

PN-MAR-556

PN-MAR-556  
ISM = 37467

# guía para el diagnóstico de laboratorio del tracoma

Preparada por los participantes en  
un simposio de la OMS



Publicación Científica No. 408

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD  
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la  
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD  
525 Twenty-third Street, N.W.  
Washington, D.C. 20037, E.U.A.

1981

Edición original en inglés:  
*Guide to the Laboratory Diagnosis of Trachoma*  
© World Health Organization 1975

ISBN 92 4 054048 6

ISBN 92 75 31408 X

© Organización Panamericana de la Salud, 1981

Las publicaciones de la Organización Panamericana de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones del Protocolo 2 de la Convención Universal de Derechos de Autor. Las entidades interesadas en reproducir o traducir en todo o en parte alguna publicación de la OPS deberán solicitar la oportuna autorización de la Oficina de Publicaciones, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. La Organización dará a estas solicitudes consideración muy favorable.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Secretaría de la Organización Panamericana de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de ninguno de los países, territorios, ciudades o zonas citados o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o del nombre comercial de ciertos productos no implica que la Organización Panamericana de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos.

De las opiniones expresadas en la presente publicación responden únicamente los autores.

## CONTENIDO

	<i>Página</i>
Prefacio .....	1
Introducción .....	3
Obtención y transporte de muestras .....	5
Muestras conjuntivales para la detección de inclusiones en frotis ....	5
Muestras conjuntivales para el aislamiento de <i>Chlamydia</i> .....	6
Obtención de muestras para la detección de anticuerpos .....	7
Detección de inclusiones en frotis conjuntivales .....	8
Tinción de Giemsa .....	8
Tinción de yodo .....	15
Tinción inmunofluorescente para la demostración de cuerpos de inclusión en frotis conjuntivales .....	15
Selección del método de tinción para la demostración de inclusiones en productos de raspado conjuntival .....	17
Referencias seleccionadas .....	18
Aislamiento de <i>Chlamydia</i> .....	19
Método del saco vitelino .....	19
Métodos de cultivo tisular .....	22
Selección del método de aislamiento .....	31
Referencias seleccionadas .....	31
Serotipificación del agente del tracoma .....	32
Método de la micro-inmunofluorescencia (micro-IF) .....	32
Referencias seleccionadas .....	36
Métodos serológicos para el diagnóstico de laboratorio del tracoma ....	37
Fijación del complemento .....	37
Prueba de la micro-inmunofluorescencia (micro-IF) .....	37
Referencias seleccionadas .....	38
Lista de participantes .....	39

## PREFACIO

*Los recientes progresos en el diagnóstico de laboratorio del tracoma permiten confirmar el diagnóstico clínico en un considerable número de casos y demostrar la presencia del agente aun en ausencia de signos clínicos manifiestos de enfermedad activa. Una aplicación más extensa de estos métodos introduciría un elemento objetivo y cuantificable en el diagnóstico y los estudios epidemiológicos. Sin embargo, para poder comparar los resultados es indispensable cierta uniformidad de métodos. Teniendo en cuenta este requisito y la conveniencia de compartir algunas de las experiencias adquiridas últimamente en ciertos laboratorios, se celebró en Londres, en julio de 1974, un Simposio de la OMS sobre el Diagnóstico de Laboratorio del Tracoma, patrocinado conjuntamente por la Organización Mundial de la Salud y el Instituto de Oftalmología de la Universidad de Londres.*

*Asistieron al simposio científicos de laboratorio que poseen considerable experiencia en este determinado campo y que han desempeñado un papel clave en el desarrollo de algunas de las técnicas. Además, científicos de laboratorios situados en países donde el tracoma sigue constituyendo un problema importante de salud pública participaron activamente en el simposio, que consistió en debates y demostraciones de laboratorio.*

*Se acordó en el simposio que se preparara y distribuyera un documento en el que se describieran las técnicas que han de utilizarse para el diagnóstico del tracoma. Esta guía expone un sistema de procedimientos para ser usados especialmente en el diagnóstico del tracoma en los países donde prevalece la enfermedad y donde las instalaciones de laboratorio pueden ser limitadas. Se considera conveniente que el personal de laboratorio dedicado a esta clase de actividad siga estos métodos lo más estrictamente posible; sin embargo, sus trabajos no tienen que limitarse a las actividades que se presentan en esta guía.*

*Las técnicas descritas reflejan el consenso de los participantes en el simposio. Se espera que esta guía contribuya al desarrollo de actividades cuyo objetivo final consista en controlar el tracoma como problema de salud pública.*

## INTRODUCCION

Para el diagnóstico del tracoma, tanto en casos individuales como en estudios epidemiológicos de la enfermedad y su control, pueden emplearse diversos métodos de laboratorio. La selección del método se basará en varios factores, tales como la sensibilidad, confiabilidad, costo y disponibilidad de la prueba de que se trate, la capacidad de los laboratorios individuales para aplicar las técnicas, así como las posibilidades del método para abarcar el número requerido de muestras.

En el caso de investigaciones que necesitan información sobre la prevalencia de la infección, es indispensable un método u otro de demostrar la presencia del agente mediante la localización de inclusiones o el aislamiento. Esta información también puede ser útil para determinar el efecto de las medidas de control.

En los estudios sobre el terreno en que la prestación de un servicio en gran escala digno de confianza constituya un requisito principal y la sensibilidad no sea una consideración de primer orden, los métodos de demostración de inclusiones en productos de raspado pueden resultar particularmente valiosos, si se dispone de microscopistas bien capacitados. La técnica de tinción de Giemsa es el método normal de demostración de inclusiones clamidiales. Ofrece indicaciones mediante la demostración de la modalidad citológica de la reacción inflamatoria. Resulta también útil para demostrar la presencia o ausencia de bacterias y para obtener preparaciones permanentes que pueden enviarse a otros laboratorios. Es el método más fácilmente disponible y más confiable. Sin embargo, exige mucho tiempo y resulta fatigoso. Los métodos de tinción de anticuerpos fluorescentes (AF) son más complicados y costosos. Aunque necesitan un tiempo de tinción más prolongado, la microscopía es menos fatigosa y más rápida que con la tinción de Giemsa. Pero el empleo satisfactorio de los métodos AF depende de la viabilidad de mantener condiciones apropiadas para el almacenamiento y transporte de muestras del campo al laboratorio. La tinción de yodo posee la ventaja de su rapidez y simplicidad pero es el método menos sensible.

En los estudios sobre el terreno en los que es conveniente una elevada sensibilidad, para trabajos en pequeña o en gran escala, el aislamiento en cultivo celular posee importantes ventajas; aunque requiere

instalaciones más complejas que la localización de inclusiones en frotis conjuntivales, constituye el método más rápido y sensible. Además, produce aislados para la serotipificación y el estudio de otras características biológicas. Como en el caso de la tinción AF en productos de raspado, su aplicación satisfactoria depende del mantenimiento de condiciones apropiadas de almacenamiento y de transporte de muestras del campo al laboratorio.

El aislamiento en saco vitelino de huevos de gallina embrionados resulta más engorroso, requiere más tiempo y posee menos sensibilidad, pero puede ocurrir que sea el único método disponible en ciertos laboratorios. Ahora bien, puede ser conveniente cuando se realizan trabajos en pequeña escala para obtener un número limitado de aislados.

La medición de anticuerpos tipo-específicos en la prueba de micro-inmunofluorescencia (micro-IF) aplicada al suero o a las lágrimas ofrece el índice más sensible de exposición a la infección tracomatosa. Por la simplicidad y disponibilidad de especímenes seriados de lágrimas en muchos lugares en que es difícil obtener suero, la aplicación de la prueba micro-IF a las lágrimas resulta un método conveniente. Sin embargo, hay que tener presente que los anticuerpos séricos pueden persistir después de la infección activa, mientras que la presencia de anticuerpos en las lágrimas parece relacionarse más estrechamente con la enfermedad activa.

La prueba micro-IF detectará anticuerpos suscitados por la infección con serotipos de los agentes de tracoma-conjuntivitis de inclusiones (Tr-CI) y linfogranuloma venéreo (LGV) comúnmente asociados a las afecciones clamidiales oculogenitales de origen venéreo. Para aclarar estas reacciones de anticuerpos se requiere incluir toda la gama de serotipos de *Chlamydia trachomatis* en la prueba micro-IF.

Hay que advertir que la utilidad de estas pruebas cuando se trata de otras regiones anatómicas, en particular las vías genitales, puede diferir considerablemente de la que se observa en especímenes oculares. Los frotis tienen mucha menos utilidad para detectar las infecciones clamidiales de los órganos genitales; el método preferido es el aislamiento en cultivo celular. Los laboratorios que traten de emprender trabajos referentes a las infecciones por *Chlamydia* de las vías genitales deberán consultar las publicaciones médicas de actualidad para elegir los procedimientos más convenientes para sus propósitos. Al final de cada sección figuran unas cuantas referencias seleccionadas.

## **OBTENCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS**

Es importante para lograr los mejores resultados dedicar la debida atención a los procedimientos meticulosos de obtención, manipulación y almacenamiento de muestras. Estos procedimientos variarán de acuerdo con el propósito de la obtención de muestras, pero se requiere considerable uniformidad para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Debe procederse a la obtención de muestras para la demostración del agente antes de administrar el tratamiento.

### **Muestras conjuntivales para la detección de inclusiones en frotis**

El empleo de anestésicos tópicos antes de la obtención de muestras es opcional y dependerá, hasta cierto punto, del propósito de la obtención y de los factores locales.

Conviene utilizar una espátula de Lindner o de Kimura. También pueden confeccionarse económicamente espátulas similares de metal, hechas con varilla de soldadura de aluminio. Se recomienda el empleo de instrumentos con un borde liso y fino, pero no afilado. Los instrumentos deben esterilizarse a la llama o frotándolos con etanol al 70% y secándolos debidamente antes de cada raspado. Al utilizarlos deberán mantenerse siempre limpios, fríos y secos. De manera sistemática, los productos de raspado deberán obtenerse de la conjuntiva tarsal superior, mediante trazos firmes a través de la superficie tarsal.

El material debe extenderse uniformemente sobre placas de vidrio limpias. Lo ideal sería que el frotis no excediera del grosor de una célula y que proporcionara para el examen por lo menos de 500 a 1,000 células epiteliales.

Puede obtenerse para la tinción de Gram un frotis separado, incluido el exudado, para demostrar la presencia de bacterias.

Los frotis deben secarse al aire y fijarse lo antes posible y siempre en el término de unas pocas horas después de su obtención.

La fijación para la tinción de Giemsa se efectúa con metanol puro, fresco y limpio, durante cinco minutos como mínimo.

La fijación para los métodos de tinción de anticuerpos fluorescentes se lleva a cabo con acetona anhidra, limpia y fresca, a +4°C (temperatura de baño de hielo) durante 5-10 minutos.

Los frotis fijados con acetona para la tinción AF deben almacenarse lo más pronto posible a la temperatura de -20°C o inferior. Tal vez sea inevitable el transporte, en breves períodos, del campo al laboratorio utilizando para las muestras un recipiente hermético con hielo húmedo, pero no debe exceder de uno o dos días. Hay que evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

### Muestras conjuntivales para el aislamiento de *Chlamydia*

La escobilladura es preferible al raspado o curetaje. Para aprovechar las posibilidades de los métodos de cultivo de admitir una muestra mucho mayor que en el caso de los métodos de localización de inclusiones, es importante escobillar lo más posible la conjuntiva de cada uno de los ojos, aumentando así la tasa de recuperación. Hay que evitar el contacto de la escobilla con las pestañas o la superficie cutánea del párpado.

Para este propósito es preferible emplear un hisopo estéril hecho de un material que no resulte tóxico para las clamidias o las células. Los hisopos estériles de algodón y alginato parecen apropiados. Los hisopos de dacrón pueden ser tóxicos y originar artefactos de tinción de yodo parecidos a las inclusiones en los cultivos tisulares. El alginato puede dar lugar, en cultivos tisulares, a ciertos artefactos que pueden confundirse con partículas clamidiales al ser examinados mediante la iluminación de campo oscuro.

Para inocular las muestras en cultivos tisulares o huevos embrionados se ha empleado tradicionalmente un medio de sacarosa-fosfato-glutamato (SFG) como medio para el transporte con el fin de reducir al mínimo la pérdida de infecciosidad durante la congelación y descongelación. Cualquier medio de mantenimiento de cultivo tisular al que se le haya añadido suero de ternera fetal al 3-10% puede ser un sustituto apropiado. Este medio suele contener antibióticos (50-100 ug/ml de estreptomycin, 50-100 ug/ml de vancomicina, 30 ug/ml de frameticina).

También puede utilizarse en su lugar un caldo de nutriente o leche descremada con antibióticos para muestras que hayan de inocularse en huevos embrionados.



Las muestras deben mantenerse a la temperatura de +4°C si pueden inocularse en cultivos celulares o huevos en el plazo aproximado de 24 horas, de lo contrario se congelarán en recipientes herméticos lo antes posible después de la obtención y se mantendrán a -60°C (nieve carbónica) o a -180°C (nitrógeno líquido) durante el transporte.

### **Obtención de muestras para la detección de anticuerpos**

#### **Suero**

Se puede extraer sangre por venopunción, separando el suero antes de que se produzca la hemólisis. El suero debe ser transportado en hielo húmedo o congelado si median más de unos pocos días. También puede recogerse sangre capilar en papel de filtro o esponjas semejantes a las que se emplean para obtener muestras de lágrimas (véase a continuación).

#### **Lágrimas (secreciones oculares)**

Las lágrimas pueden recogerse colocando tiras de papel de filtro (5 x 20 mm) en el fornix conjuntivo inferior hasta que queden saturadas. Es preciso evitar cualquier secreción lacrimal excesiva debida a la irritación. A continuación, las tiras de papel se colocan en un frasco apropiado que contenga 0.2 ml de solución salina amortiguada de fosfato y se transportan de la misma manera que el suero.

Pueden utilizarse igualmente esponjas de celulosa (de 1 x 1 x 7 mm, aproximadamente).

## DETECCION DE INCLUSIONES EN FROTIS CONJUNTIVALES

### Tinción de Giemsa

Si se utiliza una marca de colorante que merezca confianza, este método ofrece excelentes preparaciones permanentes.

Para utilizar la tinción, se prepararán diluciones con agua destilada neutra (coloración naranja con rojo neutro o púrpura con hematoxilina) o, de preferencia, con agua estabilizada, lo que puede hacerse de la manera siguiente:

a) Prepárese una solución de 0.067 mol/litro de fosfato de hidrógeno disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) utilizando 9.5 g de sal anhidra en 1 litro de agua destilada.

b) Prepárese una solución de 0.067 mol/litro de fosfato de dihidrógeno sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) disolviendo 9.2 g de la sal en 1 litro de agua destilada.

Para obtener agua estabilizada de un pH de 7.2, mézclense 72 ml de la preparación a) con 28 ml de la b) y 900 ml de agua destilada.

También pueden utilizarse soluciones preparadas con estabilizadores comerciales. Cualquier pH entre 6.8 y 7.2 es aceptable (aunque pueden ser preferibles los estabilizadores más básicos) siempre que se mantenga constante para reducir al mínimo la variación del color en las preparaciones teñidas.

La tinción de Giemsa se prepara disolviendo 0.5 g del colorante en polvo en 33 ml de glicerol a la temperatura de 55-60°C durante una hora y media o dos. A esta mezcla se le añadirán 33 ml de metanol puro, exento de acetona. Se mezclará bien la solución, dejándola sedimentar, y luego se guardará a la temperatura ambiente como solución madre. Las diluciones de esta solución madre se preparan con agua destilada neutra o agua esterilizada, a razón de una parte de solución de Giemsa madre por 40 ó 50 partes de diluyente.

## LAMINAS EN COLOR<sup>a</sup>

Las 12 figuras contenidas en las láminas 1 y 2 son frotis conjuntivales teñidos con Giemsa; las microfotografías originales fueron tomadas con una lente de inmersión en aceite de 100x y el aumento final es de 1080x.

### LAMINA 1

Fig. 1. Una inclusión de cuerpos elementales en una célula epitelial conjuntival (abajo a la derecha). En la parte superior a la izquierda se encuentra un macrófago (célula de Leber) con numerosas masas purpúreas oscuras, probablemente núcleos de leucocitos polimorfonucleares en el citoplasma mal definido.

Fig. 2 Una célula con tres inclusiones de cuerpos iniciales. Las partículas individuales están tan aglomeradas que no se distinguen. Los cuerpos iniciales son individualmente más pequeños que la mayor parte de las bacterias que comúnmente se encuentran en el ojo.

Fig. 3. Célula epitelial con inclusiones múltiples. Encima y a la izquierda del núcleo se ve una inclusión de cuerpos elementales con partículas rojas y purpúreas que parecen deformar el núcleo. Contigua al núcleo y a su derecha se extiende una inclusión densa de cuerpos elementales probablemente menos maduros. También están presentes en el citoplasma varias inclusiones pequeñas de cuerpos iniciales, así como partículas de cuerpos elementales individuales.

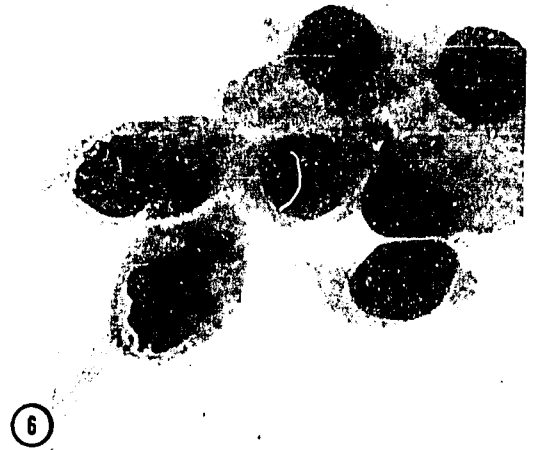
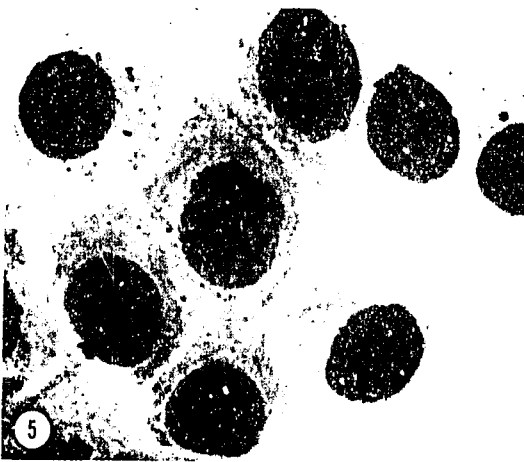
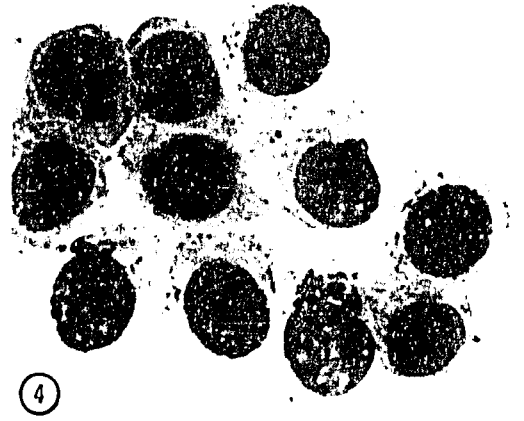
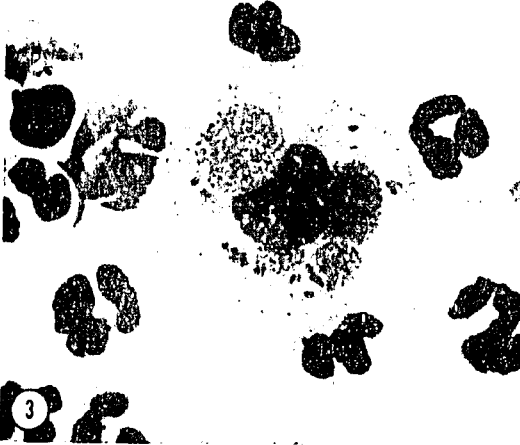
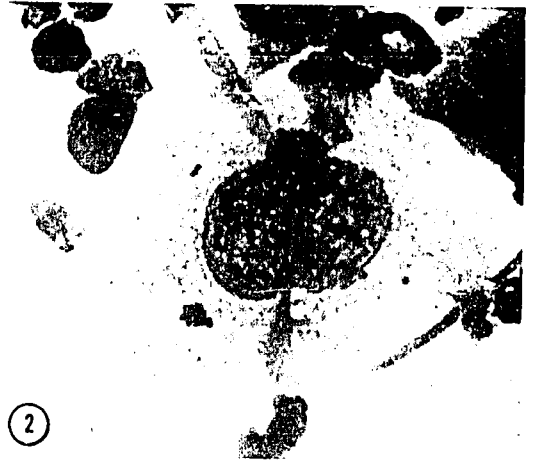
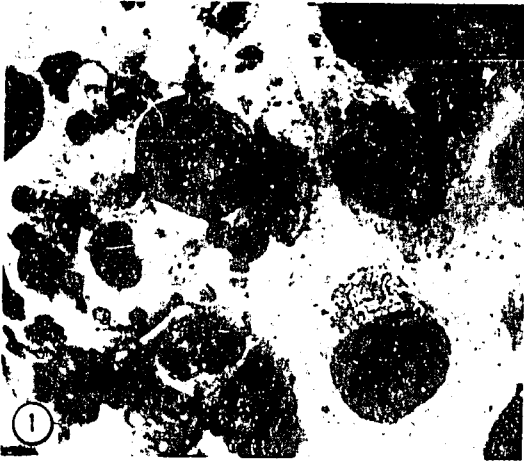
Fig. 4. Los gránulos de melanina en la célula forman un "casquete" sobre el núcleo, lo que sugiere una inclusión clamidial. La melanina puede distinguirse por su color verdinegro en frotis teñidos con Giemsa y por la presencia de gránulos individuales esparcidos por el citoplasma de muchas células contiguas.

Fig. 5. Formación por la melanina de una "seudoinclusión" muy compacta sobre el núcleo de una célula epitelial.

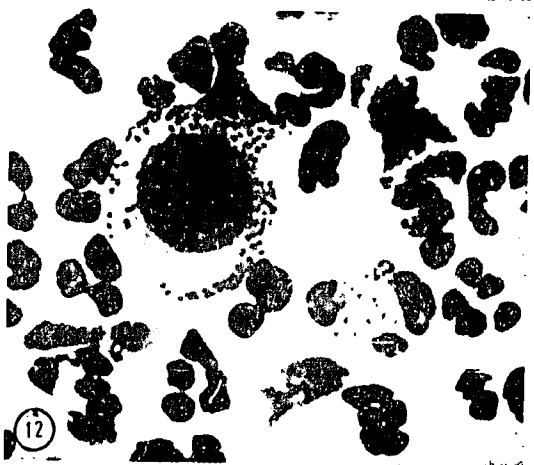
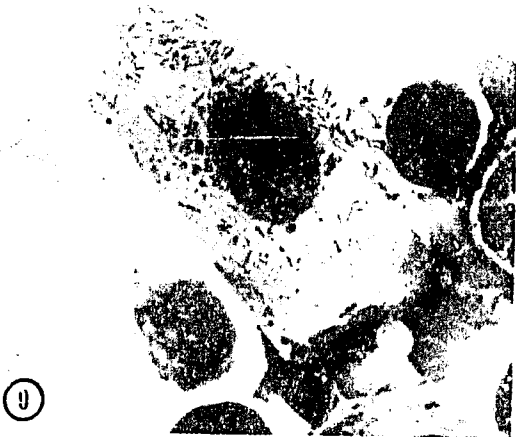
Fig. 6. Extrusiones nucleares en el citoplasma de células epiteliales. Estas extrusiones suelen estar adheridas al núcleo y tienen su mismo color y consistencia.

<sup>a</sup> Las láminas en color se han reproducido con autorización del editor del *British Journal of Ophthalmology* y los autores de los trabajos siguientes: Láminas 1 y 2, C. Yoneda *et al.* *Brit J Ophthalmol* 59:117 (1975). Lámina 3, S. Darougar *et al.* *Brit J Ophthalmol* 55:591 (1971).

LAMINA 1



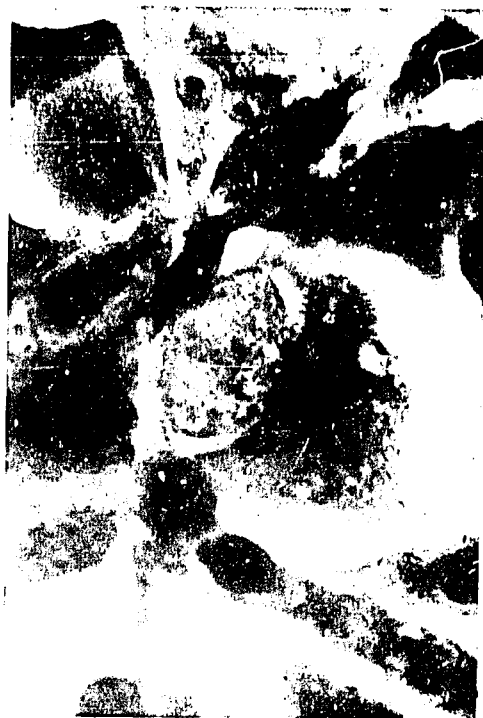
LAMINA 2



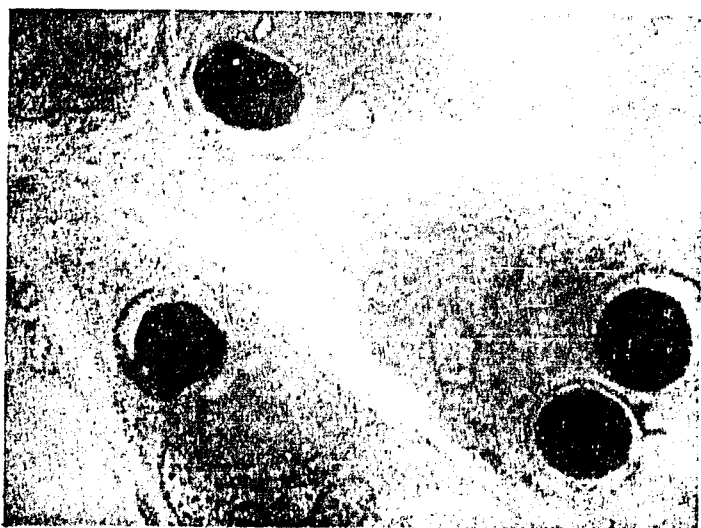
LAMINA 3



13



14



15

## LAMINA 2

Fig. 7. Gránulos en células caliciformes (productoras de mucina). Las partículas son de un color rojo rosado y raramente se distinguen tan claramente como los cuerpos elementales clamidiales. Los gránulos pueden ocupar distintas cantidades del citoplasma.

Fig. 8. Leucocitos polimorfonucleares eosinófilos y gránulos eosinófilos libres. Por su color rojo y presencia en leucocitos se distinguen claramente de los cuerpos elementales o inclusiones.

Fig. 9. Se supone que los bastoncillos delgados, ligeramente curvos en la superficie de una célula epitelial son *Haemophilus aegyptius* (o bacilo de Koch-Weeks). Las formas de tipo *H. aegyptius* y las bacterias de tipo *H. influenzae* (cocobacilos) se tiñen de azul pálido a diferencia del azul oscuro de las demás bacterias oculares.

Fig. 10. Diplococos en una célula epitelial conjuntival.

Fig. 11. Diplobacilos grandes. Se supone que pertenecen a la especie *Moraxella*.

Fig. 12. Diplococos grandes en productos de raspado obtenidos de un niño afectado de tracoma grave y de infección conjuntival por *Neisseria gonorrhoeae* demostrada por cultivo.

## LAMINA 3

Fig. 13. Cuerpo de inclusión en célula de McCoy irradiada, 60 horas, tinción de Giemsa, 1280 x, iluminación en campo oscuro. Los cuerpos elementales aparecen como partículas fluorescentes de color dorado intenso dentro del cuerpo de inclusión.

Fig. 14. Cuerpo de inclusión en célula de McCoy irradiada, 60 horas, tinción de Giemsa, 1280 x, iluminación en campo claro (el mismo campo que en la Fig. 13). El contraste entre los cuerpos elementales en los cuerpos de inclusión y otro material en el monoestrato es mucho menos pronunciado que con la iluminación en campo oscuro.

Fig. 15. Cuerpos de inclusión en células de McCoy irradiadas, 48 horas, tinción de yodo, 1920 x. Los cuerpos de inclusión están teñidos de marrón oscuro y contrastan bien con el amarillo claro del fondo.

Otra opción es el empleo de una preparación local de tinción de Giemsa, siempre que se haya comprobado que el lote es satisfactorio.

El frotis se cubre durante una hora con tinción de Giemsa diluida, preparada de nuevo todos los días. La lámina se enjuaga rápidamente en etanol al 95% para eliminar el exceso de colorante, luego se seca y se examina para determinar la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplásmicos basófilos típicos. Con los monoestratos de cultivo tisular tal vez sea preferible un período de tinción más prolongado (1-1/2 horas).

Bajo una lente de gran aumento de inmersión en aceite se ven inclusiones clamidiales en células epiteliales, en forma de masas intracitoplásmicas bien definidas que consisten en partículas que varían desde las de pequeño tamaño (alrededor de 300 nm) y color rojo o púrpúreo, formadas por inclusiones de cuerpos elementales hasta las inclusiones de cuerpos iniciales mayores (1  $\mu$ m) de color azul o púrpura, con relativamente pocas partículas individuales. Con frecuencia estos dos tipos de partículas aparecen en la misma inclusión.

#### *Seudo inclusiones y bacterias*

A continuación se enumeran varias estructuras que pueden parecerse a las inclusiones tracomatosas y dar origen a errores en la interpretación de frotis:

a) Los *gránulos de pigmento (melanina)* son negros o negrerverdosos en los frotis teñidos con Giemsa. Las partículas individuales suelen ser de tamaño irregular pero pueden acercarse al tamaño de los cuerpos elementales. Las aglomeraciones de gránulos de pigmento pueden formar un "casquete" muy apelmazado sobre el núcleo de la célula parecido a una inclusión tracomatosa.

b) En el citoplasma aparecen *extrusiones nucleares* en forma de masas irregulares comúnmente unidas al núcleo. Estas extrusiones son semejantes al núcleo en color y textura.

c) Las *células caliciformes* contienen gránulos no tan bien definidos como los cuerpos elementales y de color más claro. Estas células a menudo aparecen en racimos.

d) Los *gránulos eosinófilos* se derivan de leucocitos eosinófilos. Los gránulos individuales o en racimo en las superficies de células epiteliales pueden asemejarse a las inclusiones, pero se distinguen por su color y por los gránulos leucocitos eosinófilos y gránulos libres que los acompañan.



e) Las *bacterias* que se observan comúnmente en los frotis conjuntivales de zonas en que el tracoma es endémico incluyen especies *Haemophilus*, estreptococos, neumococos, *Neisseria*, estafilococos y difteroides. En los frotis teñidos con Giemsa pueden observarse *Haemophilus*, en forma de pequeños cocobacilos teñidos de azul pálido en racimos (tipo de *H. influenzae*) o de bastoncillos delgados, ligeramente curvos (de tipo *H. aegyptius*). Cuando están presentes en gran número en un frotis, los cocobacilos pueden distinguirse de las inclusiones por su presencia en la superficie celular, fuera del citoplasma. Los estreptococos, neumococos, estafilococos y *Neisseria* aparecen como formas teñidas de azul intenso que son de tamaño uniforme en cualquier frotis. Estos cocobacilos pueden confundirse con los cuerpos iniciales pero las bacterias casi siempre son mayores. Los difteroides son bastoncillos fusiformes que se tiñen de azul y que raramente se encuentran en las superficies celulares.

En las láminas 1 y 2 se presentan ejemplos típicos en el microscopio de preparaciones teñidas con Giemsa.

### **Tinción de yodo**

En productos de raspado que han sido secados al aire, fijados en metanol puro y teñidos con yodo de Lugol o una solución de yodo al 5% en solución de yoduro potásico al 10% durante 3-5 minutos, la matriz de inclusiones tracomatosas puede aparecer en forma de masa de un color marrón rojizo, identificable con una lente de bajo aumento, mostrando comúnmente cierta granulosidad. Los frotis se examinan en preparaciones húmedas.

### **Tinción inmunofluorescente para la demostración de cuerpos de inclusión en frotis conjuntivales**

Son aceptables los métodos directo e indirecto. Este último tal vez sea más apropiado para laboratorios que estén comenzando esos estudios, ya que los reactivos de tinción pueden adquirirse comercialmente.

El método directo necesita un tiempo de tinción más corto pero requiere grandes cantidades de suero anticlamidial específico conjugado. A los efectos de referencia, pueden adquirirse pequeñas cantidades de ese suero en algunos de los laboratorios dedicados activamente a este tipo de trabajo.

### *Técnica para el método indirecto*

Se necesitan los siguientes reactivos específicos:

- Cultivos en capas monocelulares infectadas para que sirvan de testigo
- Productos de raspado conjuntival humano
- Antisuero de conejo anticlamidial específico
- Globulina comercial de cabra anti-conejo, marcada con fluoresceína

El suero de referencia anticlamidial de conejo puede obtenerse en el Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigaciones sobre el Tracoma y Otras Infecciones Clamidiales, San Francisco.

Lo ideal sería que el antisuero de conejo incluyera anticuerpos contra los serotipos predominantes en la zona. Otro procedimiento, posiblemente más práctico, consiste en emplear un suero de amplia reactividad. El reactivo utilizado en el Centro de la OMS es suero de conejo hiperinmune contra una cepa de LGV (LGV 434B-Tipo II) cultivada en huevos embrionados. Los conejos se inmunizan por inoculación de material cultivado en saco vitelino.

Los frotis se secan al aire lo más pronto posible, se fijan con acetona a la temperatura de 4°C y se almacenan a -20°C o -60°C antes de la tinción. Los frotis que van a teñirse se ponen a la temperatura ambiente y se secarán al aire sin calor. Luego se cubren con antisuero de conejo y se incuban a la temperatura de 37°C durante 60 minutos en pequeños recipientes cerrados, con una atmósfera de humedad para evitar que se sequen las preparaciones.

A continuación, los frotis se lavan dos veces con solución salina amortiguada de fosfato de un pH de 7.2-7.4 durante 5 minutos cada vez, se secan y luego se cubren con una capa de globulina comercial de cabra anti-conejo, marcada con fluoresceína, y se incuban durante una hora a la temperatura de 37°C. Después de lavarlos con la solución salina durante 15 minutos y secarlos, se preparan en glicerol al 90% en solución salina amortiguada de fosfato y se examinan mediante la microscopia fluorescente en campo oscuro o de interferencia con filtros apropiados.

Es preciso vigilar el antisuero para asegurarse de que se obtiene la debida tinción con la dilución de trabajo con todos los serotipos del agente Tr-CI conocidos. La dilución de trabajo debe ser de 1:20 o mayor a fin de reducir la fluorescencia no específica.

La muestra clínica, para que se considere positiva, debe contener una masa intensamente fluorescente, en general de morfología similar

a la de las inclusiones teñidas con Giemsa, en el citoplasma de una célula epitelial, de preferencia contigua al núcleo. Las áreas gruesas del frotis son difíciles de interpretar, y se excluyen todas las células morfológicamente no identificables. Debe ignorarse la brillantez general o las masas fluorescentes libres.

La mejor manera de conservar las láminas teñidas es en la oscuridad a la temperatura de 4°C o -20°C, y lo ideal sería examinarlas en el término de 24 a 48 horas. Se pueden permitir períodos más prolongados de almacenamiento sin que disminuya de manera significativa la tinción siempre que se evite la exposición a la luz ultravioleta.

Entre las estructuras que pueden fluorescer y ser confundidas con inclusiones específicas figuran: leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, células epiteliales queratinizadas o plegadas, gránulos de pigmentos aglomerados en células y bacterias.

#### **Selección del método de tinción para la demostración de inclusiones en productos de raspado conjuntival**

La tinción de Giemsa es el método normal y es solo ligeramente menos sensible que el método de AF. Por eso es el que generalmente se recomienda.

La tinción de anticuerpos fluorescentes es más sensible que la tinción de Giemsa cuando se aplica a frotis conjuntivales de casos leves o tardíos de tracoma en los que se observan pocas inclusiones. Contrarresta esta ventaja la mayor complejidad del procedimiento de inmunofluorescencia. Sin embargo, la microscopia con anticuerpos fluorescentes es más rápida y menos fatigosa que con la tinción de Giemsa. Por consiguiente, la tinción de anticuerpos fluorescentes ofrece ciertas ventajas para su empleo en gran escala en laboratorios debidamente equipados y con experiencia en el examen de inclusiones teñidas con Giemsa; esto rige particularmente para los estudios sobre el terreno cuando se dispone de medios adecuados para el transporte de frotis conjuntivales fijados refrigerados.

La tinción de yodo es la menos sensible pero constituye el método más económico y rápido de tinción de inclusiones. Y puede ser de utilidad en ciertos proyectos sobre el terreno en gran escala.

## REFERENCIAS SELECCIONADAS

Hanna, L. An evaluation of the fluorescent antibody technique in the diagnosis of trachoma and inclusion conjunctivitis. *Rev Int Trach* 45:345-359, 1968.

Nichols, R. L. *et al.* Studies on trachoma. 2. Comparison of fluorescent antibody, Giemsa, and egg isolation methods for detection of trachoma virus in human conjunctival scrapings. *Amer J Trop Med Hyg* 12:223-229, 1963.

Schachter, J. *et al.* Evaluation of laboratory methods for detecting acute TRIC agent infection. *Amer J Ophthalmol* 70:375-380, 1970.

---

## **AISLAMIENTO DE *CHLAMYDIA***

Hay dos métodos comúnmente aceptados de aislamiento del agente del tracoma. El primero consiste en inocular el saco vitelino de huevo de gallina embrionados, y el establecido más recientemente es el de empleo de cultivos tisulares. Con el método del saco vitelino se requiere un tiempo considerable, de una a seis semanas, para obtener un aislado. El método de cultivo tisular es relativamente rápido: la tentativa de aislar el agente queda terminada en un plazo de tres a siete días. Este método es más sensible cuando lo aplican ciertos investigadores, pero otros consideran que los dos métodos poseen una sensibilidad comparable. No obstante, los métodos de cultivo tisular poseen grandes ventajas en cuanto a rapidez y además facilitan la manipulación de un considerable número de muestras.

### **Método del saco vitelino**

Es indispensable que los huevos fecundados procedan de aves de corral alimentadas con una dieta exenta de antibióticos. Deben elegirse huevos limpios y evitar el lavado.

Los especímenes clínicos se recogen en 1 ml de un medio apropiado con antibióticos. Las combinaciones apropiadas son de 1 a 5 mg de estreptomycinina o de 0.1 a 0.5 mg de gentamicina por mililitro de medio de cultivo con la adición de 0.25-0.5 mg de vancomicina o neomicina por mililitro. También pueden emplearse otros antibióticos, incluidas 100 UI de nistatina por mililitro o 2 ug de anfotericina B por mililitro.

La muestra se mantiene a la temperatura ambiente durante una hora antes de inocular 0.2-0.5 ml en los sacos vitelinos (SV) de 3 a 5 huevos de gallina embrionados que habían sido incubados a 38.5-39°C en humedad elevada durante un período de 6 a 8 días. Después de la inoculación (véase más adelante) los huevos se incuban a 35°C y se examinan al trasluz diariamente hasta transcurridos los 20 días subsiguientes a la primera incubación. Los huevos que mueren en los tres

primeros días después de la inoculación se desechan. Los sacos vitelinos de embriones que mueren después, o sobreviven al final del período de incubación, se recogen y se preparan frotis de impresión delgada utilizando la menor cantidad posible de material de saco vitelino y luego se tiñen (método de Giménez o el método modificado de Macchiavello, véase más adelante). Las pruebas de esterilidad se practican en saco vitelino con caldo de tioglicolato. Para los pases, los huevos se enfrían durante varias horas, y los sacos vitelinos se recogen, se homogeneizan en un medio apropiado y se pasan a otro grupo de 3 a 5 huevos de gallina embrionados. Siempre que sea posible se pasará en cada uno de los huevos un inóculo grande (1 ml de SV/huevo al 50%). Después de dos pases ciegos, cesan las tentativas por considerarse negativas.

Los criterios aceptados de un modo general para el aislamiento positivo son los siguientes: detección de cuerpos elementales en los frotis de impresión, mortalidad de huevos transmisible en serie, la presencia de antígeno de grupo en el SV y la ausencia de bacterias contaminantes.

### **Técnica de inoculación del saco vitelino**

1. Examínense al trasluz los huevos y deséchense los que no poseen un embrión vivo y un espacio de aire normalmente localizado en el extremo romo.
2. Rotúlense los huevos con el nombre del paciente o el número y la fecha de inoculación.
3. Colóquense los huevos en una gradilla y escobíllense las cáscaras únicamente en el punto de inoculación (la parte superior del extremo romo) con una solución de yodo al 5% en alcohol. Perfórese la cáscara y escobíllense de nuevo con yodo.
4. Utilícese una jeringa de 1 ó 2 ml con una aguja No. 1 o No. 2 (calibre 21 ó 22, aproximadamente 38 x 0.8 mm). La aguja se inserta por la perforación a lo largo del eje del huevo hasta que la punta de la aguja llega al centro del huevo. Inocúlese el huevo y retírese la aguja manteniéndola en el mismo eje.
5. Escobíllense la cáscara del huevo únicamente en el punto de inoculación con una solución de yodo al 5% en alcohol y ciérrase el orificio con cualquier engrudo apropiado o cinta adhesiva.
6. Colóquense nuevamente los huevos en la incubadora a la temperatura de 35°C y a una humedad elevada.

## Tinción de preparaciones de saco vitelino

Los métodos de tinción de Macchiavello y de Giménez son los que suelen emplearse para detectar cuerpos elementales en frotis de saco vitelino. En principio son métodos similares pero el de Macchiavello exige una mayor atención de los detalles. Puede utilizarse la tinción de Giemsa para detectar cuerpos elementales en frotis de saco vitelino, pero no constituye el método preferido porque requiere una experiencia considerable en diferenciar esos cuerpos del material de saco vitelino.

### *Tinción modificada de Macchiavello*

#### *Soluciones madre:*

Fucsina básica — 0.25 g en 100 ml de agua doblemente destilada  
Acido cítrico — 0.5 g en 200 ml de agua doblemente destilada  
Azul de metileno — 1.0 g en 100 ml de agua doblemente destilada

Después de secarlo al aire, el frotis o la preparación de impresión se fija por calor. La solución de fucsina básica se pasa primero por un papel de filtro en un pequeño embudo y luego se vierte sobre el frotis y, transcurridos 5 minutos, se enjuaga rápidamente. La lámina se lava primero con agua corriente y luego se sumerge durante unos segundos en la solución de ácido cítrico contenida en un vaso de Coplin. A continuación se lava bien con agua corriente y se tiñe con azul de metileno al 1% durante 20 ó 30 segundos, se lava otra vez con agua del grifo y se seca con papel absorbente. La solución de ácido cítrico debe ser fresca (de preferencia se preparará todos los días). La exposición al ácido cítrico que exceda de unos pocos segundos decolorará los cuerpos elementales y todos se teñirán de azul. En una lámina debidamente preparada estos cuerpos aparecen teñidos de rojo en un fondo azul.

### *Modificación de Giménez de la técnica de Machiavello*

#### *Solución madre:*

##### 1. Fucsina de carbol

Fucsina básica al 10% (peso/volumen) en etanol al 95%	100 ml
Fenol acuoso al 4% (peso/volumen)	250 ml
Agua destilada	650 ml

2. Solución amortiguada de fosfato sódico de 0.1 mol/litro a un pH de 7.45 (mézclense 3.5 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  de 0.2 mol/litro, 15.5 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de 0.2 mol/litro y 19 ml de agua destilada)
3. Oxalato de verde malaquita acuoso al 0.8%

Para preparar una solución de trabajo de fucsina de carbol, mézclense 4 ml de solución madre con 10 ml de solución amortiguada a un pH de 7.45; filtrese inmediatamente y, de nuevo, antes de cada tinción. La solución de trabajo se mantiene en condiciones satisfactorias durante unas 40 horas.

Un frotis de SV muy delgado, secado al aire pero no necesariamente fijado por calor, se cubre con solución filtrada de fucsina básica de carbol durante uno o dos minutos; después de lavarlo bien con agua corriente, se cubre con la solución de verde malaquita durante 6-9 segundos y se vuelve a lavar también con agua corriente; por último, las láminas se secan con papel absorbente. Los cuerpos elementales quedan teñidos de rojo en un fondo verdoso.

### Métodos de cultivo tisular

En la actualidad se han descrito tres métodos de cultivo del agente del tracoma. En todos ellos se emplea la centrifugación del inóculo en capas monocelulares.

#### Aislamiento de *Chlamydia* en células de McCoy irradiadas

##### *Medios y reactivos*

*Medio esencial mínimo (MEM)*. Con arreglo a las instrucciones, prepárese una solución de trabajo de medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, sin glutamina ni bicarbonato sódico, con preparaciones en polvo que puedan someterse a la autoclave, utilizando agua desionizada o triplemente destilada.

Distribúyanse 96.5 ml en cada frasco y sométanse a la autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Almacénense a +4°C.

*Suero bovino fetal*. Inactívese al baño de María a la temperatura de 56°C durante 30 minutos y distribúyase asépticamente en volúmenes de 5.5 ml. Almacénese a -20°C.



*Vitaminas y glutamina.* Las preparaciones requeridas pueden adquirirse en el mercado en volúmenes de 100 ml (vitaminas, una solución 100 veces mayor que la concentración requerida; glutamina, en forma de solución de 200 mmol/litro). Añádase una botella de vitaminas a 2 botellas de glutamina en un frasco estéril. Mézclase bien y distribúyase asépticamente en volúmenes de 2.3 ml. Almacénese a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Antibióticos.* Las concentraciones finales deben ser:

Estreptomicina	50 ug/ml de medio
Vancomicina	100 ug/ml de medio
Nistatina	25 UI/ml de medio

Disuélvase cada uno de los antibióticos en agua destilada estéril a una concentración 100 veces mayor que la final requerida en el MEM. Mézclense volúmenes iguales de las soluciones de antibióticos en un frasco estéril y distribúyanse asépticamente en partes alícuotas de 2.3 ml. Almacénese a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Solución de bicarbonato sódico.* Pésense 56 g de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) y disuélvanse en 1,000 ml de agua destilada. Esterilícese por filtración y distribúyanse en volúmenes de 3.5 ml. Almacénese a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

*Glucosa.* Disuélvanse 21.12 g de glucosa en 200 ml de MEM y esterilícese. Distribúyanse asépticamente en volúmenes de 5 ml. Almacénese a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Tripsina.* Prepárense 2 litros de tripsina al 0.2% (1:250) en solución salina libre de calcio y magnesio de la manera siguiente:

Pésense:

Cloruro de sodio	16 g
Cloruro de potasio	0.8 g
Glucosa	2.0 g
Bicarbonato sódico	1.68 g

Disuélvanse en 1,000 ml de agua destilada.

Colóquense 4.0 g de tripsina en un vaso de precipitados de 500 ml y conviértase la tripsina en una pasta con un poco de solución salina. Añádase poco a poco más cantidad sin dejar de revolver hasta obtener unos 250 ml de una suspensión uniforme. Añádase un imán para agitar y póngase en un agitador magnético durante 30 minutos.

Actívese poco a poco el agitador hasta que toda la suspensión se mezcle bien. Viértase esta solución en un cilindro medidor de 1 litro y contíñese añadiendo solución salina hasta llegar a la marca de 1 litro. Fíltrese con un filtro estéril y, si es necesario, prepárese otro litro con agua destilada y mézclase bien. Transfiéranse volúmenes de 200 ml de la tripsina estéril a botellas esterilizadas. Distribúyanse en partes alícuotas de 2 ml. Almacénense a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Soluciones amortiguadoras.* Solución amortiguada de fosfato, pH de 6.8 y 7.2.

*Tinción de Giemsa.* (Véase página 8.)

*Eosina.* Una solución al 0.15% en solución amortiguada de fosfato, pH de 7.0.

*Tinciones de yodo:*

a) *Solución de yodo al 5%.* Péseñse las cantidades siguientes:

Yoduro de potasio	5 g
Yodo	5 g

Disuélvase el yoduro de potasio en 50 ml de agua destilada, añáñdase los cristales de yodo y luego 50 ml de etanol puro.

b) *Solución de yodo al 2.5% en alcohol.* Disuélvase 2.5 g de yodo en 100 ml de etanol puro.

c) *Solución de yodo y glicerol.* Mézclense cantidades iguales de solución acuosa de yodo y glicerol al 5%.

*Solución amortiguada de fosfato y sacarosa, 0.2 mol/litro (2FS).* Disuélvase 68.46 g de sacarosa en una pequeña cantidad de agua destilada. Disuélvase 2.088 g de fosfato de hidrógeno potásico anhidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) en 60 ml de agua destilada. Disuélvase 1.088 g de fosfato de dihidrógeno potásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en 40 ml de agua destilada.

Disuélvase cada sustancia por separado y luego combínense las tres soluciones y añáñdase agua destilada a 1 litro. Ajústese a un pH de 7.0. Distribúyase en volúmenes de 100 ml y esterilícense por autoclave a la temperatura de  $115^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Almacénense a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Esta solución amortiguada se emplea como medio de transporte en el caso de *Chlamydia* con las adiciones siguientes en forma aséptica:

Suero bovino fetal a una concentración final de 3%

Estreptomícina a una concentración final de 50 ug/ml de medio

Vancomícina a una concentración final de 100 ug/ml de medio

Nistatina, si se requiere, a una concentración final de 25 UI/ml de medio

Distribúyanse volúmenes de 1.2 ml en ampolletas de plástico esterilizadas. Almacénense a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Solución de fosfato y sacarosa, 0.4 mol/litro (4FS).* Disuélvanse 136.92 g de sacarosa en 600 ml de agua destilada. Disuélvanse 2.268 g de fosfato de hidrógeno sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en 200 ml de agua destilada.

Combinense y añádase agua destilada a 1 litro. Ajústese a un pH de 7.0. Distribúyase en volúmenes de 100 ml y esterilicéense mediante la autoclave a la temperatura de  $115^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Almacénense a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Esta solución se emplea como un medio para almacenamiento en el caso de *Chlamydia*s.

*Glicerol.* Distribúyanse volúmenes de 10 ml y sométanse a la autoclave a la temperatura de  $115^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

#### *Equipo necesario*

Matraces de cultivo tisular con una extensa área de proliferación (aproximadamente  $75\text{ cm}^2$ )

Tubos de fondo plano (10-15 mm de diámetro interno)

Cubreobjetos (9-14 mm de diámetro) que se ajusten a los tubos anteriores

Cuentas de vidrio (2-3 mm de diámetro)

Hemocitómetro

Mezcladora

Agitador magnético

Bomba al vacío y trampa

Pipetas

Baño de María

Refrigeradores ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$ )

Incubadora ( $35^{\circ}\text{C}$ )

Centrifugadora con rotor horizontal (de tipo de recipiente desplazable)

Desinfectante

Prepárense tubos de fondo plano esterilizados que contengan cubreobjetos también esterilizados que hayan sido previamente lavados con un detergente no tóxico para los cultivos celulares y secados con alcohol.

#### *Método de cultivo celular*

##### *Preparación de medios*

a) *Medio de proliferación.* Añádanse en forma aséptica las sustancias siguientes:

Medio esencial mínimo (MEM)	96.5 ml
Suero bovino fetal inactivado	5.5 ml
Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> ) 5.6% peso/volumen	3.5 ml
Vitaminas	1.1 ml
Glutamina	1.1 ml
Estreptomina (5 mg/ml)	1.1 ml
Vancomicina (1 mg/ml)	1.1 ml

b) *Medio de aislamiento.* Añádase a ese medio 1.1 ml de una solución que contenga 2,500 UI de nistatina/ml y 5.0 ml de solución de glucosa.

*Pase de célula.* Selecciónense matraces con monoestratos confluentes. Sométanse a la acción de la tripsina y prepárese una suspensión celular uniforme empleando una pipeta de Pasteur fina esterilizada. Distribúyase asépticamente en cada uno de los matraces nuevos 1 ml de la suspensión celular y 10 ml de medio de proliferación. Incúbense a 35°C. Cámbiese el medio cada 48 horas.

*Irradiación de células.* Los monoestratos estarán en condiciones de ser irradiados en el plazo de 5 a 7 días. Selecciónense los matraces con los monoestratos más confluentes y procédase al transporte con las células en la parte más alta. Expónganse las células a 5,000 rads por cualquier medio de irradiación ionizante.

Después de la irradiación, cámbiese el medio y colóquense de nuevo en la incubadora a 35°C durante un período de 3 a 5 días. Cámbiese el medio cada 48 horas.

*Preparación de tubos de fondo plano.* Normalmente pueden prepararse hasta 200 tubos de cada matraz que contenga un monoestrato confluyente. La preparación suele hacerse 72 horas antes de que los tubos se necesiten para la inoculación.

Selecciónese un matraz de células irradiadas, gírese rápidamente y póngase a escurrir. Quítase asépticamente el medio viejo, sométanse las células a la acción de la tripsina pero volviéndolas a suspender en 10 ml (en lugar de 8 ml) de medio de proliferación. Durante el período en que las células se someten a la tripsina en la incubadora, séquense la cámara de recuento y los cubreobjetos (almacenados en alcohol) y prepárense para el recuento. Póngase 0.8 ml de una solución de eosina al 0.15% en una ampolleta.

Después de suspender de nuevo las células, transfíranse 0.2 ml de la suspensión celular a una ampolleta que contenga 0.8 ml de solución de eosina al 0.15% (para obtener una dilución de 1:5). Mézclase con una pipeta de Pasteur fina y llénense ambos lados de una cámara de

recuento de Neubauer perfeccionada. Las células degeneradas que se tiñen con eosina no se cuentan.

Déjense transcurrir 2 minutos. Cuéntense las células en los cinco cuadrados grandes de cada lado de la cámara (es decir, los cuatro cuadrados de las esquinas y el cuadrado central).

Calcúlese el promedio de células en un cuadrado grande y multiplíquese esta cifra por los factores apropiados de dilución y volumen contados. Así se obtiene el número de células en 1 ml de la suspensión celular original.

*Ejemplo de cálculo:*

Si el número de células en 10 cuadrados grandes es	= 200
el promedio de células en un cuadrado grande es	= 20
Cuando el volumen delimitado por un cuadrado grande es	= 0.1 mm <sup>3</sup>
el promedio de células en 1 mm <sup>3</sup> es	= 200
y el promedio de células en 1 cm <sup>3</sup> es	= 200,000
Dejando un margen para el factor de dilución (1:5)	
el número de células en la suspensión original es	= 1,000,000/ml

Dilúyase la suspensión para que contenga 10<sup>5</sup> células por ml, es decir, 100,000/ml. Hágase la dilución final de la suspensión en un matraz esterilizado y agítese durante unos minutos. Con una pipeta de 10 ml, transfírase asépticamente 1 ml de suspensión a cada tubo. Colóquense los tubos en una gradilla de base plana.

*Inoculación de especímenes a células de McCoy irradiadas*

Con una pipeta colóquense 2 ml de medio de aislamiento en tubos suficientes para cada uno de los especímenes que vayan a inocularse.

*Selección de monoestratos para la inoculación.* Examínense los monoestratos en los tubos de fondo plano con un microscopio invertido (objetivo de x5, ocular x8). Selecciónense monoestratos confluentes con células sanas (de tamaño mediano, que no muestren signos de degeneración o hacinamiento). Colóquense de nuevo los tubos en la incubadora hasta que se necesiten para la inoculación.

*Inoculación de especímenes.* Antes de la inoculación, agítese la muestra en una mezcladora durante 10-20 segundos. Extráigase el medio de los tubos de cultivo tisular.

Empleando una pipeta de Pasteur esterilizada, transfírase la muestra a un tubo que contenga 2 ml de medio de aislamiento. Mézclese bien e inocúlese una cantidad igual a cada uno de dos tubos de

cultivo tisular. La cantidad de inóculo puede ser de 0.1 a 1.0 ml por tubo—tal vez sea preferible la cantidad menor de inóculo para aumentar la eficacia de la centrifugación.

*Centrifugación e incubación.* Centrifúguese a 2,500 g durante 60 minutos. Si se dispone de una centrifugadora de alta velocidad con control de la temperatura, centrifúguese a 15,000 g durante una hora a 35°C para aumentar la infecciosidad. Para este propósito deben emplearse tubos de plástico apropiados. Los tubos de vidrio no ofrecen seguridad.

Incúbense los tubos a 35°C durante 2 horas. Cámbiese el medio en los tubos inoculados, añadiendo 2 ml de medio de aislamiento fresco a cada tubo y luego incúbense de nuevo por espacio de 60 a 70 horas.

*Tinción de Giemsa.* Se tiñe con Giemsa durante 1 hora el cubreobjetos de un tubo recogido unas 60 horas después de la inoculación (véase página 8). La tinción con una solución de Giemsa al 10% a la temperatura de 35°C puede mejorar la penetración del colorante.

Examínese el cubreobjetos para determinar la presencia de cuerpos de inclusión clamidiales con iluminación en campo oscuro o campo claro a un aumento de 200x. Cuéntese el número de inclusiones si es necesario. También puede utilizarse yodo o AF para teñir inclusiones (véase lámina 3).

Si el primer tubo resulta negativo, tíñase el segundo con Giemsa y examínese para la presencia de cuerpos de inclusión.

*Pase.* Si el primer tubo resulta positivo, tíñase el segundo para el pase, añadiendo 4 ó 5 cuentas de vidrio por tubo. Agítelo con una mezcladora y luego proceda de la misma manera que para la inoculación de muestras (véanse los párrafos anteriores).

*Almacenamiento de aislados.* Prepárese material para pases y mézclense las suspensiones. Hágase el cultivo en agar sangre. Añádase una cantidad igual de 4FS a la mezcla. Agréguese una gota de yema de huevo fresco embrionado no infectado por cada mililitro de la suspensión. Distribúyase 0.5-1 ml en pequeñas ampolletas. Almacénense a -60°C o en nitrógeno líquido.

### **Aislamiento de *Chlamydia* en células de McCoy tratadas con IUDR**

El tratamiento de IUDR (5-yodo-2-deosiuridina) puede emplearse como sustituto de la irradiación de células de McCoy para obtener resultados similares en el aislamiento.

Se preparan en la forma descrita en las páginas 22-28 monostratos de células de McCoy de un día en frascos cubreobjetos. Se añade un

medio que contenga 10-25 ug de IUDR por ml, y los cultivos se incuban durante tres días. Se retira el medio y se inocula el cultivo celular con 0.1 ml de inóculo por frasco. Hay otros procedimientos de centrifugación y tinción similares a los antes descritos.

### Aislamiento de *Chlamydia* en células HeLa 229 tratadas con dextrana DEAE

Este método se basa en la selección de una estirpe celular sensible (HeLa 229) y en la intensificación de la infecciosidad mediante una combinación de tratamiento previo de capas monocelulares con dextrana dietilaminoétilica (DEAE) antes de la inoculación y la centrifugación después de la inoculación. Las células no se someten a irradiación.

#### *Reactivos, medios y frascos de cultivo celular*

- a) Solución salina de Hanks equilibrada (SSE de Hanks).
- b) Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) con suero de ternero fetal al 10%.
- c) Medio de sacarosa-fosfato-glutamato (SFG) para almacenar y mantener los especímenes y los inóculos:

Sacarosa	75 g
Fósforo de hidrógeno potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.52 g
Fósforo de hidrógeno sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.22 g
Acido glutámico	0.72 g
Agua	hasta 1 litro

Ajústese a un pH de 7.4-7.6.

d) Dextrana DEAE (Peso molecular  $2 \times 10^6$ ): se prepara una solución madre al 1% en agua destilada y esterilizada mediante la autoclave o por filtración. Se prepara una solución de trabajo (30 ug/ml) en SSE de Hanks.

e) Antibióticos: estreptomicina, vancomicina (o ristocetina) y micostatina.

f) Tinción de May-Grünwald-Giemsa o tinción de Giemsa.

g) Frascos de cultivo celular: frascos de vidrio de fondo plano, desechables, de 15 mm de diámetro exterior, 45 mm de altura, con un cubreobjetos de 12 mm de diámetro y con un tapón insertado, no tóxico.

### *Cultivo celular*

Las células HeLa 229 se mantienen en MEM con suero de ternero fetal al 10% sin antibióticos en un frasco de cultivo tisular. Los cultivos celulares se separan dos veces por semana.

### *Procedimiento de aislamiento*

1. Se coloca en un frasco de cultivo un mililitro de MEM de Eagle que contenga  $2 \times 10^5$  de células HeLa 229, y luego se incuba durante 24 horas para obtener una capa monocelular confluyente.
2. Antes de inocular el espécimen, se extrae el medio y se aclara dos veces la capa monocelular con 1 ml de SSE de Hanks que contenga 30 ug/ml de dextrana DEAE. Para extraer el líquido cuando se manipula un gran número de frascos se emplea un dispositivo de succión.
3. A continuación, se inocula 0.1 ml del espécimen en cada uno de 4 frascos.
4. Los frascos se centrifugan a 900 g durante 60 minutos a la temperatura de 20°C.
5. Después de la centrifugación, se retira el inóculo. Se añade 1 ml de medio que contenga estreptomycin (100 ug/ml), vancomicina (100 ug/ml) y micostatina (25 UI/ml).
6. Los frascos se incuban a 35°C.
7. Después de una incubación de 60 a 70 horas, uno de los frascos inoculados se utiliza para detectar inclusiones con tinción de Giemsa o mediante la técnica directa de anticuerpos fluorescentes. El cubreobjetos teñido se explora con una lente de bajo aumento (x 100). Las inclusiones se confirman mediante el examen con lente de gran aumento (x 400).
8. Las capas monocelulares de los 3 frascos restantes se recogen en una pequeña cantidad de SFG (suficiente para inocular 4 frascos, v.g., 0.6 ml) raspándolas con una pipeta de Pasteur y se procede a un pase repitiendo el procedimiento antes descrito.
9. Si no se detectan inclusiones en dos pases, se termina el cultivo celular. Si solo se tiñe un cubreobjetos, se detectan alrededor de 60-70% de los positivos en el primer pase. Las posibilidades de detectar inclusiones en el primer pase pueden aumentarse mediante la tinción de 2 cubreobjetos.



## SELECCIÓN del método de aislamiento

Los métodos de cultivo celular pueden ofrecer considerables ventajas en cuanto a rapidez y mayor sensibilidad.

La técnica de células de McCoy irradiadas se desarrolló antes y se ha venido utilizando ampliamente. El tratamiento con IURD de las células de McCoy, recién introducido, no requiere instalaciones para la irradiación y es más rápido. El empleo de células HeLa 229 tratadas con dextrana DEAE ofrece una opción satisfactoria y posee ventajas para la producción de antígenos clamidiales para la serología. Además, las células HeLa 229 pueden tener una utilidad más general en los laboratorios de diagnóstico que las células de McCoy.

El método del saco vitelino para el aislamiento tiene la ventaja de su simplicidad y, cuando está garantizado un suministro de huevos exentos de antibióticos, es el método más práctico en ciertas zonas en que el tracoma es endémico.

## REFERENCIAS SELECCIONADAS

Darougar, S. *et al.* Simplified irradiated McCoy cell culture for isolation of Chlamydiae. En: *Trachoma and Related Disorders*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1971, págs. 68-70.

Hanna, L. *et al.* Psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group. En: Lennette, E. H. *et al.* (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 2ª ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974, págs. 795-804.

Kuo, C. C. *et al.* Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J Infect Dis* 125:665-668, 1972.

Wentworth, B. B. y E. R. Alexander. Isolation of *Chlamydia trachomatis* by use of 5-iodo-deoxyuridine-treated cells. *Appl Microbiol* 27:912-916, 1974.

## SEROTIPIFICACION DEL AGENTE DEL TRACOMA

### Método de la micro-inmunofluorescencia (micro-IF)

Para la clasificación serológica de organismos *C. trachomatis*—comprendidos los agentes de conjuntivitis de inclusión tracomatosa (Tr-CI) y linfogranuloma venéreo (LGV)—se emplea un método indirecto de anticuerpos fluorescentes. Los antígenos utilizados para la prueba consisten en los organismos propagados en el saco vitelino de embriones de pollo fecundos, y los anticuerpos específicos de estos antígenos se preparan en ratones.

Para el análisis antigénico completo se ensaya cada uno de los aislados que van a clasificarse en una titulación cruzada bilateral completa en comparación con una titulación de su propio antisuero y los antisueros de todos los serotipos conocidos de *C. trachomatis*, los que a su vez se titulan en comparación con sus antisueros homólogos, incluido el antisuero del aislado que se está clasificando.

En la mayoría de los casos, basta con practicar una prueba simplificada unilateral, en la que solo se emplea antisuero de ratón preparado contra el aislado no tipificado y antígenos patrón específicos de tipo. Esta prueba evita la necesidad de elaborar antígeno de saco vitelino para la preparación de antisuero para cada aislado.

Además de la serotipificación de aislados de *C. trachomatis* desconocidos, se pueden medir anticuerpos específicos de tipo en sueros humanos y en lágrimas, utilizando la prueba de micro-IF (véase página 37).

### Antígenos

Los antígenos para uso en la prueba se preparan con sacos vitelinos muy infectados, de preferencia recogidos antes de la muerte del embrión. Se elige un solo saco vitelino que posea abundantes cuerpos elementales. Se muele totalmente en un mortero y se prepara una suspensión de saco vitelino crudo al 2-3% en solución salina amorti-

guada de fosfato de 0.01 ml/litro pH de 7.0. Mediante una centrifugación ligera (500 g durante 10 minutos) se eliminan los restos y la grasa, y la suspensión se distribuye en partes alícuotas de 0.2 ml y se mantiene congelada a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

### **Antisueros**

El tipo inmunológico de un aislado se determina mediante el ensayo del antisuero de ratones inmunizados con ese aislado. Se inmunizan ratones adultos, de 4 ó 5 semanas, mediante la inyección intravenosa de 0.5 ml de una suspensión al 1% de saco vitelino sumamente infectado o una suspensión de material de cultivo celular infectado (véase método de cultivo de células HeLa 229, página 29). Transcurridos siete días se administra una inyección de refuerzo, y tres días después se desangra a los ratones. Se ha observado que el antisuero obtenido a los cuatro días de la administración de una sola inyección intravenosa muestra un título de anticuerpos satisfactorio para la inmunotipificación si se emplea una masa antigénica suficiente para la inmunización. La inyección intravenosa de una suspensión de células de McCoy irradiadas infectadas puede causar la muerte aguda del ratón. Los antisueros preparados mediante la inmunización con organismos proliferados en saco vitelino se absorben con un volumen igual de suspensión normal de saco vitelino al 40% antes del ensayo. La mezcla se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora, se refrigera a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche y se mantiene congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , salvo que se ensaye inmediatamente.

### **Conjugado AF**

Se utiliza globulina de cabra anti-ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína y, como contratinción, albúmina bovina conjugada con rodamina. Se determinan las diluciones apropiadas de estos productos (generalmente se emplean las de 1:80 a 1:160 de conjugado con fluoresceína, y se añade albúmina bovina conjugada con rodamina sin diluir, a razón de 1 parte:15 partes de conjugado). Para preparar una solución de trabajo de conjugados se mezclan las diluciones de ambos conjugados, se distribuyen en pequeñas cantidades y se mantienen a la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Procedimiento de ensayo

Para colocar los antígenos en las láminas del microscopio se utilizan plumas de inmersión. Debajo de una lámina limpia, se coloca una especie de patrón previamente marcado para que sirva de guía a la colocación del antígeno. Las láminas limpias son indispensables para practicar eficazmente la prueba. En el patrón hay un área central, de unos 22 x 16 mm, con nueve puntos dispuestos en 3 x 3. Los antígenos de ensayo que han estado almacenados a la temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  se descongelan y se agitan con una mezcladora de remolino para garantizar una suspensión homogénea. El primer antígeno se coloca con una pluma sobre cada uno de los 9 puntos, antes de retirar la lámina del patrón. Estos puntos están representados por el punto "A" en cada una de las nueve posiciones mostradas en la fig. 16. Luego se colocan otros puntos de antígeno de diferentes inmunitipos en orden de sucesión, en hileras paralelas separadas por una distancia aproximada de 1 mm, utilizando como guía los primeros puntos de antígeno (puntos B, C, D, E, etc., en cada una de las nueve posiciones que muestra la fig. 16). Si es necesario, pueden colocarse hasta 16 puntos distintos de antígeno dispuestos en 4 x 4 para cada grupo. Para cada antígeno se empleará una pluma limpia. De esta manera, se forman nueve grupos de puntos de antígeno en una lámina, cada uno de los cuales tiene el mismo orden de sucesión de los antígenos.

Después de cierta práctica, pueden prepararse numerosas láminas con relativa facilidad. Las láminas se secan al aire durante 30 minutos como mínimo (es importante que todos los puntos de antígeno estén totalmente secos) y fijados en acetona durante 10-15 minutos a la temperatura ambiente.

Se preparan diluciones dobles (utilizando 0.1 ml) y se aplican a las láminas con un asa bacteriológica. El contenido de un asa de la dilución más elevada de suero se extiende sobre el grupo de antígenos en la posición inferior derecha en la lámina (posición No. 9). El asa se seca con una toalla de papel absorbente, y la dilución menos elevada que sigue se extiende sobre el grupo (No. 8) a la izquierda del No. 9. Continúa la aplicación en serie a las posiciones numeradas inferiores, No. 7 a la izquierda del No. 8, No. 6 encima del No. 7, No. 5 a la derecha del No. 6, No. 4 a la derecha del No. 5, No. 3 encima del No. 4, y así sucesivamente. Las láminas se colocan en una cámara de humedad y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después de la incubación, se enjuagan suavemente con solución amortiguada de fosfato para quitar el suero y se lavan durante 10 minutos cambiando dos veces la solución

amortiguada de fosfato en un vaso de lavado con un agitador magnético. Después se secan al aire, dejándolas apoyadas sobre uno de los extremos, a la temperatura ambiente. Con un asa bacteriológica se aplica a las láminas el conjugado de trabajo. Se incuban a 37°C durante 30 minutos y se repite en la forma descrita el proceso de enjuague, lavado y secado al aire. Sobre la lámina se prepara un cubreobjetos con líquido de preparación AF. Por lo común, las láminas se interpretan inmediatamente, pero también pueden conservarse en el refrigerador durante unos cuantos días sin que pierdan la fluorescencia.

Las láminas se examinan con un microscopio de fluorescencia. Es indispensable utilizar filtros apropiados. En las publicaciones pertinentes figuran los detalles a este respecto.

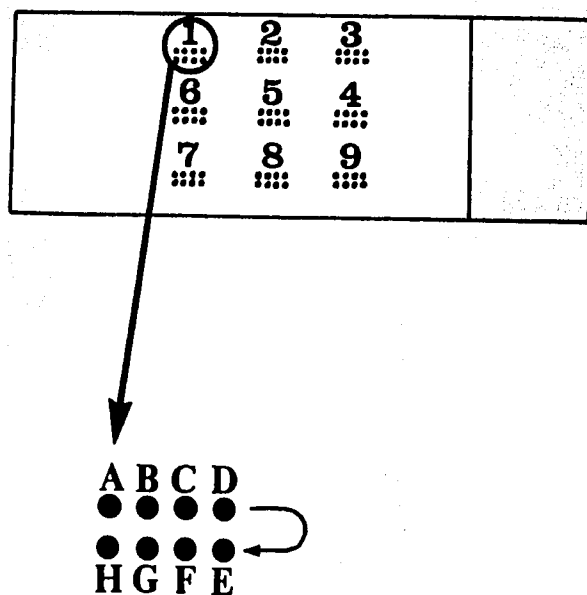


Fig. 16. Prueba de la micro-IF: ejemplo de la colocación de 8 antígenos por agrupamiento (tamaño real). La ampliación mostrada en la parte inferior indica el orden de sucesión de los antígenos en el agrupamiento.

La dilución sérica más elevada resultante en una fluorescencia bien definida de los cuerpos elementales se considera el título del suero de ese antígeno determinado. Solo se considera positiva la fluorescencia de los cuerpos elementales descritos distribuidos equitativamente.

En la actualidad son 14 los serotipos identificados: 11 Tr-CI (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I y K) y 3 LGV (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>).

Los serotipos A, B, Ba y C han sido hasta la fecha los relacionados normalmente con el tracoma en zonas endémicas. En el Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigaciones sobre el Tracoma y Otras Infecciones Clamidiales, San Francisco, pueden obtenerse cepas prototipo de cada uno de los tipos.

#### REFERENCIAS SELECCIONADAS

Wang, S. P. *et al.* A simplified method of immunological typing of trachoma-inclusion conjunctivitis-lymphogranuloma venereum organisms. *Infect Immun* 7:356-360, 1973.

---

## MÉTODOS SEROLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL TRACOMA

### Fijación del complemento

El método de fijación del complemento (FC) mide los anticuerpos específicos de grupo y no es específico respecto a la infección por el agente Tr-CI. Para el diagnóstico de estas infecciones resulta insensible. Aunque puede ocurrir que sea la única prueba disponible en ciertos laboratorios, no se recomienda su empleo.

La técnica puede ser útil para demostrar la presencia de antígenos de grupos clamidiales en material de saco vitelino para confirmar el aislamiento.

### Prueba de la micro-inmunofluorescencia (micro-IF)

Este método, recientemente descrito, es mucho más sensible que la prueba FC y mide los anticuerpos anticlamidiales específicos de tipo.

Se colocan diluciones seriadas dobles o cuádruples de suero o lágrimas en las microplacas de antígenos de serotipo *C. trachomatis*, como en la prueba de tipificación por micro-inmunofluorescencia. En lugar de la globulina de cabra anti-ratón empleada en la prueba de tipificación por micro-IF se emplea inmunoglobulina de cabra antihumana, marcada con isotiocianato de fluoresceína. Las láminas se elaboran de manera similar a la descrita para la prueba de tipificación salvo que la contracoloración se añade inmediatamente antes de su uso. Deben incluirse testigos de sueros positivos y negativos. Un título de 1:8 o mayor se considera positivo respecto a los anticuerpos séricos. Se calcula que los productos sin diluir de la levigación de tiras con material lacrimal es de una dilución de 1:12 de lágrimas. Una reacción positiva de esos productos de levigación sin diluir se considera significativa. Como en cualquier prueba serológica, un solo suero positivo no indica el momento en que se contrajo la infección.

La especificidad de tipo de las reacciones de lágrimas o sueros puede mejorarse mediante la absorción con una variedad apropiada de antígenos.

#### REFERENCIAS SELECCIONADAS

McComb, D. E. y R. L. Nichols. Antibody type specificity to trachoma in eye secretions of Saudi Arab children. *Infect Immun* 2:65-68, 1970.

Wang, S. P. y J. T. Grayston. Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. *J Infect Dis* 130:388-397, 1974.



## LISTA DE PARTICIPANTES

- Dr. S. Darougar, Conferenciante Principal en Virología Clínica, Laboratorio del Virus, Departamento de Oftalmología Clínica, Instituto de Oftalmología, Universidad de Londres, Londres, Inglaterra.
- Dr. C. R. Dawson, Co-Director, Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigaciones sobre el Tracoma y Otras Infecciones Clamidiales, Fundación Francis I. Proctor de Investigación en Oftalmología, Universidad de California en San Francisco, San Francisco, California, E.U.A.
- Sr. R. Dwyer, Conferenciante en Inmunología, Laboratorio del Virus, Departamento de Oftalmología Clínica, Instituto de Oftalmología, Universidad de Londres, Londres, Inglaterra.
- Dr. J. T. Grayston, Vicepresidente de Asuntos de Salud, Centro de Ciencias de Salud, Universidad de Washington, Seattle, Washington, E.U.A.
- \*Dr. A. T. Hanna, Facultad de Medicina, Universidad de Alejandría, Alejandría, Egipto.
- Srta. Lavelle Hanna, Especialista, Departamento de Microbiología, Universidad de California en San Francisco, San Francisco, California, E.U.A.
- Dr. N. Higashi, Presidente, Departamento de Biofísica, Instituto de Investigación de Virus, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón.
- Profesor B. R. Jones, Director, Departamento de Oftalmología Clínica, Instituto de Oftalmología, Universidad de Londres, Londres, Inglaterra.
- Dr. M. M. Khin, Jefe, División de Investigación en Virología, Departamento de Investigación Médica, Rangún, Birmania.
- Dr. A. B. MacDonald, Profesor Auxiliar, Departamento de Microbiología, Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, Massachusetts, E.U.A.
- Dr. I. F. Maichouk, Asesor Regional en Enfermedades Transmisibles de los Ojos, Oficina Regional de la OMS para el Mediterráneo Oriental, Alejandría, Egipto.
- Srta. Dorothy McComb, Departamento de Microbiología, Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, Massachusetts, E.U.A.
- Dr. F. Modabber, Profesor Asociado, Departamento de Epidemiología y Patología, Escuela de Salud Pública, Universidad de Teherán, Teherán, Irán.

---

\*Fallecido el 28 de julio de 1974.

- Dr. S. Mohadjer, Profesor Asociado, Departamento de Epidemiología y Patología, Escuela de Salud Pública, Universidad de Teherán, Teherán, Irán.
- Dr. C. H. Mordhorst, Jefe, Departamento de Ornitosis, Instituto del Suero, Copenhagen, Dinamarca.
- Dr. A. S. Mourad, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alejandría, Alejandría, Egipto.
- Dr. S. Nejmi, Laboratorio de Bacteriología, Virología e Inmunología, Hospital-Escuela Militar Mohammed V, Rabat, Marruecos.
- Dr. J. Schachter, Co-Director, Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigaciones sobre el Tracoma y Otras Enfermedades Clamidiales, Fundación George Williams Hooper, Universidad de California en San Francisco, San Francisco, California, E.U.A.
- Dr. Z. H. Sherif, Microbiólogo, Instituto Conmemorativo de Investigación Oftálmica, Giza, Cairo, Egipto.
- Dr. M. L. Tarizzo, Oficial Médico, Enfermedades Viricas, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Sr. J. Treharne, Conferenciante en Virología, Laboratorio del Virus, Departamento de Oftalmología Clínica, Instituto de Oftalmología, Universidad de Londres, Londres, Inglaterra.
- Dr. San-Pin Wang, Profesor, Departamento de Patología, Escuela de Salud Pública y Medicina Comunitaria, Universidad de Washington, Seattle, Washington, E.U.A.
-