



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## Revisión

### Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas

Mario Rodríguez-Domínguez<sup>a</sup>, Sara Sanbonmatsu<sup>b</sup>, Jesús Salinas<sup>c</sup>, Roberto Alonso<sup>d</sup>, José Gutiérrez<sup>b,e</sup> y Juan Carlos Galán<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

<sup>b</sup> Área de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

<sup>c</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, Murcia, España

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>e</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España

<sup>f</sup> Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana (RYC-CSIC), Madrid, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 25 de enero de 2013

Aceptado el 31 de enero de 2013

On-line el 22 de marzo de 2013

### Palabras clave:

Diagnóstico de *Chlamydiae*

Tipificación de *Chlamydiae*

Genomas completos

## RESUMEN

Hasta fechas muy recientes eran muy pocos los genomas de *Chlamydia trachomatis* disponibles, a pesar de su importancia en salud pública. Actualmente se están secuenciando 66 genomas completos de *C. trachomatis*. Esta revolución genómica está permitiendo comprender su biología, mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico o desarrollar herramientas epidemiológicas no solo de *C. trachomatis* sino también de especies relacionadas, como *C. pneumoniae* o *C. psittaci*. El diagnóstico basado en cultivo celular, serología o microinmunofluorescencia está siendo progresivamente sustituido por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, al superarse los inconvenientes de escaso rendimiento o reacciones cruzadas y mejorar la estandarización entre laboratorios. Por otra parte, el desarrollo de técnicas de tipificación (MLST y VNTR) aplicadas a *Chlamydiae* ha aumentado el conocimiento de la epidemiología local y global aportando información sobre cómo esas bacterias evolucionan, causan brotes o adquieren mecanismos de resistencia. Esta revisión se centra en los grandes avances alcanzados en el conocimiento de las diferentes especies de *Chlamydia*, en parte debido a la innovación tecnológica aplicada a la genómica como una aproximación para explicar la revolución que, tanto en el diagnóstico como en su epidemiología, se ha observado en este grupo de bacterias en los últimos años.

© 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Microbiological diagnosis of infections due to *Chlamydia* spp. and related species

## ABSTRACT

### Keywords:

*Chlamydia* diagnosis

*Chlamydia* typing

Completed genome

Until recently the number of completed genomes belonging to *Chlamydia trachomatis* was very low, despite its importance in Public Health. Now, there are currently sixty-six completed genomes of *C. trachomatis* sequenced in different parts of the world. This genomic revolution has helped in understanding its biology, as well as improved the sensitivity and specificity in the diagnosis, and the development of epidemiological tools, not only for *C. trachomatis*, but also for related species such as *C. pneumoniae* and *C. psittaci*. The diagnosis based on cell culture, serology and microimmunofluorescence is gradually being replaced by molecular techniques based on PCR or real-time PCR. This is because these molecular tests do not have cross-reactions problems and the procedures are easily standardised between laboratories. Moreover, molecular epidemiology tools described recently, such as Multi-Locus Sequence Typing (MLST) and Variable Number Tandem Repeat (VNTR), have increased our knowledge on local and global epidemiology. This article focuses on the impact of the genomics advances achieved over the last few years as applied to the diagnosis, epidemiology and biology of the family *Chlamydiaceae* family and related species.

© 2013 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: [jgalanm.hrc@salud.madrid.org](mailto:jgalanm.hrc@salud.madrid.org), [jgalanmontemayor@gmail.com](mailto:jgalanmontemayor@gmail.com) (J.C. Galán).

## Introducción

Las especies patógenas para el hombre de la familia *Chlamydiaceae*, *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, aunque presentan una pared celular típica de gramnegativos, pertenecen a una división bacteriana muy divergente del resto del árbol evolutivo de las eubacterias. Constituyen, junto con los micoplasmas, las especies bacterianas con los genomas más pequeños, entre 1,04 y 1,23 Mb (25% del genoma de *Escherichia coli*), posiblemente debido a que son bacterias intracelulares obligadas desde hace mucho tiempo, lo que les ha permitido perder genes considerados esenciales (como *FtsZ*) o ciertas rutas metabólicas (como la biosíntesis de aminoácidos o de la fermentación anaeróbica)<sup>1</sup>.

Pese a las grandes cifras mundiales de infecciones humanas por clamidias, las pruebas microbiológicas necesarias para la precisa detección e identificación de estas bacterias en muestras humanas han sido tradicionalmente difíciles, tediosas y requerían personal altamente preparado. Sin embargo, las alarmas de salud pública internacional ocurridas en 2003 como consecuencia de un brote de linfogranuloma venéreo (LGV) inicialmente descrito en Holanda<sup>2</sup> pero rápidamente extendido a otros países europeos, Estados Unidos y Australia<sup>3</sup>, o la identificación y rápida diseminación en Suecia de una nueva variante de *C. trachomatis* en 2006 que no era detectada por los sistemas comerciales más ampliamente empleados<sup>4</sup>, generaron la necesidad de disponer de sistemas de diagnóstico y genotipificación rápidos y precisos, ya que las dificultades para la detección en el laboratorio podrían estar ligadas a un retraso en el diagnóstico y, consecuentemente, a la diseminación de nuevas infecciones<sup>5</sup>.

La disponibilidad de técnicas de secuenciación masiva que permiten descifrar genomas bacterianos completos ha supuesto una verdadera revolución en la taxonomía bacteriana, especialmente entre las bacterias de difícil manejo en el laboratorio, como las clamidias<sup>6</sup>. Hoy en día disponemos de secuencias de genomas completos de *C. trachomatis*<sup>7</sup>, *C. pneumoniae*<sup>8</sup> o *C. psittaci*<sup>9</sup> y especies relacionadas<sup>10</sup>. Si bien es cierto que la existencia de especies relacionadas con *Chlamydia* es conocida desde hace tiempo<sup>11</sup>, los análisis bioinformáticos de secuencias completas de especies del orden *Chlamydiales* han permitido inferir una biodiversidad mayor de la esperada. Gracias a la enorme capacidad actual de secuenciación, en los últimos años este grupo de especies relacionadas con clamidias ha aumentado significativamente, identificándose hasta 7 familias pertenecientes al orden *Chlamydiales*: *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaeae* y *Waddliaceae*. Algunas de estas familias engloban especies patógenas para el hombre, como *Parachlamydia acanthamoebiae*, *Simkania negevensis* o *Rhabdochlamydia spp.*<sup>12</sup>, y el número de nuevas especies descritas sigue creciendo. Los análisis bioinformáticos sorprendentemente también han servido para rebatir el paradigma de la escasa tasa de recombinación en este grupo de bacterias, sospechado por lo particular de su ciclo biológico, que sugería escasas oportunidades de intercambio genético<sup>13</sup>. La existencia de recombinación tiene su relevancia clínica en la descripción de la cepa hipervirulenta de LGV, L2c, relacionada con el brote de LGV<sup>14</sup>, resultado de la recombinación entre serovares L2b y D de *C. trachomatis*.

Los serovares de *C. trachomatis* están tradicionalmente asociados a la seroespecificidad de la principal proteína de membrana externa, MOMP. Sin embargo, hoy en día no existe relación entre la secuencia del gen *ompA* (que codifica para MOMP) y el tropismo celular o la virulencia<sup>15</sup>, por lo que la genotipificación basada en el gen *ompA* como biomarcador no es válida, aunque ha sido ampliamente usada. Varios marcadores genéticos (*pmpH*, *inc*, *tarp*, *T3SS*...) han sido identificados como biomarcadores útiles en el estudio de los mecanismos biológicos implicados en la infección y el tropismo<sup>16</sup>. Los intentos para caracterizar y establecer

relaciones entre los aislados de LGV en diferentes partes del mundo relanzó el desarrollo de herramientas de epidemiología molecular, ya descritas en otras especies bacterianas pero poco exploradas en *Chlamydia*. En 2007 se diseñaron las primeras propuestas de *multilocus sequence typing* (MLST) para la caracterización epidemiológica de especies de *Chlamydia*<sup>17</sup>, y un año más tarde se describió el sistema *variable number of tandem repeats* (VNTR). Posteriormente, en parte debido a la baja variabilidad observada y en parte a la accesibilidad a los sistemas de secuenciación masiva, se inició la secuenciación de genomas completos<sup>7</sup>.

Todos estos cambios son suficientes para realizar una actualización de esta familia bacteriana, donde *C. trachomatis* es responsable de más de 100 millones de infecciones de transmisión sexual y de 90 millones de casos de tracoma en el mundo<sup>18,19</sup>. Por su parte, *C. pneumoniae* podría ser responsable de un número importante de neumonías asociadas a la comunidad<sup>20</sup> y de otras patologías crónicas, como aterosclerosis, miocarditis o cáncer de pulmón. Finalmente, aunque la incidencia de las infecciones por *C. psittaci* en la población humana es muy escasa, probablemente infravalorada por la dificultad en el diagnóstico, brotes de psitacosis son descritos todos los años en Europa<sup>21</sup>.

## Estudios genómicos: implicaciones evolutivas y taxonómicas

Nuestra percepción de la diversidad de las clamidias cambió sustancialmente cuando en 1997 se describieron nuevas especies *Chlamydia-like*, llamadas clamidias ambientales<sup>22</sup>. El descubrimiento de especies de clamidias que no son patógenos primarios para el hombre abrió nuevas posibilidades para investigar la evolución y adaptación de este particular grupo de bacterias. De hecho, la diversidad ahora conocida es solamente la punta del iceberg, pues entre las 7 familias conocidas, algunas de ellas están constituidas por un solo representante<sup>23</sup>. Este orden *Chlamydiales* se separó hace ~2000 millones de años desde un ancestro común con las especies de vida libre *Verrucomicrobia* y *Lentisphaera*<sup>24</sup> y hace ~700 millones de años se diferenció la familia *Chlamydiaceae* de las otras familias del mismo orden<sup>25</sup>, que se comportan como simbiontes de amebas de vida libre y con quienes comparte casi la mitad de su genoma (560 genes son comunes en todas las especies del orden). De hecho, especies de la familia *Chlamydiaceae* como *C. pneumoniae* también sobreviven y se multiplican dentro de amebas, sugiriendo que especies de *Acanthamoeba* han podido servir como el principal reservorio y vehículo de dispersión de las clamidias<sup>25</sup>.

La clasificación taxonómica de la familia *Chlamydiaceae* ha sido muy discutida en los últimos años. En 1999, estudios basados en el análisis de las subunidades 16S y 23S del ADNr establecieron los géneros *Chlamydia* (como *Chlamydia trachomatis*) y *Chlamydophila* (como *Chlamydophila pneumoniae* o *Chlamydophila psittaci*)<sup>26</sup>. Esta nueva nomenclatura no ha sido ampliamente aceptada, pues se considera que puede llevar a confusiones. El *International Committee on Systematics of Prokaryotes* ha recomendado la fusión de los 2 géneros en uno, *Chlamydia*<sup>27</sup>. La edición de 2011 del Manual Bergey se hace eco de esta recomendación<sup>1</sup>, pero el debate permanece abierto<sup>28</sup>.

El tamaño del genoma de las especies de *Chlamydia* (que oscila entre 1,042 Mb en *C. trachomatis* a 1,230 en *C. pneumoniae*) es 2-3 veces más reducido que el de otras especies de familias pertenecientes al mismo orden (que oscila entre 2,116 Mb en *Waddlia chondrophila* y 3,072 Mb en *P. acanthamoebiae*)<sup>10</sup>, sugiriendo que el proceso de adaptación desde formas de vida libre hacia patógenos humanos ha supuesto también una reducción genómica. Un buen ejemplo se obtiene de la comparación del genoma de *C. pneumoniae* aislada de koalas australianos con aislados de origen humano, que permite inferir que *C. pneumoniae* de origen humano

**Tabla 1**

Relación de los factores de virulencia más comunes descritos en *Chlamydiae*

Especies	<i>ompA</i>	<i>pmp</i>	<i>trp</i>	<i>inc</i>	<i>tarP</i>
<i>C. trachomatis</i>	18	9	+ <sup>a</sup>	7	+
<i>C. pneumoniae</i>	1	21	-	7	+
<i>C. psittaci</i>	9	21	-	3	+

*ompA* (el gen que codifica para la proteína principal de membrana externa, MOMP); *pmp* (proteínas polimórficas de membrana externa); *trp* (ruta biosintética del triptófano); *inc* (inclusión), y *tarP* (fosfoproteína de reclutamiento de actina) son proteínas efectoras del sistemas de secreción tipo III.

<sup>a</sup> La ruta biosintética del triptófano está ausente en los serovares relacionados con tracoma. Puede observarse la mayor similitud en factores de virulencia entre *C. pneumoniae* y *C. psittaci* que ha vuelto a abrir nuevamente el debate de la reclasificación de clamidias en 2 géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*<sup>28</sup>. Los números indican el número de serovares o genes que existen en esa especie bacteriana.

es una zoonosis donde la cepa se adaptó a través de un proceso de pérdida de material genético<sup>29</sup>. El primer paso evolutivo desde formas de vida libre hacia formas patógenas eucariotas fue la adquisición de un sistema de secreción tipo III (solo presente en proteobacterias), sistema esencial para la infección de la célula eucariota. Progresivamente los miembros de la familia *Chlamydaceae* fueron adquiriendo otros factores de virulencia relacionados con la adherencia e invasión celular, aunque todavía no podemos definir con certeza todos los factores de virulencia que han influido en los diferentes tropismos bacterianos (tabla 1). A medida que alcancemos un mayor grado de conocimiento sobre la prevalencia de determinados factores de virulencia que determinen el tropismo celular, podremos definir con mayor precisión técnicas moleculares que permitan genotipar las diferentes variantes o biotipos de una especie<sup>15</sup>.

Así, los estudios de genómica comparada de *C. trachomatis* han permitido inferir que solo los genes *pmpH*, *pmpF*, *incD* e *incE* agrupan las cepas en función de su tropismo: ocular, genital no-invasivo o genital invasivo<sup>30</sup>. Estos genes podrían emplearse para la genotipificación del LGV, si bien el gen más comúnmente utilizado hoy en día es *pmpH*. Similares aproximaciones se han iniciado en *C. pneumoniae*<sup>31</sup>. Esto es, a nuestro parecer, lo que progresivamente puede ir marcando el diagnóstico de clamidias en el futuro. Es decir, el empleo de técnicas moleculares no solo de cribado, sino también de genotipificación.

### Detección en el laboratorio de las principales especies de *Chlamydia* relacionadas con patología en humanos

Hasta finales del siglo XX, el cultivo celular de *Chlamydia* ha sido el estándar de referencia frente al cual se han comparado todas las demás pruebas. Pero debido principalmente a la aparición de nuevos métodos diagnósticos más fáciles de implementar, rápidos y sensibles, el cultivo celular ha quedado relegado a laboratorios de referencia, con utilidad en estudios epidemiológicos y/o forenses. Progresivamente las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se están convirtiendo en las herramientas de diagnóstico más habituales en los laboratorios de diagnóstico, al superar los inconvenientes del escaso rendimiento en el cultivo, o de las reacciones cruzadas observadas en técnicas de microinmunofluorescencia.

La aseveración anteriormente expuesta podría tener tintes más realistas en *C. trachomatis*, donde la implantación generalizada de las técnicas moleculares para el diagnóstico diferencial

de esta especie, desde 2007, ha aumentado significativamente la tasa de incidencia publicada de las infecciones relacionadas con *C. trachomatis* en Europa y Estados Unidos<sup>32</sup>. En los próximos años podremos valorar si un impacto similar ocurrió en *C. pneumoniae*, si bien recientes publicaciones sobre la incidencia de casos detectados por técnicas moleculares ha sido de 0,1% en un período de 10 años<sup>33</sup>. Para una revisión más extensa de las técnicas diagnósticas de *Chlamydia* recomendamos la lectura del procedimiento número 44 de la SEIMC<sup>34</sup>.

El grado de desarrollo y universalidad de estas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos es distinto según las especies de clamidias (tabla 2). El mayor grado de desarrollo se ha alcanzado en *C. trachomatis*, donde por su elevada sensibilidad y especificidad han desplazado al resto de técnicas, convirtiéndose en el método de referencia actual. De hecho, las recomendaciones diagnósticas del CDC sugieren usar como cribado técnicas moleculares de amplificación<sup>35</sup>. La disponibilidad de métodos moleculares ha incrementado sensiblemente el potencial diagnóstico de estas bacterias en los laboratorios de microbiología. En *C. pneumoniae* las técnicas moleculares son preferentemente empleadas en las fases tempranas, mientras que las pruebas de serología son más útiles en fases más avanzadas o de confirmación. Finalmente, en *C. psittaci* no existen técnicas moleculares disponibles comercialmente y las técnicas serológicas son las pruebas de referencia para el diagnóstico de la psitacosis debido a la escasa prevalencia y agudeza de la enfermedad.

### Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*

La estrategia en *C. trachomatis* para aumentar la sensibilidad se basa en la detección de genes presentes en alto número de copias, como el plásmido críptico (~10 copias/genoma) o algunas técnicas caseras basadas en el ARNr 16S (2 copias/genoma). En Europa, la mayoría de los sistemas comerciales se basan en la detección del plásmido críptico, alcanzando una sensibilidad entre 300-350 copias/ml. El inconveniente de esta aproximación es que el 1% de las cepas carecen del plásmido, por lo que los sistemas que solo detectan esta diana darían resultados falsos negativos en estas cepas. Por otra parte, en 2006 se detectó en Suecia una nueva variante con una delección de 377 pb en la región CDS1 del plásmido empleada como diana diagnóstica<sup>36</sup>. Esta misma delección había sido detectada previamente en 1990 en *C. pneumoniae*<sup>37</sup>. La falta de sensibilidad de los sistemas disponibles dio lugar a la diseminación de esta variante, que llegó a representar el 30% de los casos en Suecia, y un incremento significativo de los casos de *C. trachomatis* en los años posteriores. Esta variante comenzó a diseminarse por los países vecinos, e incluso se detectaron casos en Rusia, Escocia y Francia. Como consecuencia se diseñaron técnicas que empleaban 2 dianas distintas con objeto de detectar esta variante (bien 2 dianas en el mismo plásmido o bien una diana en plásmido críptico y otra en *ompA*), resultando en un descenso de los casos por esta variante desde el 30 al 6% en 2011<sup>38</sup>. En Estados Unidos, las técnicas basadas en la captura e hibridación de los ácidos nucleicos mediante el empleo de sondas específicas constituyen el sistema más distribuido. Tiene una alta sensibilidad al emplear como diana los miles de transcritos de ARNr23S, su sensibilidad es mayor que las técnicas moleculares de primera generación, pero requiere el doble de tiempo<sup>39</sup>. Un inconveniente de las técnicas moleculares

**Tabla 2**

Dianas empleadas para el diagnóstico molecular de las principales especies de *Chlamydia* relacionadas con patología humana

Especies		Dianas
<i>C. trachomatis</i>	Plásmido críptico (1 o 2 dianas)	<i>ompA</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>PstI</i>	<i>ompA</i>
<i>C. psittaci</i>		<i>ompA</i>
		ARNr 16S (2 copias)
		ARNr 16S (1 copia)
		ARNr 16S (1 copia)
		<i>pmpH</i>
		<i>pmp4</i>
		ARNr 23S
		Citoadhesina
		ARNr 16S-23S

disponibles comercialmente es que no han sido aprobadas para su empleo con muestras de origen rectal, si bien múltiples ensayos han sido publicados a raíz del brote de LGV descrito en 2003, demostrando su utilidad.

Los ensayos serológicos para el diagnóstico de *C. trachomatis*, como el enzimoinmunoensayo (EIA) o los que emplean anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (DFA) frente a la proteína MOMP o frente al lipopolisacárido (LPS), o frente a la proteína HSP60, están en claro retroceso en los laboratorios de microbiología, pues aunque son técnicas rápidas o incluso algunas comercializadas como técnicas «point-of-care» (~30 min), tienen baja sensibilidad y especificidad clínica. La detección del LPS da muchos falsos positivos por reacciones cruzadas con el LPS de otras enterobacterias y la proteína MOMP de *C. pneumoniae* puede reaccionar inespecíficamente con la MOMP de *C. trachomatis*. También pueden observarse problemas de reacciones cruzadas con *P. acanthamoebae* cuando se emplean anticuerpos específicos frente a la HSP60, por lo que no deben emplearse en muestras con alta carga bacteriana, como rectales o faríngeas<sup>40</sup>.

#### Diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae*

Las técnicas moleculares para la detección de *C. pneumoniae* usan como diana ADNr16S o el gen *ompA* (una copia en cada caso), adaptándose en los últimos años a técnicas de PCR en tiempo real en formato multiplex (técnicas que simultáneamente detectan otros patógenos respiratorios, fundamentalmente *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*), desplazando a las técnicas de PCR anidada, debido a los problemas de contaminación asociados con esta técnica. Anteriormente se ha descrito la conveniencia de emplear técnicas moleculares para el diagnóstico de infecciones agudas, porque la PCR puede resultar positiva incluso antes de aparecer los síntomas, mientras que los valores serológicos solo empiezan a positizarse a partir de la cuarta semana para la IgM y de las 6-8 semanas para la IgG<sup>41</sup>. Este retraso en la respuesta serológica condiciona que en muchos casos el diagnóstico se realice de forma retrospectiva. Por el contrario, en infecciones crónicas o procesos crónicos relacionados con *C. pneumoniae* la carga bacteriana puede ser baja y la PCR puede resultar negativa, mientras que los valores serológicos se mantienen positivos, como la IgE en pacientes asmáticos<sup>42</sup>. La dificultad para definir la fase clínica de la infección puede dar lugar a resultados a veces contradictorios en la sensibilidad entre PCR y serología. Así, se encuentran en la literatura oscilaciones en la prevalencia de infecciones por *C. pneumoniae* de entre 0-44%, dependiendo del grupo de edad, de la fase de la infección, de la localización geográfica y de la técnica empleada, pero en general los ensayos de PCR rinden tasas más bajas ( $\leq 1\%$ ) de infecciones del tracto respiratorio inferior asociadas a *C. pneumoniae* que los test serológicos<sup>43</sup>. La posible sobreestimación de los casos, basándose en ensayos serológicos, podría estar condicionada por la larga vida media de la IgG de semanas o meses, teniendo en cuenta que la seroprevalencia en población adulta es  $\sim 70\%$ . Así, pacientes mayores o con enfermedad obstructiva crónica pueden tener títulos altos de IgG sin relación con la clínica. Otras explicaciones de la posible sobreestimación son problemas de reacción cruzada entre diferentes especies de *Chlamydia*. Por ello, en caso de infecciones crónicas la estimación de IgA (vida media de 5-7 días) es un buen marcador de infección persistente. Debido a la alta prevalencia de anticuerpos en la población, el diagnóstico serológico de la infección requiere la disponibilidad de sueros pareados. La técnica de referencia es la microinmunofluorescencia (MIF)<sup>44</sup>, capaz de detectar IgM, IgG e IgA. Los criterios usados para identificar una infección por *C. pneumoniae* son: IgM  $\geq 1:16$  o incremento de 4 veces el título de IgG o IgG  $\geq 1:512$ .

Las técnicas de EIA frente al LPS o MOMP son específicas de género o especie, respectivamente, y al igual que en el

caso de *C. trachomatis* son rápidas y fáciles de implementar, pero pueden dar lugar a falsos positivos por problemas de reacciones cruzadas. Estos ensayos deben validarse respecto a la técnica de referencia, la MIF, con una sensibilidad del 58-96% y una especificidad del 95-100%<sup>45</sup>.

#### Diagnóstico de *Chlamydia psittaci*

Las técnicas serológicas constituyen la base del diagnóstico de la psitacosis. Según el CDC, se considera *caso confirmado* si existe un cuadro clínico compatible y se evidencia por fijación del complemento (FC) o MIF la presencia de IgM específicas con un título  $\geq 1/16$  o una seroconversión ( $>4$  veces) en sueros pareados entre la fase aguda y convaleciente, obtenidas con una diferencia entre 2-4 semanas. Será *caso probable* si existe sospecha epidemiológica o se evidencia en suero único un título  $\geq 1/32$ . Las técnicas de EIA son menos sensibles que la FC y la MIF. La MIF, o inmunofluorescencia indirecta (IFI), es probablemente la técnica más sensible y específica. Sin embargo, puede dar reacciones cruzadas con otras especies de *Chlamydia*. Para aumentar la fiabilidad de las técnicas se recomienda que los estudios serológicos se realicen al mismo tiempo y en el mismo laboratorio. Emplea antígenos de superficie de *C. psittaci*. El sistema comercial de *Focus Diagnostics* contiene antígenos para *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Tiene un elevado valor predictivo negativo (98%) y una alta sensibilidad. Otros sistemas detectan independientemente IgA, IgM e IgG para *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. psittaci*.

Se han utilizado distintas aproximaciones basadas en PCR. Los ensayos de *touchdown enzyme time release-PCR* (TETR-PCR) amplifican regiones del 16S y regiones intergénicas ADNr16S-23S<sup>46</sup>. Esta aproximación tiene como característica realizar una PCR de hasta 60 ciclos. También se han descrito métodos de PCR a tiempo real que amplifican el gen *ompA* o *envB*, empleando sondas específicas o SYBR green con distintos tipos de muestras<sup>47,48</sup>. Estas técnicas resultan positivas rápidamente, a partir del tercer día de síntomas, lo que supone una ventaja respecto a la serología. Sin embargo, no están disponibles comercialmente, por lo que se requiere una optimización y validación previa en cada laboratorio.

#### Diagnóstico de infecciones por nuevos géneros del orden *Chlamydiales*

Se han desarrollado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, no comerciales, con fines epidemiológicos y diagnósticos de las infecciones por *P. acanthamoebae*, *S. negevensis* y *W. chondrophila*. De hecho, el hallazgo de las primeras especies relacionadas con *Chlamydia* se describió por la amplificación genérica (pan-clamidia) del ADNr16S y posterior secuenciación en muestras de origen clínico<sup>49</sup>. Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de PCR en tiempo real, también basada en ADNr16S pero específica para miembros de las familias *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaeae* y *Waddlia*<sup>50,51</sup>. También se han desarrollado técnicas de EIA para *S. negevensis*, pero presentan reacción cruzada con *C. pneumoniae*. Asimismo, técnicas de MIF desarrolladas para *C. pneumoniae* se han empleado para *P. acanthamoebae*, con resultado positivo. Estas bacterias se han logrado cultivar en las mismas líneas celulares empleadas para el resto de clamidias.

#### Tipificación molecular en *Chlamydia*

La tipificación molecular es de gran importancia en la caracterización de brotes o nodos de transmisión de *C. trachomatis* en redes sexuales. La aplicación de las técnicas moleculares mejora nuestra comprensión de la inmunopatogénesis de las infecciones por *Chlamydia*<sup>52</sup>. El genoma core, común a todos los miembros de la familia *Chlamydiateae*, llega a ser  $\sim 90\%$  y comúnmente dispuesto

en el mismo orden (sintenia). Esto supone una dificultad añadida al desarrollar sistemas de tipificación. Existen 2 estrategias mayoritariamente aceptadas para la tipificación de cepas de *Chlamydia*. En 2007 se describió el MLST, basado en la secuenciación de 5 regiones genómicas: CT046 (hctB), CT682 (pbpB), CT058, CT144, CT172<sup>53</sup>. En 2008 se describió el sistema VNTR, definido como diferencias en regiones repetidas de un mismo nucleótido o motivo. Las variaciones en el número de repeticiones da lugar a diferente longitud del segmento genómico, lo que permite diferenciar cepas. En esas regiones es fácil sospechar que la ADN-polimerasa sea más propensa a cometer errores. Se eligieron 3 regiones: CT1335, CT1299 y CT1291<sup>54</sup>. El poder discriminativo de esta técnica aumenta al secuenciar también el gen *ompA*, técnica denominada Multilocus-VNTR-*ompA* (MLVA). Por MLVA se ha alcanzado gran poder de discriminación en cepas estudiadas de distintos serotipos de *C. psittaci* y *C. trachomatis* de diferentes orígenes geográficos. Esta estrategia muestra un índice Simpson de diversidad del 0,94, muy próximo al índice de diversidad óptimo recomendado en los sistemas de tipificación<sup>55</sup> y similar al índice de diversidad obtenido con MLST<sup>17</sup>. Existe una segunda propuesta de MLST basada en 7 genes, pero el índice de discriminación no es superior al MLST de 5 genes. Por ello, el subcomité sobre la taxonomía de las clamidias sugirió, en su reunión de 2009, que al menos 5 genes *housekeeping* deberían ser usados y que los criterios de distancia génica deberían ser comparados con análisis filogenéticos, cuando exista un número suficientemente alto de secuencias conocidas. La caracterización de cepas de *C. psittaci* por MLST ha demostrado su utilidad para la clasificación de genotipos de acuerdo con la especie del huésped. Sin embargo, esta estrategia tiene escaso poder de discriminación en cepas de *C. pneumoniae*.

Recientemente se ha publicado un estudio basado en la amplificación de una región variable de *ompA* con un sistema de PCR a tiempo real, seguido de un análisis del amplicón por *high resolution melting* (HRM). El sistema, sencillo y rápido, demostró su eficiencia en la detección y tipificación de *C. psittaci* y *C. trachomatis*<sup>56</sup>.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Este trabajo está incluido dentro de Subprograma de Inmigración y Salud perteneciente al programa DAPET en CIBERESP (Biomedical Research in Network in Epidemiology and Public Health).

## Bibliografía

- Horn M. Phylum XXIV. Chlamydiae Garrity and Holt 2001. En: Krieg NR, editor. *Bergery's Manual of Systematic Bacteriology*, 4, 2nd ed New York: Springer; 2011. p. 843-65.
- Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, van der Meijden WI, Neumann HA. Unusual presentation of early lymphogranuloma venereum in an HIV-1 infected patient: Effective treatment with 1 g azithromycin. *Sex Transm Infect*. 2003;79:453-5.
- Savage EJ, van de Laar MJ, Gallay A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, et al. European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill*. 2009;14, pii: 19428.
- Ripa T, Nilsson PA. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006;11, E061109.
- Bonn D. Lymphogranuloma venereum spread linked to reporting delay. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:265.
- Seth-Smith HM, Thomson NR. Whole-genome sequencing of bacterial sexually transmitted infections: implications for clinicians. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26:90-8.
- Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HM, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet*. 2012;44:413-9.
- Rouli E, Polkinghorne A, Timms P. *Chlamydia pneumoniae*: modern insights into an ancient pathogen. *Trends Microbiol*. 2013;21:120-8.
- Van Lent S, Piet JR, Beeckman D, van der Ende A, van Nieuwerburgh F, Bavoil P, et al. Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains. *J Bacteriol*. 2012;194:6930-1.
- Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, et al. Unity in variety—the pan-genome of the *Chlamydiae*. *Mol Biol Evol*. 2011;28:3253-70.
- Ossenwaarde JM, Maier A. Molecular evidence for the existence of additional members of the order *Chlamydiales*. *Microbiology*. 1999;145:411-7.
- Corsaro D, Greub G. Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:283-97.
- Joseph SJ, Didelot X, Gandhi K, Dean D, Read TD. Interplay of recombination and selection in the genomes of *Chlamydia trachomatis*. *Biol Direct*. 2011;6:28.
- Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, et al. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is recombinant between lymphogranuloma venereum (L2) and D lineages. *MBio*. 2011;2, e00045-11.
- Byrne GI. *Chlamydia trachomatis* strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. *J Infect Dis*. 2010;201 Suppl 2:S126-33.
- Rabasseda X, Morré SA, Ouburg S. Bioinformatic approaches to the study of Chlamydial diseases. *Drugs Today (Barc)*. 2009;45 Suppl B:173-87.
- Ikryannikova LN, Shkarupeta MM, Shitikov EA, Ilina EN, Govorun VM. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59:188-96.
- World Health Organization. Priority eye diseases. 2008 [consultado 7 Mar 2013]. Disponible en: [www.who.int/gho/neglected\\_diseases/trachoma/en/index.html](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/trachoma/en/index.html)
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
- Teh B, Grayson ML, Johnson PD, Charles PG. Doxycycline vs macrolides in combination therapy for treatment of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:E71-3.
- McGuigan CC, McIntryre PG, Templeton K. Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2011 to February 2012. *Euro Surveill*. 2012;17, pii=20186.
- Birtles RJ, Rowbotham TJ, Storey C, Marrie TJ, Raoult D. *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet*. 1997;349:925-6.
- Horn M. *Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:113-31.
- Kameva OK, Liberles DA, Ward NL. Genome-wide influence of indel substitutions on evolution of bacteria of the PVC superphylum, revealed using a novel computational method. *Genome Biol Evol*. 2010;2:870-86.
- Horn M, Collingro A, Schmitz-Esser S, Beier CL, Purkhold U, Fartmann B, et al. Illuminating the evolutionary history of *Chlamydiae*. *Science*. 2004;304:728-30.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaeae* 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*. 1999;49 Pt 2:415-40.
- Greub G. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the *Chlamydiae*: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60 Pt 11:2691-3.
- Voigt A, Schöfl G, Saluz HP. The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS One*. 2012;7:e35097.
- Myers GS, Mathews SA, Eppinger M, Mitchell C, O'Brien KK, White OR, et al. Evidence that human *Chlamydia pneumoniae* was zoonotically acquired. *J Bacteriol*. 2009;191:7225-33.
- Nunes A, Nogueira PJ, Borrego MJ, Gomes JP. *Chlamydia trachomatis* diversity viewed as a tissue-specific coevolutionary arms race. *Genome Biol*. 2008;9:R153.
- Maier CJ, Maier RH, Virok DP, Maass M, Hintner H, Bauer JW, et al. Construction of a highly flexible and comprehensive gene collection representing the ORFeome of the human pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *BMC Genomics*. 2012;13:632.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe, 1990-2009. Stockholm: ECDC; 2011.
- Senn L, Jaton K, Fitting JW, Greub G. Does respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae* still exist? *Clin Infect Dis*. 2011;53:847-8.
- Galán JC, Alonso R, Gutiérrez J, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. En: Cantón R, Cercenado E, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2.ª ed. (44), 2012 [consultado Dic 2012]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap44indice.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory diagnostic testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Atlanta, GA: American Public Health Laboratories, Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
- Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24:62-9.
- Wills JM, Watson G, Lusher M, Mair TS, Wood D, Richmond SJ. Characterization of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. *Vet Microbiol*. 1990;24:11-9.
- Persson K, Hammas B, Janson H, Bjärtling C, Dillner J, Dillner L. Decline of the new Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* after introduction of appropriate testing. *Sex Transm Infect*. 2012;88:451-5.
- Chernesky MA, Jang DE. APTIMA transcription-mediated amplification assays for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:519-25.

40. Baud D, Regan L, Greub G. Comparison of five commercial serological tests for the detection of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29:669-75.
41. Hvidsten D, Halvorsen DS, Berdal BP, Gutteberg TJ. *Chlamydophila pneumoniae* diagnostics: Importance of methodology in relation to timing of sampling. Clin Microbiol Infect. 2009;15:42-9.
42. Hahn DL, Schure A, Patel K, Childs T, Drzik E, Webley W. *Chlamydia pneumoniae*-specific IgE is prevalent in asthma and is associated with disease severity. PLoS One. 2012;7:e35945.
43. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: Current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2007;44:568-76.
44. Wang SP. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: Technique and interpretation. J Infect Dis. 2000;181 Suppl 3:S421-5.
45. She RC, Welch R, Wilson AR, David D, Litwin CM. Correlation of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. IgG and IgM antibodies by microimmunofluorescence with antigen detection methods. J Clin Lab Ana. 2011;25:305-8.
46. Madico G, Quinn TC, Boman J, Gaydos CA. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using 16S and 16S-23S spacer rRNA gene. J Clin Microbiol. 2000;38:1085-93.
47. Mitchell SL, Wolff BJ, Thacker WL, Ciembor PG, Gregory CR, Everett KD, et al. Genotyping and *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. J Clin Microbiol. 2009;47:175-81.
48. Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time, PCR assays. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010;33:473-84.
49. Corsaro D, Venditti D, Valassina M. New parachlamydial 16S rDNA phylogenotypes detected in human clinical samples. Res Microbiol. 2002;153:563-7.
50. Casson N, Posfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G. New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Parachlamydia acanthamoebiae* DNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 2008;46:1491-3.
51. Goy G, Croxatto A, Posfay-Barbe KM, Gervaix A, Greub G. Development of a real-time PCR for the specific detection of *Waddlia chondrophila* in clinical samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:1483-6.
52. Turner K, Clarke I, Timpson N, Horner P. *Chlamydia trachomatis* in the age of the genome: application of molecular genotyping to improve our understanding of the immunopathogenesis of *Chlamydia* genital tract disease. Sex Transm Dis. 2011;38:495-8.
53. Klint M, Fuxelius HH, Goldkuhl RR, Skarin H, Rutemark C, Andersson SC, et al. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol. 2007;45:1410-4.
54. Pedersen LN, Pødenphant L, Møller JK. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using *omp1* and a set of variable number tandem repeats. Clin Microbiol Infect. 2008;14:644-52.
55. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007;13 Suppl 3:1-46.
56. Li JH, Yin YP, Zheng HP, Zhong MY, Peng RR, Wang B, et al. A high-resolution melting analysis for genotyping urogenital *Chlamydia trachomatis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68:366-74.