



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETECCIÓN DE *Chlamydia trachomatis* POR PCR EN CÉLULAS
McCOY INFECTADAS CON ASPIRADO BRONQUIAL DE NEONATOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

FERNANDO FLORES GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. MARCELA LÓPEZ HURTADO

ASESOR DE TESIS

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA



MÉXICO, D.F.

2011



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 esta 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.

DEDICATORIAS

Mamá, papá y hermanos, no me equivoco si les digo que son la mejor familia del mundo, los amo.

A mi mamá Rosa, gracias por todo tu esfuerzo, tu apoyo y confianza que depositaste en mí, gracias por estar a mi lado siempre.

A mi papá Miguel Ángel, gracias por ser mi papá y por creer en mí, por todo tu empeño y dedicación, por tus lecciones y enseñanzas infinitas gracias.

A los dos les agradezco por todo su apoyo, confianza, fe y sobre todo por el amor y cariño que me han dado.

A mis hermanos Chayo y Miguel, gracias por siempre apoyarme, por sus consejos, paciencia y sobre todo por su amor fraternal que me han dado.

Por eso, esta tesis se las dedico a ustedes, mi familia, gracias por compartir su vida conmigo, gracias por estar en un momento tan importante en mi vida, pero sobre todo gracias por ser mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Guerra y a la maestra Marcela López, por su dedicación, paciencia, esfuerzo, confianza, conocimiento, amistad y sobre todo por su cariño y aprecio, gracias porque sin ustedes esta tesis no sería una realidad.

Al Dr. Rubén Marroquín por su apoyo, por compartir su conocimiento, por su sencillez y por su amistad y aprecio, por los cafés y las galletas, gracias por todo profe.

Por mis sinodales, la maestra Fabiola, la Dra. Raque y el Profesor Javier, gracias por su atención, apoyo dedicación y confianza que tuvieron hacia mí.

A personas tan increíbles, cada uno en una manera muy especial forman parte de mi vida, personas que he llegado a querer mucho y que son muy especiales para mí. Gracias Cabash, Richo, Nacho, Rox, Eli Bonilla, Geno, Beca, Nai, Satán, Sandy, Belén, Eli Lazalde, Fabi, Vale, Chucho, Jessi, Wen, Kise, Pau, Abuela, Aldo, Lesli, Arturo y Viri, gracias por esos momentos tan geniales que hemos pasado y los que aún nos falta por vivir.

A mis maestros en especial a Paty, Queta, Ruth, Gabriel, Lili, Magín, Marisol, Idalia, Isabel, Víctor, Gloria, Felipe, Estelita, Lulú y por ultimo pero no menos importante a José Luis, que gracias por sus conocimientos, apoyo, confianza y amistad.

A mis amigos del stunam, Bravo, Chava, Luis, Martín y Saúl, gracias por su ayuda, por las retas de básquet, por las parrilladas pero sobre todo gracias por su amistad.

A la gente del INPer Selene, Mike, Irma, Chela, Iyary, Diana, Pili, Oscar, Benito, Lupita, Richi, Gabriel y Lidia solo puedo decirles gracias por su apoyo durante el tiempo que llevo esta tesis.

A todos mis amigos que no los nombro porque no quiero que ninguno se me vaya a olvidar, a todos los que están compartiendo este momento tan importante para mí, solo me queda decirle mil gracias por todo.

*"Si yo tuve la suerte de alcanzar algo, esto se debe solo a que me apoyé en hombros de gigantes".
Newton*

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Clasificación.....	3
Figura 1. Clasificación actual y anterior de <i>C. trachomatis</i>	3
Estructura	4
Figura 2. Representacion de la membrana de <i>C. trachomatis</i>	5
Ciclo de vida	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>C. trachomatis</i>	7
Mecanismo de infección	7
Antígenos	8
Genoma de <i>C. trachomatis</i>	8
Factores de virulencia	9
Figura 4. Serotipos de <i>C. trachomatis</i> que producen enfermedades en el hombre	10
Epidemiología	10
Métodos de diagnóstico.....	12
Detección Directa	12
Inmunofluorescencia Directa	13
Cultivo celular	13
Determinación de Antígenos por el método de ELISA.....	14
Detección de Anticuerpos	15
Fijación del Complemento	15
Microinmunofluorescencia Indirecta.....	15
Técnicas Moleculares.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
OBJETIVOS.....	18
HIPÓTESIS.....	19

MATERIALES	20
Reactivos	20
Material.....	21
Equipo	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
Tipo de estudio	23
Se realizo un estudio de tipo prospectivo y transversal.....	23
Población de estudio.....	23
Identificación de <i>C. trachomatis</i> en cultivo celular	23
Cultivo celular.....	23
Observación microscópica	24
Diagnóstico de <i>C. trachomatis</i> por PCR	24
Obtención de DNA.....	24
Integridad del DNA	25
Concentración de DNA.....	25
Amplificación de DNA de <i>Chlamydia</i> mediante PCR.....	25
Detección del DNA de <i>C. trachomatis</i> posterior al PCR.....	26
Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS	28
Figura 5. Inmunofluorescencia de cultivo de celulas McCoy infectadas con <i>C. trachomatis</i>	28
Figura 6. Integridad del DNA en gel de agarosa de celulas McCoy infectadas con <i>C. trachomatis</i>	28
Figura 7. Ampliifcación de 129 pb de <i>C. trachomatis</i> despues de PCR.....	29
Tabla 1. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF como referencia	30
Tabla 2. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR como referencia	30
Sensibilidad y especificidad de la PCR e IMF con respecto a la presencia de datos clínicos.	30
Tabla 3. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta SDR	31
Tabla 4. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta SDR	31
Tabla 5. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta RPM	31

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta RPM	32
Tabla 7. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta DBP	32
Tabla 8. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta DBP	32
Tabla 9. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta sepsis	33
Tabla 10. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta sepsis ..	33
Tabla 11. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta RNPT ...	34
Tabla 12. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta RNPT ...	34
Factores y riesgo relativo de infección por <i>C. trachomatis</i>	34
Tabla 13. Datos socioeconómicos y ginecológicos de las madres de RN infectados con <i>C. trachomatis</i> diagnosticados por IMF directa	37
Tabla 14. Datos socioeconómicos y ginecológicos de las madres de RN infectados con <i>C. trachomatis</i> diagnosticados por PCR.....	38
Tabla 15. Signos clínicos de RN infectados con <i>C. trachomatis</i> detectados por IMF directa.....	39
Tabla 16. Signos clínicos de RN infectados con <i>C. trachomatis</i> detectados por PCR	40
Tabla 17. Datos ginecológicos de las madres de los RN infectados con <i>C. trachomatis</i> detectados por IMF directa	41
Tabla 18. Datos ginecológicos de las madres de los RN infectados con <i>C. trachomatis</i> detectados por PCR	42
Tabla 19. Medidas antropométricas de los RN infectados con <i>C. trachomatis</i> diagnosticados por IMF directa..	43
Tabla 20. Medidas antropométricas de los RN infectados con <i>C. trachomatis</i> diagnosticados por PCR	44
Discusión	45
Tabla 21. Sensibilidad y especificidad obtenida en la prueba piloto para la PCR después de cultivo	47
Tabla 22. Sensibilidad y especificidad obtenida en la prueba piloto para la PCR muestra directa	47
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
c-hsp60	Proteína de choque térmico de 60 kDa <i>Chlamydia</i>
DBP	Displasia broncopulmonar
DNA	Acido Desoxirribonucleico
EB	Cuerpo elemental
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
h-hsp60	Proteína de choque térmico de 60 kDa humana
IMF	Inmunofluorescencia
INF- γ	Interferon gamma
kDa	Kilodalton
LCR	Reacción en cadena de la ligasa
LPS	Lipopolisacarido
MEM	Medio mínimo esencial
MOMP	Proteína mayor de membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RB	Cuerpo reticulado
RN	Recién nacido
RNA	Acido ribonucleico
RNTP	Recién nacido pretérmino
RPM	Ruptura prematura de membranas
rpm	Revoluciones por minuto
SDR	Síndrome de dificultad respiratoria
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

RESUMEN

C. trachomatis es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada y de transmisión sexual. En las mujeres, una infección en el sistema reproductivo puede conducir a una enfermedad inflamatoria pélvica, la cual puede conducir a infertilidad y durante el embarazo aumenta el riesgo de aborto, óbito, RPM, partos prematuros y neonatos con conjuntivitis y/o neumonía. La incidencia de infección por *C. trachomatis* es de 3 a 10 por cada 1000 nacidos vivos y el porcentaje de conjuntivitis es del 45 al 55%. Su detección requiere pruebas de diagnóstico laboriosas, caras y de difícil acceso.

En este trabajo se analizaron 100 muestras de aspirado bronquial de recién nacidos con dificultades respiratorias, con sospecha de infección por *C. trachomatis* por PCR, estableciendo las condiciones óptimas para desarrollar esta técnica a partir de células McCoy que han sido previamente infectadas con las muestras.

Los resultados obtenidos fueron de 43 muestras positivas y 47 negativas. Con estos se calculó una sensibilidad de 50% y una especificidad de 62.96%.

INTRODUCCIÓN

C. trachomatis es un microorganismo de transmisión sexual y la infección genital causada por esta bacteria suele cursar con poca o nula sintomatología, y durante el embarazo aumenta el riesgo de aborto, óbito, RPM, partos prematuros y neonatos con conjuntivitis y/o neumonía. La incidencia de infección por *C. trachomatis* es de 3 a 10 por cada 1000 nacidos vivos y el porcentaje de conjuntivitis es del 45 al 55%. Este microorganismo tiene un ciclo de vida intracelular obligado, por lo que su detección requiere pruebas de diagnóstico laboriosas, caras y de difícil acceso. En el caso de los recién nacidos la detección de este patógeno se realiza mediante el cultivo microbiológico del aspirado bronquial en células McCoy, ya que las técnicas moleculares en muestras directas no son empleadas debido a la presencia de moco que inhibe la prueba de PCR. El objetivo de esta investigación es establecer las condiciones adecuadas de la técnica de PCR para la detección de *C. trachomatis* en células McCoy, que han sido infectadas con muestras de aspirado bronquial de recién nacidos. Además comparar esta metodología contra el diagnóstico de *C. trachomatis* por IMF para determinar la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos de la prueba de PCR.

MARCO TEÓRICO

Clasificación

C. trachomatis pertenece a la familia *Chlamydiaceae*, la cual está formada por bacterias que son parásitos intracelulares obligados de las células eucariotas. Aunque a diferencia de otras familias, la familia *Chlamydiaceae* tiene un ciclo de vida distintivo para su replicación (1,2). Los miembros de esta familia son trivialmente denominado clamidias. Hasta el 2001 la familia *Chlamydiaceae* constaba de cuatro especies reconocidas: *C. trachomatis*, *C. psittacii*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*. A partir de ese año se creó una nueva clasificación en donde *C. psittacii*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum* pertenecen al género *Chlamydophila*, y *C. trachomatis* se clasificó dentro del género *Chlamydia*, junto con *C. suis* y *C. muridarum*, siendo *C. trachomatis* la única causante de enfermedad en los humanos. (1,3,4)

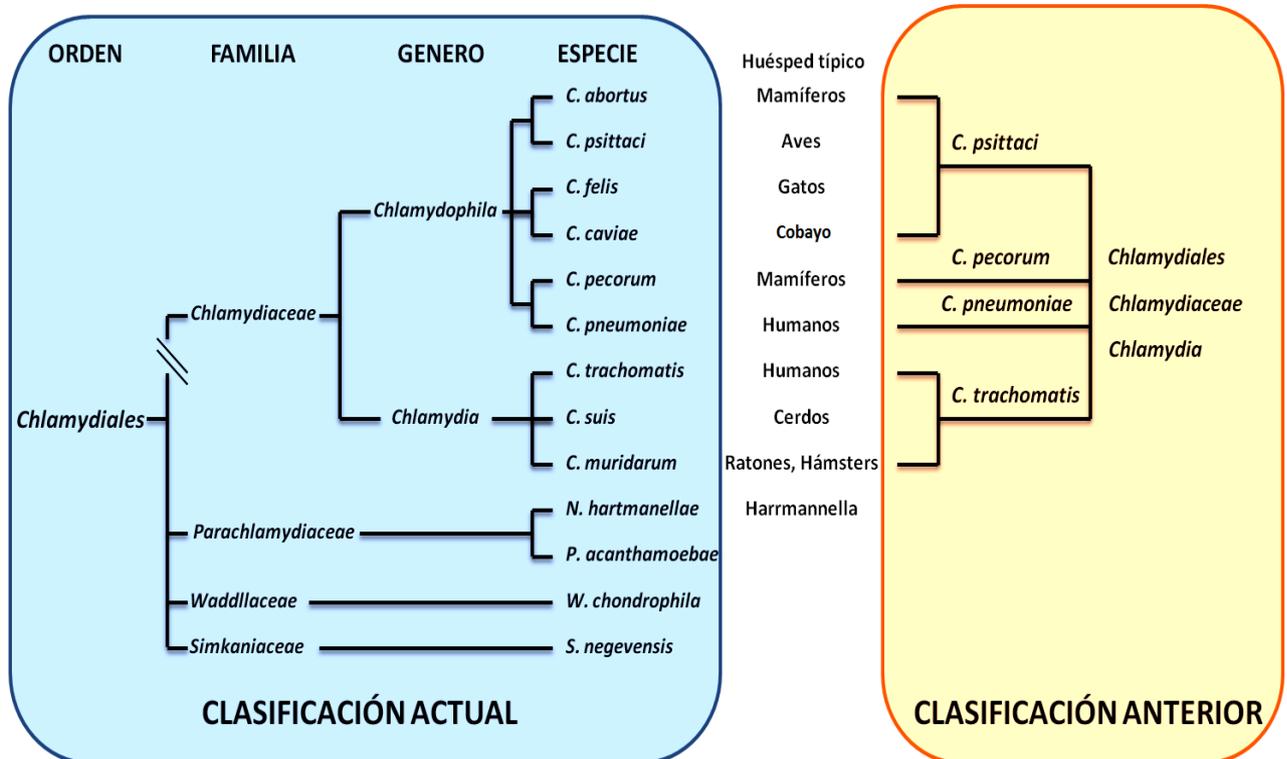


Figura 1. Clasificación actual y anterior de *C. trachomatis*.

C. trachomatis es una bacteria con estructura de Gram negativa ya que tiene una pared celular carente de peptidoglucano pero con lipopolisacáridos específicos del género, es una bacteria intracelular obligada por su incapacidad para producir ATP. Infecta células epiteliales de la mucosa ocular, respiratoria y genitourinaria, así como macrófagos. (5)

Estructura

C. trachomatis, presenta una morfología esférica u ovalada y se observan como cocos, son inmóviles no ciliadas, con una membrana interna y otra externa y tienen un ciclo de crecimiento único que implica dos formas denominadas cuerpo elemental y cuerpo reticulado o de inclusión, los cuales representan las formas extracelulares e intracelulares respectivamente de esta bacteria. (6)

Los cuerpos elementales (EB) son estructuras redondeadas, diminutas, infecciosas, rígidas que se liberan cuando se lisa la célula huésped infectada, tienen un tamaño de 200 a 400 nm y con la coloración de Giemsa se tiñen de color púrpura. (5,7,8)

En los EB se encuentra el DNA y el RNA. La mayor parte de DNA se encuentra en el nucleoide central y la mayor parte del RNA está en los ribosomas. Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica y no se pueden replicar. (5,7,8)

Los cuerpos reticulados (RB) son el resultado de la diferenciación de los EB al ser fagocitados, tienen una morfología bacilar, están desprovistos de nucleoide y su tamaño es de 600 a 1000 nm, no son infecciosos. Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse, tienen actividad metabólica y el ADN se encuentra disperso. (5,7,8)

La membrana de los RB presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los cuerpos

elementales para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Los RB son frágiles en comparación con los EB. (5,7,8)

Las proteínas de la membrana externa ricas en cisteína incluyen:

a) Proteína mayor de membrana externa (MOMP) la cual se expresa en la envoltura del cuerpo elemental, pesa 40 kDa, constituye casi el 60% del total de las proteínas de la membrana externa y está codificada por el gen *omp1* o *ompA*; muestra una función de porina y se glucosida post-traduccion. Actualmente, se ha visto que participa en la adherencia electrostática y contiene epitopes antigénicos de superficie. (5, 9)

b) Proteína de 60 kDa. Esta proteína está codificada por el gen *omp2*. Se encuentra en el espacio periplásmico, dando una integridad semejante a la dada por el peptidoglucano. Los cuerpos reticulados no contienen la proteína de 60 kDa.(5, 9)

c) Proteína de 12-15 kDa: codificada por el gen *omp3*, es una lipoproteína hidrofílica. Los RB no la contienen. (5).

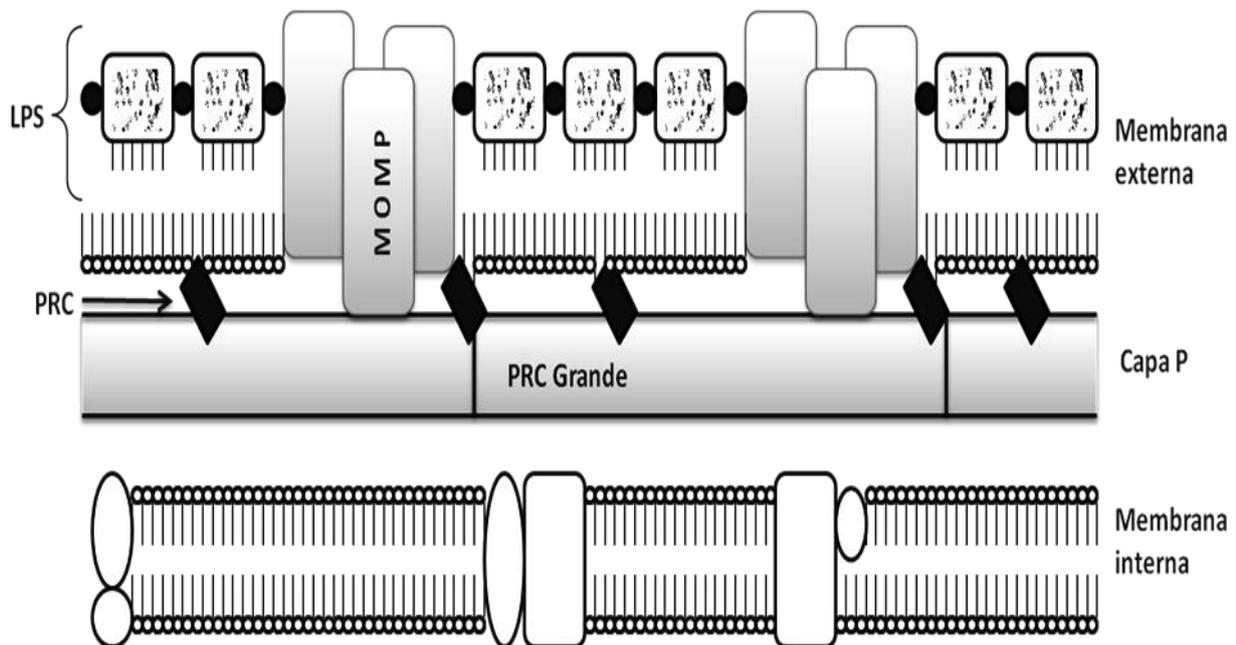


Figura 2. Representacion de la membrana de *C. trachomatis*. (5)

La proteína de choque térmico humana de 60 kDa (h-hsp60), muestra una secuencia de aminoácidos con una homología del 50% con la hsp60 de *Chlamydia* (c-hsp60). Por lo tanto, una infección por *Chlamydia* en la trompa de Falopio puede inducir el desarrollo de autoanticuerpos contra la h-hsp60. La expresión de esta proteína en una etapa temprana del embarazo puede reactivar los linfocitos c-hsp60 sensibilizados por una infección persistente previa por *C. trachomatis*, que conduce a rechazo inmunológico del embrión. La detección y tratamiento de una infección recientemente adquirida puede prevenir el desarrollo de autoanticuerpos h-hsp60, la oclusión tubárica, y las complicaciones tales como el embarazo ectópico preservando la fertilidad. (7,10,11)

C. trachomatis posee proyecciones hemisféricas de superficie especializadas, cuyo diámetro es de aproximadamente 40 nm, con una altura de 30 nm y la distancia entre cada una de ellas es de 25 nm. Están separadas por pequeñas depresiones con bases planas, las cuales se cree que participan en la adhesión de los EB a la célula huésped. (5)

También existen proyecciones puntiagudas que son formas intermedias entre los cuerpos EB y RB, se originan debajo de las depresiones de la membrana plasmática y se extienden a través del espacio periplásmico y la membrana externa, con una longitud total aproximada de 90 nm, de los cuales 25 a 35 nm se proyectan más allá de la superficie; lo cual sugiere que estas "púas" podrían ser conexiones entre la célula huésped y *Chlamydia*, al igual que lo son los LPS el cual es un sistema de secreción tipo III. (5)

Ciclo de vida

Las Chlamydias tienen un ciclo reproductivo común. La partícula infectante es estable en el ambiente, es una célula pequeña (EB). Para adherirse a las células huésped requiere que tenga un receptor de sulfato de heparan (parecido a la glucosamina). Después de la adhesión, el EB se introduce por fagocitosis a la célula huésped dentro de una vacuola derivada de la membrana superficial. Este EB se reorganiza en uno más

grande (RB). Dentro de la vacuola rodeada por una membrana, el RB aumenta de tamaño y se divide varias veces por fisión binaria. Con el tiempo toda la vacuola se encuentra llena de EB derivados de la fisión binaria de los RB para formar una inclusión en el citoplasma de la célula huésped. Los EB recién formados pueden liberarse de la célula huésped para infectar nuevas células. El ciclo de reproducción dura de 24 a 72 horas. (5,7, 12, 13)

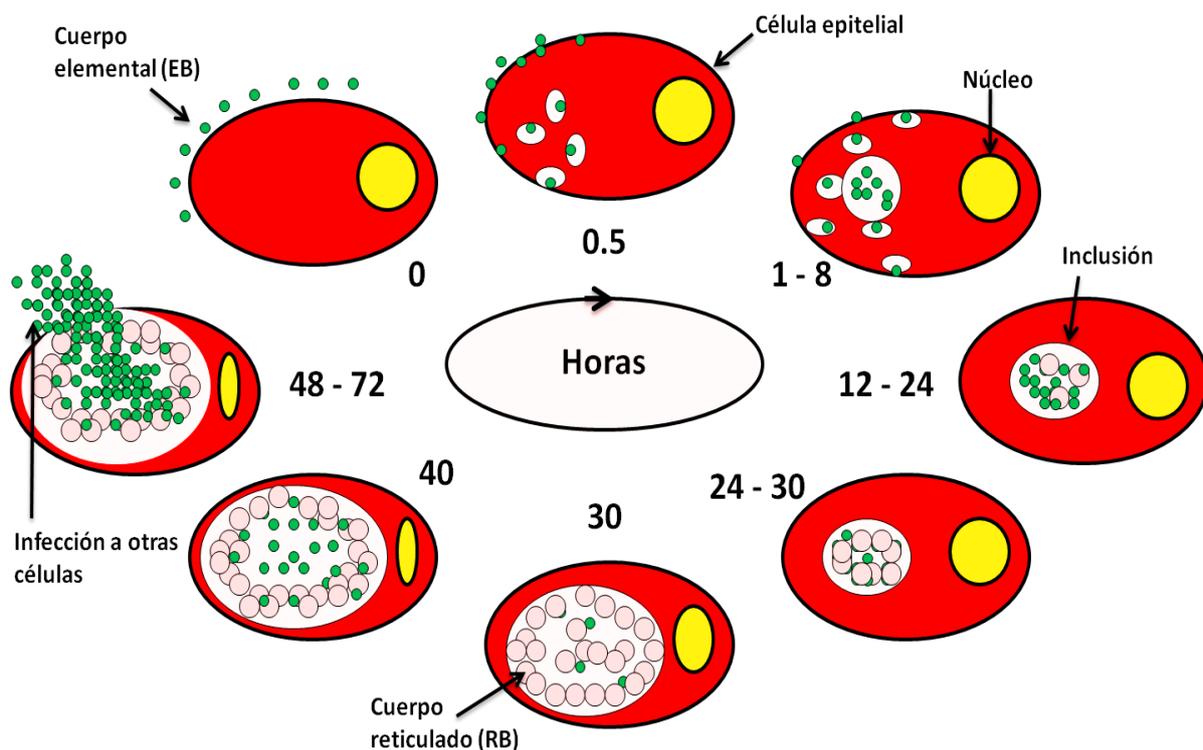


Figura 3. Ciclo de vida de *C. trachomatis*. (1)

Mecanismo de infección

De acuerdo a los resultados obtenidos en modelos animales de experimentación se ha propuesto el siguiente mecanismo por el cual *C. trachomatis* produce una oclusión de las trompas de Falopio:

Los EB de *C. trachomatis* en el semen de un hombre infectado se transmiten a su compañera. Estos ascienden por el aparato reproductivo femenino e infectan las células

epiteliales de las trompas de Falopio. Dentro de las células epiteliales los EB se convierten en RB y comienzan a replicarse. En ese momento, la vías que conducen a la apoptosis de la célula infectada se bloquean, asegurando la supervivencia de los RB. Cuando los EB llegan a una cierta densidad son liberados de las células epiteliales e infectan las células epiteliales vecinas. Como respuesta del huésped a los EB extracelulares se activa su sistema inmunológico liberando IFN- γ , TNF- α y otras citocinas. La respuesta inmune primaria mantiene bajo el número de EB e inhibe la replicación intracelular de los RB. La interrupción de la replicación del RB permite que *Chlamydia* persista en esta forma intracelular para escapar de la respuesta inmune. De esta forma la c-hsp60 es liberada persistentemente, induciendo inflamación localizada. Cuando la concentración de EB se reduce por debajo de un cierto nivel crítico, se detiene la activación del sistema inmune por lo que se reanuda la replicación del RB. De esta manera, alternando ciclos de infección primaria con la destrucción de nuevas células epiteliales y persistencia intracelular con liberación de c-hsp60, eventualmente la infección resulta en la formación de cicatrices y el daño a la permeabilidad de las trompas de Falopio. (5,7,11,13,14,15,16)

Antígenos

Las Chlamydias poseen antígenos específicos de tipo lipopolisacáridos termoestables con el ácido 2 -ceto 3 -KDO. Se pueden detectar anticuerpos contra estos antígenos mediante fijación de complemento o inmunofluorescencia. Los antígenos específicos de especie o específicos de variedad serológica son principalmente proteínas de membrana externa que se describieron anteriormente. (5,17,18)

Genoma de *C. trachomatis*

C. trachomatis tiene un genoma cromosómico de 1042519 pb, (con 58.7% de A-T). El análisis genómico ha mostrado que codifica para 875 proteínas aproximadamente, 70 de

las cuales son exclusivas de *C. trachomatis* y tiene un plásmido críptico de 7493 pb que no posee la *C. pneumoniae*. (5,19)

Es importante mencionar que la región cercana al origen de la replicación del cromosoma es donde existe mayor diversidad genética. Esta región incluye genes que controlan la síntesis y el papel del triptófano, el cual se ha relacionado con la función del IFN- γ y con el desarrollo de la infección persistente. (5)

Todos los plásmidos de *C. trachomatis* aislados de humanos son extremadamente similares con menos de un 1% de variaciones en la secuencia de nucleótidos, tienen alrededor de 7500 nucleótidos, con 8 marcos abiertos de lectura. (5,20)

Factores de virulencia

Numerosos factores de virulencia contribuyen a la patogenia de *C. trachomatis*. La colonización de *Chlamydia* comienza con la unión a los receptores de ácido siálico en ojos, garganta u órganos genitales. Persisten en sitios del cuerpo inaccesibles a los fagocitos y células T y B. (16,21)

Uno de los problemas importantes para el desarrollo de anticuerpos es que *Chlamydia* es un organismo intracelular que libera antígenos de acuerdo con su ciclo de vida, de 48 a 72 horas. Además, el microorganismo infecta a la célula vecina mediante puentes intracitoplasmáticos, sin que se exponga la bacteria al espacio extracelular. (11,21)

Dentro de las proteínas codificadas por la familia de genes omp, está la MOMP, codificada por el gen omp1 con un peso molecular de 40 kDa, la cual representa aproximadamente 60% del total de las proteínas de la membrana, presenta diversas funciones entre las que se encuentran: la integridad estructural de la membrana, la acción de porina y la de adhesión. Basados en el análisis de esta proteína, la bacteria ha clasificado en 18 serotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a, L3, L3a. (5,22)

La MOMP contiene cuatro dominios variables (VS) que están flanqueados e interespaciados por cinco dominios constantes. Tres de los cuatro DV (VS1, VS2 y VS4) se encuentran en la superficie y contienen epítopes antigénicos que son sitios blanco para la serotipificación.

Otras proteínas que han sido identificadas y que tienen propiedades de adhesión son de 18, 28 y 82 kDa. (5,23,24,25)

Las proteínas de 60 kDa y 12 kDa (codificadas por los genes *omp2* y *omp3*) son ricas en cisteínas y se encuentran solamente en los EB. Este después de la adhesión es fagocitado, el cual permanece en la vacuola fagocítica y obstaculiza la fusión de los fagolisosomas por bloqueo de la degranulación. (23,26)

La proteína de 60 kDa ha sido considerada como el sitio de unión por el cual se une el heparán sulfato, de la célula huésped. Las proteínas de 98 kDa (complejo proteico codificado por el gen *omp4-15*), tiene una función que provee de resistencia al tratamiento con tripsina, siendo también un factor de virulencia de la bacteria. (23,27)

Serotipo	Enfermedad que causa
A, B, Ba, C	Tracoma ocular
D, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Enfermedad Pélvica Inflamatoria (EPI) Salpingitis Uretritis no gonocócica
L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo

Figura 4. Serotipos de *C. trachomatis* que producen enfermedades en el hombre

Epidemiología

En la actualidad, se reconoce a *C. trachomatis* como el principal microorganismo transmitido sexualmente, con más de 50 millones de casos nuevos por año. La Organización Mundial de la Salud estimó que en 1995 ocurrieron 89 millones de casos en

el mundo (5). Aproximadamente el 75% de las mujeres infectadas y el 50% de los hombres infectados son asintomáticos. En mujeres embarazadas, la infección por *C. trachomatis* también constituye un problema de salud. Se ha reportado una prevalencia de infección del 2% al 35% en el cuello uterino de mujeres embarazadas, esta situación es preocupante porque la infección tubaria puede degenerar en obstrucción permanente y como consecuencia de ello producir infertilidad, o cuando se ocasiona obstrucción parcial puede presentarse embarazo ectópico. (16,28,29)

En algunos reportes se menciona que *C. trachomatis* está presente en el 71% de los casos de infertilidad masculina y aunque no se conocen los mecanismos por los que este microorganismo deteriora la fertilidad del hombre, se ha reportado su adherencia y penetración al citoplasma del espermatozoide. Pueden presentarse complicaciones como epididimitis o infección de los ductos espermáticos de los testículos. Aunque es causa del 40 al 60% de las uretritis no gonocócicas de los varones, en los últimos años se ha demostrado una disminución en el porcentaje de individuos con esta patología (10-20%). (8,30,31)

También se ha documentado que los niños nacidos a través del canal del parto infectado son más susceptibles de adquirir la infección por *Chlamydia*. Entre estos infantes el riesgo de desarrollar conjuntivitis de inclusión varía desde 18% hasta 50% y el riesgo de neumonía desde 3% hasta 20%. También puede producir en el recién nacido otros procesos como rinitis, rinofaringitis, otitis y vulvitis. (20,24,31,32)

En los Estados Unidos, las infecciones bacterianas por *C. trachomatis* son las más comúnmente reportadas con 4.5 millones de casos anualmente. En México son escasos los datos epidemiológicos sobre la prevalencia de infección cervical, aunque hay publicaciones que indican que es del 9% en población abierta, 16% en mujeres embarazadas y 18% en mujeres infértiles. (5,17,33)

El linfogranuloma venéreo es una enfermedad sistémica producida por los tipos L1-L3 de *C. trachomatis* y que inicia con la aparición de una pápula o vesícula en la piel de la región genital, la infección se difunde por vía linfática, de manera que desde el primer mes se produce una adenitis inguinal que se reblandece y forma un absceso que posteriormente se hace fistula y abre hacia el exterior. Le sigue una fase de esclerosis, con formación de estenosis en el recto, uretra o vagina. El linfogranuloma venéreo ocurre con baja frecuencia en Norteamérica y Europa pero es común en Africa, Asia y Sudamérica. (1,5,8)

Este microorganismo también puede incrementar el riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual como VIH y virus del papiloma humano, entre otras. (1,5)

Métodos de diagnóstico

Existen varias técnicas para realizar el diagnóstico de infecciones causadas por *Chlamydia*; las más utilizadas son:

Detección Directa

Los cuerpos de inclusión de *C. trachomatis* contienen glucógeno, que históricamente se han coloreado con iodo, Giemsa y Gram; después de incubar 48-72 horas la muestra biológica, los cubreobjetos son extraídos y coloreados. Si hay gran presencia de cuerpos de inclusión de *Chlamydia*, el diagnóstico se puede establecer por los métodos de coloración con Giemsa o Giménez, que permiten distinguir las inclusiones por su color de reacción, morfología y localización. Las inclusiones se ubican en el citoplasma de las células epiteliales y tienen a menudo una ubicación perinuclear; sin embargo se requiere de un analista con experiencia. La coloración de Gram no es específica, pues presenta muchas variaciones. La tinción con iodo tiene dificultades, pues el glucógeno está

presente solo en algunas fases del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*, y algunas células normales del cérvix contienen glucógeno dando falsos positivos. (5)

Inmunofluorescencia Directa

Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) que van dirigidos contra el antígeno específico de especie, sobre LPS de membrana y sobre la MOMP de las células obtenidas del sitio infectado. Los EB que se observan en las muestras clínicas, son pequeños (0.25-0.35 μm), de forma redonda, bordes netos y bien definidos. La presencia de células de epitelio columnar aumenta la sensibilidad de la prueba. Esta técnica presenta una sensibilidad del 80-90% y una especificidad del 98-99% con respecto al cultivo celular (34) y una sensibilidad de 61% y una especificidad del 98-99% con respecto a la PCR (34). Es un método sensible para detección de conjuntivitis de inclusión y debe ser realizada por personal altamente capacitado y con un microscopio de alta calidad para alcanzar niveles óptimos de diagnóstico.(5,7,35)

Cultivo celular

Es el método más sensible y considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de las infecciones causadas por *C. trachomatis* del tracto genital tanto en hombres como en mujeres. La sensibilidad es del 70-85% (34). Como *C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada requiere de una célula huésped para su desarrollo y multiplicación. Las líneas celulares más utilizadas son: McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa 229 (carcinoma humano de cuello uterino), BHK-21 (células de ovario de hámster) y recientemente BGMK (riñón, de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*). (36)

El aislamiento de *C. trachomatis* también puede obtenerse por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollo embrionados de 6 - 8 días de edad. (5,7)

Las líneas celulares se tratan con irradiación, dextran o cicloheximida, para aumentar la sensibilidad del aislamiento. Antes de inocular la muestra se puede sonicar para romper las células huésped y permitir que los cuerpos elementales se separen. (5,7)

La línea celular más utilizada es la McCoy tratada con cicloheximida. El cultivo se propaga en una monocapa sobre un cubreobjeto inoculando las muestras biológicas; si hay suficiente número de cuerpos elementales de *Chlamydia* infectarán las células y crecerán para formar inclusiones citoplasmáticas; después de incubar 48-72 horas, las inclusiones son visualizadas por tinción con anticuerpos marcados con fluorescencia, los cuales se ligan al lipopolisacárido de *Chlamydia*. Otros anticuerpos reconocen de manera específica la MOMP de *C. trachomatis*. La visualización directa de las inclusiones que poseen una morfología distintiva contribuye al 100% de especificidad del diagnóstico por cultivo. (5,34)

Determinación de Antígenos por el método de ELISA

La técnica del inmunoensayo enzimático para la detección del antígeno de *Chlamydia* permite el análisis de diferentes tipos y un gran número de muestras; los resultados se obtienen a las cuatro horas después de iniciada la prueba. Se detectan antígenos de tipo lipopolisacáridos específicos del género y extraídos de los cuerpos elementales de la muestra, los cuales son más abundantes y más solubles que la proteína MOMP. Una desventaja de esta técnica es que los LPS pueden dar reacciones cruzadas con los LPS de otras bacterias Gram negativas y producir falsos positivos. Sin utilizar reactivos bloqueadores de anticuerpos esta prueba presenta una especificidad cercana al 97% y con reactivos bloqueadores, esta se acerca al 99% con respecto a cultivo celular. La sensibilidad frente a la PCR es del 75%. (3,5,36)

Detección de Anticuerpos

Debido a múltiples problemas, el diagnóstico de la infección por *Chlamydia*, mediante la detección de anticuerpos, es limitado. Una sola muestra de suero es inadecuada y los sueros pareados son difíciles de obtener porque la enfermedad suele ser inicialmente asintomática o tener un largo periodo de incubación, lo cual dificulta la obtención del suero en la fase aguda de la infección. Los anticuerpos persisten por largos periodos y su detección en el suero indica únicamente una exposición anterior al microorganismo. Un aumento de 4 diluciones del título, entre la fase aguda y la de convalecencia, acompañado de sintomatología clínica, apoya el diagnóstico de la infección por *Chlamydia*. La concentración de anticuerpos está relacionada con la naturaleza de la infección. Generalmente, entre más invasivo es el microorganismo, más alto es el título de los anticuerpos. Los títulos más altos se encuentran en los casos de linfogranuloma venéreo activo, los títulos de las mujeres con salpingitis son más altos que los de cervicitis, y los de las mujeres en general, son más altos que los de los hombres. (3,5,36)

Fijación del Complemento

Esta prueba detecta anticuerpos contra *Chlamydia*, pero no distingue entre especies e inmutotipo; se puede usar para medir anticuerpos de la psitacosis y del linfogranuloma venéreo. (5)

Microinmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica utiliza pequeños volúmenes de suero; es muy sensible para detectar, inmutotipificar y cuantificar anticuerpos. Anteriormente se utilizaban antígenos por separado para cada inmutotipo y actualmente se ha encontrado que es más práctico utilizar una mezcla de antígenos. La prueba puede ser utilizada con conjugados mono-específicos de las clases IgM, IgG e IgA. (2,5)

Técnicas Moleculares

Los métodos moleculares patógeno específicos han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual. Las pruebas basadas en la tecnología de la amplificación de ácidos nucleicos pueden usar muestras biológicas como orina e hisopados vaginales, disminuyendo la necesidad de exámenes físicos y aumentando la especificidad y la sensibilidad.

La primera técnica molecular implementada utilizó una sonda de DNA quimioluminiscente, la cual hibridaba con una secuencia de rRNA 16S específica de la especie de *Chlamydia*. El género *Chlamydia* posee hasta 104 copias de estos RNA. Una vez formados los híbridos se absorbían sobre esferillas y la cantidad de quimioluminiscencia se podía detectar en un luminómetro. Esta técnica presenta una sensibilidad del 85% y una especificidad del 98-99%. Esta técnica fue aprobada para el uso en muestras genitales y oculares. (5,6,25,34,36)

Debido a la dificultad en el diagnóstico y a los avances científicos y tecnológicos se han venido implementando técnicas alternas de valoración de *Chlamydia* a escala molecular, basadas en la amplificación del DNA utilizando PCR y LCR. Estos procedimientos son altamente sensibles y específicos, lo que contribuye a la obtención de resultados de óptima calidad. La PCR es un método que permite detectar un bajo número de copias del DNA de *Chlamydia*, obteniendo una especificidad de 90% y una sensibilidad de 99-100% (34). Sin embargo, el uso de la PCR empleando muestras que presentan moco no es fácil, ya que este inhibe la prueba dando falsos negativos. (4,5,6,32,33)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

C. trachomatis es el causante de infecciones de transmisión sexual más frecuente tanto en varones como en mujeres, por lo que esto representa un problema de salud a nivel mundial. La infección vertical en el recién nacido es frecuente ya que desarrolla infecciones respiratorias y conjuntivales por lo que su diagnóstico es prioritario. El principal obstáculo para el diagnóstico de infección por este patógeno es la detección de los EB en el cultivo celular ya que se realiza mediante la IMF. En muchas ocasiones la fluorescencia y/o la presencia de partículas con tamaño y morfología similar al EB pueden confundir al analista, por lo que la sensibilidad y especificidad de esta técnica ha sido reportada entre 60%-80% y entre 90%-95%, respectivamente. Debido a esto se implementó la técnica de PCR que detecta un fragmento de 129 pb del gen *omp* de *C. trachomatis* la cual muestra mayor sensibilidad y especificidad que la IMF.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer la condiciones de reacción adecuadas para desarrollar una técnica de PCR para la detección de *C. trachomatis* a partir de células McCoy que han sido previamente infectadas con muestras de aspirado bronquial de recién nacidos.

Objetivos Particulares

- a) Infectar células McCoy con muestras de aspirado bronquial de RN con diagnóstico presuntivo de infección por *C. trachomatis*.
- b) Detectar la presencia de *C. trachomatis* en células McCoy mediante la técnica de IMF directa.
- c) Estandarizar la técnica de PCR para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* en células McCoy.
- d) Detectar *C. trachomatis* en células McCoy infectadas con muestras de aspirado bronquial de RN mediante la técnica de PCR.

HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa

La técnica de PCR es más sensible y específica que la IMF directa para la detección de EB de *C. trachomatis* en células McCoy.

Hipótesis nula

La técnica de PCR no es más sensible y específica que la IMF directa para la detección de EB de *C. trachomatis* en células McCoy.

MATERIALES

Reactivos

- Células McCoy
- Medio de transporte 2SP
- Medio de cultivo MEM
- Anticuerpo monoclonal anti-Chlamydia
- Solución salina balanceada de Hanks
- Líquido de montaje
- Amortiguador de lisis para glóbulos blancos
- Fenol
- Cloroformo
- Cloruro de sodio 1M
- Etanol
- Agua inyectable
- Tris Acetato EDTA (TAE)
- Agarosa
- Regulador para PCR
- Iniciador MOMP-1 [5'-GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC-3']
- Iniciador MOMP-2 [3'-CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA-5']
- Cloruro de magnesio
- Taq polimerasa
- dNTPs
- DNA de cada una de las muestras
- Bromuro de etidio

- Solución de semen de Salmón con concentración de 10 mg/mL

Material

- Tubos de polietileno de 15 mL estériles
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta graduada de 1 mL
- Cajas de cultivo celular estériles
- Tubos Eppendorf de 2 mL
- Tubos Eppendorf de 600 μ L
- Tubos Eppendorf de 100 μ L para PCR
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Micropipeta de 40 a 200 μ L
- Micropipeta de 200 a 1000 μ L
- Micropipeta de 5 a 40 μ L
- Micropipeta de 0.5 a 10 μ L
- Micropipeta para PCR de 0.1 a 10 μ L
- Micropipeta para PCR de 10 a 100 μ L

Equipo

- Campana de flujo
- Incubadora de CO₂
- Vortex
- Centrífuga

- Cámara húmeda
- Microscopio de fluorescencia
- Incubadora
- Ultracentrífuga
- Concentrador
- Espectroscopio
- Termociclador
- Cámara para electroforesis
- Transiluminador

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo prospectivo y transversal.

Población de estudio

Se seleccionaron 100 muestras durante noviembre de 2009 a agosto de 2010 de pacientes que ingresaron a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) y a la Unidad de Cuidados Intensivos del Recién Nacido (UCIREN) del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) los cuales mostraron signos de conjuntivitis y síntomas de dificultad respiratoria, caracterizada por taquipnea, apnea, estertores, tos, quejido respiratorio y cianosis.

Identificación de *C. trachomatis* en cultivo celular

El diagnóstico de *C. trachomatis* se llevó a cabo por cultivo en células McCoy de la siguiente manera (Guerra y cols. 1995):

Cultivo celular

Se adicionaron 1×10^6 células McCoy en medio de cultivo MEM IX (adicionado de suero fetal de ternera al 10%, 1 mL de L-glutamina 100X, 1 mL de antibiótico antimicótico 100X y bicarbonato de sodio) a microplacas de 24 pozos de fondo plano que contenían cubreobjetos de 13 mm de diámetro. La placa fue incubada a 37 °C durante 24 h en incubadora de CO₂ (Water-Jacketed CO₂ Incubator Biotechnology BELLCO). Al término de la incubación se adicionaron 300 µL de las muestras clínicas por duplicado (Las muestras de aspirado bronquial se adicionaron en medio de transporte sacarosa-fosfato (2SP) y en seguida se les sometió a 3 ciclos de choque térmico (de -70 °C a 90 °C). Después se

centrifugaron (Centrifuga IEC HN.SII International Equipment Company) a 3,500 rpm durante 15 min.

Observación microscópica

Después de 72 h de cultivo se recuperaron los 2 cubreobjetos, se fijaron con metanol, a uno de ellos se le adiciono 20 μ L de anticuerpo monoclonal anti-Chlamydia (bioMérieux®, este dirigido contra la MOMP y el LPS de la bacteria) conjugado a fluoresceína, y se incubó en cámara húmeda durante 20 min en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se lavó el cubreobjetos con solución salina balanceada de Hanks y se eliminó el exceso de esta solución. En seguida se adicionó una gota de líquido de montaje en un portaobjetos y se colocó encima de este el cubreobjetos con las células McCoy adheridas e inoculadas con las muestras clínicas. Posteriormente se procedió a la observación microscópica en un microscopio de Epifluorescencia (Axiovert 100 ZEISS) para la búsqueda de EB y/o de inclusiones fluorescentes (determinando como muestras positivas aquéllas en donde se encontraron 10 o más EB).

Diagnóstico de *C. trachomatis* por PCR

Al otro cubreobjetos se le realizó la prueba de PCR a partir de la obtención de DNA de la siguiente manera:

Obtención de DNA

Se adicionaron 200 μ L de regulador de lisis para glóbulos blancos al pozo, en seguida se hizo un raspado de las células adheridas y se pasaron a un tubo Eppendorf. En seguida, el tubo se agitó en el vortex (Thermolyne Type 37600 Mixer) durante 1 minuto y se incubó (Incubadora GEMINI Twin Shaking Wather-Back Robbins Scientific®) a 56° C por 1 h. Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron al tubo 200 μ L de fenol y 200

μL de cloroformo y se agitó en vortex por 1 min, se centrifugó (Centrífuga Microfuge® ZZR BECKMAN COLLTER) 10 min a 3000 rpm. En seguida, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 200 μL de cloroformo, se agitó en vortex por 15 minutos. Finalizada la agitación, el tubo se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 30 μL de cloruro de sodio 1M y 1 mL de etanol absoluto frío (-20° C), mezclándose por inversión, para posteriormente centrifugarse a 13,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Después, el sobrenadante se decantó y la pastilla de DNA se dejó secar, para después resuspenderla en 40 μL de agua inyectable.

Integridad del DNA

La integridad del DNA se verificó mediante una electroforesis (Cámara de electroforesis HORIZON®58 LIFE TECHNOLOGIES™) en gel de agarosa al 1 % en solución reguladora Tris Acetato EDTA.

Concentración de DNA

Se determinó la concentración de DNA de cada muestra midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Helios α, UNICAM). Determinando la concentración de cada muestra con respecto a una curva estándar de DNA de semen de salmón (Boehringer Mannheim concentraciones de 10000, 7500, 5000, 2500 y 1000 ng).

Amplificación de DNA de *Chlamydia* mediante PCR

Se detectó el DNA de *Chlamydia* de las muestras mediante la amplificación de un fragmento de 129 pb del gen *ompA* (gen de la proteína principal de membrana externa de 40 kDa) de *C. trachomatis*. Los iniciadores utilizados para la amplificación de este

fragmento fueron:

MOMP-1 [5'-GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCTC-3']

MOMP-2 [3'-CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA-5']

El volumen final para llevar a cabo la PCR fue de 20 μ L con el siguiente esquema: se adicionaron por muestra 4 μ L de regulador (5x Green GoTaq™ Reaction Buffer PROMEGA) de PCR, 0.3 μ L de cada uno de los iniciadores, 1.2 μ L de cloruro de magnesio (25 mM PROMEGA), 0.2 μ L de Taq polimerasa (GoTaq® PROMEGA), 0.2 μ L de dNTPs (dNTP Mix 10 mM PROMEGA) y 1 μ L de DNA de las muestras clínicas completando los 20 μ L con agua inyectable. Las muestras se procesaron en un termociclador (Programmable Thermal Controller PTC-100 MJResearch© USA) con los siguientes ciclos: desnaturalización a 95° C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación (cada ciclo comprendió un paso de desnaturalización a 95°C por 60 segundos, alineación a 61°C por 120 segundos y una extensión a 70°C por 60 segundos) y una extensión final a 70°C por 10 minutos. Se incluyeron los controles positivo y negativo.

Detección del DNA de *C. trachomatis* posterior al PCR.

Los productos de la amplificación del PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio al 0.1%, en el mismo gel se metió un marcador de peso molecular de (50 bp DNA Step Ladder PROMEGA) Las muestras que se consideraron positivas para *C. trachomatis* fueron las que presentaron una banda de 129 pb.

Análisis Estadístico

Se compararon los resultados obtenidos de la determinación de *C. trachomatis* por IMF y por PCR determinando la sensibilidad y especificidad así como los valores

predictivos positivo y negativo de ambas pruebas empleando tablas de contingencia 2X2 mediante la prueba exacta de Fisher.

		MÉTODO DE REFERENCIA	
		Positivo	Negativo
MÉTODO DE PRUEBA	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

Donde: A = Verdaderos positivos
 B = Falsos positivos
 C = Falsos negativos
 D = Verdaderos negativos

$$\begin{aligned} \text{Sensibilidad} &= A / (A+C) & \text{VPP} &= A / (A+B) \\ \text{Especificidad} &= D / (D+B) & \text{VPN} &= D / (C+D) \end{aligned}$$

Además, los datos extraídos de los expedientes clínicos de los recién nacidos se compararon con los resultados obtenidos por IMF y PCR mediante la prueba de Fisher, se consideró significativo cuando el valor de p fue menor a 0.5. También se determinó el riesgo relativo y la razón de momios con un intervalo de confianza al 95%.

RESULTADOS

Con la IMF directa se observan los EB de *C. trachomatis* en cultivo de células McCoy (figura 5). En la figura 6 se observa la integridad del DNA obtenido de las células McCoy infectadas con muestras de aspirado bronquial obtenido por la técnica de fenol-cloroformo. En la figura 7 se muestra el producto de amplificación de 129 pb que representa la infección por *C. trachomatis*.

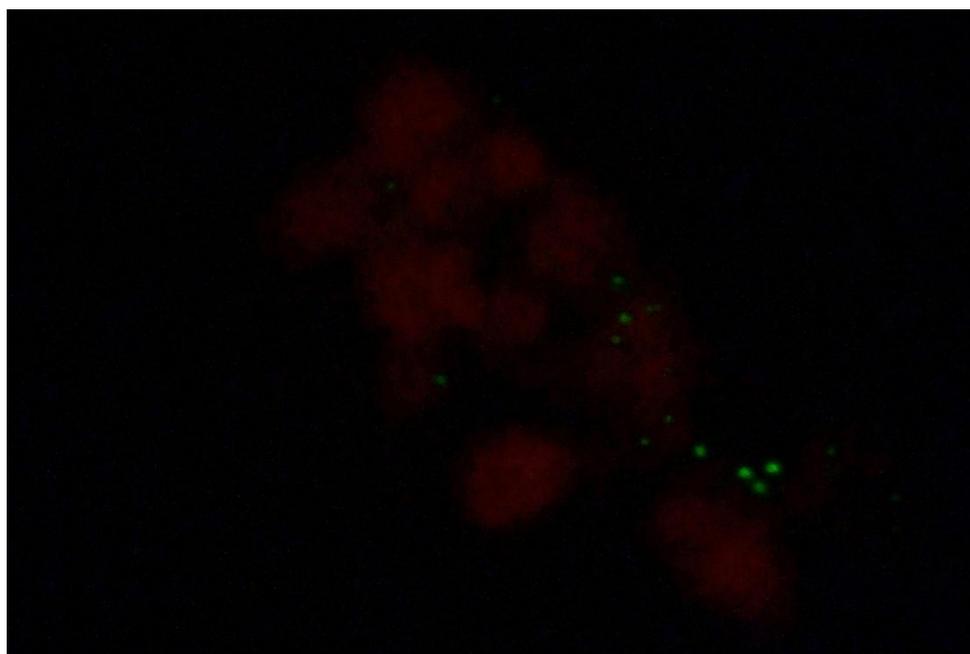


Figura 5. Inmunofluorescencia de cultivo de células McCoy infectadas con *C. trachomatis*

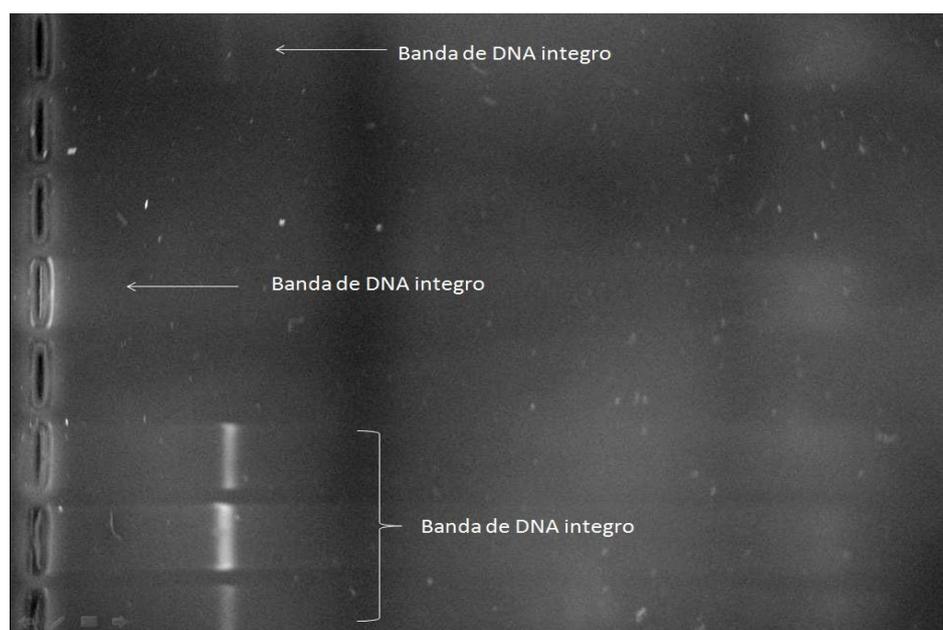


Figura 6. Integridad del DNA en gel de agarosa de células McCoy infectadas con *C. trachomatis*

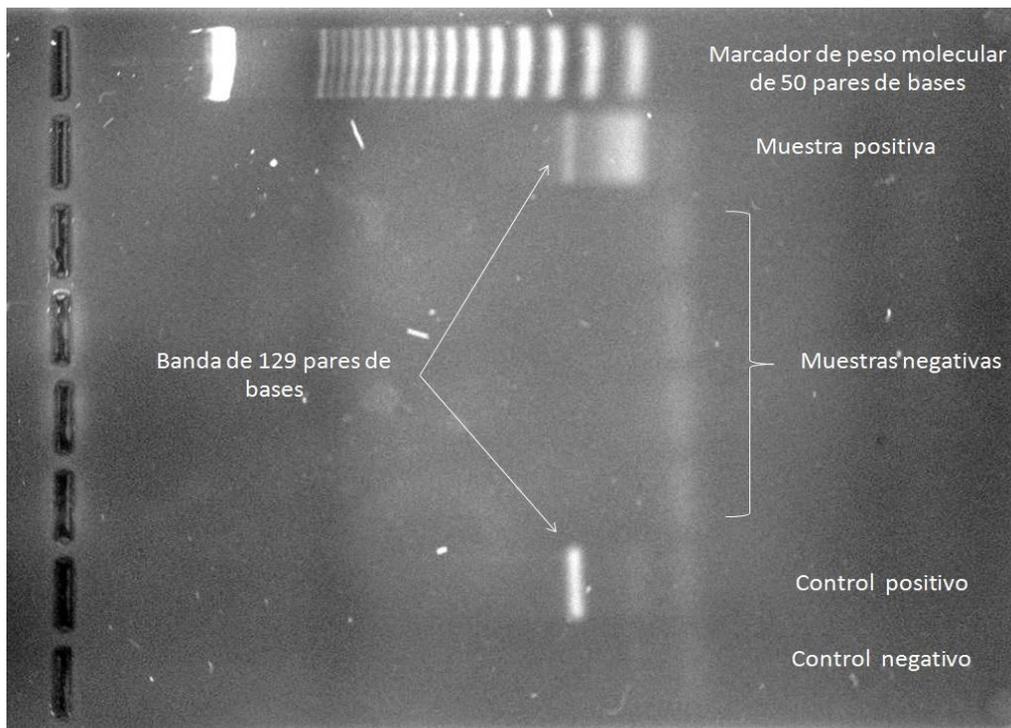


Figura 7. Ampliificación de 129 pb de *C. trachomatis* después de PCR

Los resultados sobre la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR teniendo como referencia la técnica de IMF directa, fueron del 50 % y 62.9% respectivamente, mientras que el VPP y VPN fueron del 53.4 % y el 59.6 %, respectivamente.

En cuanto a la técnica de IMF directa, también se llevaron estas determinaciones, teniendo como referencia los resultados obtenidos por la técnica de PCR. Estas fueron de 53.4 % y 59.6 % respectivamente, mientras que el VPP es de 50 % y el VPN 62.9 %.

Esta baja sensibilidad y especificidad es debido a que hubo una disminución en la correlación entre las muestras positivas y negativas en ambos métodos de diagnóstico. Debido a lo anterior se determinó la frecuencia y el riesgo relativo de los padecimientos del recién nacido así como de la madre para poder establecer cuál de los 2 métodos de diagnóstico correlaciona mejor con el padecimiento del recién nacido.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF como referencia

		IMF		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	23	20	43
	Negativas	23	34	57
Total		46	54	100

Sensibilidad= 50 % VPP= 53.48 %
 Especificidad= 62.96 % VPN= 59.64 %

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR como referencia

		PCR		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	23	23	46
	Negativas	20	34	54
Total		43	57	100

Sensibilidad= 53.48 % VPP= 50 %
 Especificidad= 59.64 % VPN= 62.96 %

Sensibilidad y especificidad de la PCR e IMF con respecto a la presencia de datos clínicos.

El síndrome de dificultad respiratoria se encuentra asociado a la infección por *C. trachomatis*. Los resultados sobre la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR cuando se presenta este síndrome, fueron del 40.2 % y 51.5% respectivamente, mientras que el VPP y VPN fueron del 62.7 % y el 29.8 %.

Para la técnica de IMF directa estos parámetros resultaron ser de 44.7 % y 51.5 % para sensibilidad y especificidad respectivamente, mientras que el VPP es de 65.2 % y el VPN 31.48 %.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta SDR

		SDR		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	27	16	43
	Negativas	40	17	57
Total		67	33	100

Sensibilidad= 40.29 % VPP= 62.79 %
Especificidad= 51.51 % VPN= 29.82 %

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta SDR

		SDR		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	30	16	46
	Negativas	37	17	54
Total		67	33	100

Sensibilidad= 44.77 % VPP= 65.21 %
Especificidad= 51.51 % VPN= 31.48 %

Se llevo a cabo la determinación de estos 4 parámetros anteriores cuando se presenta la ruptura prematura de membranas. Estas resultaron ser las mismos para ambas técnicas, obteniendo valores de 38.4 % y 53.4 % para sensibilidad y especificidad respectivamente, mientras que el VPP es de 12.8 % y el VPN 82.9 %.

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta RPM

		RPM		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	05	34	39
	Negativas	08	39	47
Total		13	73	86

Sensibilidad= 38.46 % VPP= 12.82 %
Especificidad= 53.42 % VPN= 82.97 %

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta RPM

		RPM		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	05	34	39
	Negativas	08	39	47
Total		13	73	86

Sensibilidad= 38.46 % VPP= 12.82 %

Especificidad= 53.42 % VPN= 82.97 %

Los valores obtenidos al calcular la sensibilidad y especificidad cuando se presenta displacia broncopulmonar fueron de 40 % y 56.2 % respectivamente para la técnica de PCR, mientras que para la técnica de IMF resultaron ser del 35 % y 51.2 % respectivamente.

En cuanto el VPP y el VPN se obtuvieron valores del 18.6 % y 78.9 % para la técnica de PCR, mientras para la técnica de IMF fueron del 15.2 % y el 75.9 %, respectivamente.

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta DBP

		DBP		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	08	35	43
	Negativas	12	45	57
Total		20	80	100

Sensibilidad= 40 % VPP= 18.60 %

Especificidad= 56.25 % VPN= 78.94 %

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta DBP

		DBP		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	07	39	46
	Negativas	13	41	54
Total		20	80	100

Sensibilidad= 35 % VPP= 15.21 %
Especificidad= 51.25 % VPN= 75.92 %

En cuanto a la presencia de sepsis neonatal, se encontró que la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR fue del 48.3 % y 59.4% respectivamente, mientras que para la IMF estos valores fueron del 45.1 % y 53.6 % respectivamente.

Los valores predictivos positivo y negativo obtenidos para PCR fueron del 34.8 % y el 71.9 %, respectivamente., mientras que para la técnica de IMF resultaron ser del 30.4 % y del 68.5 %.

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta sepsis

		Sepsis		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	15	28	43
	Negativas	16	41	57
Total		31	69	100

Sensibilidad= 48.38 % VPP= 34.88 %
Especificidad= 59.42 % VPN= 71.92 %

Tabla 10. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta sepsis

		Sepsis		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	14	32	46
	Negativas	17	37	54
Total		31	69	100

Sensibilidad= 45.16 % VPP= 30.43 %
Especificidad= 53.62 % VPN= 68.51 %

En la Tabla 11 y 12 se determinó la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR e IMF cuando hay un recién nacido pretérmino. Estas fueron de 46.2 % y 51.5 % para la PCR, mientras que para la IMF fueron del 46.2 % y 51.5 % respectivamente.

También se calcularon los VPP y VPN para ambas técnicas obteniendo VPP de 65.9 % y el VPN 32 % para la PCR y del 67.3 % y el 33.3 % para IMF respectivamente.

Tabla 11. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de PCR cuando se presenta RNPT

		RNPT		Total
		Positivas	Negativas	
PCR	Positivas	31	16	47
	Negativas	36	17	53
Total		67	33	100

Sensibilidad= 46.26 % VPP= 65.95 %
 Especificidad= 51.51 % VPN= 32.07 %

Tabla 12. Sensibilidad y especificidad obtenida empleando los resultados de IMF cuando se presenta RNPT

		RNPT		Total
		Positivas	Negativas	
IMF	Positivas	31	15	46
	Negativas	36	18	54
Total		67	33	100

Sensibilidad= 46.26 % VPP= 67.39 %
 Especificidad= 54.54 % VPN= 33.33 %

Factores y riesgo relativo de infección por *C. trachomatis*

Se analizaron las frecuencias de los datos socioeconómicos y ginecológicos de las madres de recién nacidos infectados con *C. trachomatis* diagnosticados por IMF directa (Tabla 13) y por PCR (Tabla 14). En la Tabla 13 se observa que la infección por esta bacteria es frecuente en personas de nivel económico muy bajo, bajo y medio (1, 2 y 3).

En cuanto a nivel de estudios, la infección es más común en mujeres que tienen estudios de secundaria y bachillerato, aunque hay algunos casos en mujeres con nivel superior.

Respecto al estado civil la proporción de mujeres infectadas con este microorganismo es idéntica ya sean casadas, en unión libre o solteras. De estas mujeres, el 33% mostró alguna vez aborto y menos frecuente fue la muerte neonatal y el óbito en comparación con las mujeres no infectadas por este patógeno. Durante el parto las madres de niños infectados con esta bacteria no mostraron ruptura prematura de membranas.

En cuanto a las madres de niños infectados por *C. trachomatis* y diagnosticado por PCR se encontró que al igual que la IMF directa el nivel socioeconómico fue bajo y medio (1 y 2). En cuanto a nivel de estudios, la infección fue más frecuente en mujeres que tienen estudios de secundaria y bachillerato. En referencia al estado civil la proporción fue igual ya sean casadas, solteras o en unión libre. De estas mujeres, la infección por este patógeno fue más común en aquellas que no cuentan con antecedentes de aborto, muerte neonatal u óbitos, comparadas con las madres de recién nacidos sin infección. Además, de que no mostraron ruptura prematura de membranas.

Por otro lado, se analizaron los signos clínicos de recién nacidos infectados con *C. trachomatis* detectados tanto por IMF directa (Tabla 15) como por PCR (Tabla 18).

De los resultados mostrados en las Tablas 15 y 16 no hubo alguna diferencia significativa con ninguno de los parámetros analizados, sin embargo en la tabla 15 se evidencio un riesgo relativo de padecer SDR (1.051 [0.796-1.387] IC 95%), taquipnea (1.091 [0.856-1.392] IC 95%), DBP (1.393 [0.739-2.637] IC 95%), conjuntivitis (1.370 [0.774-2.425] IC 95%) y sepsis (1.027 [0.646-1.632] IC 95%) cuando los RN son infectados por este germen. En la Tabla 16 también se muestra un riesgo relativo a

padecer SDR (1.118 [0.840-1.487] IC 95%), taquipnea (1.081 [0.845-1.383] IC 95%), DBP (1.094 [0.605-1.976] IC 95%) y conjuntivitis (1.100 [0.639-1.895] IC 95%), pero no sepsis.

Al analizar los datos ginecológicos de las madres de los RN infectados con *C. trachomatis* detectados por IMF directa (Tabla 17) y por PCR (Tabla 18) tales como: ocupación, partos, abortos, cesáreas, muertes neonatales, óbitos y si presentaron RPM. En la Tabla 17 se muestra una significancia estadística de $p < 0.05$ y riesgo relativo (1.830 [1.017-3.291] IC 95%) de padecer una infección por este microorganismo si el bebe nace por vía vaginal, también hay un riesgo relativo de sufrir un aborto (1.591 [0.866-2.922] IC 95%), muerte neonatal (1.060 [0.352-3.198] IC 95%), óbito (2.102 [0.433-10.211] IC 95%) y RPM (1.328 [0.472-3.732] IC 95%).

En la Tabla 18 no se encontró ninguna significancia estadística pero si se muestra un riesgo relativo de padecer una infección por *C. trachomatis* si el bebe nace por vía vaginal (1.467 [0.832-2.587] IC 95%), muerte neonatal (1.009 [0.335-1.187] IC 95%), óbito (2.209 [0.455-10.734] IC 95%) y RPM (1.328 [0.472-3.732] IC 95%).

También se analizaron las medidas antropométricas de los RN infectados con esta bacteria diagnosticados por IMF directa (Tabla 19) y por PCR (Tabla 20) tales como: peso, talla, edad gestacional, capurro y sexo. En la tabla 19 se observan riesgos relativos para los RN con un peso menor a 1500 gramos (1.581 [0.963-2.597] IC 95%) y con una talla menor de 42 centímetros (1.099 [0.702-1.719] IC 95%). En esta tabla también se muestra una diferencia significativa de $p < 0.05$ para el sexo femenino de los RN.

Al igual que en la tabla 19, la tabla 20 mostró un riesgo relativo para los RN con un peso menor a 1500 gramos (1.581 [0.963-2.597] IC 95%), y con una talla menor a 42 centímetros (1.477 [0.933-2.340] IC 95%), y a diferencia de lo observado en la Tabla 19 se observa un riesgo relativo para los RN de sexo masculino (1.521 [0.960-2.411] IC

95%), con capurro y edad gestacional menor a 33 semanas (1.555 [0.928-2.605] IC 95% y 1.935 [1.192-3.140] IC 95% respectivamente) mostrando también para esta última una diferencia significativa de $p < 0.01$.

Tabla 13. Datos socioeconómicos y ginecológicos de las madres de RN infectados con *C. trachomatis* diagnosticados por IMF directa

		Negativo	Positivo	Total
Nivel socioeconómico	1 (Muy bajo)	05 (06.09%)	12 (14.63%)	17 (20.73%)
	2 (Bajo)	24 (29.26%)	12 (14.63%)	36 (43.90%)
	3 (Medio)	12 (14.63%)	12 (14.63%)	24 (29.26%)
	4 (Medio)	01 (01.22%)	01 (01.22%)	02 (02.44%)
	5 (Alto)	00 (00.00%)	01 (01.22%)	01 (01.22%)
	6 (Seguro de gastos médicos)	01 (01.22%)	01 (01.22%)	02 (02.44%)
	Total	43 (52.43%)	39 (47.56%)	82 (100%)
Nivel de estudio	Primaria	03 (03.33%)	03 (03.33%)	06 (06.66%)
	Secundaria	22 (24.44%)	13 (14.44%)	35 (38.88%)
	Bachillerato	16 (17.77%)	19 (21.11%)	35 (38.88%)
	Superior	07 (07.77%)	07 (07.77%)	14 (15.55%)
	Total	48 (53.33%)	42 (46.66%)	90 (100%)
Estado civil	Soltera	09 (10.71%)	13 (15.47%)	22 (26.19%)
	Unión libre	21 (25.00%)	15 (17.85%)	36 (42.85%)
	Casada	13 (15.47%)	13 (15.47%)	26 (30.95%)
	Total	43 (51.19%)	41 (48.80%)	84 (100%)
Número de abortos	0	28 (31.11%)	31 (34.44%)	59 (65.55)
	1	14 (15.55%)	08 (08.88%)	22 (24.44%)
	2	04 (04.44%)	02 (02.22%)	06 (06.66%)
	3	01 (01.11%)	01 (01.11%)	02 (02.22%)
	4	01 (01.11%)	00 (00.00%)	01 (01.11%)
	Total	48 (53.33%)	42 (46.66%)	90 (100%)
Número de muertes neonatales	0	37 (45.67%)	33 (40.74%)	70 (86.42%)
	1	05 (06.17%)	05 (06.17%)	10 (12.34%)
	2	01 (01.23%)	00 (00.00%)	01 (01.23%)
	Total	43 (53.08%)	38 (46.91%)	81 (100%)
Número de óbitos	0	38 (46.91%)	36 (44.44%)	74 (91.35%)
	1	05 (06.17%)	02 (02.46%)	07 (08.64%)
	Total	43 (53.08%)	38 (46.91%)	81 (100%)
RPM	No	39 (45.34%)	34 (39.53%)	73 (84.88%)
	Si	08 (09.030%)	05 (05.81%)	13 (15.11%)
	Total	47 (54.65%)	39 (45.34%)	86 (100%)

Tabla 14. Datos socioeconómicos y ginecológicos de las madres de RN infectados con *C. trachomatis* diagnosticados por PCR

		Negativo	Positivo	Total
Nivel socioeconómico	1 (Muy bajo)	08 (09.75%)	09 (10.97%)	17 (20.73%)
	2 (Bajo)	16 (19.51%)	20 (24.39%)	36 (43.90%)
	3 (Medio)	18 (21.95%)	06 (07.31%)	24 (29.26%)
	4 (Medio)	01 (01.21%)	01 (01.21%)	02 (02.43%)
	5 (Alto)	01 (01.21%)	00 (00.00%)	01 (01.21%)
	6 (Seguro de gastos médicos)	00 (00.00%)	02 (02.43%)	02 (02.43%)
	Total	44 (53.6%)	38 (46.34%)	82 (100%)
Nivel de estudio	Primaria	01 (01.11%)	05 (05.55%)	06 (06.66%)
	Secundaria	20 (22.22%)	15 (16.66%)	35 (38.88%)
	Bachillerato	19 (21.11%)	16 (17.77%)	35 (38.88%)
	Superior	10 (11.11%)	04 (04.44%)	14 (15.55%)
	Total	50 (55.55%)	42 (46.66%)	90 (100%)
Estado civil	Soltera	10 (01.11%)	12 (14.28%)	22 (26.19%)
	Unión libre	19 (22.61%)	17 (20.23%)	36 (42.85%)
	Casada	17 (20.23%)	09 (10.71%)	26 (30.95%)
	Total	46 (54.76%)	38 (45.23%)	84 (100%)
Número de abortos	0	35 (38.88%)	24 (26.66%)	59 (65.55%)
	1	12 (13.33%)	10 (11.11%)	22 (24.44%)
	2	02 (02.22%)	04 (04.44%)	06 (06.66%)
	3	01 (01.11%)	01 (01.11%)	02 (02.22%)
	4	00 (00.00%)	01 (01.11%)	01 (01.11%)
	Total	50 (55.55%)	40 (44.44%)	90 (100%)
Número de muertes neonatales	0	38 (46.91%)	32 (39.50%)	70 (86.41%)
	1	05 (06.17%)	05 (06.17%)	10 (12.34%)
	2	01 (01.23%)	00 (00.00%)	01 (01.23%)
	Total	44 (54.32%)	37 (45.67%)	81 (100%)
Número de óbitos	0	39 (48.14%)	35 (43.20%)	74 (91.35%)
	1	05 (06.17%)	02 (02.46%)	07 (08.64%)
	Total	44 (54.32%)	37 (45.67%)	81 (100%)
RPM	No	39 (45.34%)	34 (39.53%)	73 (84.88%)
	SI	08 (09.30%)	05 (05.81%)	13 (15.11%)
	Total	47 (54.65%)	39 (45.34%)	86 (100%)

Tabla 15. Signos clínicos de RN infectados con *C. trachomatis* detectados por IMF directa

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
SDR	No	33 (33%)	17 (17%)	16 (16%)	NS	0.905 (0.518-1.581)
	Si	67 (67%)	37 (37%)	30 (30%)		1.051 (0.796-1.387)
Taquipnea	No	27 (27%)	13 (13%)	14 (14%)	NS	0.791 (0.415-1.507)
	Si	73 (73%)	41 (41%)	32 (32%)		1.091 (0.856-1.392)
Neumonía	No	61 (61%)	37 (37%)	24 (24%)	NS	1.313 (0.944-1.828)
	Si	39 (39%)	17 (17%)	22 (22%)		0.658 (0.401-1.081)
DBP	No	80 (80%)	41 (41%)	39 (39%)	NS	0.788 (0.539-1.160)
	Si	20 (20%)	13 (13%)	07 (07%)		1.393 (0.739-2.637)
Conjuntivitis	No	75 (75%)	38 (38%)	37 (37%)	NS	0.792 (0.547-1.145)
	Si	25 (25%)	16 (16%)	09 (09%)		1.370 (0.774-2.425)
Sepsis neonatal	No	69 (69%)	37 (37%)	32 (32%)	NS	0.978 (0.664-1.632)
	Si	31 (31%)	17 (17%)	14 (14%)		1.027 (0.646-1.632)
RNPT	No	33 (33%)	18 (18%)	15 (15%)	NS	1.015 (0.692-1.488)
	Si	67 (67%)	36 (36%)	31 (31%)		0.982 (0.624-1.547)

Tabla 16. Signos clínicos de RN infectados con *C. trachomatis* detectados por PCR

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
SDR	No	33 (33%)	17 (17%)	16 (16%)	NS	0.802 (0.460-1.398)
	Si	67 (67%)	40 (40%)	27 (27%)		1.118 (0.840-1.487)
Taquipnea	No	27 (27%)	13 (13%)	14 (14%)	NS	0.812 (0.427-1.545)
	Si	73 (73%)	40 (40%)	30 (30%)		1.081 (0.845-1.383)
Neumonía	No	61 (61%)	36 (36%)	25 (25%)	NS	1.086 (0.787-1.499)
	Si	39 (39%)	21 (21%)	18 (18%)		0.880 (0.539-1.436)
DBP	No	80 (80%)	45 (45%)	35 (35%)	NS	0.938 (0.624-1.408)
	Si	20 (20%)	12 (12%)	08 (08%)		1.094 (0.605-1.976)
Conjuntivitis	No	75 (75%)	42 (42%)	33 (33%)	NS	0.933 (0.640-1.362)
	Si	25 (25%)	15 (15%)	10 (10%)		1.100 (0.639-1.895)
Sepsis neonatal	No	69 (69%)	41 (41%)	28 (28%)	NS	1.151 (0.777-1.705)
	Si	31 (31%)	16 (16%)	15 (15%)		0.839 (0.528-1.332)
RNPT	No	33 (33%)	17 (17%)	16 (16%)	NS	0.863 (0.587-1.268)
	Si	67 (67%)	36 (36%)	31 (31%)		0.982 (0.624-1.547)

Tabla 17. Datos ginecológicos de las madres de los RN infectados con *C. trachomatis* detectados por IMF directa

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
Ocupación	Hogar	75 (75%)	41 (41%)	34 (34%)	NS	1.093 (0.643-1.860)
	Otros	16 (16%)	08 (08%)	08 (08%)		0.907 (0.523-1.571)
Nacimiento vía vaginal	No	56 (56%)	25 (25%)	31 (31%)	0.049*	0.706 (0.509-0.977)
	Si	34 (34%)	23 (23%)	11 (11%)		1.830 (1.017-3.291)
Abortos	No	59 (59%)	28 (28%)	31 (31%)	NS	0.790 (0.586-1.066)
	Si	31 (31%)	20 (20%)	11 (11%)		1.591 (0.866-2.922)
Cesáreas	No	12 (12%)	07 (07%)	05 (05%)	NS	1.225 (0.420-3.572)
	Si	78 (78%)	41 (41%)	37 (37%)		0.970 (0.825-1.139)
Muerte neonatal	No	70 (70%)	37 (37%)	33 (33%)	NS	0.991 (0.834-1.178)
	Si	11 (11%)	06 (06%)	05 (05%)		1.060 (0.352-3.198)
Óbitos	No	74 (74%)	39 (39%)	35 (35%)	NS	0.937 (0.822-1.068)
	Si	07 (07%)	05 (05%)	02 (02%)		2.102 (0.433-10.211)
RPM	No	73 (73%)	39 (39%)	34 (34%)	NS	0.952 (0.798-1.136)
	Si	13 (13%)	08 (08%)	05 (05%)		1.328 (0.472-3.732)

* Significancia estadística menor de 0.05

Tabla 18. Datos ginecológicos de las madres de los RN infectados con *C. trachomatis* detectados por PCR

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
Ocupación	Hogar	75 (75%)	32 (32%)	43 (43%)	NS	1.147 (0.677-1.943)
	Otros	16 (16%)	08 (08%)	08 (08%)		0.853 (0.489-1.488)
Nacimiento vía vaginal	No	56 (56%)	28 (28%)	28 (28%)	NS	0.800 (0.582-1.100)
	Si	34 (34%)	22 (22%)	12 (12%)		1.467 (0.832-2.587)
Abortos	No	59 (59%)	35 (35%)	24 (24%)	NS	1.167 (0.855-1.593)
	Si	31 (31%)	15 (15%)	16 (16%)		0.750 (0.425-1.324)
Cesáreas	No	12 (12%)	08 (08%)	04 (04%)	NS	1.600 (0.519-4.933)
	Si	78 (78%)	42 (42%)	38 (38%)		0.933 (0.796-1.094)
Muerte neonatal	No	70 (70%)	38 (38%)	32 (32%)	NS	0.999 (0.840-1.187)
	Si	11 (11%)	06 (06%)	05 (05%)		1.009 (0.335-1.187)
Óbitos	No	74 (74%)	38 (38%)	36 (36%)	NS	0.933 (0.818-1.064)
	Si	07 (07%)	05 (05%)	02 (02%)		2.209 (0.455-10.734)
RPM	No	73 (73%)	39 (39%)	34 (34%)	NS	0.952 (0.798-1.136)
	Si	13 (13%)	08 (08%)	05 (05%)		1.328 (0.472-3.732)

Tabla 19. Medidas antropométricas de los RN infectados con *C. trachomatis* diagnosticados por IMF directa

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
Peso < 1500 g	No	50 (50%)	28 (28%)	22 (22%)	NS	0.699 (0.481-1.014)
	Si	41 (41%)	21 (21%)	20 (20%)		1.581 (0.963-2.597)
Talla < 42 cm	No	43 (43%)	22 (22%)	21 (21%)	NS	0.921 (0.622-1.363)
	Si	45 (45%)	25 (25%)	20 (20%)		1.099 (0.702-1.719)
Edad gestacional < 33 sem	No	43 (43%)	24 (24%)	19 (19%)	NS	1.072 (0.733-1.567)
	Si	48 (48%)	25 (25%)	23 (23%)		0.922 (0.590-1.442)
Capurro < a 33 sem	No	47 (47%)	26 (26%)	21 (21%)	NS	1.106 (0.735-1.665)
	Si	38 (38%)	19 (19%)	19 (19%)		0.894 (0.570-1.401)
Sexo	F	42 (42%)	28 (28%)	14 (14%)	0.037*	1.515 (1.037-2.213)
	M	50 (50%)	22 (22%)	28 (28%)		0.595 (0.363-0.975)

* Significancia estadística menor de 0.05

Tabla 20. Medidas antropométricas de los RN infectados con *C. trachomatis* diagnosticados por PCR

		Muestras	Ct (-)	Ct (+)	P <	IC 95%
Peso < 1500 g	No	50 (50%)	23 (23%)	27 (27%)	NS	0.699 (0.481-1.014)
	Si	41 (41%)	27 (27%)	14 (14%)		1.581 (0.963-2.597)
Talla < 42 cm	No	43 (43%)	19 (19%)	24 (24%)	NS	0.710 (0.473-1.066)
	Si	45 (45%)	28 (28%)	17 (17%)		1.477 (0.933-2.340)
Edad gestacional < 33 sem	No	43 (43%)	17 (17%)	26 (26%)	0.006*	0.575 (0.379-0.872)
	Si	48 (48%)	33 (33%)	15 (15%)		1.935 (1.192-3.140)
Capurro < a 33 sem	No	47 (47%)	22 (22%)	25 (25%)	NS	0.711 (0.486-1.042)
	Si	38 (38%)	25 (25%)	13 (13%)		1.555 (0.928-2.605)
Sexo	F	42 (42%)	19 (19%)	23 (23%)	NS	0.707 (0.477-1.046)
	M	50 (50%)	32 (32%)	18 (18%)		1.521 (0.960-2.411)

* Significancia estadística menor de 0.05

DISCUSIÓN

C. trachomatis es el microorganismo más frecuente en las infecciones de transmisión sexual y actualmente es considerado como un problema de salud pública. En las mujeres embarazadas, la infección por esta bacteria produce abortos de repetición, RPM, bajo peso del producto al nacer y mortalidad perinatal; mientras que en el RN produce conjuntivitis y neumonía (21,37). La prevalencia de infección por *C. trachomatis* en los RN de este estudio fue del 43% por PCR y del 46% por IMF.

La prevalencia de infección por *C. trachomatis* de este estudio fue diferente a las reportadas por Corrales y col.(28) del 13,33 % utilizando la prueba de cultivo e IMF directa y por la reportada por Vallejos-Medic(21) que fue del 0.49% mediante la técnica de ELISA.

En otro estudio llevado a cabo por López-Hurtado y cols. (38), reportaron que la prevalencia de *C. trachomatis* en RN con dificultad respiratoria fue del 12.9%. La técnica de diagnóstico que emplearon estos investigadores fue el cultivo celular e IMF, la diferencia obtenida en la prevalencia fue, que probablemente se debió a un aumento en el número de casos en la institución ya que ambos estudios se realizaron en el Instituto Nacional de Perinatología, o que posiblemente el médico neonatólogo ha observado un mayor número de datos clínicos que sugieran la participación de *C. trachomatis* como el causante de la infección en los RN que muestran dificultad respiratoria.

Además, en este estudio se determinó la sensibilidad y especificidad de la técnica PCR a partir del cultivo de células McCoy infectadas con muestras de aspirado bronquial con respecto al “estándar de oro” que es la técnica de cultivo celular con detección de EB de *C. trachomatis* por IMF directa. Los resultados mostraron que la sensibilidad y especificidad del PCR fue del 50% y 62.9% respectivamente, con valores predictivos positivos y negativos menores del 50% respectivamente. Estos resultados nos describen que hay más muestras positivas por IMF directa que por PCR.

La baja sensibilidad de la PCR puede ser por diversas causas tales como: la presencia de sustancias que pueden inhibir la reacción, que es más marcada cuando se trata de muestras endocervicales o de aspirado bronquial. Estos inhibidores pueden interferir con la DNA polimerasa mediante el bloqueo directo, total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al DNA de doble cadena, tales inhibidores comprenden: sales biliares, polisacáridos complejos, colágeno, melanina, mioglobina, proteinasas, urea, hemoglobina, inmunoglobulina G, etcétera.

El conocimiento de que algunos de los inhibidores son lábiles, se han realizado diferentes intentos para eliminarlos, como dejar las muestras a 37° C durante la noche o someterlas a ciclos de congelación-descongelación. Sin embargo, la PCR de punto final tiene la singular ventaja de poder ser objeto de pruebas a gran escala debido a su automatización (39,40,41). A pesar de lo anterior, existen aún técnicas más sensibles como la PCR de tiempo real, que muestra una sensibilidad y especificidad de 100% y 98.9%, respectivamente.

Otra posibilidad de que no haya funcionado la PCR se debió a que la bacteria no se encontrara viable en la muestra (deficiencia en el transporte, no refrigerada o almacenada por más de una semana) por lo que no se replicó en el cultivo celular, y por lo tanto, después de 72 h de cultivo, el DNA de las partículas bacterianas podría estar en proceso de apoptosis o degradación. Debido a lo anterior, no se lograría detectar el DNA de *C. trachomatis*. Para corroborar esta hipótesis se realizó el análisis directo por PCR (es decir de la muestra original antes del cultivo celular) de 18 muestras de aspirado bronquial, las cuales fueron tratadas con 3 ciclos de congelación y descongelación. De las 18 muestras, 14 fueron positivas, y 4 negativas por cultivo celular e IMF directa, mientras que por cultivo celular y detección por PCR solo 2 fueron positivas.

Al analizar las 18 muestras de forma directa por PCR, los resultados obtenidos mostraron 9 muestras positivas, de las cuales 8 eran positivas por IMF directa, estos

resultados demuestran que no hubo proliferación de la bacteria en el cultivo celular, ya que no se recuperó el DNA de la bacteria. En la Tabla 21 se observa que la sensibilidad del PCR después del cultivo celular fue 7.1%, mientras que en la Tabla 22 se observa que la sensibilidad de la PCR en las muestras directas que fue del 57.1%.

Tabla 21. Sensibilidad y especificidad obtenida en la prueba piloto para la PCR después de cultivo

		IMF		Total
		Positivas	Negativas	
PCR de cultivo	Positivas	01	01	02
	Negativas	13	03	16
Total		14	04	18

Sensibilidad= 07.1% **VPP= 50%**
Especificidad= 75% **VPN= 18.75%**

Tabla 22. Sensibilidad y especificidad obtenida en la prueba piloto para la PCR muestra directa

		IMF		Total
		Positivas	Negativas	
PCR directo	Positivas	08	01	09
	Negativas	06	03	09
Total		14	04	18

Sensibilidad= 57.1% **VPP= 88.8%**
Especificidad= 75% **VPN= 33.3%**

Otro aspecto interesante, es que durante la realización de este estudio hubieron ciertos factores que probablemente influyeron en los resultados y en la sensibilidad de la PCR, tales como: contaminación de reactivos, trabajar con muestras de aspirado bronquial que tienen moco y pueden inhibir la PCR, trabajar con una concentración inadecuada de DNA de las muestras (ya que al tener una baja concentración no se logran

obtener las copias de DNA suficientes) o altas concentraciones de DNA presentes (se pueden formar aglomerados y dar falsos positivos). Todas estas situaciones reducen la sensibilidad de la técnica de PCR si no son evitadas al momento de desarrollar la técnica.

Aunque se dispone de varios métodos para la detección de *C. trachomatis* en diversos especímenes clínicos, las pruebas de amplificación de DNA, como la PCR de punto final ha demostrado que alcanza una sensibilidad del 98% (gracias a que el límite inferior de detección es de 1 a 10 cuerpos elementales), y una especificidad del 97 al 100%. (42,43) a diferencia de lo que ocurre con el cultivo celular tiene una sensibilidad del 70 al 90% y una especificidad del 100%.

Por otro lado, el cultivo celular no está ampliamente disponible y tiene una alta tasa de falsos negativos cuando se comparan con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. La detección del microorganismo por IMF directa también muestra una sensibilidad del 70 al 100% y una especificidad mayor al 95%.(2). Realizar el diagnóstico de *C. trachomatis* no es fácil, la sensibilidad del cultivo celular varía de acuerdo a diversos factores tales como: la calidad de las muestras, los sistemas de transporte utilizado, el estado en el que se encuentren las células, la velocidad de centrifugación, etc. Una ventaja del cultivo es que se conserva el microorganismo para estudios adicionales, tales como: determinación del genotipo o sensibilidad antimicrobiana. (34,39). Al integrar la IMF directa para la detección de algún antígeno de membrana ya sea, la MOMP o el LPS, se consigue un mayor porcentaje de sensibilidad en el rango de 80-90%, y una especificidad del 98%, con valor predictivo positivo de 62% y negativo de 99%, siendo la limitante de este, que la lectura depende de la experiencia del observador para dar un resultado como positivo o negativo.(39). En esta investigación se emplearon anticuerpos monoclonales anti-MOMP de *C. trachomatis* por lo que solo detectará EB, es decir formas maduras ya que los RB y las inclusiones no serían detectados fácilmente, esto explicaría porque las muestras positivas por PCR no fueron detectadas por IMF.

Las infecciones respiratorias debidas a *C. trachomatis* son las predominantes en los neonatos, quienes contraen la infección al pasar a través del canal de parto de su madre. Frecuentemente, los infantes infectados tienen conjuntivitis, y pueden presentar taquipnea, tos, estertores e infiltrados difusos en la radiografía de tórax. La enfermedad generalmente es leve, y la falla respiratoria rara vez se llega a dar, aunque se presenta una alta incidencia de secuelas respiratorias crónicas, incluyendo la obstrucción de las vías respiratorias y asma. (20,44,45), con base a estos datos clínicos se trató de determinar la sensibilidad y la especificidad de la PCR y de la IMF.

El SDR ha sido asociado con infección por *C. trachomatis*, este síndrome actualmente se define como un síndrome clínico y patofisiológico complejo de daño pulmonar agudo de causa multifactorial que amenaza la vida, caracterizado por una severa dispnea, hipoxemia arterial, disminución del rendimiento respiratorio e infiltrados difusos bilaterales. Los resultados de la tabla 3 y 4 mostraron que la sensibilidad y especificidad del PCR fue del 40.2 % y 51.5% respectivamente, y de IMF de 44.7 % y 51.5 %, cuando se presenta este síndrome, este bajo valor de sensibilidad y especificidad es debido a que este síndrome no solo es provocado por *C. trachomatis*, sino es causado por otros microorganismos como son en mayor frecuencia *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, y en menor frecuencia por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pyogenes*, así como por microorganismos atípicos como Clamidias, Micoplasmas y Ureaplasmas. (46)

La sensibilidad y especificidad en ambas técnicas cuando hubo RPM fue del 88.7%, y 53.4% respectivamente. La RPM se define como la pérdida de la integridad del saco gestacional antes del inicio del trabajo de parto, esto es independiente de la edad gestacional.

Aunque hay una buena sensibilidad para detectar la *C. trachomatis* cuando se presenta este padecimiento, ambas técnicas muestran una baja especificidad ya que este

microorganismo no es el único desencadenante de la RPM, ya que esta puede ser provocada por *Neisseria gonorrhoea*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* del grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y levaduras además de otros factores etiológicos. (47).

La sensibilidad y especificidad de ambas técnicas para detectar la presencia de *C. trachomatis* cuando el RN presenta la DBP menor de 40 % y menor de 60 % respectivamente. Es probable que esta baja sensibilidad y especificidad se deba a que la DBP es una enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa que se presenta casi totalmente en RN prematuros, mas cuando tienen bajo peso al nacer (principalmente en los menores de 1000 g), que desarrolla una insuficiencia respiratoria después de la primera semana de vida, con anomalías radiológicas pulmonares y necesidad de oxígeno suplementario a los 28 días de edad o después de las 36 semanas de edad gestacional.

Esta se puede presentar por infección con diversos microorganismos como los antes mencionados, además de factores como predisposición genética. (48,49)

Recientemente se asociado que la infección por *C. trachomatis* puede causar sepsis, que se define como el síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica, que se confirma al aislarse en hemocultivos o cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR), bacterias, hongos o virus y que se manifiesta dentro de los primeros 28 días de vida. Al analizar la sensibilidad y especificidad de estas técnicas para detectar este padecimiento se encontró que ambas son menores al 50 y 60% respectivamente. La sepsis neonatal puede ser provocada por un número variado de microorganismos como son *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Fusobacterium spp*, *Gardnerella spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter spp*. (50)

Los nacimientos prematuros o menores de 33 semanas de gestación también se ha asociado con infección por clamidia durante el embarazo. Los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad para ambas técnicas estas fueron de 46.2 % y 51.5 % respectivamente.

Estos resultados son probablemente debido a que *C. trachomatis*, no es la única bacteria que puede desencadenar un parto prematuro ya que también hay varios microorganismos relacionados con esta complicación en el embarazo como son *Streptococcus* del grupo B, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y los microorganismos que causan vaginosis bacteriana como los anaerobios facultativos, *Gardnerella vaginalis*, micoplasmas genitales y *Mobiluncus sp.* (51).

En lo que se refiere a conjuntivitis, la prevalencia obtenida en este trabajo fue del 9% por IMF directa, y del 10% por PCR, estos datos son diferentes a los reportados por Rours y cols.(52) del 59.4% por PCR, Ress(53) con una prevalencia del 48.8% y Schachter y cols. (54) con el 58.3%; estas dos últimas diagnosticadas por IMF directa, las diferencias en la prevalencia obtenida en este trabajo con respecto a los reportes mencionados se puede deber a que en este estudio la muestra con la que se trabajó fue aspirado bronquial de los RN, por lo que no se sabe cuántos neonatos desarrollaron conjuntivitis, ya que las prevalencias obtenidas en este trabajo en cuanto a conjuntivitis, resultaron de las pocas muestras de raspado conjuntival analizadas.

Otro de los síntomas clínicos provocados por la infección por *C. trachomatis* es la dificultad respiratoria y en particular la neumonía neonatal, para la cual se obtuvo una prevalencia del 22% y del 18% mediante la técnica de IMF directa y PCR respectivamente. Estas prevalencias son similares a las reportadas por Schachter y cols. (54) del 27.2% por cultivo celular y por Chang y cols. (55), la cual fue del 10.5% por IMF directa, estos últimos mencionan un riesgo del 5% al 20% de sufrir neumonía debido a la infección por *C. trachomatis*. (55)

Las alteraciones más importantes durante una infección por *C. trachomatis* durante el embarazo es la corioamnionitis, líquido amniótico teñido de meconio, prematuridad, bajo peso al nacer, RPM e insuficiencia respiratoria. En un estudio, llevado a cabo por Numazaki (56) con 16 sueros de recién RNPT y con enfermedad respiratoria crónica (clínicamente diagnosticada como DBP), se encontró que 5 presentaron anticuerpos IgM contra *C. trachomatis*. En el presente estudio, 20 RN con DBP fueron positivos por PCR de un total de 100 recién nacidos, además de 67 RN con SDR 27 fueron PCR positivo.

En otro trabajo realizado por Numazaki et. al (57) con 5 muestras nasofaríngeas de neonatos por PCR, encontró que 4 fueron positivas para *C. trachomatis*, en este estudio de 100 muestras de aspirado bronquial 43 fueron positivas por PCR para *C. trachomatis*. Aún cuando son pocas muestras las trabajadas por Numazaki (57) la mayoría fueron positivas para esta bacteria al igual que en este trabajo, aunque se trabajó con un mayor número de muestras.

CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones adecuadas para desarrollar la técnica de PCR para la detección de *C. trachomatis* a partir de células McCoy previamente infectadas con muestras de aspirado bronquial de RN con dificultad respiratoria.
- Se detectaron 46 muestras positivas para infección por *C. trachomatis* por IMF directa.
- Se detectaron 43 muestras positivas para infección por *C. trachomatis* por PCR.
- No se demostró que la PCR fuera mejor que IMF directa.
- El tratamiento de muestra con 3 ciclos de congelación y descongelación es útil para realizar el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* mediante PCR.

REFERENCIAS

1. Michael Ward. En: www.chlamydiae.com [Sede web]. Inglaterra. 2008 (acceso 01 de marzo de 2011). Disponible en www.chlamydiae.com.
2. Iván-Ruiz A, Sánchez R, Ostos O, Bonilla H & Correa C. Estudio piloto de prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* detectada por PCR en mujeres con parto prematuro en el Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2005;230:255-230.
3. Lutter E, Bonner C, Holland M, Suchland R, Stamm W, Jewett T, et al. Phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infection and Immunity*. 2010;78:3678–3688.
4. Lienard J, Croxatto A, Aeby S, Jatón K, Posfay-Barbe K, Gervais A, et al. Development of a new *Chlamydiae*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49:2637-2642.
5. Ostos-Ortiz OL & Mélida-Sánchez R. *Chlamydia trachomatis*: avances y perspectivas. *Nova. Publicación científica*. 2003;1:81-93.
6. Coy B, Ostos-Ortiz OL, Pinzón J & Mélida-Sánchez R. Determinación de la asociación entre *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, en muestras de orina mediante técnicas de biología molecular. *Nova. Publicación científica*. 2004;2:28-32.
7. Manavi K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2006;20:941-951.
8. Gallegos-Ávila G. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* sp. Su relación con la infertilidad masculina. *Bol Col Mex Urol*. 2003;18:106-112.
9. Sandoz K & Rockey D. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. *Future Microbiol*. 2010;5:1427–1442.
10. Agrawal T, Vats V, Salhan S & Mittal A. Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with *Chlamydia trachomatis*. *Clinical*

and Experimental Immunology. 2007;148:461–468.

11. Rours G, de Krijger R, Ott A, Willemsse H, de Groot R, Zimmermann L, et al. Chlamydia trachomatis and placental inflammation in early preterm delivery. Eur J Epidemiol. 2011;26:421-428.

12. Zhong G. Chlamydia trachomatis secretion of proteases for manipulating host signaling pathways. Frontiers in microbiology. 2011;2:1-5.

13. Derré I, Swiss R & Agaisse H. The lipid transfer protein CERT interacts with the Chlamydia inclusion protein IncD and participates to ER-Chlamydia inclusion membrane contact sites. PLoS Pathog. 2011;7:1-13.

14. Wang C, Tang J, Crowley-Nowick PA, Wilson CM, Kaslow RA & Geisler WM. Interleukin (IL)-2 and IL-12 responses to Chlamydia trachomatis infection in adolescents Clinical and Experimental Immunology. 2005;142:548–554.

15. Ohman H, Tiitinen A, Halttunen M, Lehtinen M, Paavonen J & Surcel H. Cytokine polymorphisms and severity of tubal damage in women with Chlamydia-associated infertility. J Infect Dis. 2009;199:1353-1359.

16. Byrne G. Chlamydia trachomatis strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. J Infect Dis. 2010;201:126–133.

17. Howie S, Horner J & Horne A. Chlamydia trachomatis infection during pregnancy - known unknowns. Discovery Medicine. 2011;12:57-64.

18. Alevtina G, Horowitz A, Hassan J, Ángeles N, Tetteh K, Riley E, et al. Systemic Effector and Regulatory Immune Responses to Chlamydial Antigens in Trachomatous Trichiasis. Front Microbiol. 2011;2:1-13.

19. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman D, Jolley K, Keijzers W., Vretou E, et al. Multilocus sequence typing of Chlamydia reveals an association between Chlamydia psittaci genotypes and Host Species. PLoS One. 2010;5:1-5.

20. Bourke SJ. Chlamydial respiratory infections. BMJ. Londres. 1993;3:1219-1220.

21. Vallejos-Medic C, Enríquez-Guerra MA, López-Villegas MR, Valdez-García JA, Pérez Pría-Kasusky P. Cérvico-vaginitis por *Chlamydia trachomatis* en mujeres atendidas en un hospital de Acatlán de Osorio, Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. abril-junio 2010;30:49-52.
22. Quint K, Geraets D, van den Munckhof H, de Koning M, Smelov V, Melchers W, et al. Evaluation of a novel *Chlamydia trachomatis* microsphere suspension assay for detection and genotyping of the different serovars in clinical samples. *J Mol Diagn*. 2011;13:152-159.
23. López-Hurtado M & Guerra-Infante FM. Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatol Reprod Hum*; 2002;16:140-150.
24. Gallo-Valet L, Entrocassi C, Corominas A & Rodríguez-Fermepin M. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. *BMC Res Notes*. 2010;3:1-6.
25. Ruiz-del-Río N, Rodríguez-Prado S, Martínez-Ormaechea E, Agüero-Balbín J, Beltrán-Núñez P & Martínez-Sanz F. Newborn chronic follicular conjunctivitis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83:559-561.
26. Romero-Cabello R. *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Ed. Panamericana. 3ra edición México 2007. Capítulo 100:1076-1077.
27. Idahl A, Lundin E, Jurstrand M, Urbano K, Elgh F, Ohlson N, et al. *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* plasma antibodies in relation to epithelial ovarian tumors. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2011;2011:1-10.
28. Corrales H, Nieves B, Sánchez K, Vegas L & Santos M. Infección por *Chlamydia*

trachomatis en embarazadas con complicaciones obstétricas. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 2003;45:27-31.

29. Blake I, Burton M, Salomón A, West S, Basáñez M, Gambhir M, et al. Targeting Antibiotics to Households for Trachoma Control. *PLoS desd Trop Dis*. 2010;4:1-10.

30. Guerra-Infante FM, Tapia-Yáñez JR, López-Hurtado M, Flores-Medina S & Díaz-García FJ. Infección por *Chlamydia trachomatis* en varones y su asociación con las alteraciones ginecológicas de su compañera sexual. *Revista de Investigación Científica*. 2005;57:406-414.

31. Gita S, Suneeta M, Anjana S, Niranjana N, Sujata M & Pandey RC. *trachomatis* in Female Reproductive Tract Infections and RFLP-Based Genotyping: A 16-Year Study from a Tertiary Care Hospital. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2011;2011:1-6.

32. Wang Y, Liu J, Colmillo F, El L, Li J, Zhang Q, et al. Microbiological etiology in children with community acquired pneumonia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010;12:184-187.

33. Webley W, Tilahun Y, Lay K, Patel K, Stuart E, Andrzejewski C, et al. Occurrence of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory infections. *Eur Respir J*. 2009;33:360-367.

34. Black C. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10:160–184.

35. Alzahrani A, Obeid O, Hassan M & Almulhim A. Screening of pregnant women attending the antenatal care clinic of a tertiary hospital in eastern Saudi Arabia for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*. 2010;31:81-86.

36. Harkins A & Munson E. Molecular Diagnosis of Sexually Transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2011;2011:1-17.

37. Fresse A, Sueur J & Hamdad F. Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28:326-31.
38. López-Hurtado M, Zamora-Ruíz A, Flores-Medina S, Guerra-Infante FM. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in newborn infants with respiratory problems. *Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Perinatología.* 1999;41:267-272.
39. Gallenga P, Del Boccio M, Rapinese M, Di Iorio A, Toniato E & Martinotti S. Molecular approach by PCR is the best method to detect the presence of *Chlamydia trachomatis* and to define the true agent of ocular bacterial inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24:285-296.
40. Harminder S, Arun D. Randomised trial comparing topical povidone-iodine and chloramphenicol for the prevention of neonatal conjunctivitis. *British Journal Ophthalmol.* 2007;91:1430–1434.
41. La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. *News Letter Microbial.* 2009;1-2.
42. Porter M, Mak D, Chidlow G, Harnett G & Smith D. The molecular epidemiology of ocular *Chlamydia trachomatis* infections in Western Australia: implications for trachoma control. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:514-517.
43. Khan E, Hossain M, Mahmud M, Rahman M, Nahar K, Mahmud N, et al. Molecular Diagnosis of Genital *Chlamydia trachomatis* Infection by Polymerase Chain Reaction. *Mymensingh Med J.* 2011;20:362-365.
44. Arráiz N, Ginestre M, Perozo A, Castellano M, Urdaneta B & García MM. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela. *Rev Chil Infectol.* 2007;24:48-52.

45. Rours G, Duijts L, Moll H, Arends L, Verbrugh H, Jaddoe V, et al. Chlamydia trachomatis infection during pregnancy associated with preterm delivery: a population-based prospective cohort study. *Eur J Epidemiol.* 2011;26:493–502.
46. Travieso-Novelles M & Blanco-Hidalgo O. Association between involved mechanisms and therapeutic targets in the acute respiratory distress syndrome. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2009. Disponible en: *Rev Cubana Invest Bioméd* vol.28 no.2 Ciudad de la Habana Apr.-June 2009. URL disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002009000200004
47. León-González H & Nitola M. Guía de manejo. Ruptura prematura de membranas: Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C. Asociación Bogotana de Obstetricia y Ginecología (Asbog). 2009.
48. Sabogal-Rosas C. & Talmaciu I. Bronchopulmonary dysplasia (pulmonologist's point of view). *Rev. peru. pediatr.* 2088;61:176-187.
49. Gasque-Góngora J. Displasia broncopulmonar. *Rev Mex Pediatr* 2010;77:27-37.
50. Coronell W, Pérez C, Guerrero C & Bustamante H. Sepsis neonatal. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.* 2009;23:57-68.
51. Vadillo-Ortega F, Beltran-Montoya J & Zaga-Clavellina V. Infección intrauterina y nacimiento pretérmino. *Rev. invest. clín.* 2004;56:93-102.
52. Rours I, Hammerschlag M, Ott A, Verbrugh H, De Groot R, Verkooyen R. *Chlamydia trachomatis* as a Cause of Neonatal Conjunctivitis in Dutch Infants. *Pediatrics.* 2008;121:320-326.
53. Rees E & Tait R. Neonatal conjunctivitis caused by *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. *British Journal of Venereal Diseases.* 1977;53:173-179.

54. Schachter J, Grossman M, Holt J, Sweet R & Spector S. Infection with *Chlamydia trachomatis*: Involvement of Multiple Anatomic Sites in Neonates. *The journal of infectious diseases*. 1979;139:232-234.
55. Chang K, Cheng VYW, Kwong N. Neonatal haemorrhagic conjunctivitis: a specific sign of chlamydial infection. *Med J*. 2006;12:27-32.
56. Numazaki K, Chiba S, Kogawa K, Umetsu M, Motoya H & Nakao T. Chronic respiratory disease in premature infants caused by *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Pathol*. 1986;39:84-88.
57. Numazaki K, Asanuma H & Niida Y. *Chlamydia trachomatis* infection in early neonatal period. *BCM Infectious Diseases*. 2003;3:1-5.