología bacteriana de EPOC y Asma. Infección por *Chlamydia pneumoniae* y enfermedad pulmonar crónica: ¿Relación causal ó epifenómeno? Revista Med. 16(1):39-44.
74. Principi N, Esposito S. 2001. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. Lancet Infect Dis 1(5):334-44.
75. Ridker PM, Kunds RB, Stampfer MJ. 1999. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. Circulation 99: 1161-4.
76. Roca, B. 2007. Infecciones por clamidias. Anales de Medicina Interna, 24 (6), 292-299.
77. Rodríguez, M., Sanbonmatsu, S., Salinas, J., Alonso, R., Gutiérrez, J., Galán, JC. 2014. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 32 (6).
78. Romero, M., Más, P., Lacasaña, M., Téllez, M., Aguilar, J., Romieu, I. 2004. Impacto de la contaminación del aire en menores de edad, de la ciudad de La Habana. Salud Pública de México. 46 (3). 222-233.
79. Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol. 16;135(1-2):2-21.
80. Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J. Müller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P. & Ehrlich, R. 2009. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from cell culture and clinical samples. Vet. Microbiol., 135, 22–30.

81. Saikku, P., Leinonen, M., Mattila, K. 1988. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with coronary heart disease and acute myocardial infection. *Lancet* 938-986.
82. Secretaría de Salud, Manual de Enfermedades Respiratorias Agudas. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. México DF, EDITORIAL, 2012.
83. Soler, V., Pérez, X., Rigñack, L., Hevia, L. 2013. Relación entre las infecciones respiratorias agudas altas y el asma bronquial. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 29 (3). 297-305.
84. Soriano, F. 1997. Microbial etiologies of acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* Jun;3 Suppl 3:S23-S25
85. Tamayo, V., Rosell, L., Carrión, Y. 2015. Enfermedades prevalentes en niños guatemaltecos menores de 5 años. 19 (6). 715.
86. Taylor-Robinson, D. 2002. *Mycoplasma genitalium* an up-date. *Int. J. STD AIDS* 13 (3) 145-151
87. Hackstadt, T. 1999. Cell Biology. I. En Stephens, Richard Scott. ASM PRESS. Pp 101-129.
88. The Center for Food Security & Public Health. 2009. Psitacosis/Clamidiosis aviar. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/psittacosis-es.pdf>
89. Thom, DH, Grauston JT, Siscovick DS. 1992. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 268: 68-72.
90. Vanrompay, D., Harkinezhad, T., van de Walle, M., Beeckman, D., van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., et al. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2007 Available from <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/7/07-0074>
91. Vanrompay, D., Harkinezhad, T., Van De Walle, M., Beeckman, D., Van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A. & Cauwerts, K. 2007. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1108–1110.
92. Verani, J., McCracken, J., Arvelo, W., Estevez, A., Renee, M., Reyes, L., Moir, J., Bernart, C., Moscoso, F., Gray, J., Olsen, S., Lindblade, K. 2013. Surveillance for Hospitalized Acute Respiratory Infection in Guatemala. *PLoS One*. 8 (12).
93. Verminnen, K., Duquenne, B., De Keukeleire, D., Duim, B., Pannekoek, Y., Braeckman, L., & Vanrompay, D. (2008). Evaluation of a *Chlamydophila*

- psittaci* Infection Diagnostic Platform for Zoonotic Risk Assessment. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 281–285.
94. Villarreal C, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. 2002. Persistent *Chlamydiae* and chronic arthritis. *Arthritis Res* 4(1):5-9
95. Voigt A, Schöfl G, Saluz HP. 2012. The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS One*. 2012;7(4):e35097
96. Wallensten, A., Fredlund, H., Runehagen, A. 2014. Multiple human-to-human transmission from a severe case of psitacosis, Sweden, January-February 2013. *Euro Surveill*. 19 (42).
97. Wang, S.P., and Grayston, J.T. 1990. Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, p. 402–405. In W. R. Bowie, H. D. Caldwell, R. P. Jones, P.-A. Mårdh, G. L. Ridgway, J. Schachter, W. E. Stamm, and M. E. Ward (ed.), *Chlamydial infections—1990*. Cambridge University Press, Cambridge.
98. Weiss, SG., Newcomb, RW., Beem, MO. 1986. Pulmonary assessment of children after chlamydial pneumonia of infancy. *JrPediatr* 108:659-64.
99. Wheeler, WB., Kurachek, SC., Lobas, JG., Einzig, MJ. 1990. Acute hypoxemic respiratory failure caused by *Chlamydia trachomatis* and diagnosed by flexible bronchoscopy. *Am Rev Respir Dis* 142:471-3.
100. Xuan, C., Yan, L., Zegang, W. 2013. Rapid Detection of Acute Respiratory Virus an Atypical Bacteria Infections in Children. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 6 (5): e6236.
101. Yamasaky, M. y López, G. 1999. *Chlamydia pneumoniae* y su papel en la inmunoalergia. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. 8 (4). 118-120.
102. Dirección General de Epidemiología. 2016. [Epidemiologia.salud.gob.mx](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx) Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd\\_boletin.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html)

## 12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Martha Jaqueline Martínez Tamez

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia* spp. EN INFANTES CON INFECCIONES CRÓNICAS DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR EN UNA REGIÓN DEL SURESTE DE MÉXICO.

Campo de estudio: Ciudad Universitaria

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 1 de Abril de 1991, hija de Martín Martínez y Teresa Irazema Tamez Villalón.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Grado obtenido de Químico Clínico Biólogo en 2013.

Experiencia Profesional:

Centro de Salud San Rafael y el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Agosto de 2012 a Noviembre de 2012. Áreas de trabajo: Hematología, Química Clínica, Serologías y Bacteriología.

Hospital Materno Infantil. Febrero de 2013 a Junio de 2013. Áreas de trabajo: Uroanálisis y Parasitología, Serologías, Bacteriología y Hematología.

Trabajo de tesis realizado en la Facultad de Medicina de la UANL en el Departamento de Patología de la misma. Diagnóstico de *Chlamydia* spp en niños con infecciones respiratorias crónicas de una región del sureste de México. Apoyo en las clases de Biología Celular. Enero 2014 a Diciembre 2015.

Personal profesional no docente del departamento de Patología, Facultad de Medicina de la UANL. Enero 2016- Actualmente.