

54
2/3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DIAGNOSTICO DE LA INFECCION
POR
Chlamydia trachomatis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA SEPULVEDA GONZALEZ

DIRECTOR: DR. ERNESTO CALDERON JAIMES

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
I.- RESUMEN	1
II.- ABREVIATURAS	2
III.- INTRODUCCION	3
IV.- GENERALIDADES	6
1.- TAXONOMIA	7
2.- CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS	8
3.- CICLO DE DESARROLLO	12
4.- INMUNOLOGIA	16
5.- PATOLOGIA	19
6.- DIAGNOSTICO	21
7.- TRATAMIENTO	26
V.- OBJETIVO	28
VI.- MATERIALES Y METODOS	30
1.- POBLACION ESTUDIADA	31
2.- OBTENCION DE MUESTRA	32
3.- MATERIAL Y EQUIPO	32
4.- PROCEDIMIENTOS	34
5.- ANALISIS ESTADISICO	41
VII.- RESULTADOS Y DISCUSION	45
VIII.- CONCLUSIONES	56
IX.- BIBLIOGRAFIA	59

I.- RESUMEN

La presente Tesis está basada sobre el estudio que se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología para determinar la prevalencia de Chlamydia trachomatis en mujeres embarazadas que presentaban patología cervicovaginal, utilizando como grupo control a mujeres no embarazadas que presentaban de igual forma patología cervicovaginal.

El método utilizado para el diagnóstico directo fue el basado en la técnica de ELISA denominada Chlamydiazyme.

La prevalencia del microorganismo en las mujeres embarazadas fue del 8.9% (39/435) no encontrándose diferencia significativa con respecto al grupo control que presentó un 7.5% (35/469) de infección, valores que entran en los límites inferiores al rango reportado de 2-21% en la literatura. La edad gestacional y el embarazo no son factores que favorezcan la infección. Por último el factor que se asoció como predisponente a la infección fue la edad, ya que en ambos grupos la mayor incidencia se encontró en el rango de 15 a 20 años.

II.- ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ATP	Adenosintrifosfato
C	Grados centígrados
CE	Cuerpo elemental
CR	Cuerpo reticular
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Análisis enzimático inmunoabsorbente
HCl	Acido clorhídrico
IF	Inmunofluorescencia
IgA, IgG, IgM	Inmunoglobulinas A, G o M
LGV	Linfogranuloma venéreo
M	Molaridad
MIF	Microinmunofluorescencia
min	Minuto
ml	Mililitro
N	Normalidad
nm	Nanómetros
nl	Microlitros
OPD	Orto-fenilendiamina
p	Proporción
RNA	Acido ribonucleico
seg	Segundo
2 SP	Buffer de fosfatos con sacarosa 0.2M
X ²	Ji cuadrada

III.- INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por contacto sexual, las llamadas enfermedades venéreas, por su repercusión social y clínica han tomado especial interés en su diagnóstico, tratamiento y control. Con el descubrimiento de los antibióticos disminuyeron su incidencia y se tuvo un casi total control sobre ellas. Pero el problema de las enfermedades venéreas persiste y vuelve a tener auge en nuestros días con el descubrimiento de nuevas infecciones o incluso el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antibióticos por parte de estos patógenos.

Las infecciones causadas por la Chlamydia trachomatis en el humano tienen cada vez mayor importancia, puesto que este microorganismo ha tomado el primer lugar de frecuencia dentro de este grupo de enfermedades. (1)

El linfogranuloma venéreo (LGV) y el tracoma son sus presentaciones clínicas más comúnmente conocidas, en tanto que en la mujer ha sido menos definida por no presentar una sintomatología específica.

Sus repercusiones en el neonato dan importancia a su diagnóstico durante el embarazo para proporcionar un tratamiento adecuado y oportuno.

En México la falta de estudios sobre las enfermedades que

causa la Chlamydia trachomatis y su incidencia en nuestra población trae como resultado que pocos sean los hospitales y laboratorios que hayan implementado rutinariamente las metodologías para su diagnóstico.

IV.- GENERALIDADES

1.- TAXONOMIA

El conocimiento de las llamadas Chlamydia se tuvo de manera inicial por su presentación clínica, al describirse el tracoma por los egipcios en el Siglo I. A.C. y no ser sino hasta 1907 en que Von Prowasek descubrió su agente causal al que denominó Chlamydozoa. La psittiacosis, otra infección causada por este género, fue descubierta a partir de una epidemia en 1930. Desde entonces por sus semejanzas, sobre todo en su forma única de reproducción se comenzaron a correlacionar para poderlas clasificar dentro de algún género conocido. (2,3)

Con el pasar del tiempo para clasificarle se le consideró: protozooario al ser observadas las inclusiones intracitoplasmáticas, después dio la idea de ser un virus de gran tamaño por su crecimiento intracelular, incluso se le denominó como bacteria por su sensibilidad a sulfonamidas y poseer tanto DNA como RNA. (3)

Fue con toda esa confusión sobre el género a asignarle y conforme se ampliaban los conocimientos sobre sus características que se le denominó de varias formas, entre ellas: Bedsonia, TRIC, Rickettsia formis, etc., y no es sino hasta 1945 en que Jones, Rake y Stearns dieron el primer nombre válido taxonómicamente: Chlamydia (del griego Chlamys,

que significa manto o cubierta) para indicar la presencia de una matriz que rodea a los cuerpos elementales. (2) Cuadro 1.

En la actualidad por su modo único de reproducción se les ha colocado en un lugar aparte dentro de la clasificación encontrándose en el orden de los Chlamydiales, con una familia Chlamydiaceae, un género Chlamydia y dos especies: C.trachomatis y C.psittaci. (2,4)

2.- CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS

Las dos especies se diferencian entre si, ya que la C.trachomatis es susceptible a antibióticos, puede producir mayor cantidad de glicógeno y folatos, mientras que la C.psittaci no. Además al hibridar ambos DNA, cruzan en un 10% de sus bases. (2)

En cuanto a su patogenicidad la C.trachomatis es parásito exclusivo del humano, mientras que la C.psittaci es aislada principalmente de aves y mamíferos pequeños que pueden llegar a infectar al humano. (2)

CUADRO 1

DIFERENCIACION ENTRE Chlamydia, Virus y Bacterias

	<u>Chlamydia</u>	<u>Virus</u>	<u>Bacterias</u>
Medida (nm)	200-1200	15-350	300-3000
Forma	cocoide	simétrico	variado
Parásitos obligados	si	si	no
Ac. nucleicos (DNA,RNA)	2	1	2
Pared celular compleja	si	no	si
Ac. murámico	no	no	si
Modo de reproducción	ciclo- complicado y fisión	eclipse- síntesis- ensable	fisión
Sensibilidad a antibióticos	si	no	si
Ribosomas	si	no	si
Enzimas metabólicas	si	no	si
Producción de energía	no	no	si

De Page L.A. (2)

Las Chlamydia son definidas como microorganismos cocoides (200-1200nm), intracelulares, los cuales se multiplican solamente en el citoplasma de la célula huésped por un proceso similar a la fisión binaria, se les consideran por sus restricciones metabólicas como parásitos energéticos; poseen tanto DNA como RNA, son inmóviles y sensibles a antibióticos.

Se ha demostrado que el género Chlamydia presenta dos formas denominadas cuerpo elemental (CE) y cuerpo inicial o reticular (CR), las que difieren entre sí. El primero tiene un tamaño de 200-400 nm y es la forma infectante adaptada para sobrevivir extracelularmente, presentando una pared trilaminar rígida similar a la de los gramnegativos, pero carente de ácido murámico, se tiñe de modo característico rojo-azulado con la tinción de Giemsa. Mientras que el cuerpo reticular o inicial mide de 800-1200 nm y es la forma intracelular y reproductora, a diferencia de la anterior su pared no está ligada por uniones peptídicas, lo que la hace más delgada y frágil, permitiendo un intercambio de sustancias con el medio ambiente. Con la tinción de Giemsa se tiñe de color azul. (12) Cuadro 2.

Grupos de éstas partículas forman las inclusiones características, que pueden contener una mezcla de partículas grandes y pequeñas, observándose de color púrpura y en

forma de media luna con la tinción de Giemsa. (6,7)

CUADRO 2

DIFERENCIAS ENTRE CUERPO ELEMENTAL Y RETICULAR

	Cuerpo Elemental	Cuerpo Reticular
Diámetro (nm)	200-400	500-1200
Tiempo de aparición en el ciclo de desarrollo	tardío	temprano
Infectividad	+	-
Multiplicación intracelular	-	+
Lisis por tripsina	-	+
Ac. murámico	-	-
DNA	compacto	disperso
Proporción RNA/DNA	1:1	3:4
Ribosomas	escasos	abundantes
Generación neta de ATP	-	-
Sistema de transporte ATP/ADP	-	+
Liberación de CO dependiente de ATP de glucosa 6 fosfato, piruvato, glutamato y aspartato.	+	+
Síntesis de proteínas libres del huésped dependientes de ATP	-	+
Pared celular	rígida	frágil

3.- CICLO DE DESARROLLO

El ciclo de desarrollo puede dividirse en tres fases:

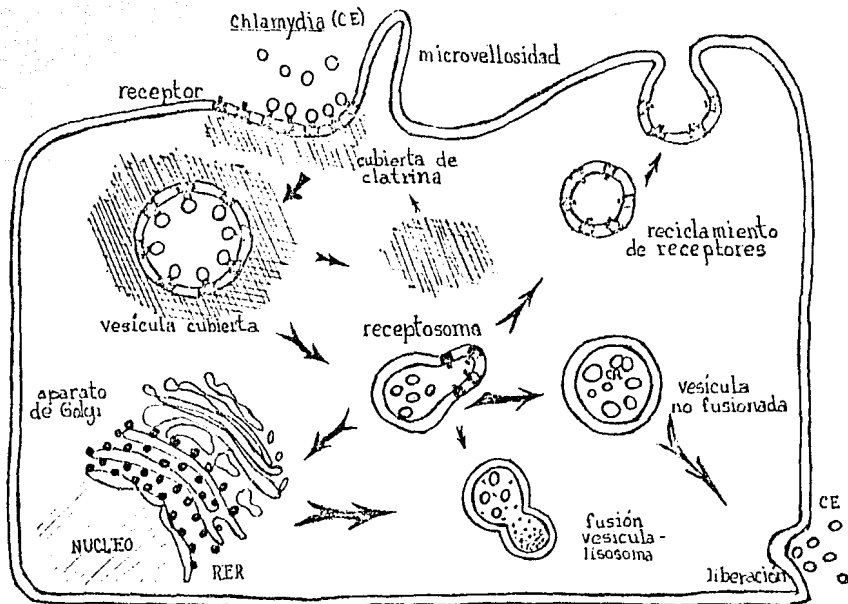
- 1) Entrada del CE a las células huésped y su reorganización en CR.
- 2) Multiplicación del CR.
- 3) Conversión de gran parte de la población del CR en una generación de CE los cuales se liberan de las células huésped.

Analizando cada una de las fases, se ha encontrado que la C. trachomatis tiene preferencia en la adhesión a epitelios columnares genitales y oculares. Esta adhesión es favorecida en los sitios receptores específicos, localizados en la base de los microfilamentos superficiales de la célula, iniciándose quizá por fuerzas electrostáticas. Estos receptores celulares son de naturaleza glicoproteica y se requieren para su unión la presencia de grupos amino y carbohidratos en la superficie clamidial. (8)

Una vez realizada ésta unión, la Chlamydia penetra en la célula por un mecanismo en el cual escapa de la fusión con el fagosoma y evita así su degradación, no sin antes provocar alteraciones en la membrana, como cambios en su fluidez, carga e hidrofobicidad, que repercute en la disminución de la

respuesta humoral (complemento) y celular (linfocitos Tc) e incluso en la fusión fagolisosomal. (10)

En la C.psittaci se ha estudiado más a fondo este mecanismo de entrada donde se ha propuesto la realización de un proceso de endocitosis mediada por el receptor que ocasiona la formación de una depresión de la membrana que se invagina dando lugar a una vacuola móvil dentro del citoplasma que es rodeada de la proteína clatrina. En el interior esta proteína se desprende de la vacuola y se reciclan nuevamente los receptores específicos a la superficie de la membrana. (9)



CICLO DE DESARROLLO DE CHLAMYDIA'

*DE Hodinka RL; 1986.(9)

Dentro de la vacuola los CE sufren cambios al ser reducidos los complejos de su pared a estados monoméricos y permitir el aumento de la permeabilidad con el paso de ATP y otros nucleósidos necesarios para la síntesis macromolecular con la consecuente reorganización en cuerpos iniciales. La estructura donde se lleva a cabo la transformación se conoce como receptosoma y es expandido por el aumento de CR reproducidos por fisión binaria. (11)

Con la generación de nuevas partículas infectivas se presenta la aparición de material extraño en la superficie celular que actúa como antígeno de género. (9)

Se ha sugerido que en la C.trachomatis se lleva a cabo una fusión de las vesículas formando así la gran inclusión. En esta etapa se libera glicógeno al medio como producto de su metabolismo, que es detectado por la tinción con iodo. En la C.psittaci por la formación de pequeñas y múltiples inclusiones, el glicógeno que es producido en bajas concentraciones no es detectado por la tinción de iodo. (12)

Posteriormente los CR se colapsan y son liberados de la célula en forma de CE al parecer por un mecanismo similar a la exocitosis.

Se ha encontrado que dependiendo de la concentración del

inóculo inicial será la toxicidad hacia la célula hospedera, ya que una elevada concentración provoca la muerte celular y no llega a producirse la replicación clamidial, mientras que a bajas concentraciones las inclusiones se desarrollan dentro de las células, donde incluso las células pueden dividirse y producir células hijas o no. (3)

4.- INMUNOLOGIA

Los Chlamydiales son complejos, antigénicamente hablando, ya que poseen antígenos de género, especie y serotipo específicos. Cada uno de éstos tienen sus propias características que sirven para su clasificación. En la actualidad se sabe que el antígeno de grupo o género específico es un polisacárido ácido de alto peso molecular relacionado con la estructura del ácido 2-ceto-3-desooctanoico de los gramnegativos (similar al de Salmonella) y estable al calor, éste ha sido detectado por la fijación del complemento. (3,4)

Los antígenos especie específicos se evidencian por fluorescencia directa e inmunolectroforesis bidimensional, son de naturaleza proteica lábiles al calor, altamente inmunogénicos y están asociados principalmente a los antígenos de membrana.

Por último los antígenos serotipo específicos con estructura proteica son detectados por microinmunofluorescencia indirecta que en el caso de la C.trachomatis presenta 15 serotipos que tienen complejas relaciones serológicas entre

ellos y donde cada serotipo está asociado a una determinada enfermedad, con diferencias incluso de invasividad, como por ejemplo, el serotipo del linfogranuloma venéreo es el más invasivo por sus diferencias en el DNA con respecto a otros serotipos. (3,7) Cuadro 3.

CUADRO 3

SEROTIPOS DE Chlamydia trachomatis

Tracoma hiperendémico	A	B	Ba	C	J			
Infección genital y paratracoma	D	E	F	G	H	I	K	
Linfogranuloma venéreo	L1	L2	L3					

De Schachter J. (3)

Con todo lo anterior debemos esperar que la respuesta inmune por parte del hospedero presente también características especiales donde debe considerarse primero, que el inicio de una respuesta inmune puede no correlacionarse con la resistencia de la continuidad de la infección o subsecuentes infecciones. Esto no aclara por qué la respuesta inmune que acompaña a una infección adquirida naturalente no da una protección duradera a subsecuentes infecciones clamidiales. Puede ser debido a la variabilidad antigénica entre las cepas, a la presencia de Chlamydias viables que mantengan la inmunidad o a una adaptación clamidial que resulta de la destrucción o evasión de la inmunidad protectora.

En segundo lugar, las manifestaciones francas de la enfermedad, se deben más a la respuesta inmune local que a la replicación de Chlamydia por si misma.

Un tercer factor muestra que la mayor parte de las infecciones al final se resuelvan vía el sistema inmunitario, sin embargo, este es otro punto especial para Chlamydia, la cual puede persistir y llegar a ser crónica como en el tracoma, de tal manera que la respuesta inmunitaria a la infección contribuye más a la patogenia que a la resolución de la infección.

Los anticuerpos que aparecen en suero son de tipo IgG o IgM

(de vida corta) y locales del tipo IgG o IgA (en lágrimas o secreciones del cérvix y uretra). La respuesta local puede servir como limitante para desarrollar la infección y controlar estadios agudos de la enfermedad, aunque la erradicación puede no ocurrir aún en la presencia de elevados títulos de anticuerpos. (13)

5.- PATOLOGIA

En la actualidad las infecciones causadas por C.trachomatis ocupan un lugar importante dentro de las enfermedades de transmisión sexual debido al desplazamiento que de las infecciones clásicas (gonorrea y sífilis) han hecho, puesto que son las que con mayor frecuencia se reportan dentro de este grupo, aunado a su variada presentación y que sus repercusiones causan especial interés. (1,14)

La C.trachomatis es un microorganismo que solamente parasita al humano y que puede transmitirse de tres maneras principalmente, de las cuales depende su presentación clínica:

En primer lugar, la infección ocular causada por el contacto mano-ojo, con secreciones contaminadas, lo que ocasiona conjuntivitis folicular, queratinitis y el llamado tracoma en el adulto. (3,6,7)

La transmisión por contacto sexual ocasiona en el hombre un cuadro clínico muy similar al de la gonorrea denominado uretritis no gonococcica, también se puede desarrollar uretritis postgonococcica y el llamado linfogranuloma venéreo. (6,7) En la mujer la infección ascendente causa cervicitis (3,6,15), endometritis (16) e incluso salpingitis (17) con posible infertilidad subsecuente (18) así como el síndrome uretral agudo (19). También se ha reportado que estas infecciones pueden cursar en forma asintomática, por lo que no hay un cuadro clínico característico atribuible a la C.trachomatis en la mujer (15,24).

Durante el embarazo se pueden presentar anomalías como un embarazo ectópico, posible ruptura de membranas, trabajo de parto y alumbramiento prematuro (6,18,20,21).

Cuando la mujer durante el embarazo padece la infección, una forma adicional de contagio es el paso del producto por el canal del parto, lo que ocasiona en cerca de un 50% de los neonatos la presencia de conjuntivitis de inclusión de los cuales un 10-20% desarrolla neumonía (3,6,22,23).

Se ha sugerido además que en caso de niñas recién nacidas de madres infectadas puede la Chlamydia permanecer latente durante la niñez y desarrollarse posteriormente (25).

La psittacosis humana, causada por la C.psittaci es adquirida por el hombre que tiene estrecho contacto con los animales infectados, principalmente aves. Se presenta de dos formas: pneumonia severa e infección sistémica.

6.- DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico de las enfermedades causadas por la C.trachomatis se han implementado variadas técnicas siendo entre ellas algunas más sofisticadas y costosas, mientras que otras son sencillas y accesibles.

En todos los casos la toma de muestra y el almacenamiento es de gran importancia, debiéndose muestrear en los sitios comprometidos, eliminando primero el exceso de moco para obtener el mayor número de células infectadas (26), en los casos en que se busca al microorganismo, tomando en cuenta que el hisopo a utilizar debe ser preferentemente de algodón y plástico ya que otro tipo de hisopo como sería el de alginato de calcio y aluminio tienen efectos tóxicos sobre las clamidias, disminuyendo considerablemente su número (27).

Por otra parte el almacenamiento no debe ser prolongado y la temperatura debe ser de 2 a 8 C por 5 días ó a -60 C para que

no haya un gran decremento, debiéndose utilizar los medios de transporte de buffer de fosfatos con sacarosa 0.2M (2SP), con una selección de antibióticos para prevenir la contaminación, excluyéndose las tetraciclinas, macrólidos y penicilinas. (4,27,28).

Para que las técnicas sean válidas como diagnóstico, es necesario considerar que el valor de sensibilidad (probabilidad de que un resultado sea positivo en una persona con la enfermedad) y especificidad (probabilidad de que un resultado sea negativo en una persona sin la enfermedad) sea mayor de 0.90, obteniendo este valor a partir de la comparación de una técnica con respecto a otra que es 100 % sensible. (29)

Los métodos más comunes para el diagnóstico de la C.trachomatis se pueden asociar de la siguiente manera:

- De aislamiento
- Citológicos
- Inmunológicos

Para el aislamiento se utilizan tres sistemas: cultivo celular, inoculación en saco vitelino de embrión de pollo e inoculación en ratón. Las técnicas de inoculación en ratón han caído en desuso en los laboratorios al igual que la

inoculación en embrión de pollo, que es un procedimiento laborioso y aplicable para estudios de sensibilidad a antibióticos y para la producción de grandes números de cuerpos elementales necesarios para la producción de antígenos en las pruebas serológicas. (4)

El cultivo celular que se ha considerado como el diagnóstico definitivo por ser 100% sensible (es decir, aísla al microorganismo de todos los individuos infectados), tiene como mayor limitante el no poder ser utilizado en cualquier laboratorio. Se basa en el desarrollo de Chlamydia en cultivos celulares de células HeLa 229 o McCoy previamente sensibilizadas con cicloheximida o DEAE-dextran a partir de una suspensión del medio de transporte, que después de incubar por 48-72 horas se tiñe y observan al microscopio las inclusiones características. (30)

Dentro de los citológicos encontramos las tinciones que evidencian las inclusiones intracitoplasmáticas. Entre ellas tenemos la tinción con Iodo que tiñe de color café la matriz de glucógeno de las inclusiones, principalmente de muestras conjuntivales y de cultivo celular (4,28), donde son altamente sensibles; la tinción de Giemsa aplicada directamente en muestras de lugares comprometidos tiene una sensibilidad de 42% y especificidad del 98% (31), solamente en muestras de conjuntiva la sensibilidad aumenta el 90% (23) debido a que

estas muestras no poseen en gran cantidad material extraño a las células como ocurre en las del cervix femenino.

Las tinciones de Gimenez y Machiavello detectan los cuerpos elementales en el saco vitelino de embrión de pollo. La técnica de Papanicolau en cuanto a su aplicación como prueba diagnóstica presenta controversias. (32)

En todos los casos la experiencia en la observación hará que cada técnica sea más o menos sensible y específica.

Los métodos inmunológicos se pueden dividir a su vez en aquellos que detectan anticuerpos (Ac) y los que detectan al antígeno (Ag).

Las técnicas serológicas más empleadas son la fijación de complemento y la microinmunofluorescencia (MIF), aunque también se utilizan el análisis inmunoenzimático y el radioinmunoanálisis de fase sólida, sin embargo este tipo de pruebas por ser costosas y complicadas han sido desplazadas por la inmunofluorescencia (IF) y la técnica de ELISA que son sencillas y rápidas.

La fijación del complemento no es utilizable para el diagnóstico definitivo de C.trachomatis debido a que detecta Ac dirigido al Ag de género por lo que es usado en el

diagnóstico de psitiasis (causada por C.psittaci) y el linfogranuloma venéreo, no detectando a la uretritis no gonococcica ni la conjuntivitis de inclusión. Puede utilizarse para comprobar una infección activa y fases agudas o de convalecencia por los títulos de Ac que comienzan a elevarse de 2-4 semanas después del inicio de la enfermedad. (6,33)

La MIF diseñada por Wang en 1971 detecta Ac contra Ag tipo específicos que se encuentran en suero o en secreciones del tipo IgG e IgM. Mediante esta técnica se clasificaron los 15 serotipos de C.trachomatis. No es aplicable como prueba de rutina por ser costosa y complicada. (33,34)

La técnica de IF que utiliza Ac monoclonales especie específicos marcados usualmente con isotiocianato de fluorescencia es un tipo de examen directo, que aplicado en muestras de cervix, uretra, conjuntiva y recto, ha desplazado a los métodos anteriores por su fácil aplicación, aunado a que su sensibilidad (92-100%) y especificidad (94-99%) son elevadas. (23,35,36)

Se basa en la detección al microscopio de fluorescencia de las Chlamydias teñidas previamente con el Ac marcado, observándose esferas con un color verde manzana característico en un fondo contrastante. Esta prueba

requiere, como toda tinción, de personal entrenado en la interpretación pues presenta cierta dificultad por la presencia de partículas de tamaño inadecuado o muestran fluorescencia insuficiente. (4.28)

Por último la técnica de ELISA aunque un poco más tardada que la anterior pero de costo similar tiene la ventaja de poder trabajar un gran volumen de muestras, lo que la hace accesible a los laboratorios de rutina, además de ser una técnica sensible(81-86%) y específica (90-98%). (36,37,38)

La metodología ELISA se basa en la detección del Ag específico fotométricamente, directo de la muestra cervical o uretral, al unirse un Ac a C.trachomatis y la fijación subsecuente del conjugado enzimático (Ac marcados con peroxidasa) que reacciona finalmente con el sustrato para el desarrollo de color, los valores de absorbancia se comparan con una curva patrón. Esta prueba puede presentar una reacción cruzada con las cepas de la familia Enterobacteriaceae por su similitud con el lipopolisacárido de Chlamydia. (39)

7.- TRATAMIENTO

El tratamiento de estas infecciones se ha establecido in vitro a través de las concentraciones mínimas inhibitorias en

cultivos celulares de los diferentes antimicrobianos de donde los más activos fármacos contra C.trachomatis son rifampicina, tetraciclinas, macrólidos y sulfamidas. (40)

In vitro la rifampicina es el más activo, pero no es aplicable in vivo por la posibilidad de desarrollar resistencia. Las tetraciclinas y eritromicinas son las más activas pues su aplicación es efectiva en un 95% (24), administrándose en el embarazo, a niños y adultos. El tratamiento con nitrato de plata para prevenir la conjuntivitis no es efectivo contra C.trachomatis por lo que es necesario aplicar eritromicina en forma tópica a nivel ocular a los neonatos con riesgo de adquirir la infección. (25)

Las sulfonamidas que son moderadamente activas son utilizables en el tratamiento a niños. (25)

Las cefalosporinas y aminoglucósidos son inactivos a estas infecciones así como las penicilinas y ampicilinas que al aplicarse en el tratamiento contra gonorrea no erradica la infección clamidial concomitante. (40)

V.- OBJETIVO

ESTABLECER LA PREVALENCIA DE
Chlamydia trachomatis A NIVEL
CERVICOVAGINAL DURANTE LA
GESTACION EN MUJERES QUE
PRESENTAN PATOLOGIA, MEDIANTE
EL DIAGNOSTICO DEL
LABORATORIO POR EL METODO DE
ELISA.

VI.- MATERIALES Y METODOS

1.- POBLACION

El presente estudio realizado en el Instituto Nacional de Perinatología como parte del protocolo de riesgo perinatal por C.trachomatis, de septiembre de 1986 a agosto de 1987, fue integrado por mujeres que asistían a la consulta de infectología perinatal por diferentes patologías, fundamentalmente leucorreas persistentes, cistitis o cistouretritis y vaginosis inespecífica.

El grupo fue constituido por 435 mujeres embarazadas, teniendo como grupo control 464 mujeres no embarazadas.

Los criterios de inclusión a dichos grupos fueron, en las mujeres embarazadas la presencia de patología cervicovaginal en su última visita prenatal; en mujeres no embarazadas vida sexual activa y patología cervicovaginal, ingresando a este grupo pacientes de las clínicas de esterilidad, infertilidad y ginecológicas; en ambos casos el no haber recibido tratamientos antimicrobianos en el mes anterior al estudio.

Los criterios de exclusión comprendían a aquellas mujeres que no aceptaban su participación en el estudio, falta de seguimiento a la consulta, sangrado en el momento de la consulta en mujeres no embarazadas.

Información sobre raza, nivel socioeconómico, historia obstétrica, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, número de compañeros sexuales y métodos anticonceptivos no se incluyen en este estudio por no ser su objetivo.

2.- OBTENCION DE MUESTRA

Las muestras utilizadas son obtenidas una vez colocada la paciente en posición de litotomía, donde una vez colocado el espéculo vaginal, se remueve el exceso de moco del exocervix con un hisopo. Se inserta, posteriormente otro hisopo limpio en el endocervix y se rota por 10-30 segundos, para asegurar una buena absorción y muestreo.

Evitar el tocar las paredes vaginales al retirar el hisopo.

3.- MATERIAL Y EQUIPO

- Esferas sensibilizadas.
- Control positivo. C.trachomatis inactivada.
- Control negativo. Buffer de fosfatos.

- Anticuerpos anti-C.trachomatis (producidos en conejo).
- Conjugado Chlamydiazyme. Anti IgG de conejo (producido en cabra) unido a peroxidasa.
- Buffer de dilución de fosfatos.
- OPD (o-fenilendiamina.2HCl).
- Diluyente para OPD. Buffer de citrato-fosfato con 0.02% de peróxido de hidrógeno.
- Acido sulfúrico 1 N.
- Pipetas de precisión de 200 y 300 nl.
- Equipo de lavado Pentawash II con bomba de vacío.
- Estufa bacteriológica.
- Vortex.
- Espectrofotómetro Quantum II.
- Hisopos para colección de muestras STD (Abbott).
- Medio de transporte STD (Abbott).

4.- PROCEDIMIENTOS

La técnica empleada fue de tipo ELISA, aplicándose el método de Abbott conocido como Chlamydiazyme.

1) Manejo de Muestra.

Una vez obtenida la muestra, es colocada en un tubo de transporte (incluido en el equipo), conteniendo el hisopo, el cual deberá estar cubierto por el medio.

La muestra en estas condiciones puede ser probada dentro de los 5 días siguientes, mientras tanto se mantiene a una temperatura entre 2 y 8 C.

2) Preparación de los especímenes problema y control para el análisis.

a) Especímenes problema.

- A los tubos de transporte que contiene los hisopos se agrega 1 ml de buffer de dilución.
- Procurar que la porción de algodón se encuentre sumergida en la solución por espacio de 10 a 15 min.

- Agitar los tubos en vortex de preferencia multitubo, colocando el control de velocidad en 4, en 3 ciclos de 15 seg.
- Inmediatamente después de la agitación remover el exceso de líquido del hisopo por presión y rotación del mismo contra las paredes del tubo, desechando el hispo posteriormente.

b) Controles.

- El control positivo debe ser agitado vigorosamente en un vortex por 1 minuto.
Tomar 200 nl del control y colocarlos en un tubo rotulado y adicionar 1 ml de buffer para dilución, agitando vigorosamente.
- Del control negativo tomar 200 nl y colocarlo en un tubo rotulado, agregar 1 ml de buffer de dilución, agitar en el vortex.
- Se correrán en cada prueba un control positivo y tres controles negativos, bajo las mismas condiciones.

3.- Procedimiento de ensayo.

- a) Primera incubación.

- Colocar 200 nl de las muestras y los controles en los pozos de las placas del equipo.

- Colocar en cada pozo una esfera sensibilizada, evitando la formación de burbujas en los pozos, en caso de su formación removerlas, el traslado de las esferas debe ser con material no metálico, sellar la caja.

- Incubar a 37 ± 2 C por espacio de 60 ± 3 min.

- Remover la cubierta y lavar con agua desmineralizada 4 veces con volúmenes de 4 a 6 ml por pozo.

b) Segunda incubación.

- Colocar 200 nl de anti-C.trachomatis en cada pozo de reacción.

- Incubar a 37 ± 2 C por $60 \text{ min} \pm 3 \text{ min}$, después de cubrir y eliminar las burbujas de aire formadas.

- Remover la cubierta y lavar de la misma forma.

c) Tercera incubación.

- Colocar 200 nl de conjugado en cada pozo.

- Sellar nuevamente y remover las burbujas

- Incubar a 37 ± 2 C por 60 ± 3 min.

- Remover la cubierta y lavar

d) Desarrollo de color.

- Colocar las esferas en tubos adecuadamente identificados.

- Colocar en cada tubo 300 nl de sustrato OPD previamente preparado, colocando un tubo adicional, para usarse como blanco.

- Cubrir los tubos de la luz e incubar 30 ± 2 min a temperatura de 15 a 30 C.

Agregar a cada tubo 1 ml de solución de Ac. sulfúrico 1N.

- Leer en espectrofotómetro con absorbancia de 492 nm.

Cabe señalar que el espectrofotómetro registra los datos y los analiza estadísticamente, marcando aquellos que resultan positivos según la curva patrón establecida.

Precauciones.

- Muestreo:

Utilizar hispos por separado, si se requieren pruebas adicionales.

La prueba se aplica sólo a muestras endocervicales o uretrales.

Las muestras a temperatura ambiente duran 48 horas en los tubos de transporte. No deben ser congeladas.

Si la muestra diluida no se procesa en las siguientes cuatro horas, refrigérese a 2-8 C por no más de 48 horas, lleve entonces a temperatura ambiente y agite antes de procesar.

- Reactivos:

No usar reactivos de diferentes lotes, ni ya caducos. Evitar la contaminación de los reactivos o reacciones cruzadas usando puntas por separado.

Mantener en refrigeración los reactivos hasta su uso.

Los reactivos deben usarse a temperatura ambiente y refrigerarse inmediatamente después de su uso.

Las esferas sensibilizadas y las tabletas de OPD no deben manejarse con pinzas de metal u otro agente oxidante.

La solución de OPD debe prepararse de 5-10 minutos antes de su uso.

Evitar el contacto con la piel y mucosas del OPD y del ácido sulfúrico.

La solución de OPD se debe mantener al abrigo de la luz y agitarse suavemente antes de su uso.

El diluyente de OPD no debe presentar coloración rojo-naranja, de lo contrario debe evitarse su uso por descomposición.

- Procesamiento:

No salpicar de un pozo a otro durante el manejo o lavado.

Checar previamente el sistema de lavado, succión y rocío

de agua desmineralizada o destilada.

Eliminar el exceso de agua de los pozos.

Evitar la formación de burbujas en los tubos de ensaye para que no haya interferencias en la lectura de absorbancias.

- Evaluación de los resultados:

La presencia o ausencia de C.trachomatis es determinada por la relación de la absorbancia de las muestras con el valor de corte, obtenido de la suma de la media de las absorbancias de los controles negativos más el factor 0.1 (valor ya obtenido de la curva patrón).

Los valores con absorbancias mayores o iguales al valor de corte son considerados positivos.

Para que la prueba sea válida la diferencia entre el control positivo y la media de los controles negativos debe ser mayor o igual a 0.8. De lo contrario se repetirá la prueba.

Si el valor (Positivo)-(Negativo) es bajo puede sospecharse el deterioro de los reactivos.

5.- ANALISIS ESTADISTICO

Para que la comparación de las dos poblaciones sea válida, es necesario hacer un análisis estadístico que confronte ambos valores para encontrar o no diferencias significativas entre éstos y que nos permitirá reafirmar la validez del estudio.

Por seguir la población muestreada un comportamiento de distribución normal, las pruebas seleccionadas para comparar al grupo de mujeres embarazadas con el control fueron las denominadas χ^2 (Ji cuadrada) y z, dependiendo de la característica a comprobar.

En situaciones experimentales o de muestreo en donde las observaciones son datos enumerativos, es decir, son cualitativos más que cuantitativos y consisten en recuentos o proporciones de individuos en cada clasificación, las comparaciones y las inferencias estadísticas se efectúan en base a estas proporciones.

El manejo estadístico de estas situaciones corrobora las hipótesis concernientes a datos de enumeración, como es el caso del presente estudio, lo que consiste en calcular lo que se conoce como prueba ji cuadrada (χ^2) y compararla con valores críticos tabulados donde la obtención de un valor de p (proporción) por debajo de 0.05 fue considerado como

significativo.

En las poblaciones con datos cuantitativos en los que se pueden obtener valores de media, varianza y el número de la población es mayor a 30, es apropiado el uso de la prueba z. En este caso las distribuciones por edades en ambos grupos nos permite la comparación de las medias por esta prueba, teniendo como válidos los criterios de aceptación anteriormente expuestos. (41,42)

Fórmulas empleadas

Prueba χ^2

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (O_{ij} - E_{ij})^2 / E_{ij}$$

Donde:

O_{ij} - Número observado en la celda (ij).

$E_{ij} = R_i C_j / n$ - Número esperado en la celda (ij).

$R_i = \sum_{j=1}^c O_{ij}$ - Número de observaciones en el i ésimo renglón (R).

$C_j = \sum_{i=1}^r O_{ij}$ - Número observado en la j otésima columna (C).

El valor de χ^2 dado por la ecuación tiene $\delta^2 = (r-1)(c-1)$ grados de libertad.

Prueba z.

$$z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

\bar{X} = Media aritmética

S = Desviación estándar

VII.- RESULTDOS Y DISCUSION

El presente estudio constó de un total de 899 muestras cervicovaginales analizadas, de donde 435 fueron mujeres embarazadas y 464 del grupo control de mujeres no embarazadas. Población que por su número se considera representativa, bajo ciertas circunstancias, puesto que se debe tomar en cuenta que dentro del Instituto Nacional de Perinatología se atienden embarazos de alto riesgo y mujeres no embarazadas por infertilidad o esterilidad, que en algunos casos las predisponen a la infección por Chlamydia. (21)

CUADRO 1

INCIDENCIA DE C.trachomatis EN AMBOS GRUPOS

Grupo	Chlamydiazyme*		Incidencia (%)	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Embarazadas	39/435	396/435	8.9	91.1
No embarazadas	35/464	429/464	7.5	92.5
Total	74/899	825/899	8.2	91.8

* $\chi^2 = 0.4278$, $gl = 1$, $p = 0.53$. No significativa

Se encontró C.trachomatis en 74 (8.2%) muestras del total de muestras, donde 39 (8.9%) muestras de embarazadas y 35 (7.5%) muestras de no embarazadas resultaron positivas. Cuadro 1.

Estos resultados se encuentran en ambos casos cercanos a los límites inferiores de los rangos establecidos del 2-21% en embarazadas y del 3 al 27% en no embarazadas, concordando principalmente con la prevalencia obtenida del 8 % en embarazadas por Harrison (21). (3,40,43,44)

Dentro de estos rangos se debe considerar que los límites superiores corresponden a poblaciones de alto riesgo que asisten frecuentemente a clínicas de enfermedades de transmisión sexual, y que el rango es en ambos casos de una amplitud considerable debido a que hay varios factores de riesgo que predisponen a la infección, como sería la corta edad, elevada actividad sexual, nivel socioeconómico bajo y uso de anticonceptivos orales, principalmente (21,44).. Además se debe considerar el método de diagnóstico utilizado.

La baja prevalencia puede ser debida, en nuestro caso, a que la población con que se trabajó, en cuanto a su comportamiento sexual se puede decir es homogéneo por presentar un patrón de conducta sexual muy similar y no ser considerado dentro del grupo de alto riesgo a enfermedades de transmisión sexual, mientras que en los países donde se

presenta con mayor frecuencia tienen patrones de conducta sexual muy diferentes y con mayor promiscuidad con respecto a nuestro país.

La diferencia entre los porcentajes de prevalencia no fue significativa en estos grupos ($p= 0.58$) lo que indica que la comparación de los grupos es válida y que el embarazo no es un factor que favorezca la infección.

El rango de edad en las mujeres embarazadas fue de 14-40 años con un promedio de 27 ± 5 años, siendo menor que en el grupo control en el cual el rango fue de 14-53 años y con una edad promedio de 29 ± 6 años, encontrándose una diferencia significativa entre los grupos ($p<0.001$) debida principalmente a la amplitud de los rangos en ambas poblaciones.

CUADRO II

INCIDENCIA DE C.trachomatis EN MUJERES EMBARAZADAS POR EDAD

No.	Rango Edad	No.de mujeres	<u>Chlamydia</u> * Positiva	Incidencia %
1	X ≥ 15.5	4	0	0.0
2	15.5-20.5	53	10	18.8
3	20.5-25.5	132	19	14.4
4	25.5-30.5	126	4	3.2
5	30.5-35.5	91	6	6.5
6	35.5-40.5	29	0	0.0

* $\chi^2 = 17$, $gl = 3$, $p < 0.001$. Diferencia significativa
Se unieron los rangos 1-2 y 5-6.

CUADRO III

INCIDENCIA DE C.trachomatis EN EL GRUPO CONTROL POR EDAD

No.	Rango Edad	No.de mujeres	<u>Chlamydia*</u> Positiva	Incidencia %
1	X ≤ 15.5	4	0	0.0
2	15.5-20.5	22	7	31.0
3	20.5-25.5	109	7	6.4
4	25.5-30.5	134	12	8.9
5	30.5-35.5	145	7	4.8
6	35.5-40.5	39	0	0.0
7	40.5-45.5	4	0	0.0
8	45.5-50.5	5	2	4.0
9	50.5-55.5	2	0	0.0

$\chi^2 = 16.5$, gl = 3, p < 0.001. Diferencia significativa.

Se unieron los rangos 1,2 así como los 6,7,8 y 9.

Los cuadros II y III muestran la incidencia de C.trachomatis en base a la edad en embarazadas y el grupo control respectivamente. En ambos casos se observa un comportamiento similar donde en edades menores de los 20 años se encuentra una mayor incidencia de la infección (18.8% y 31% en embarazadas y no embarazadas respectivamente) y que conforme aumenta la edad disminuye la incidencia.

Este comportamiento aunado a la diferencia significativa que entre los rangos de edades existe ($p < 0.001$) en los dos grupos nos hace pensar que la edad es un factor determinante para la infección por Chlamydia tal como lo menciona Khurana (43) y Chacko (44), quienes han encontrado que en la adolescencia se encuentran mayor probabilidades de infección.

CUADRO IV

INCIDENCIA DE Chlamydia EN MUJERES EMBARAZADAS POR SEMANA DE GESTACION.

Semana Gestacional	No. de Embarazadas	<u>Chlamydia</u> * Positivas	Incidencia %
X ≤ 14.5	36	2	5.5
14.5-27.5	193	18	9.3
27.5-40.5	206	19	9.2

* $\chi^2 = 0.92$, gl = 2, p = 0.66. No significativa.

Basándose en el cuadro IV, la edad gestacional promedio es de 26 + 8 semanas y donde la edad gestacional no es determinante para que se presente o no la infección puesto que no hay una diferencia significativa entre los subgrupos (p = 0.66), coincidiendo en ello tanto con Khurana (43) como con Harrison (21).

Con lo que respecta a la asociación con otros patógenos se puede decir a groso modo, puesto que no es parte del objetivo, que la infección se vió relacionada con la presencia de Trichomonas, Candida albicans, Gardnerella vaginalis y Ureaplasma urealyticum principalmente, y en algunos casos con Neisseria gonorrhoeae, aunque se ha encontrado bibliográficamente que la asociación a microorganismos no es determinante para que ocurra la infección por Chlamydia. (15)

En cuanto al método utilizado se puede decir que es válido para el manejo de muestras numerosas y que siendo su sensibilidad del 86% nos permite confiar en nuestros resultados. (37)

Durante la aplicación de la técnica se observó como factor de importancia la adecuada obtención de la muestra, ya que una muestra con una apropiada cantidad de células nos permitirá un resultado más confiable.

De manera paralela, pero sin formar parte en el estudio, se aplicaron a manera de comparación otras técnicas diagnósticas: el método de inmunofluorescencia (Microtrack, Syva), la tinción de Giemsa y la tinción de iodo, de lo que se observó que la tinción fluorescente es mucho más sensible

y reduce el error por reacción cruzada al identificar más fácilmente las estructuras de la Chlamydia, es más rápida en su manejo y de costo similar al método por ELISA; su inconveniente es que de preferencia se deben manejar un número reducido de muestras en la rutina diaria. Tanto la tinción de iodo como la de Giemsa presentaron como mayor obstáculo la falta de experiencia en el reconocimiento de las estructuras clamidiales, por lo que no se continuó con su aplicación.

Con lo anterior se sugiere que el método a escoger dependerá en gran medida de los insumos, personal capacitado, equipo e instalaciones, así como la afluencia que a cada clínica u hospital se presente.

Con el presente estudio se muestra lo que en nuestro país la infección por Chlamydia trachomatis ha avanzado con respecto a otros países, pero aun quedan interrogantes en las que es preciso concretizar, sobre todo en lo que respecta a un estudio epidemiológico que permita el manejo de mayor información como sería historia obstétrica, patrones de conducta sexual, raza y uso de anticonceptivos orales, entre otros, que han sido reportados como predisponentes a la infección; siendo además necesario un estudio prospectivo con respecto a las pacientes embarazadas para evitar complicaciones en el neonato. (21,44).

Esto permitirá que en México el incremento de la infección disminuya o se anule por completo. De manera inmediata es necesario ampliar la información de las infecciones dentro del personal médico para que sean diagnosticadas con oportunidad y eficacia.

VIII.- CONCLUSIONES

- 1.- En primer lugar, el hecho de saber que en México la prevalencia de Chlamydia trachomatis en mujeres embarazadas (39/435, 8.9%) es similar al obtenido por Harrison (21) del 8% y que en ambos casos se encuentran dentro de los rangos establecidos del 2-21% (3,40,43,44), nos indica que estas infecciones ocupan ya un lugar imponente dentro de las enfermedades transmitidas sexualmente.

- 2.- Dentro de nuestro grupo, el factor que se asoció como predisponente a la infección fue la edad en el rango de los 15 a los 20 años, ya que en éste se presenta una mayor incidencia del microorganismo, mientras que el estado de gravidez y la edad gestacional no se han encontrado como factores que favorezcan la presencia de C.trachomatis, correspondiendo estas observaciones a las hechas por Khurana (43) y Chacko (44).

- 3.- Dado que la población con que se trabajó presenta factores que permiten el aumento en la frecuencia de la infección como son embarazos de alto riesgo y esterilidad e infertilidad en el grupo control (21), es conveniente hacer una comparación con una población sana y sin ninguno de estos factores de riesgo, y donde nuestro estudio serviría como base de comparación.

4.- Puesto que se ha reportado una prevalencia considerable en nuestro país, se recomienda la implementación de métodos diagnósticos rápidos, de fácil aplicación, accesibles y confiables, como el aquí empleado, en hospitales y laboratorios de rutina, aplicándolos de preferencia en aquellos casos de etiología dudosa.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Morse SA, Johnson SR. Antimicrobial resistance among sexually transmitted pathogens.
ASM News. 1987; 53:201-204
- 2.- Page LA. Obligately intracellular bacteria: The genus Chlamydia.
En: Starr MP, Stolp H, Grüber, Belows A, Schlegel, (Eds). The Prokaryotes. USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1981; 2210-2222.
- 3.- Schachter J, Caldwell HD. Chlamydiae. Ann Rev Microbiol. 1980; 34: 285-309
- 4.- Schachter J. Chlamydiae. En Lennette EH, Balows A, Hausler W (Eds.). Manual of clinical microbiology. Washington. American Society for Microbiology, 1985: 856-862
- 5.- Freeman B. Textbook of microbiology. 25a. edición, USA. Saunders Company, 1979: 901-915
- 6.- Narcio ML. Infecciones causadas por Chlamydia. Infectología. 1987; 7: 205-218.
- 7.- Oriol JD, Ridgway GL. Infecciones genitales causadas por Chlamydia trachomatis. México: Editorial Científica PLM, 1985.

- 8.- Kelstrom EM, Soderland G. Early phases in the interaction between Chlamydia trachomatis and eucariotic cells. En Leive (Eds.). Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1986: 82-85.

- 9.- Hodinka RL, Wrick PB. Is the intracellular fate of Chlamydia psittaci governed by specific mode of entry into the host cells? En Leive (Eds.). Microbiology. Washington: ASM, 1986: 86-90.

- 10.- Wilde ChE, Karimi ST, Haak RA. Cell surface alteration during chlamydial infections. En Leive (Eds.). Microbiology. Washington: ASM, 1986: 96-98.

- 11.- Moulder JW. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol Rev. 1985; 49: 298-337.

- 12.- Becker Y. The Chlamydia: molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryocytes. Microbiol Rev. 1878; 42: 274-306.

- 13.- Byrne GI. Interferons and the immune response to Chlamydial infections. En Leive (Eds.). Microbiology. Washington: ASM, 1986: 99-102.

- 14.- Wyrick PB, Newhall WJ. Biology and pathogenesis of

Chlamydia. En Leive (Eds.). Microbiology. Washington: ASM, 1986: 80-1.

- 15.- Oriel JD, Johnson AL, Barlow D y cols. Infections of the uterine cervix with Chlamydia trachomatis. J Inf Dis. 1978; 137:443-451.
- 16.- Barbacci MB, Spence MR, Kappus EW y cols. Postabortal endometritis and isolation of Chlamydia trachomatis. Obstet Gynecol. 1986; 68: 686-90.
- 17.- Mard PA, Ripa T, Svensson L, Westromm L. Chlamydia trachomatis infection in patients with acute salpingitis. New Engl J Med. 1977; 296: 1377-79.
- 18.- Quinn PA, Patric M, Barkin M y cols. Prevalence of antibody to Chlamydia trachomatis in spontaneous abortion and infertility. Am J Obstet Gynecol. 1987; 156: 291-6.
- 19.- Stamm WE, Wagner KF, Amsel R, Russell E. Causes of the acute urethral syndrome in women. New Engl J Med. 1980; 303: 409-15.
- 20.- Schachter J. Chlamydial infections. N Engl J Med. 1978; 298:490-5

- 21.- Harrison HR, Russell E, Weinstein L y cols. Chlamydia trachomatis and mycoplasmal infections in pregnancy. JAMA. 1983; 250: 1721-27.
- 22.- Heigie AD, Lumicao GG, Stuart LA y cols. Chlamydia trachomatis infection in mothers and infants. Am J Dis Child. 1981; 135:507-11.
- 23.- Rapoza PA, Quinn TC, Kiessling LA y cols. Assessment of neonatal conjunctivitis with a direct immunofluorescent monoclonal antibody stain for Chlamydia. JAMA. 1986; 255; 3369-73.
- 24.- Saltz GR, Linnemann CC, Brookman RR, Rauh JL. Chlamydia trachomatis cervical infections in female adolescents. J Ped. 1981; 98:981-5.
- 25.- Rettig PJ. Chlamydial infections in pediatrics: diagnostic and therapeutic considerations. Ped Infect Dis. 1986; 5:
- 26.- Hernández TJ, Noller KL, Smith TF. Detection of Chlamydia trachomatis using consecutive endocervical swabs. Prevalence in asymptomatic female adolescents and women attending a sexually transmitted disease clinic. J Repr Med. 1986; 31: 497-500.

- 27.- Mahony JB, Chernesky MA. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of Chlamydia trachomatis from clinical specimens. J Clin Microb. 1985; 22: 865-867.
- 28.- Clyde WA, Kenny GE, Schachter J. Laboratory diagnosis of chlamydial and mycoplasmal infections, Cumitech 19. ASM. 1984.
- 29.- Sox HC. Probability theory in the use of diagnostic tests. Ann Int Med. 1986; 104: 60-66.
- 30.- Sabet SF, Simmons J, Caldwell HD. Enhancement of Chlamydia trachomatis infectious progeny by cultivation in Hela 229 cells treated with DEAE-Dextran and cycloheximide. J Clin Micro. 1984; 20:217-22.
- 31.- Schachter J. Chlamydial infections. New Engl J Med. 1978; 298:540-9.
- 32.- Spence MR, Barbacci M, Kappus E, Quinn T. A correlative study of Papanicolaou smear, fluorescent antibody, and culture for the diagnosis of Chlamydia trachomatis. Obstet Gynecol. 1986; 68: 691-65.
- 33.- Hammerschlang MR. Chlamydial infections. Ped Rev. 1981; 3: 77-84.

- 34.- Wang SP, Grayston JT, Rusell E, Holmes KK. Simplified microimmunofluorescence test with Trachoma-Lymphogranuloma venereum (Chlamydia trachomatis) antigens for use as a screening test for antibody. J Clin Micro. 1975; 1: 250-55.
- 35.- Quinn TC y cols. Screening for Chlamydia trachomatis infection in an innercity population: a comparision of diagnostic methods. J Infect Dis. 1985; 152: 419-423.
- 36.- Chernesky MA, Mahony JB, Castriciano S y cols. Detection of Chlamydia trachomatis antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and ansymptomatic men and women. J Infect Dis. 1986; 154: 141-48.
- 37.- Jones MF, Smith TF, Houglum AJ, Herrmann JE. Detection of Chlamydia trachomatis in genital specimens by the Chlamydiazyme test. J. Clin Micro. 1984; 20: 465-67.
- 38.- Howard LV, Coleman PF, England BJ, Herrmann JE. Evaluation of Chlamydiazyme for the detection of genital infections caused by Chlamydia trachomatis. J Clin Micro. 1986; 23: 329-32.
- 39.- Saikku P, Puolakkainen M. Cross reactivity between

Chlamydiazyme and Acinetobacter strains. N Engl J Med.
1986; 314: 922-24.

- 40.- Stamm WE, Holmes KK. Chlamydia trachomatis infections in adult. En Holmess KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ (Eds.). Sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill Book Company, 1984, 258-267.
- 41.- Duncan RC, Knapp RG, Clinton M. Bioestadística. México: Interamericana. 1978; 133-149.
- 42.- Ostle B. Estadística aplicada. México: Limusa-Wiley. 1970; 151-60.
- 43.- Khurana CM, Deddish PA. Prevalence of Chlamydia trachomatis in the pregnant cervix. Obstet Gynecol. 1985; 66: 241-43.
- 44.- Chacko MR, Lovchik JC. Chlamydia trachomatis infection in sexually active adolescents: prevalence and risk factor. Pediatrics. 1984; 73: 836-40.