

Validez de las tinciones de Giemsa y Lendrum en frotis conjuntivales para la identificación de *Chlamydia trachomatis*

Isabel de Ramírez,^{1,2} Mildred Mejía,² Juan Carlos García de la Riva,¹
Federico Hermes¹ y Carlos Fernando Grazioso²

Con el objetivo de encontrar pruebas diagnósticas confiables, válidas y económicas para identificar *Chlamydia trachomatis* en frotis conjuntivales, se evaluó la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de las tinciones de Lendrum y Giemsa empleando como prueba de oro la inmunofluorescencia directa. Asimismo, se estimó la reproducibilidad inter e intraobservador empleando dos observadores independientes. Las lecturas se efectuaron a ciegas. La prevalencia de clamidiasis ocular en la zona del estudio oscilaba alrededor de 50%. En total se estudiaron 103 personas (206 ojos). A cada una se le hicieron tres frotis de cada ojo. Para estimar la reproducibilidad de las tinciones, se empleó el estadístico kappa. La reproducibilidad interobservador fue nula y la reproducibilidad intraobservador varió entre 0,35 y 0,79. La sensibilidad de la tinción de Giemsa es un poco más alta que la de Lendrum (28% y 22% respectivamente), y la especificidad, similar (82% y 85%, respectivamente). Por consiguiente, la capacidad de ambas tinciones para detectar casos positivos es baja, así como su confiabilidad. Las tinciones de Lendrum y Giemsa no constituyen pruebas adecuadas para el diagnóstico de clamidiasis ocular. Para este propósito se recomienda utilizar la inmunofluorescencia directa.

Las infecciones oculares por *Chlamydia trachomatis* constituyen un problema importante de salud. En diferentes zonas de Guatemala, se han detectado prevalencias de infección clínicamente activa de hasta 60% a través del Programa de Prevención de la Ceguera del Comité Nacional Prociegos y Sordos.

En estas áreas hiperendémicas, el diagnóstico de conjuntivitis de inclusión se basa generalmente en la clínica. Sin embargo, para establecer el diagnóstico individual y, en ocasiones, obtener datos objetivos para programas de salud pública es necesario disponer de métodos de diagnóstico de

laboratorio confiables, válidos y accesibles que permitan confirmar el diagnóstico clínico.

El diagnóstico de las infecciones por clamidias se puede establecer mediante tres métodos de laboratorio: citología, aislamiento por cultivo y serología. La citología está disponible desde 1909 y es el que suele usarse en nuestro medio con la tinción de Giemsa. La infección se identifica por las características inclusiones intracitoplasmáticas. La ventaja del método es la facilidad de su empleo. La sensibilidad de la tinción de Giemsa para las conjuntivitis del neonato, comparada con el cultivo, es de 95% (1). Para las conjuntivitis del adulto, es de 45% (2) y la de la inmunofluorescencia, 85%. No obstante, esta proporción solo se alcanza si se trabaja con muestras de buena calidad y el diagnóstico lo realiza un observador experimentado (1, 2).

Dadas estas desventajas de la tinción de Giemsa, se decidió evaluar la validez de la tinción de Lendrum, una coloración específica para cuerpos de inclusión descrita por

¹ Hospital de Ojos y Oídos "Dr. Rodolfo Robles V", Guatemala, Guatemala. Dirección postal: CeSSIAM, Hospital Dr. Rodolfo Robles, Diagonal 21, calle 19, zona 11, Guatemala, Guatemala 01011.

² Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud, Impedimentos y Alteraciones Metabólicas (CeSSIAM), rama de investigación para el Comité Nacional Pro Ciegos y Sordos de Guatemala.

Lendrum en 1947. En esta tinción se emplea floxina, tartracina y hematoxilina de Mayer y el tiempo de tinción oscila entre 45 minutos y una hora. Los núcleos celulares se tiñen de azul, los cuerpos de inclusión, de rojo y el resto de la célula, de amarillo, con lo que teóricamente se logra un contraste que facilita la observación de los cuerpos de inclusión (3, 4). Aunque algunos métodos citológicos, como la inmunofluorescencia, tienen una sensibilidad y especificidad adecuadas, requieren un equipo especial de microscopía y son más costosos.

El objetivo de este estudio fue conocer la confiabilidad (repetibilidad intra e interobservador) y la validez de la tinción de Lendrum para el diagnóstico de las infecciones oculares por *Chlamydia trachomatis* y determinar si constituye un método diagnóstico alternativo a la tinción de Giemsa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la aldea de Pampojilá, municipio de San Lucas Tolimán, Departamento de Sololá, situada a 135 km al oeste de la capital de Guatemala.

En la zona de estudio, la prevalencia de infecciones clínicas por clamidias oscila alrededor de 50%. En esta investigación se incluyeron 103 personas (206 ojos), cuyas edades estuvieron comprendidas entre los 3 y los 80 años.

Los frotis se obtuvieron por raspado conjuntival con espátula de Kimura. Esta espátula se utilizó en lugar del hisopo, porque con ella se obtienen muestras de mejor calidad y contenido celular. Se tomaron muestras de ambos ojos y en total se estudiaron 206 frotis con cada una de las tres técnicas: inmunofluorescencia directa, Giemsa y Lendrum. Los frotis fueron evaluados a ciegas por dos observadores independientes. Para considerar los frotis evaluables, se tuvieron en cuenta factores como la cantidad de células, la calidad de la tinción, la presencia de otras células, etc. Para este estudio, un frotis evaluable se definió como aquel que contenía una buena cantidad de células intactas (como mí-

nimo, 10 en un campo de 20 aumentos), para poder visualizar cuerpos de inclusión en caso de que los hubiera.

El patrón de referencia utilizado (estándar de oro) fue la inmunofluorescencia directa (IFD *Chlamydia trachomatis*, Direct Specimen, Direct Antigen Detection System, Kallestad Diagnostics, Pathfinder, Texas) (5-8). Los frotis marcados con anticuerpos fluorescentes fueron evaluados por dos observadores simultáneamente en un microscopio de dos cabezas. El diagnóstico final se estableció por consenso de ambos observadores.

Para estimar la reproducibilidad intra e interobservador, se utilizó el estadístico *kappa* (*k*), que evalúa la concordancia entre observadores, teniendo en cuenta la concordancia debida al azar (9-11). Asimismo, se evaluó la validez de las tinciones en el diagnóstico de la infección por clamidias calculando su sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo (10). Por último, se calcularon los intervalos de confianza de 95% (IC95%) de *k*, de la sensibilidad y de la especificidad.

RESULTADOS

De un total de 206 frotis disponibles para inmunofluorescencia directa, 194 se clasificaron como evaluables. De ellos, 112 (58%) se clasificaron como positivos para clamidias por consenso de los dos observadores.

La tinción de Giemsa se evaluó en dos ocasiones diferentes. En la primera lectura, el observador 1 detectó, de 186 frotis evaluables, 41 positivos (22%) y en la segunda lectura, 38 positivos (20%). Por su parte, en la primera lectura, el observador 2 detectó, de 158 frotis evaluables, 11 positivos (7%) y en la segunda, 28 positivos (15%) de 186 evaluables (cuadros 1 y 2).

La tinción de Lendrum se evaluó de la misma manera. En la primera lectura, el observador 1 detectó, de 188 frotis evaluables, 22 positivos (12%), y en la segunda lectura, de 196 frotis evaluables, 9 positivos (4%). Por su parte, en su primera lectura, el observador 2 detectó, de 172 frotis evaluables, 25 positivos

CUADRO 1. Datos necesarios para calcular la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de las pruebas evaluadas por el observador 1

Resultados de la prueba	Prueba (lectura)			
	Giemsa		Lendrum	
	1	2	1	2
Positivo verdadero	41	38	22	9
Negativo verdadero	74	72	74	76
Positivo falso	8	10	5	4
Negativo falso	63	66	87	101

CUADRO 2. Datos necesarios para calcular la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de las pruebas evaluadas por el observador 2

Resultados de la prueba	Prueba (lectura)			
	Giemsa		Lendrum	
	1	2	1	2
Positivo verdadero	11	28	25	30
Negativo verdadero	51	56	56	56
Positivo falso	15	21	20	19
Negativo falso	81	79	71	65

CUADRO 3. Sensibilidad y especificidad e intervalos de confianza de 95% correspondientes (entre paréntesis) de la tinción de Giemsa evaluada por dos observadores en dos lecturas independientes y a ciegas

	Observador 1		Observador 2	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
Sensibilidad	39% (49,0-32,0)	36% (42,8-29,2)	12% (17,1-6,9)	26% (32,6-19,4)
Especificidad	90% (90,4-89,5)	88% (92,6-83,4)	77% (83,6-70,4)	73% (79,7-66,3)

CUADRO 4. Sensibilidad y especificidad e intervalos de confianza de 95% correspondientes (entre paréntesis) de la tinción de Lendrum evaluada por dos observadores en dos lecturas independientes y a ciegas

	Observador 1		Observador 2	
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 1	Lectura 2
Sensibilidad	20% (25,7-14,3)	8% (11,8-4,1)	26% (32,5-19,5)	32% (42,1-27,9)
Especificidad	93% (96,6-89,4)	95% (98,1-91,9)	74% (80,5-67,4)	75% (81,5-68,5)

(14%), y en la segunda lectura, de 170 frotis evaluables, 30 positivos (17%) (cuadros 1 y 2).

Los valores de la sensibilidad y especificidad, y los IC95% correspondientes, de las tinciones obtenidos en la primera y segunda lecturas por ambos observadores se presentan en los cuadros 3 y 4. Los valores predictivos de ambas tinciones aparecen en el cuadro 5.

Los dos observadores examinaron los frotis dos veces, independientemente y a ciegas. Los valores de la reproducibilidad intra e interobservador figuran en el cuadro 6.

DISCUSIÓN

Los factores del huésped y del ambiente determinantes de las infecciones por *C. trachomatis* son la edad (los niños son el principal reservorio), el sexo (las mujeres tienen conjuntivitis más grave) y el clima (las regiones áridas, las temperaturas altas y el mal abastecimiento de agua se asocian con mala higiene, favorecen la proliferación de moscas y aumentan la incidencia estacional de oftal-

mía bacteriana aguda) (2, 12). Aunque la frecuencia de estos factores en las poblaciones estudiadas es baja, las condiciones higiénicas no son satisfactorias y, por lo tanto, favorecen la transmisión de *Chlamydia trachomatis*.

En este estudio se utilizó la prueba de inmunofluorescencia directa como método de referencia para determinar la sensibilidad y especificidad de las tinciones utilizadas. La sensibilidad y la especificidad de esta prueba son, respectivamente, 90 y 98% (6, 8). Con ella se observó que, de los 206 frotos estudiados, 112 (58%) presentaban cuerpos elementales de *C. trachomatis*. La detección con la tinción de Giemsa varió de 11 a 41 frotos positivos, lo cual constituye un porcentaje bastante bajo (entre 7 y 22%), y el de la tinción de Lendrum, de 9 a 30 frotos positivos (de 4,5 a 17%). Los datos de los valores predictivos positivo y negativo indican que el porcentaje de casos positivos verdaderos que se están detectando con la tinción de Giemsa es, en promedio, 66% y el de negativos verdaderos, 53%. El valor predictivo positivo de la tinción de Lendrum fue, en promedio, 66% entre la primera y segunda lecturas y el valor predictivo negativo

fue, en promedio, 45%. Por consiguiente, las tinciones de Giemsa permiten detectar más positivos verdaderos.

A partir de los datos obtenidos se puede observar que con los métodos citológicos se detectan 66% de los casos verdaderamente infectados, por lo que se deben considerar alternativas aplicables que aumenten la sensibilidad de la prueba diagnóstica. Además, la reproducibilidad intra e interobservador demuestra que estas tinciones no son reproducibles y que su sensibilidad es baja en relación con la inmunofluorescencia directa.

El propósito de este estudio era encontrar una prueba diagnóstica alternativa utilizable en laboratorios con recursos limitados, de bajo costo, y que tuviera una sensibilidad y especificidad elevadas. Se creyó que la tinción de Lendrum podría cumplir estas condiciones. Los resultados obtenidos muestran que la tinción de Giemsa es ligeramente más sensible que la de Lendrum, pero la especificidad de ambas es similar. Además, la tinción de Giemsa sigue siendo el método de uso rutinario para el diagnóstico de infecciones por clamidias en medios con recursos limitados, si bien su sensibilidad y especificidad no se ajustan a los requisitos ideales.

La tinción de Lendrum como técnica alternativa de tinción no tiene valor práctico para uso rutinario. La inmunofluorescencia directa es la prueba recomendable en este caso, dada la poca validez de las pruebas evaluadas, por lo que se recomienda usar la inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de laboratorio, siempre que sea posible. Por último, como muestran los resultados obtenidos, la reproducibilidad de las pruebas evaluadas es baja.

CUADRO 5. Valores predictivos positivo (VP +) y negativo (VP -) de las pruebas evaluadas

Prueba (lectura)	Observador 1		Observador 2	
	VP +	VP -	VP +	VP -
Giemsa (1)	84	54	42	39
Giemsa (2)	79	79	57	41
Lendrum (1)	81	46	55	44
Lendrum (2)	69	43	61	46

CUADRO 6. Resultados del estudio de la reproducibilidad intra e interobservador (κ e intervalos de confianza de 95%) de las dos pruebas evaluadas

Reproducibilidad	Tinción	Observador	
		1	2
Intraobservador	Giemsa	0,79 (0,64-0,93)	0,35 (0,21-0,49)
	Lendrum	0,50 (0,38-0,64)	0,51 (0,35-0,66)
Interobservador	Giemsa	0,00	0,24 (0,09-0,39)
	Lendrum	0,14 (0,003-0,29)	0,00

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Jesús Bulux la ayuda prestada en el análisis estadístico de los datos.

REFERENCIAS

1. Schachter J, Dawson CR. *Human chlamydial infections*. PSC Publishing Co. Inc; 1978:120.
2. Treharne JD. The community epidemiology of trachoma. *Rev Infect Dis* 1985;7:760-763.
3. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJH. *Métodos de laboratorio*. 2a. ed. México: Editorial Interamericana S.A.; 1972.
4. Lendrum AC. Staining methods of Lendrum. *J Pathol Bacteriol* 1947;59:399-404. En: Armed Forces Institute of Pathology. *Clinical histopathology laboratory manual of histologic staining methods*. 3a ed. Blackston Division, Mc Graw Hill; 1968.
5. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de América, Servicio de Salud Pública, Centros para el Control de Enferme-

dades. *Infecciones por Chlamydia trachomatis*. Atlanta, GA: CDC; 1985.

6. Uyeda CT, Welborn P, Ellison-Birang N, Shunk K, Tsaquse B. Rapid diagnosis of chlamydial infections with the micro trak direct test. *J Clin Microbiol* 1984;20:948-950.
7. Newhall WJ, Terho P, Wilde III CE, Batteiger BE, Jones RB. Serovar determination of Chlamydia trachomatis isolates by using type-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1986;23:333-338.
8. Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology*. 4a. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1985.
9. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley & Sons; 1981.
10. Dawson-Saunders BR, Trapp RG. *Basic and clinical biostatistics*. Norwalk: Appleton and Lange; 1990:59.
11. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 3a. ed. Boston, MA: PWS-Kent Publishing Co.; 1990:456-458.
12. Taylor HR, Sommer A. Risk-factor studies as an epidemiologic tool. *Rev Infect Dis* 1985;7:765-767.

ABSTRACT

Validity of Giemsa and Lendrum Stains in Conjunctival Smears for the Identification of *Chlamydia trachomatis*

With the objective of finding reliable, valid, and economic diagnostic tests to identify *Chlamydia trachomatis* in conjunctival smears, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of Lendrum and Giemsa stains were evaluated using direct immunofluorescence as the gold standard. In addition, inter- and intraobserver reproducibility were estimated through the use of two independent observers, who were blinded to the results during

their readings. The prevalence of ocular chlamydiosis in the study area was around 50%. In all, 103 persons (206 eyes) were studied. Three smears from each eye were taken for each subject. The *kappa* statistic was used to estimate the reproducibility of the stains. Interobserver reproducibility was null, and intraobserver reproducibility ranged between 0.35 and 0.79. The sensitivity of the Giemsa stain was a bit higher than that of the Lendrum stain (28% and 22%, respectively), and the specificity was similar (82% and 85%, respectively). Based on these results, the ability of both stains to detect positive cases was judged to be low, as was their reliability. The Lendrum and Giemsa stains are not adequate tests for the diagnosis of ocular chlamydiosis. For this purpose the use of direct immunofluorescence is recommended.