

31
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

EVALUACION DE LAS TECNICAS DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES FLUORESCENTES Y DE COLORACION
PARA CUERPOS ELEMENTALES EN EL DIAGNOSTICO
DE INFECCION CONJUNTIVAL POR
CHLAMYDIA TRACHOMATIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARTIN MARTINEZ SANCHEZ



MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

INTRODUCCION	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
OBJETIVOS	13
HIPOTESIS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	21
DISCUSION DE RESULTADOS	32
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUCCION

El género *Chlamydia* comprende dos especies de organismos intracelulares obligados que son agentes etiológicos de enfermedades humanas *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Las infecciones clamidiales son transmitidas al hombre directa o indirectamente por pájaros o mamíferos; las transmitidas directamente, pueden ser localizadas en el ojo (tracoma, conjuntivitis de inclusión), el tracto urogenital (sobre todo uretritis), o sistema respiratorio. La transmisión indirecta de infecciones clamidiales raramente afecta al hombre, con excepción de la psitacosis. (1,10,12,17,23)

El tracoma es una infección que ataca a los núcleos de población de bajo nivel socioeconómico como consecuencia de las deficiencias higiénicas. Es producida por *C. trachomatis* generalmente serotipos A, B, Ba y C; se encuentra distribuida en casi todos los países y se le considera la mayor causa de ceguera. (1,10,12,14,26,31)

El método clásico para diagnosticar la infección clamidial (en tracoma), es demostrando las inclusiones intracelulares patognomónicas en muestras de conjuntiva mediante tinción de Giemsa, Marchiavello o Gimenez. La reacción directa con anticuerpos monoclonales fluorescentes conjugados especie específicos a *Chlamydia trachomatis*, es un nuevo método para diagnosticar tracoma. (24,33)

En vista de que no hay reportes claros en la literatura que evalúen la especificidad y sensibilidad de estos métodos: Se tomaron muestras de 100 pacientes (ambos ojos) que mostraron sintomatología sugestiva de infección por *Chlamydia*: ardor, enrojecimiento, fotofobia, sensación de cuerpos extraños; y muestras de 55 pacientes sin sintomatología de ninguna especie (controles). Las muestras se tñeron por las técnicas de Giemsa, Marchiavello, Gimenez y por la técnica de reacción directa de anticuerpos monoclonales fluorescentes

(técnica comercial Kallestad Pathfinder Merck), detectándose un 10% de positividad en la población con sintomatología por técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes, lo cual mostró que este método es el más específico y sensible para el diagnóstico de Chlamydia trachomatis, según el análisis que se realiza en este trabajo.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. Antecedentes científicos.

Las clamidias suelen agruparse de la manera siguiente según el manual Bergey

Orden: Chlamydiales
 Familia: Chlamydiaceae
 Género: Chlamydia
 Especie: C. trachomatis
C. psittaci

Chlamydia trachomatis es el organismo causante del tracoma (serotipos A, B, Ba y C), conjuntivitis de inclusión (serotipos D, E, F, G, H, I, J y K), linfogranuloma venéreo (serotipos D y K) y otras infecciones de transmisión sexual, así como algunos casos de neumonía en roedores.

Chlamydia psittaci se considera agente infeccioso de especies animales y sólo ocasionalmente afecta al hombre (psittacosis). (1,11,14,25)

Durante mucho tiempo se consideró a las clamidias como virus debido a que poseen algunas propiedades comunes o semejantes a ellos, como el ser parásitos intracelulares obligados y no desarrollarse en medios de cultivo tradicionales. Las clamidias son tan pequeñas (300nm), como las rickettsias (300nm) y los micoplasmas (150-300nm); se reproducen por división binaria al igual que estas. Se diferencian de los virus en que las clamidias tienen capacidad de síntesis proteica independiente y poseen DNA y RNA, además de ser susceptibles a los antibióticos, tener paredes celulares y ribosomas. (7,14,23,24)

Las clamidias inhiben la síntesis de DNA del huésped y son además parásitos energéticos, ya que utilizan la energía metabólica del huésped, empleando algunas sustancias ricas

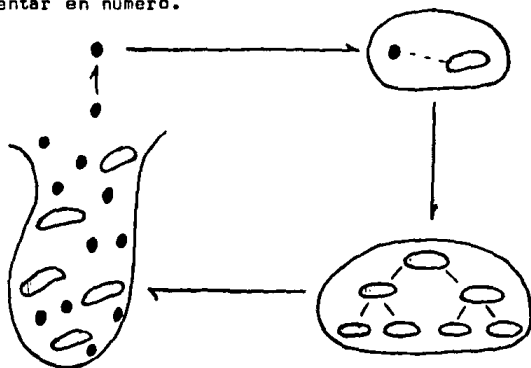
en energía como el ATP. (7,14,31)

1. Características generales del ciclo de vida

En las células parasitadas se producen corpúsculos de inclusión grandes, que son microcolonias resultantes de la "condensación" de los cuerpos reticulares (formas metabólicamente activas y de réplica del organismo); estas estructuras reciben el nombre de cuerpos elementales y son esféricos con una porción central más densa, siendo altamente infecciosas y resistentes al estado extracelular. Cuando penetran en la célula huésped, aumentan de tamaño para convertirse en cuerpos reticulares sin capacidad infectiva y cuya evolución dura aproximadamente 24 horas. Posteriormente se dividen estos cuerpos reticulares por fisión binaria y dan lugar a los cuerpos elementales infecciosos. El cuerpo elemental está compuesto de material nucleico, tanto DNA como RNA, estructuras ribosomales, envueltos en paredes celulares con glucolípidos y proteínas que confieren las características antigénicas de familia y tipo respectivamente. Asimismo, la formación de cuerpos elementales se acompaña de una matriz, sustancia que contiene glucógeno y que se encuentra en el interior de la inclusión; dichos cuerpos elementales presentan estructura cocoide de 300nm de diámetro, mientras que el cuerpo reticular, que puede ser esférico o irregular presenta un tamaño de hasta 1000nm. (1,7,10)

CICLO INFECCIOSO:

0-8 hrs el cuerpo elemental invade la célula huésped y se diferencia, produciendo un cuerpo reticular no infeccioso de gran tamaño, sin aumentar en número.



12-30hrs. Las células hijas se diferencian de nuevo, produciendo cuerpos elementales infecciosos; la célula se rompe, liberando partículas que infectarán a otras células del huésped y se repite el ciclo.

8-12hrs el cuerpo reticular se divide consecutivamente por fisión binaria.

Las clamidias son fácilmente observables al microscópio óptico. El tamaño de su genoma es de alrededor de un tercio del genoma de E. coli. Las células huésped presentan inclusiones características en su citoplasma; cuando la célula madura, tales inclusiones se hallan cerca del núcleo formando una estructura en casco. (7,14)

2. Epidemiología

La aparición del tracoma en México, se observa en el primer tercio del siglo XIX en la zona sur y se relaciona con la llegada de barcos con trabajadores sudaneses y su instalación en los estados de Chiapas y Tabasco. (1)

En lugares industrializados, la conjuntivitis causada por *Chlamydia trachomatis* es más prevalente en adultos de alrededor de los 20 años. En el caso de tracoma clásico en lugares desarrollados, la mayor incidencia de la enfermedad activa ocurre en niños entre 2 y 5 años de edad. La conjuntivitis de inclusión en adultos es usualmente una infección clamidial genital. En contraste, en el tracoma endémico, la infección se extiende del ojo de persona infectada a ojo de persona sana; basta con 20 partículas infectivas para producir la enfermedad en individuos sensibles. La conjuntivitis de inclusión solo raramente puede tener una transmisión no genital. (3,13,16,22,25)

La conjuntivitis neonatal suele considerarse enfermedad de transmisión sexual. Y aunque la etiología de la oftalmia neonatal es compleja, hay 2 agentes causales que se conocen perfectamente y son Neisseria gonorrhoeae y C. trachomatis, el primero es causa del 24% al 49% de los casos de oftalmia neonatal en Africa y recientemente el segundo agente causal fué aislado del 34% de los casos en Gambia y el 19% de los casos en Rep. de Africa Central. Tentativamente la incidencia de las enfermedades clamidiales es mucho mayor que lo indicado por estudios anteriores. Y suele verse aumentada la

incidencia de infección conjuntival por C.trachomatis en zonas de países en las que las condiciones de higiene son deficientes. (5,35)

3. Patogénesis

Las enfermedades producidas por las clamidias en general presentan un curso crónico y recurrente.

Tracoma.- Es una infección que ataca fundamentalmente a los núcleos de población de bajo nivel socioeconómico como consecuencia de las deficiencias higiénicas. Es producida por Chlamydia trachomatis, se encuentra distribuida en casi todos los países y se le considera la mayor causa de ceguera. En condiciones naturales sólo ataca al hombre y puede transmitirse directamente del ojo del enfermo al ojo de otro individuo susceptible por los dedos u objetos contaminados. (1,11,31)

El tracoma puede dividirse epidemiológicamente en la enfermedad que produce ceguera y la enfermedad que no causa ceguera. El tracoma que no causa ceguera es común y endémico, usualmente no produce complicaciones. El tracoma que causa ceguera se acompaña generalmente de rinitis, otitis media, infecciones del tracto respiratorio y linfadenopatía preauricular.

La mayoría de los pacientes que sufren de tracoma son asintomáticos. Cuando se dan manifestaciones clínicas, la signomatología puede ser leve (como sucede principalmente en niños, los que presentan ptosis ligera del párpado superior e hipertrofia folicular de la conjuntiva tarsal superior e hipertrofia folicular tarsal inferior). En el caso de que el principio sea agudo, habrá una marcada infiltración con hipertrofia papilar, inflamación conjuntival palpebral y bulbar, opacidades de la cornea y foliculos en la conjuntiva entre otras. (14,25)

Paratracoma o conjuntivitis de inclusión es el término

empleado para describir la infección transmitida por agentes genitales (serotipos D, E, F, G, H, I, J, K), ocurre generalmente entre los 18 y 30 años; el ojo del enfermo presenta secreción mucoides o líquida por las mañanas, hipertermia de la conjuntiva, sensación de cuerpo extraño y enrojecimiento de los ojos. También pueden contagiarse los infantes en el momento del parto, presentando manifestaciones clínicas oculares semejantes a los adultos. (13)

Al progresar el tracoma pasa por diversos estadios clínicos de acuerdo a la clasificación de Mr. Callan:

TRI. Indica el primer estadio del tracoma. En este caso se observan los folículos inmaduros en conjuntiva tarsal y en zona central; puede haber alteración corneal precoz.

TRII. Segundo estadio del tracoma, se observan los folículos bien desarrollados, hiperplasia papilar, pannus, con infiltración que se extiende del limbo superior.

TRIII. Este es un periodo cicatricial del tracoma con necrosis folicular. En algunos casos pueden observarse características del estadio II.

TRIV. En este periodo se pierde totalmente la infectividad, aquí el tejido cicatricial del estadio III es substituido totalmente por tejido fibrótico y puede evaluarse éste según el grado de afectación en triquiasis, entropión y opacidades corneales. (1)

Estudios sobre la patogenicidad del tracoma indican que es una enfermedad inmunopatológica en la que al progresar, la mayor severidad se relaciona con pannus y formación de cicatriz, lo cual ocurre solo después de la reinfección. Esta hipótesis es supuesta por un estudio de 10 años realizado a 32 familias que fueron seguidas con repetidas observaciones clínicas y de laboratorio. (12)

El tracoma activo es caracterizado por inflamación crónica de la conjuntiva, y los episodios repetidos de reinfec-

ción se piensa que son necesarios para mantener la inflamación. Clínicamente no es posible establecer el diagnóstico de las infecciones conjuntivales por C. trachomatis, por lo que se han buscado métodos de laboratorio ideales y aplicables a un gran grupo de población. (1,12,29)

4. Características inmunológicas

Para Chlamydia se han identificado 2 tipos de antígenos: Los antígenos específicos de familia que se hallan en el sobrenadante de lisados de estos microorganismos y los antígenos específicos de tipo relacionados con la pared celular.

El antígeno de familia es estable al calor, soluble en éter, resistente a la tripsina y es inactivado por el perydato; muy probablemente se trata de un glucolípido. Por fijación de complemento o por inmunofluorescencia, resulta posible detectar la presencia de anticuerpos frente a este antígeno.

El antígeno de tipo confiere a las cepas diferencias en virulencia y en sensibilidad frente a los antibióticos. Al parecer tal antígeno es una proteína, ya que su actividad es reducida por acción de la tripsina o por extracción con fenol.

El tracoma se considera una enfermedad de hipersensibilidad y con una exposición repetida de antígeno clamidial. Algunos estudios establecen que los antígenos clamidiales incluyen un antígeno proteico de 57-kilodaltons, que favorece la reacción ocular de hipersensibilidad.

Cuando las células conjuntivales infectadas llegan a su estado celular final, hay un recambio natural y la lisis de algunas de estas células da por resultado la exposición antigénica. Esto puede explicar las reacciones de hipersensibilidad y hace posible detectar clamidias viables en el ojo. (4,26)

5. Métodos de detección

El diagnóstico se puede realizar mediante exámen por inmunofluorescencia, o diversas tinciones con colorantes básicos que se dirigen fundamentalmente a las inclusiones citoplasmáticas de las células epiteliales obtenidas por raspado conjuntival.

La observación directa de los frotis conjuntivales teñidos es un procedimiento útil aunque requiere de experiencia la búsqueda de las inclusiones y existen limitaciones en su interpretación, pues con facilidad se confunden con otros elementos como son: bacterias, corpúsculos de mozo, restos celulares, granulaciones de leucocitos, granulaciones de célula cebada, pigmento exógeno (cosméticos), partículas de carbón cuando se flama el frotis o procedentes del asa cuando ésta es sometida al fuego. (1,2,17)

El método de elección en el diagnóstico de infección clamidial, se considera que es el aislamiento en cultivo celular; esta técnica requiere laboratorios especializados y personal entrenado, facilidades que no se presentan en la mayoría de las áreas tracomatosas-endémicas. La reciente introducción de métodos no de cultivo, ofrecen la posibilidad de realizar el diagnóstico en los laboratorios de dichas áreas. (20, 31)

La reacción inmunofluorescente de citología conjuntival con anticuerpos monoclonales es un nuevo método para la detección de infección ocular clamidial. Recientemente se ha preconizado el empleo de anticuerpos monoclonales de híbrido marcado con epinefrina para técnica de inmunofluorescencia. Este método utiliza anticuerpos monoclonales conjugados especie-específicos a Chlamydia trachomatis para detectar cuerpos elementales de clamidia en muestras de la conjuntiva. La técnica de inmunofluorescencia directa fué comparada con el cultivo celular convencional, resultando la primera 100% sensible y con especificidad del 97.5%. De 178 pa-

cientes, 19 (11%) fueron positivos por técnica de inmunofluorescencia y 15 (8.4%) por cultivo celular. (21)

En un estudio realizado en 1988 por Patricia M, Roblin et al., (30) 473 muestras conjuntivales (entre hombres y mujeres) fueron analizadas por dos técnicas comerciales de anticuerpos monoclonales fluorescentes: Kallestad Pathfinder y Syva Microtrack, comparando con técnicas de cultivo. Los resultados indican que no hay diferencia significativa entre la sensibilidad y la especificidad de las dos pruebas comerciales. La sensibilidad de dichas pruebas con respecto al cultivo celular, fué del 90.6%. Asimismo, el estudio muestra que la técnica citológica de tinción con anticuerpos monoclonales es un método rápido y eficiente de diagnóstico para la infección ocular clamidial.

Ultimamente han surgido otras técnicas para realizar el diagnóstico de Chlamydia trachomatis en infección conjuntival; tales como la tinción con azul de toluidina para detectar inclusiones tanto en células Mc Coy como en células HeLa; el inmunoensayo enzimático (clamidia-enzima) y la hibridización de DNA para C. trachomatis. Recientemente se estudiaron en Egipto, cinco diferentes pruebas para el diagnóstico de infección clamidial, las técnicas fueron tinción de Giemsa, aislamiento en cultivo celular, anticuerpos monoclonales fluorescentes, inmunoensayo enzimático y prueba de DNA. La tinción de Giemsa presentó la menor sensibilidad (29%). Las otras pruebas fueron equivalentes entre sí en su funcionamiento, con un rango de sensibilidad del 73% al 84% y especificidad del 93% al 100%. (26)

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se calcula que el tracoma y las infecciones asociadas afectan en el mundo a unos 400 o 500 millones de personas, de las cuales 2 millones padecen ceguera. El tracoma sigue siendo endémico en la mayor parte del Norte de África y del Mediterraneo Oriental, así como en ciertos lugares de Asia, África Oriental y Latinoamérica; dentro de estas zonas endémicas se observan grandes diferencias en cuanto a la prevalencia y la gravedad de la infección, diferencias correlacionadas con factores ecológicos y socioeconómicos. (31)

En el campo de la Oftalmología, tiene especial importancia el tracoma y las conjuntivitis foliculares. El tracoma es una entidad bien conocida en nuestro país y las zonas endémicas están bien identificadas en Chiapas y Tabasco. No obstante que en algunos países se considera que el tracoma se ha erradicado, la Organización Mundial de la Salud señala: "El tracoma y las infecciones relacionadas de las tunicas externas del ojo, continúan siendo las principales causas de ceguera en el mundo". Por su parte, las conjuntivitis foliculares producidas por otros germenos o agentes etiológicos comparten manifestaciones clínicas con el tracoma, por lo que en las zonas no tracomatosas, urbanas y suburbanas no se reconocen con facilidad. (11)

Por tanto, dadas las bajas condiciones económicas e higiénicas en algunos sectores de la población mexicana, es de interés: 1) demostrar mediante técnicas confiables de laboratorio, la presencia de infección conjuntival por Chlamydia trachomatis. 2) Evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas tradicionales de tinción para cuerpos de inclusión en células epiteliales conjuntivales.

OBJETIVOS

- Demostrar la eficacia de la toma de muestra de saco conjuntival en el diagnóstico de Chlamydia trachomatis.
- Detectar la presencia de C. trachomatis (agente causal de tracoma y conjuntivitis de inclusión), mediante técnicas comerciales de anticuerpos monoclonales fluorescentes.
- Analizar al mismo tiempo estas muestras por técnicas tradicionales de tinción tales como Machiavello, Gimenez y Giemsa.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas tradicionales de tinción respecto a la técnica por anticuerpos monoclonales fluorescentes.

HIPOTESIS

Dada la alta capacidad de unión de los anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos de los antígenos de superficie de Chlamydia trachomatis, presentes en los cuerpos elementales y reticulares que se encuentran en células conjuntivales, se espera detectarlos de manera más específica que con técnicas de coloración clásicas, en pacientes con sintomatología sugestiva.

III. MATERIAL Y METODOS (METODOLGGIA)

MATERIAL:

- Hisópos estériles
- Portaobjetos (nuevos preferentemente)
- Cubreobjetos
- Cajas de Petri (para cámaras húmedas)
- Pipetas Pasteur
- Marcadores
- Equipo comercial para el diagnóstico in vitro de Chlamydia trachomatis. (Kallestad Pathfinder MERCK)
- Microscópio de fluorescencia.
- Metanol
- Soluciones para cada una de las técnicas de coloración

Gimenez: (14)

- Fucsina básica al 10% (P/V). Sol. Stock en etanol al 95%100ml
Fenol acuoso al 4% (P/V)250ml
Agua destilada650ml
- Solución buffer de fosfatos de sodio (0.1M) a pH de 7.45 (Mezclar 3.5ml de NaH_2PO_4 0.2M, 15.5ml de Na_2HPO_4 0.2M y 19ml de agua destilada)
- Solución de oxalato de verde de malaqui ta acuoso 0.8%

Preparar una solución de carbol-fucsina mezclando 4ml de la solución stock con 10ml de buffer (pH 7.45) y filtrar inmediatamente en papel Watman # 1. La solución es adecuada para usarse alrededor de

las 40 hrs. siguientes.

Machiavello: (14)

- Fucsina básica. 0.25g en 100ml de agua bidestilada.
- Acido cítrico. 0.5g en 200ml de agua bidestilada. Es importante usar una solución recién preparada.
- Azul de metileno. 1.0g en 100ml de agua bidestilada.

Giemsa: (14)

- Solución stock:

Giemsa0.5g

Metanol absoluto libre de acetona...33.0ml

Mezclar, dejar a temperatura ambiente y eliminar el sedimento.

- Boffer pH 7.2:

Solución 1. Preparar Na_2HPO_4 0.067M adicionando 9.5g de sal anhidra para 1 litro de agua destilada.

Solución 2. Preparar NaH_2PO_4 0.067M disolviendo 9.2g de NaCl en 1 litro de agua destilada.

Mezclar 72ml de la solución 1 con 28ml de la solución 2 y 900ml de agua destilada.

- Solución para trabajar:

Una parte de solución stock y 40 a 50 partes de boffer pH 7.2.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- Se tomaron muestras de 100 pacientes que clínicamente presentaban síntomas sugestivos de infección por C. trachomatis : enrojecimiento de la conjuntiva, fotofobia, comezón, ardor. Las muestras se tomaron de ambos ojos y se analizaron de acuerdo al instructivo de la técnica comercial para anticuerpos fluorescentes y según la metodología descrita por Lenette y colaboradores para métodos de coloración.
- Los pacientes muestreados fueron de la consulta externa de la clínica Oftalmólogos Asociados S.A.
- Asimismo, se tomaron muestras de 55 personas que no presentaban sintomatología de ninguna especie (controles). Las muestras se tomaron de ambos ojos.
- Todas las muestras se obtuvieron entre los meses de Noviembre de 1989 y Febrero de 1990.
- La técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes se correlacionó con las técnicas de coloración de Machiavello, Gimenez y Giemsa.

METODOLOGIA:

Toma de muestra:

- La toma de muestra conjuntival se realizó con ayuda del hisópo estéril, frotando cuidadosamente la superficie interna del párpado inferior.

- Para preparar las laminillas, se hace rodar el hisópo sobre el círculo (previamente trazado en el portaobjetos), apoyando firmemente.

De acuerdo a la técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes : (34)

- Dejar que la muestra se seque completamente al aire.
- Colocar la laminilla horizontalmente y cubrir con metanol dejando que se evapore.
- Añadir 30 μ l del reactivo que contiene los anticuerpos fluorescentes específicos a cada preparación (controles y muestras) fijadas previamente, asegurándose que se cubra el área del círculo.
- Dejar la preparación 30 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente.
- Aspirar el exceso de reactivo con pipeta Pasteur.
- Enjuagar con agua destilada durante 10 segundos y dejar secar al aire.
- Añadir fluido de montaje, colocar un cubreobjetos y leer las preparaciones con microscopio de fluorescencia, utilizar un objetivo de inmersión con aumento de 63x para confirmar la morfología.

Las muestras positivas presentan cuerpos elementales extracelulares que son visibles a un aumento de 400-500x, apareciendo como pequeños puntos de luz. A un aumento de 630x esos cuerpos elementales son redondos

con una fluorescencia de color verde manzana sobre fondo rojo.

Las muestras negativas no presentan la mínima fluorescencia específica, solo se observan las células teñidas de rojo.

Para la técnica de Gimenez; (14)

- Dejar secar la preparación al aire.
- Cubrir con la solución de fucsina y dejar durante 1 a 2 minutos.
- Lavar con agua, cubrir con la solución de verde de malaquita por 6 a 9 segundos y lavar con agua.

Los cuerpos elementales aparecen rojos sobre un fondo verde.

Para la técnica de Machiavello: (14)

- Después de secar al aire, fijar las preparaciones por calor.
- Cubrir con solución de fucsina básica durante 5 minutos, lavar con agua, añadir solución de ácido cítrico por unos segundos, lavar con agua, cubrir con azul de metileno durante 20 a 30 segundos, enjuagar y secar.

Cuando se realiza la tinción de manera adecuada, los cuerpos elementales aparecen rojos y el resto azul-oscuro.

Para la técnica de Giemsa: (14)

- Después de secar al aire, se fijan las preparaciones con metanol.
- Cubrir con solución de Giemsa durante

una hora, cuidar que no se seque el colorante y si es necesario, añadir unas gotas más.

- Enjuagar sumergiendo la preparación en alcohol al 96% hasta que desaparezca el exceso de colorante, dejar secar y observar.
- Los cuerpos elementales aparecen de color morado.

El criterio de positividad utilizado para la técnica de anticuerpos monoclonales según el fabricante, son aquellas muestras en las que se encuentran por lo menos 8 cuerpos elementales (número establecido para este estudio, dado que se indica que la presencia de cuerpos elementales reduce al ser tomada la muestra con hisópo). El criterio de positividad para las técnicas de Siemsa, Machiavello y Gimenez es de 5 cuerpos elementales por lo menos (14). Asimismo, se descartan aquellas muestras que presentan menos de 10 células del epitelio conjuntival (lo que demuestra la eficacia en la toma de muestra del saco conjuntival para diagnóstico de C. trachomatis.)

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio son presentados a continuación por medio de gráficas y tablas binarias simples en las que puede visualizarse la funcionalidad de las distintas técnicas de tinción tradicionales, así como de la técnica directa de anticuerpos monoclonales fluorescentes.

La gráfica I muestra los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a la población control (55 personas que no mostraban sintomatología de ninguna especie).

La gráfica II muestra los resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas a los pacientes con sintomatología sugestiva de infección conjuntival por C. trachomatis.

La tabla I muestra la evaluación de las técnicas de tinción tradicionales usando como referencia, la técnica de detección de Chlamydia trachomatis por anticuerpos monoclonales fluorescentes.

El análisis de resultados para evaluar la especificidad, sensibilidad y predicción de valores, se realizó empleando el análisis de tablas binarias simples (tabla de "2 por 2"), de acuerdo a Griner et al (36), y los parámetros se evaluaron según el modelo siguiente:

		ENFERMEDAD		TOTAL
		PRESENTAN	NO PRESENTAN	
PRUEBA	POSITIVA	A	B	A B
	NEGATIVA	C	D	C D
TOTAL		A C	B D	A B C D=N

- A= pacientes realmente positivos
- B= individuos falsos positivos
- C= pacientes falsos negativos
- D= individuos realmente negativos
(grupo control)

Sensibilidad = Probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la enfermedad esta presente $A/(A C)$.

Especificidad = Probabilidad de que la prueba sea negativa cuando la enfermedad no esta presente $D/(B D)$.

Falsos positivos = Probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la enfermedad no esta presente $B/(B D)$.

Falsos negativos = Probabilidad de que la prueba sea negativa cuando la enfermedad esta presente $C/(A C)$.

Predicción de valores positivos = Probabilidad de que la enfermedad este presente cuando el ensayo resulta positivo $A/(A+D)$.

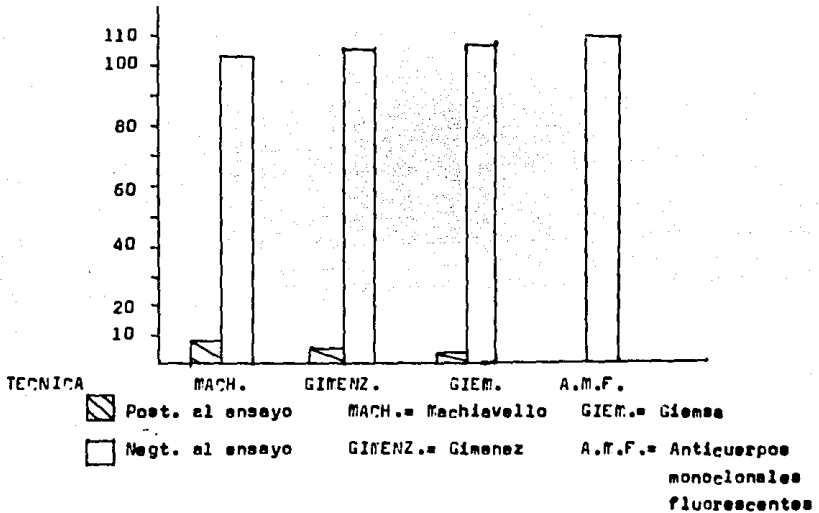
Predicción de valores negativos = Probabilidad de que la enfermedad no este presente cuando el ensayo es negativo $D/(C+D)$.

Sensibilidad	=	$\frac{\text{Resultados positivos-verdaderos}}{\text{Total de ojos con enfermedad}}$	
Especificidad	=	$\frac{\text{Resultados negativos-verdaderos}}{\text{Total de ojos en el grupo control}}$	
Porcentaje falsos negts.	=	$\frac{\text{Resultados falsos negativos}}{\text{Total de ojos con enfermedad}}$	X 100
Porcentaje falsos posts.	=	$\frac{\text{Resultados falsos positivos}}{\text{Total de ojos en el grupo control}}$	X 100
Predicción de valores posts.	=	$\frac{\text{Pacientes positivos}}{\text{pacientes positivos + falsos posts.}}$	
Predicción de valores negts.	=	$\frac{\text{Pacientes negativos}}{\text{pacientes negativos + falsos negts.}}$	

GRAFICA I. Muestra los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a la población control (55 personas que no mostraban sintomatología de ninguna especie).

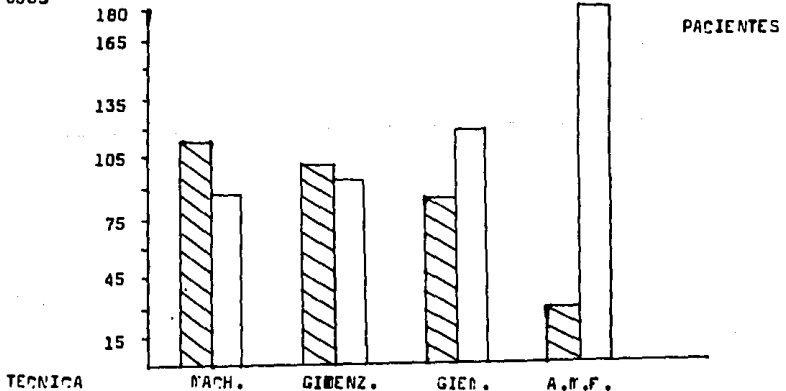
OJOS

CONTROLES



GRAFICA II. Muestra los resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas a los pacientes con sintomatología sugestiva de infección conjuntival por *C. trachomatis*.

OJOS



Dado que en el presente estudio no se cuenta con una técnica tal que asegure verdaderamente la presencia o ausencia de la enfermedad, como podría ser la detección del agente causal por un método de cultivo. Presuponemos que los 55 individuos controles están sanos, lo cual nos da un total de 110 ojos y puede realizarse el siguiente análisis:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Resultados negativos en grupo control}}{\text{Total de ojos en el grupo control}}$$

Anticuerpos monoclonales	=	$\frac{110}{110}$	=	1
hachivello	=	$\frac{103}{110}$	=	0.93
Simenez	=	$\frac{106}{110}$	=	0.96
Siensa	=	$\frac{108}{110}$	=	0.98

$$\% \text{ de falsos positivos.} = \frac{\text{Resultados positivos en grupo control}}{\text{Total de ojos en el grupo control}} \times 100$$

Anticuerpos monoclonales	=	$\frac{0}{110} \times 100$	=	0%
hachivello	=	$\frac{7}{110} \times 100$	=	6.3%
Simenez	=	$\frac{4}{110} \times 100$	=	3.6%
Siensa	=	$\frac{2}{110} \times 100$	=	1.8%

Como se observa, la técnica de anticuerpos monoclonales presenta la mayor especificidad y el menor porcentaje de falsos-positivos. Por tanto, suponiendo que es la técnica más adecuada y confiable (entre las técnicas empleadas), se tomará como referencia para evaluar las técnicas restantes.

Por la técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes, resultó positivo un 10% de la población estudiada. Es decir, que de un total de 200 ojos (muestras conjuntivales de estos) analizados, 20 resultaron positivos a C. trachomatis y 180 fueron negativos. Partiendo de estos datos, se realizó el análisis siguiente:

ANTICUERPOS MONOCLONALES FLUORESCENTES (prueba de referencia).

de pacientes con sintomatología muestreados = 100
= 200 ojos.

de pacientes con ensayo positivo = 10 = 20 ojos.

de pacientes con ensayo negativo = 90 = 180 ojos.

positivos a negativos a
C. trachomatis. C. trachomatis.

POSITIVO AL ENSAYO	20	0	
NEGATIVO AL ENSAYO	0	180	
TOTAL	20	180	200

$$\text{Sensibilidad} = \frac{20}{20} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{180}{180} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Porcentaje falsos post.} = \frac{0}{180} \times 100 = 0.0\%$$

$$\text{Porcentaje falsos negt.} = \frac{0}{20} \times 100 = 0.0\%$$

$$\text{Predicción valor post.} = \frac{20}{20} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Predicción valor negt.} = \frac{180}{180} \times 100 = 100\%$$

- # de pacientes muestreados = 100 = 200 ojos
 (20 ojos positivos a C. trachomatis)
 # de pacientes con ensayo positivo = 80 ojos.
 # de pacientes con ensayo negativo = 120 ojos.

Positivos a negativos a
C. trachomatis. C. trachomatis.

POSITIVO
 AL ENSAYO
 NEGATIVO
 AL ENSAYO

19	61
1	119

TOTAL 20 180 200

$$\text{Sensibilidad} = \frac{19}{20} \times 100 = 95.0\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{119}{180} \times 100 = 66.11\%$$

$$\text{Porcentaje falsos post.} = \frac{61}{180} \times 100 = 33.88\%$$

$$\text{Porcentaje falsos negt.} = \frac{1}{20} \times 100 = 5.0\%$$

$$\text{Predicción valor post.} = \frac{19}{20} \times 100 = 23.75\%$$

$$\text{Predicción valor negt.} = \frac{119}{120} \times 100 = 99.16\%$$

de pacientes muestreados = 100 = 200 ojos.

(20 ojos positivos a C.trachomatis)

de pacientes con ensayo positivo = 113 ojos.

de pacientes con ensayo negativo = 87 ojos.

Positivos a Negativos a
C.trachomatis. C.trachomatis.

POSITIVO AL ENSAYO	18	95	
NEGATIVO AL ENSAYO	2	85	
TOTAL	20	180	200

$$\text{Sensibilidad} = \frac{18}{20} \times 100 = 90.0\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{85}{180} \times 100 = 47.22\%$$

$$\text{Porcentaje falsos post.} = \frac{95}{180} \times 100 = 52.77\%$$

$$\text{Porcentaje falsos negt.} = \frac{2}{20} \times 100 = 10.0\%$$

$$\text{Predicción valor post.} = \frac{18}{113} \times 100 = 15.92\%$$

$$\text{Predicción valor negt.} = \frac{85}{87} \times 100 = 87.62\%$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

de pacientes muestreados = 100 = 200 ojos
(20 positivos a C. trachomatis)

de pacientes con ensayo positivo = 103 ojos.

de pacientes con ensayo negativo = 97 ojos.

Positivos a Negativos a
C. trachomatis. C. trachomatis.

POSITIVO
AL ENSAYO
NEGATIVO
AL ENSAYO

15	88
5	92

TOTAL 20 180 200

$$\text{Sensibilidad} = \frac{15}{20} \times 100 = 75.0\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{92}{180} \times 100 = 51.11\%$$

$$\text{Porcentaje falsos post.} = \frac{88}{180} \times 100 = 48.8\%$$

$$\text{Porcentaje falsos negt.} = \frac{5}{20} \times 100 = 25.0\%$$

$$\text{Predicción valor posit.} = \frac{15}{103} \times 100 = 14.56\%$$

$$\text{Predicción valor negat.} = \frac{92}{97} \times 100 = 94.84\%$$

TABLA I. Evaluación de las técnicas de tinción tradicionales usando como referencia la técnica de detección de C. trachomatis por anticuerpos monoclonales fluorescentes.

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	% FALSOS POSITIVOS	% FALSOS NEGATIVOS	PREDICCIÓN VALORES POSITIVOS	PREDICCIÓN VALORES NEGATIVOS
ANTICUERPOS MONOCLONALES.	100%	100%	0.0%	0.0%	100%	100%
MACHIAVELLO	90.0%	47.22%	52.77%	10.0%	15.92%	87.62%
GIEMSA	95.0%	66.11%	33.88%	5.0%	23.75%	99.16%
GIMENEZ	75.0%	51.11%	48.8%	25.0%	14.56%	94.84%

Sensibilidad = Probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la enfermedad esta presente.

Especificidad = Probabilidad de que la prueba sea negativa cuando la enfermedad no esta presente.

Falsos positivos = Probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la enfermedad no esta presente.

Falsos negativos = Probabilidad de que la prueba sea negativa cuando la enfermedad esta presente.

Predicción de valores positivos = Probabilidad de que la enfermedad este presente cuando el ensayo resulta positivo.

Predicción de valores negativos = Probabilidad de que la enfermedad no este presente cuando el ensayo resulta negativo.

DISCUSION

La sintomatología que presentan los pacientes, sugestiva de infección por Chlamydia trachomatis puede en muchos casos confundirse con la presentada por otros microorganismos, tales como Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus, Haemophilus aegyptius, Streptococcus pneumoniae, etc., lo cual dificulta seriamente el diagnóstico específico de la enfermedad, tal como lo expresan diferentes autores. (16)

Uno de los objetivos del trabajo era demostrar la eficacia de la toma de muestra de saco conjuntival con hisopo de algodón, para lo cual se aceptó el criterio estricto de que solamente serían válidas aquellas muestras en las que hubiera más de 10 células epiteliales en las laminillas de lectura. De las 310 muestras obtenidas en este estudio, ninguna fue rechazada, lo cual confirma que el método de hisopo de algodón es aceptable según había sido reportado anteriormente. (35)

En vista de que las técnicas de cultivo de C. trachomatis no resultan accesibles a la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico, el análisis de datos que aquí se utilizó conlleva la suposición (basada en los resultados obtenidos en el grupo control) de que la técnica de detección por anticuerpos monoclonales fluorescentes es 100% confiable y en base a esto se evalúan las técnicas de tinción tradicionales con respecto a la técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes, ya que no se cuenta en la literatura con datos precisos que señalen sensibilidad y especificidad de estas técnicas de tinción.

Algunos autores (Lennette, Mitschel H, Fotts NJ), recomiendan la técnica de tinción de Giemsa como la más confiable para el diagnóstico de la infección conjuntival causada por C. trachomatis; sin embargo, nuestros datos demuestran una baja especificidad (66.11%) y conjuntamente un alto porcentaje

de falsos positivos (33.88%) en comparación con la técnica de detección especie-específica para cuerpos elementales y cuerpos reticulares de C. trachomatis por anticuerpos monoclonales fluorescentes.

Analizando los resultados de sensibilidad y especificidad que presentan las técnicas de Machiavello y Gimenez, podemos concluir que estos métodos son definitivamente inadecuados para el diagnóstico de C. trachomatis, dado el número tan elevado de falsos positivos y falsos negativos, así como la poca credibilidad de los valores predictivos positivos.

En 48 de los pacientes estudiados se pudo obtener información respecto al tratamiento sintomático establecido previo al estudio de laboratorio y los resultados obtenidos. En 39 de ellos (81%) se observó una mejoría considerable al aplicar gentamicina por vía oftálmica, el resto 9 (19%) fueron tratados con kanamicina por vía oftálmica y también curaron. Es interesante hacer notar que a ninguno de estos 48 pacientes se les detectó infección por C. trachomatis por el método de anticuerpos monoclonales fluorescentes, aunque todos ellos dieron resultados falsos positivos por los métodos de tinción tradicional, lo cual apoya las afirmaciones hechas por otros autores de que en estos pacientes se presentan pseudoinclusiones que se colorean por estos métodos y que se confunden fácilmente con los cuerpos elementales y cuerpos reticulares de C. trachomatis. Tales pseudoinclusiones parecen ser estructuras nucleares, células calciformes, gránulos eosinófilos, gránulos de pigmento o bacterias. (1)

CONCLUSIONES

La especificidad de las técnicas de tinción tradicionales es baja, quizá por la presencia de pseudoinclusiones, las cuales llegan a ser confundibles con los cuerpos elementales de C. trachomatis.

La toma de muestra mediante raspado de saco conjuntival inferior con hisópo estéril, es adecuada para el diagnóstico de C. trachomatis, ya que de 310 ojos muestreados ninguno se rechazó por tener menor número de células epiteliales que el criterio de selección establecido.

La sintomatología sugestiva de infección conjuntival por C. trachomatis puede en algunas ocasiones confundirse con infección conjuntival de tipo bacteriano.

Cuando hay infección conjuntival bacteriana por agentes etiológicos no totalmente identificados que responden al tratamiento oftálmico de antibióticos (Gentamicina, Kanamicina) tiende a presentarse un incremento de falsos positivos.

Según los datos obtenidos en este estudio, se observa que las técnicas de tinción tradicionales aquí evaluadas presentan de manera generalizada un elevado porcentaje de falsos positivos y negativos. Las técnicas de Machiavello y de Gimenez resultaron tener valores de especificidad muy bajos y consiguientemente un número de falsos positivos muy elevado, por lo cual no se recomienda su utilización en el diagnóstico oftalmológico de C. trachomatis. La técnica de Giemsa tiene una sensibilidad más o menos elevada aunque su especificidad es baja y su valor predictivo positivo muy deficiente; el número de falsos negativos es aceptable y podríamos considerarla una técnica de diagnóstico alternativa siempre que no se cuente con otros métodos más confiables.

La técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes es

altamente específica y sensible para el antígeno lipopolisacárido de superficie de los cuerpos elementales y cuerpos reticulares de Chlamydia trachomatis, lo que hace de esta la técnica hasta hoy más adecuada y confiable (después del cultivo) para el diagnóstico de infección clamidial conjuntival.

BIBLIOGRAFIA:

1. ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA EN ESCUELAS DE MEDICINA A.C. "microbiología médica". tomo II
Editor y distribuidor Francisco Méndez Oteo.
México, D.F. 1982
2. BELL TA; KUO CC; STAMM WE; TAM MR; STEPHENS RS; HOLMES KK; & GRAYSTON JT. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant Chlamydia trachomatis infections. Pediatrics 1984 74(2): 224-228
3. BIALASIEWICZ AA; BARTHELMESS S; LANG GK; JAHN GJ; BLENK H. Evaluation of infectious, inflammatory external eye diseases. Klin Monatsbl Augenheilkd 1984 ; 185(3): 174-176
4. CHANDLER R. DAWSON M.D. Conjunctivitis of incl. (paratrachoma chlamydial). Current Ocular Therapy 2. Associate Editor.- W.B. Saunders Company. 1985
5. CHIRAMBO MC; TIZAZU T. Ocular disease and ophthalmic services in Malawi. Soc Sci Med 1983; 17(22): 1173-80
6. DAVIDSOHN I. & HENRY J.B. TODD-SANFORD. "Diagnóstico clínico por el laboratorio". Edit.- Salvat Sexta edición España 1981
7. DAVIES B.D. DULBECCO R. et al. "Tratado de Microbiología".

Edit.- Salvat
 Segunda edición
 España 1980

8. DARDUGAR S; WOODLAND RM; JONES BR; HOUSHMAND A; FARAHMANDIAN HA. Comparative sensitivity of fluorescent antibody staining of conjunctival scrapings and irradiated McCoy cell for the diagnosis of hyperendemic trachoma. Br J Ophthalmol 1980 ; 64(4): 276-278
9. DEAN D; PALMER L; PANT CR; COURTRIGHT F; FALKOW S; O'HANLEY P. Use of a Chlamydia trachomatis DNA probe for detection of ocular chlamydiae. J Clin Microbiol 1989 ; 27(5): 1062-7
10. GILL PEARNS, SHIRLEY J. RICHMOND AND CHRISTOPHER C. STOREY. Sensitive immune dot blot test for diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. J Clin Microbiol 1988; 26: 1810-1813
11. GONZALEZ ALMARAZ GABRIEL, FINEDA CARDENAS M. Diagnóstico citológico de la conjuntivitis por Chlamydia trachomatis. Revista mexicana de Oftalmología. 1987; 61 No.4
12. GRAYSTON JT; WANG SP; YEH LJ; KUO CC. Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. Rev Infect Dis 1985 ; 7(6): 717-25
13. HARDING SP; MALLINSON H; SMITH JL; CLEARKIN LG. Adult follicular conjunctivitis and neonatal ophthalmia in a Liverpool eye hospital, 1980-1984. Eye 1987; 1(4): 512-521

14. LENNETTE, E.H.; BALLOWS A; HAUSLER W.J; TRUANT J.
 "Manual of Clinical Microbiology".
 Edit.- American Society for Microbiolo_
 gy.
 4ht edition.
 U.S.A. 1985

15. HOWARD LAWRENCE V; COLEMAN PAUL F; ENGLAND BJ; &
 HERRMANN JOHN E. Evaluation of chlamy_
 diazyme for the detection of genital
 infections caused by Chlamydia
trachomatis. J Clin Microbiol 1986
 23(2): 329-332

16. LIEVE FRANSEN, HERBERT NSANZE, VOLKERKLAUSS.
 Ophthalmia neonatorum in Nairobi, Kenya:
 the roles of Neisseria gonorrhoeae and
Chlamydia trachomatis. J Infect Dis
 1986 ; 153(5): 862-869

17. MOHAMMED NR; HILLARY IB. Detection of Chlamydia
trachomatis inclusions in McCoy and
 HeLa-229 cells: an alternative staining
 technique using toluidine blue.
 J Clin Pathol 1984 ; 37(6): 682-685

18. NABLI B. Human chlamydial infections.
 Nov Presse Med 1980 ; 9(6): 371-374

19. PETERSON ELLENA M, AND DE LA MAZA LUIS M.
 Restriction endonuclease analysis of
 DNA from Chlamydia trachomatis biovars.
 J Clin Microbiol 1987 ; 26(4):
 625-629

20. POTTS MJ; PAUL ID; ROOME AP; CAUL ED. Rapid
 diagnosis of Chlamydia trachomatis
 infection in patients attending an
 ophthalmic casualty department. Br J
 Ophthalmol 1988; 70(9): 677-680

21. ROBLIN PATRICIA M, HAMMERSCHLAG MARGARET R,
CUMMINGS CYNTHIA, WILLIAMS THERESA H,
AND WORKU MULGETA. Comparison of two
rapid microscopic methods and culture
for detection of Chlamydia trachomatis
in ocular and nasopharyngeal specimens
from infants. J Clin Microbiol 1989
27(5): 968-970
22. RONNERSTAM R; PERSSON K. Chlamydial eye infection
in adults. Scand J Infect Dis Suppl
1982; 32; 111-115
23. SAN-PIN WANG, CHIO-CHOU KUO, ROBERT C. BARNES,
RICHARD S. STEPHENS, AND J. THOMAS G.
Immunotyping of Chlamydia trachomatis
with monoclonal antibodies. J Infect
Disea 1985;23(4): 324-329
24. S. DAROUGAR AND N.D. VISWALINGAM. Immunodiagnosis
of adult chlamydial conjunctivitis.
British Journal of Ophthalmology 1988;
72(10): 415-421
25. S. DAROUGAR M.D., D.T.M. & F.R.C. PATH AND N.
VISWALINGAM M.D.- Trachoma.
Current Ocular Therapy 2.
Associate Editor.- W.B.Saunders Company
1985
26. SCHACHTER J. MONCADA. C.R. DAWSON, J.SHEPPARD,
P. COURTRIGHT, M.E. SAID, S. ZAKI, S.F.
HAFEZ, AND A. LORINEZ. Nonculture
methods for diagnosing chlamydial
infection in patients with trachoma: A
clue to the pathogenesis of the disease
J Infect Disea 1988; 156(6): 1347-1352

27. TORROELLA, J.J. PORTILLO.- Tracoma
Arch. APEC. 1984; 3(2): 45-48
28. TAYLOR HR, AGARWALA N, JOHNSON SL. Detection of
experimental Chlamydia trachomatis eye
infection in conjunctival smears and in
tissue culture by use of fluorescein-
conjugated monoclonal antibody. J Clin
Microbiol 1984 20(3): 391-395
29. TAYLOR HR; JOHNSON SL; SCHACHTER J; CALDWELL HD;
PRENDERGAST RA. Pathogenesis of trachoma
the stimulus for inflammation.
J Immunol 1987 138(9): 3023-3027
30. TILTON RICHARD, JUDSON FRANKLYN, BARNES ROBERT,
GRUNINGER ROBERT, RYAN RAYMOND AND
STEINGRIMSSON OLAFUR. Multicenter
comperative evaluation of two rapid
microscopic methods and culture for
detection of Chlamydia trachomatis in
patient specimens. J Clin Microbiol.
1988; 26(2): 167-170
31. WATKINS G. NANCY, CALDWELL D. HARLAN, AND
HACKSTADT TED. Chlamydial hemagglutinin
identified as lipopolysaccharide.
J Bacteriol 1987 ; 169(8): 3826-28
32. WILLIAMS DM, SCHACHTER J. Role of cell-mediated
immunity in chlamydial infection:
implications for ocular immunity. Rev
Infect Dis 1985 7(6): 754-9
33. WITSCHEL H; SUNDMACHER R; HARNISCH JP; DAROUGAR
S; MATTES A; BREDT W. Chlamydial
disease of the eye: a report on 27
cases. Klin Monatsbl Augenheilkd 1981
179(3): 149-156

34. MANUAL PARA EL EMPLEO DEL EQUIPO PARA DIAGNOSTICO IN VITRO DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS DIRECTO. Kallestad Pathfinder (MERCK).
35. CDC Laboratory Update: Isolation of C. trachomatis in cell culture. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, 1980.
36. GRINER et al. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. Ann Intern Med. 1981; 94(4): 557-592.