



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"

**DETECCION DE *Clamydia trachomatis* Y SU
FRECUENCIA EN INFECCIONES UROGENITALES**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MARIA DEL ROSARIO DE LA ROSA SUAREZ

DIRECTORES:

DR. JORGE MANUEL HILL JUAREZ
QFI. ANDREA BECERRIL OSNAYA



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1989



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

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y METODOS	27
RESULTADOS	53
DISCUSION	69
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFIA	79

ABREVIATURAS

Análisis enzimático inmunoabsorbente	ELISA
Anticuerpo	Ac.
Antígeno	Ag.
Chlamydia trachomatis	C. <u>trachomatis</u> .
Chlamydia psittaci	C. <u>psittaci</u> .
Cuerpo Elemental	C. E.
Cuerpo Reticular	C. R.
Exudado	Ex.
Grados Centígrados	°C.
Incubar	Inc.
Inmunofluorescencia Directa	IFD.
Linfogranuloma venéreo	LGV.
Microinmunofluorescencia	MIF
Microlitros	µl.
Molaridad	M.
Nanómetros	nm.
Normalidad	N.
Orto-fenil-diamina	OPD.
Solución	sol.
Uretritis no gonocócica	(UNG)
Uretritis postgonocócica	(UPG)

INTRODUCCION

Las infecciones por C. trachomatis constituyen enfermedades altamente prevalentes de gran importancia epidemiológica, y clínica por ser de transmisión sexual, y por las secuelas que producen. Por ello su presencia constituye un verdadero problema de salud que ha derivado en la necesidad de la identificación de C. trachomatis mediante la implementación de una gran multitud de métodos.

El diagnóstico etiológico de este tipo de infecciones tiene su fundamento en la identificación del agente responsable y que en el caso de C. trachomatis puede realizarse a través de pruebas de laboratorio que ofrecen diferente sensibilidad y especificidad.

Los cultivos de exudados uretrales y vaginales, la observación directa con colorantes como Fucsina, azul de metileno y verde de Malaquita que se emplean rutinariamente han sido desplazados recientemente por la IFD, el ELISA y otras técnicas, que han ampliado la posibilidad de detectar estas infecciones tanto en la población general como en sujetos de alto riesgo incluyendo homosexuales, mujeres embarazadas y neonatos.

Los métodos de Machiavelli y Gímenez son muy útiles en el laboratorio clínico por su alta especificidad, sin embargo

su pobre sensibilidad no permite detectar la incidencia real de C. trachomatis. En contraste la IFD y el ELISA son técnicas en las que se reporta una alta sensibilidad y cuyo empleo en las clínicas es cada vez mayor, pero la reacción cruzada con otros antígenos bacterianos, ha abierto una discusión sobre su utilidad real y la aplicación en estudios clínicos.

GENERALIDADES

ANTECEDENTES HISTORICOS:

El papiro de Ebers (1500 A.C.) contiene una descripción de una enfermedad exudativa y productora de cicatrices en el ojo, esta enfermedad también se conocía entre los chinos, en la antigua Grecia y en Roma. Pedanius Dioscorides en el año 60 A.C., crea el término TRACOMA que significa ojo con rugosidades, y Galeno describió los cuatro estadios de la enfermedad. Se cree que el Tracoma se transmitió desde el Medio Oriente a través de Europa llevado por las cruzadas que regresaban de Tierra Santa y las campañas egipcias de Napoleón produjeron un segundo reflujo de aparición de la infección.

(42)

El gonococo fué descubierto por Neisser en 1879 y el método de tinción de Gram se descubrió poco después. En la década de 1880 el uso de ese método y los sistemas de cultivo para el gonococo se logró la clasificación de formas gonocócicas y no gonocócicas de uretritis, así como de oftalmis neonatal; en 1883, apareció el primer estudio de la etiología del Tracoma cuando Koch describió que había podido cultivar Haemophilus egyptius y Neisseria gonorrhoeae de pacientes con "Oftalmis egipcia", una enfermedad a la cual podemos considerar

como uno de los sinónimos del Tracoma en esa época, pero la causa real no se reveló hasta que se publicaron en 1907 los trabajos de Halberstaedter y von Prowazek. Estos investigadores describieron las inclusiones intraepiteliales que ahora llevan su nombre, en los frotis conjuntivales de orangutanes infectados en forma experimental. Dos años más tarde describieron inclusiones similares en frotis conjuntivales de recién nacidos con oftalmía no gonocócica. (42)

Heyman en 1910; descubrió inclusiones en las células cervicales y uretrales de los padres de niños con problemas de oftalmía neonatorum, pero algunos de estos casos también estaban infectados con gonococos, lo cual provocó confusiones y controversias. La uretritis postgonocócica (UPC), fué descrita por primera vez por von Wahl en 1911, y aclaró que no se debía a la gonorrea, sino que podría ser resultado de una infección mixta entre gonorrea y un agente de uretritis no gonocócica (UNG). (42)

Bedson y Bland en 1934, notaron las similitudes entre el ciclo de C. psittaci y C. trachomatis. La localización de las inclusiones en el epitelio transicional del cérvix fue sugerido por Thygeson y Mengert en 1936. (42)

Tang F. F., Chang H.L., Huang Y.T., y Wang K.C. en 1957 , -

aislaron con éxito el agente causal del Tracoma, usando como medio de cultivo el saco vitelino de embriones de pollo. (42)
 Collier y Sowa en 1958, establecieron la relación serológica entre los microorganismos que producían el Tracoma. (10)

Collier, Duke-Elder y Jones en el mismo año establecieron que la transmisión del Tracoma es de persona a persona. (9)

Jones, Collier y Smith en 1959, aislaron por primera vez a C. trachomatis, cultivando el microorganismo a partir de los ojos de un niño con conjuntivitis de inclusión y del cérvix de madre y uretra del padre. (24)

Harper T. A., Dwyer R. St. C., Garland J. A., Jones B. R., en 1967, observaron que para el diagnóstico de C. trachomatis las técnicas de utilización del saco vitelino son caras, incómodas y están vinculadas a problemas técnicos, entre los cuales se encuentran las posibilidades de aislamientos equivocados por contaminación; si bien este tipo de investigación implicó un avance de gran importancia, no son tan adecuados para estudios a gran escala. (21)

El cultivo en laboratorio de C. trachomatis fue difícil y esto provocó otros intentos encaminados a obtener métodos serológicos para el diagnóstico. La primera prueba empleada para este fin fue la de Fijación de Complemento usando un antígeno

no de la psitacosis ó del Linfogranuloma Venéreo (LGV); esta prueba tiene poca sensibilidad, por lo que generalmente no se emplea en la investigación de infecciones superficiales como conjuntivitis de inclusión y (UNG). (31)

Wang en 1971 desarrolló la técnica de microinmunofluorescencia (micro-IF), lo que se consideró como un avance de gran importancia en relación a las pruebas de Fijación de Complemento. En ese mismo año Wang y Grayston desarrollaron un esquema de serotipificación para las cepas de C. trachomatis. (67)

Dwyer R. St. J., Treharne J. D., Jones B. R. and Herring, en 1972, probaron la especificidad de la técnica de microinmunofluorescencia, así como la capacidad de ésta para diferenciar a C. psittaci de C. trachomatis, y también la presencia de serotipos capaces de determinar anticuerpos específicos para los mismos en el suero de pacientes infectados. (13)

En la primavera de 1983, el progreso en el diagnóstico de -- Clamidia se debió al método de microinmunofluorescencia de anticuerpos policlonales. (51a, 52a)

En el otoño de 1983, el método de microinmunofluorescencia de anticuerpos monoclonales. (59a, 60a, 66)

En 1985, El Inmunoensayo Enzimático (ELISA). (13a, 39a)

TAXONOMIA:

Los primeros estudios acerca del Tracoma fueron realizados por Halberstaedter y von Prowezek en 1907, y sugirieron la formación de una familia llamada Chlamydozoa (derivado del griego Chlamys, que significa manto o cubierta) para indicar la presencia de una matriz que rodea a los cuerpos elementales en las preparaciones teñidas con Giemsa. Jones, Rake y Stearns, en 1945, ampliaron las diferencias entre las rickettsias y las clamidias y les dieron el nombre taxonómicamente válido Chlamydia. (46)

Page en 1966, hizo una extensa revisión acerca de la morfología, citología, naturaleza química y metabolismo de este microorganismo y estableció que se trataba de bacterias.

Una proliferación de presuntos nombres precedió a esta revisión de Page, un ejemplo de ello: Miyagwanella, Ehrlichia, Chlamydozoon, Rickettsiaformis, Rakeia, Chlamydia, Bedsonia, y Colettsia. Otros autores utilizaron nombres en el lenguaje común por ejemplo: "Psitacosis-ornitosis-pneumonitis de los mamíferos" (POPM), "Psitacosislinfogramuloma venéreo" (PLV), "Tracoma-inclusión-conjuntivitis" (TRIC) y "Psitacosislinfogramuloma-tracoma" (PLT)

Los trabajos de Moulder de 1964 a 1966, dividieron la familia

en dos subgrupos. En el grupo A estaban los agentes del Tracoma y las enfermedades relacionadas con él, y en el subgrupo B los del grupo psitacosis. (37, 38) Como consecuencia, Page en 1968, propuso dos especies de un único género, llamado C. trachomatis para el subgrupo A y para el subgrupo B C. psittaci. (45)

MORFOLOGIA Y NATURALEZA DE C. trachomatis.

Las clamidias son microorganismos procariotes, caracterizados por ser pequeños cocos gram negativos, viven en un parasitismo intracelular obligado y presentan dos formas distintas. Ambas comparten un grupo antigénico común. Las dos diferentes formas de este microorganismo se llaman: Cuerpo Elemental (C.E.) y Cuerpo Reticular (C.R.) (52)

CUERPO ELEMENTAL:

Es la partícula más pequeña y su tamaño es de 200 a 400 nm. Esta es la forma de transporte extracelular, es altamente infectante y se tiñe de un color rojo azulado con Giemsa. La pared celular es una estructura trilaminar rígida, análoga a la de las bacterias gram negativa, pero carente de ácido murámico. (66)

CUERPO RETICULAR:

Tiene un tamaño variable entre 800 y 1200 nm. Su capacidad para infectar es baja, y es la forma intracelular y reproductora; se tiñe de color azulado con la tinción de Giemsa. La pared celular es delgada y frágil y está aparentemente adherida más laxamente a la membrana celular, hecho importante para permitir la difusión de sustancias hacia adentro y afuera de la inclusión en desarrollo. (2)

La pared celular de los cuerpos contiene Lisina y D-alanina, se discute la presencia eventual del ácido N-acetilmurámico (característico de las bacterias). La pared celular del C.R. difiere de la elemental en que los péptidoglicanos no están ligados por uniones peptídicas. Esto puede permitir un aumento de la permeabilidad del C.R., para que su pared celular pueda ser atravesada por el trifosfato de adenosina. A diferencia de los micoplasmas, las clamidias no contienen colesterol en la pared celular, presentan grandes cantidades de lípidos y carbohidratos, pero sólo pequeñas proporciones de ácidos nucleicos.

En contraste con los virus, las clamidias tienen ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico, este último, en el C.E., se localiza en el nucleóide, como una cadena doblemente

trenzado y enrollado. La relación de guanina-citocina es aproximadamente de 45% en C. trachomatis, 40% en C. psittaci, y el tamaño del genoma es cercano a 9.8×10^8 daltons.

En el citoplasma se encuentran ribosomas 70 S divisibles en componentes 30 S y de 50 S. Por lo menos se han encontrado 18 aminoácidos en ellos, que ocupan el 60 % del C.E. (42)

Las clamidias son en principio parásitos energéticos, que -- obtienen de la célula huésped el Adenosintrifosfato. Weiss E., Myers W. F., Dressler H. R., and Chun-hoon H., en 1964, demostraron que el metabolismo anaeróbico de la glucosa ocurre probablemente vía pentosa-fosfato y por vía glicolítica. Esta actividad se lleva a cabo a un nivel bajo y en condiciones anormales parece producir una pérdida neta de adenosintrifosfato y ácido desoxirribonucleico. Poseen citocromo C-reductasa, pero carecen del sistema de transporte de electrones (68)

CUADRO I

DIFERENCIACION ENTRE: Chlamydia, Virus y Bacterias.

	Chlamydia	Virus	Bacterias
Diámetro (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 compli- cado y fisión binaria	Eclipse Síntesis ensamble	Fisión binaria
Sensibilidad a antibió- ticos	Si	No	Si
Ribosomas	Si	No	Si
Enzimas metabólicos	Si	No	Si
Producción de energía	No	No	Si

De Page L.A. (46)

CICLO VITAL DE C. trachomatis:

Las clamidias son capaces de producir su propia fagocitosis,

lo cual es una ventaja obvia para un parásito intracelular obligado. El ciclo de desarrollo se divide en tres fases:

- 1.- Entrada de cuerpos elementales en células huésped y su organización en cuerpos reticulados.
- 2.- Multiplicación de C. R.
- 3.- Conversión de gran parte de la población de C. R. en una nueva generación de C. E., los cuales se liberan de la célula huésped.

El ciclo es asincrónico y a cada una de las dos primeras fases se sobrepone con la siguiente que le sucede. Se ha demostrado la morfología de las inclusiones de clamidias en diferentes estadios del ciclo de su evolución; dos horas y media después de la infección pueden verse CE al comienzo de su desarrollo.

La célula clamidial aún retiene su pared celular rígida y -- nucleóide central. Subsecuentemente a las 12 horas puede observarse una gran estructura en una vacuola citoplásmica, estos son los CR. Veinte horas después de la infección, el citoplasma del huésped se llena con CR que han desplazado al núcleo celular. Algunos de los CR tienen la forma de las células procariotas en el proceso de fisión binaria. A las

30 horas la gran población de CR se ha reducido y los tres tipos de CE aparecen. (4) (Fig. 1)

Para que las clamidias se consideren como un agente patógeno es necesario que haya interacción con células huésped permisivas y esta relación culmine con la liberación de nuevos - CE infecciosos. Esta interacción denota cooperación entre patógeno y huésped. La fase inicial es la adherencia, que en el caso de C. trachomatis, limita su preferencia celular sobre todo a los epitelios de órganos genitales y oculares, C. psittaci prefiere el epitelio respiratorio.

Figura 1

14

Representación esquemática del ciclo infeccioso de *Chlamydiae* con características de las dos formas de desarrollo del microorganismo. (41)

CUERPO ELEMENTAL: (C.E.)

CUERPO RETICULADO: (C.R.)

Pared celular rígida.

Pared celular frágil.

Relativamente resistente a
sonicación.

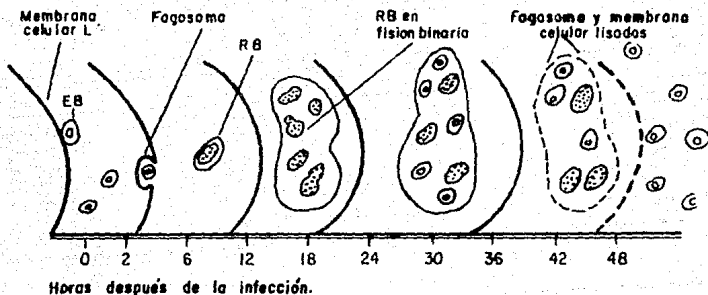
Sensible a sonicación.

Subunidades en envoltura celular.

No hay subunidades de envoltura.

Tóxico para ratón.

No tóxico para ratón.



SEROLOGIA DE LA C. trachomatis:

Las C. Trachomatis y C. psittaci, comparten un grupo antigénico común, reactivo para la Fijación del Complemento; este antígeno es un polisacárido ácido de alto peso molecular -- (Grayston y Wang, en 1975). Si bien tiene aplicación para el serodiagnóstico de la psitacosis y el linfogranuloma venéreo, la prueba de Fijación de Complemento es poco sensible en el diagnóstico de infecciones oculogenitales por C. trachomatis. (34)

El desarrollo de la técnica de Microinmunofluorescencia, permitió la separación de C. trachomatis en 15 serotipos (Grayson y Wang, en 1975). Las reacciones serológicas entre ellas son complejas y sus respectivos antígenos no han sido identificados bioquímicamente. (36)

SEROTIPOS DE C. trachomatis

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

El tipo A, en general está limitado al Oriente Medio y al Norte de Africa, y el B a la producción de Tracoma entre los indios norteamericanos, D y E son los serotipos que se asocian con mayor frecuencia a infecciones genitales y conjuntivitis de inclusión en adultos y en recién nacidos.

Los serotipos L1 y L2, reaccionan en forma cruzada el uno con el otro y pueden ser utilizados en pruebas de antígeno único para determinar la presencia de anticuerpos contra las clamidias en el suero humano.

SENSIBILIDAD DE C. trachomatis FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS:

La sensibilidad de C. trachomatis a diversos agentes antimicrobianos ha mostrado ser útil para elucidar sus características microbiológicas y para obtener orientación en su tratamiento.

Werner G. H., en 1961, estudió los efectos de una gran variedad de antimicrobianos en los cultivos del saco vitelino, que son de posible uso terapéutico (penicilina, tetraciclinas, sulfonamidas y macrolidos). Reeve P., Taverne J., y Bushby S. R. M., en 1968 investigaron la acción de los inhibidores del ácido fólico en un sistema de embrión de pollo con cultivos de C. trachomatis. Reeve en 1976 y Ridway en 1982, confirma-

ron la eficacia "in vitro" de las tetraciclinas y de la eritromicina, y la eficacia parcial de las sulfonamidas y las penicilinas, así como la poca actividad anticlamidia del trimetropin y de los aminoglucósidos. (1, 3, 13, 17, 28, 40)

Los agentes antimicrobianos de mayor efectividad "in vivo" y su dosis terapéutica son:

Clorhidrato de tetraciclina (HCL):

500 mg/vía oral, 4 veces al día/7 días.

Hiclato de doxiclina:

100 mg/vía oral, 2 veces al día/7 días.

Para las pacientes en quienes las tetraciclinas están contraindicadas ó no sean toleradas, la droga alternativa es:

Eritromicina base o estearato:

500 mg/vía oral, 4 veces al día/7 días.

Las sulfonamidas también son efectivas contra C. trachomatis aunque no se han definido las dosis óptimas de sulfonamidas para la detección por clamidia; probablemente sea efectivo el sulfametoxazol a dosis de:

Sulfametoxazol:

1 g/vía oral, 2 veces al día/ 10 días.

Durante el embarazo las drogas de elección son:

Eritromicina base

500 mg/vía oral, 4 veces al día/7 días.

Etil-succinato de eritromicina:

800 mg/vía oral, 4 veces al día/7 días.

En las conjuntivitis del recién nacido:

Eritromicina oral en suspensión:

50 mg/Kg. de peso corporal por día, dividido en
4 dosis, por 14 días

EPIDEMIOLOGIA:

Las enfermedades de transmisión sexual representan un problema de salud pública tanto en países desarrollados como en - - países subdesarrollados, en los que el interés ha sido principalmente en las "enfermedades venéreas clásicas", (sífilis y gonorrea). Estas infecciones han sido superadas en frecuencia por un grupo importante de enfermedades como la uretritis no gonocócica y los padecimientos relacionados con ella.

En estas enfermedades se han descrito varios agentes etiológicos, entre los que destaca la alta prevalencia de C. trachomatis, siendo la causa del 40 al 50 % de enfermedad no gonocócica en población sexualmente activa.

INFECCIONES POR CLAMIDIAS:

Se piensa que las clamidias de cepas genitales producen muchas enfermedades en varones, mujeres y niños. Cuadro 2.

La variedad de éstas en relación con C. trachomatis ha ido creciendo en los últimos años tal vez pronto se harán nuevos agregados a esa lista, por lo tanto, es claro que C. trachomatis es un microorganismo importante para la sociedad.

CUADRO 2

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA INFECCION POR C. trachomatis

Enfermedades del adulto:

Tracoma

Conjuntivitis de inclusión

Linfogranuloma venéreo

Uretritis no gonocócica

Uretritis postgonocócica

Epididimitis

Proctitis

Cervicitis mucopurulenta

Infección de los conductos de Bartolin

Salpingitis

Perihepatitis

Infertilidad

Pérdidas fetales

Displasia cervical

Síndrome uretral

Síndrome de Reiter

Bronquitis/neumonía

Endocarditis

} Papel aún no definido

INFECCIONES OCULARES:

Existen dos formas importantes de enfermedades oculares originados por clamidias. El Tracoma (productor de ceguera o hiperendémico) aparece con mayor frecuencia en los países subdesarrollados. Es una enfermedad inflamatoria crónica de los ojos que puede llevar a una cicatrización conjuntival y corneana, siendo la causa más común de ceguera evitable en el mundo. (9, 10, 12, 50, 54, 60, 61)

Enfermedades fetales y neonatales:

Conjuntivitis de inclusión

Infección faríngea.

Neumonía

Otitis media

Vulvovaginitis

El paratracoma comprende: conjuntivitis de inclusión de los adultos, queratitis difusa y el tracoma endémico, frecuentemente en las sociedades urbanas occidentales y se relaciona con infecciones genitales, por contacto directo o indirecto con las secreciones de esas áreas. (12, 54, 60, 61). La conjuntivitis de inclusión neonatal también se debe a la infección por cepas genitales de C. trachomatis, adquiridas a partir de la madre en el momento del parto. Se ha sugerido además que en caso de niños recién nacidos de madres infectadas puede la -

C. trachomatis permanecer latente durante la niñez y desarrollarse posteriormente. (55)

NEUMONIA:

Los estudios muestran que la colonización de la vías respiratorias por el microorganismo, puede asociarse con un síndrome característico de neumonía sin fiebre, éste se presenta entre la 4a. y 12a. semana de vida. Con frecuencia existe también oclusión nasal parcial con exudación mucocida, junto con otitis media, pero los que predominan son la taquipnea y tos con paroxismo evidente. (5, 19, 47)

SINDROME DE REITER:

Es una uretritis adquirida por transmisión sexual, es mucho más común en hombres que en mujeres y con frecuencia sigue un curso crónico con recidivas. La tríada clásica del síndrome de Reiter es uretritis, conjuntivitis y artritis. (30, 56, 64, 69)

INFECCIONES GENITALES EN EL HOMBRE Y EN LA MUJER:

Las infecciones más frecuentes causadas por clamidias en genitales masculinos son UNG y la UPG, y en hombres jóvenes -- epididimitis, (56, 66). Se ha informado faringitis por cla--

midias en pacientes con conjuntivitis de inclusión, tal vez como resultado del drenaje del ojo infectado. (15)

Aún más importantes son las infecciones por clamidias entre mujeres. La mayoría de estas infecciones cursan asintomáticas, en los órganos genitales puede producir infecciones en el cuello uterino, uretra, conductos de las glándulas de -- Bartolin y de trompas de Falopio. Es posible que el microorganismo produzca también perihepatitis (síndrome de Curtis Fitz-Hugh), o incluso infecte el recto. (18, 20, 49, 66, 69)

En relación a la enfermedad inflamatoria pélvica producida por C. trachomatis, la inflamación de las trompas de Falopio ocasiona fibrosis y obstrucción tubaria en grado variable, lo cual puede originar infertilidad (oclusión completa) y aumento en la frecuencia del embarazo ectópico (por oclusión parcial). (25, 32)

Tanto la salpingitis sola como asociada a perihepatitis se debe con mayor frecuencia a infección clamidial o afección gonorréica. Los cambios observados en la mucosa rectal por la infección incluyen la presencia de folículos con aspectos de "empedrado de guijarros" debido a la congestión y cicatrización y la fibrosis se ha manifestado en ocasiones como una

masa vaginal sintomática y en otras sólo como un exudado mucopurulento. (20, 25, 59)

La salpingitis ha sido también asociada con el uso del dispositivo intrauterino y la evidencia serológica de infección anterior por clamidias. (20, 59)

CERVICITIS AGUDA:

Esta enfermedad se caracteriza por congestión cervical y eritema con presencia de exudado cervical anormal. La cervicitis aguda puede aparecer cuando ya existe una erosión cervical, en cuyo caso esta última se presenta como congestiva y edematosa, le llaman erosión hipertrófica. La presencia de un exudado mucopurulento endocervical es más común en los casos positivos para clamidias que en los casos negativos. (43)

LINFOGRANULOMA VENEREO (LGV):

Es una enfermedad transmitida por contacto sexual y producida por los serotipos de C. trachomatis L1, L2, L3, tiene distribución universal pero es común sobre todo en países tropicales y subtropicales. Clínicamente el LGV difiere de los síndromes producidos por las cepas genito-oculares, en que mientras éstas infectan al epitelio cilíndrico, la del LGV atacan el tejido linfático y la mayor parte de los efectos de la enfermedad se deben a esta invasión; se desconoce hasta que punto -

difieren entre sí los tres serotipos. (18, 23)

El curso clínico del LGV puede dividirse en tres etapas:

Etapa primaria, se involucra la infección inicial y lesiones tempranas. Casi siempre es con frecuencia transitoria e imperceptible, es indolora.

Etapa secundaria, infección a los nódulos linfáticos regionales. Frecuentemente por agrandamiento de bubones, los cuales pueden ser dolorosas; la infección aguda suele ser común y se acompaña de fiebre, cefalea y mialgias.

Etapa terciaria, usualmente resultante de la diseminación progresiva con lesiones hipertróficas y necróticas.

PSITACOSIS HUMANA:

La psitacosis humana, causada por la C. psittaci es adquirido por el hombre que tiene estrecho contacto con los animales -- infectados, principalmente aves. Sus dos formas de presentación son neumonía severa e infección sistémica.

Los escasos datos que se tienen respecto a la prevalencia de C. trachomatis en nuestra población, nos ha conducido a investigar la prevalencia y el espectro clínico de C. trachomatis en población de mujeres embarazadas, no embarazadas y en hombres clínicamente sanos.

OBJETIVOS

~~1.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.
2.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.
3.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.
4.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.
5.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.~~

1.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.

2.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.

3.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.

4.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.

5.- Comparar la estructura de las relaciones de las empresas
generales en sus respectivos países.

MATERIAL Y METODOS

A): Equipo:

Agitador mecánico (vortex).

Asa Bacteriológica.

Baño María con graduador de temperatura 0-110°C.

Cámara húmeda.

Dispensador de perlas.

Equipo de lavado Pentawash II con bomba de vacío.

Espectrofotómetro Quantum II.

Espejo vaginal.

Esteroscopio.

Estufa bacteriológica.

Frascos con gotero.

Guantes y cubre boca.

Hisopos estériles.

Lápiz de diamante.

Mechero Bunsen.

Microscopio de Luz.

Microscopio de Fluorescencia.

Pinzas.

Pipetas automáticas: 200, 100 y 25 µl.

Pipetas graduadas: 1, 2, 5 y 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Pipetas vaginales.

Placas de polietileno.

Porta y cubreobjetos.

Puente de tinción.

Refrigerador.

Tubos con medio de transporte.

Vasos de coplin.

B): MATERIAL BIOLÓGICO

POBLACION ESTUDIADA:

Para el presente estudio se seleccionaron tres grupos de pacientes que acudieron a la consulta externa del Hospital Regional "20 de Noviembre" de julio de 87 a junio de 1988.

CUADRO 3
CLASIFICACION DE LAS MUESTRAS

MUJERES Y HOMBRES	PROBLEMAS
162 Ex. vaginales de embarazadas	Leucorrea. Vaginitis.
100 Ex. vaginales no embarazadas	Cervicitis. Infertilidad. Leucorrea. Vaginitis
52 Ex. Uretrales	Clinicamente sanas.

MÉTODOS:

Los métodos empleados para la detección de C. trachomatis en el presente trabajo fueron: dos tinciones tradicionales y dos equipos comerciales.

TINCIÓN DE GIMENEZ.

TINCIÓN DE MACHIAVELLO.

TINCIÓN DE INMUNOFLORESCENCIA "MICROTRAK" (SYVA)

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO "CHLAMYDIAZYME" (ABBOTT)

REACTIVOS PREPARADOS:

- GIMENEZ:
- 1.- Sol. Stock fucsina básica.
 - 2.- Sol. amortiguadora fosfato de sodio 0.1 ml a pH 7.45.
 - 3.- Sol. oxalato verde de Malaquita 0.8%

MACHIAVELLO: 1.- Sol. fucsina básica.

- 2.- Sol. azul de metileno al 1%.
- 3.- Sol. ácido cítrico al 5%

INMUNOFLORESCENCIA: Equipo Microtrak (SYVA)

- 1.- Reactivo para C. trachomatis 2.0 ml.
- 2.- Diluyente de reconstitución 5.0 ml.
- 3.- Sol. fluido de montaje. 2.0 ml.

INMUNOENZIMATICO: Equipo Chlamydiazyme (ABBOTT)

- 1.- 100 perlas tratadas Chlamydiazyme.
- 2.- Un frasco de 20 ml. conjugado de Chlamydiazyme IgG de cabra-anticonejo. Peroxidasa rústica, concentración mínima 0.05 mg/ml. en amortiguador TRIS y agente microbial.
- 3.- Un frasco de 4 ml control positivo Chlamydiazyme, C. trachomatis (inactivada) en amortiguador de fosfato salino.
- 4.- Un frasco de 15 ml. control negativo Chlamydiazyme, en amortiguador fosfato salino.
- 5.- Un frasco de 20 ml C. trachomatis anti-conejo, concentración mínima 0.05 mg/ml. en amortiguador TRIS y agente -- antimicrobial.
- 6.- Un frasco de 100 ml. amortiguador de dilución de la muestra. Amortiguador de fosfato salino.
- 7.- Un frasco de 10 tabletas OPD. (O-fenilen diamina. 2HCl).
- 8.- Un frasco de 55 ml. diluyente para OPD. Amortiguador de citrato fosfato conteniendo 0.02% de peróxido de hidrógeno.
- 9.- Un frasco de 100 ml. ácido sulfúrico 1. N.

ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

La sensibilidad y la especificidad son dos características útiles para validar la exactitud de las pruebas de laboratorio.

El proceso de diagnóstico generalmente puede tener dos resultados: Verdadero positivo, cuando se considera que el individuo investigado tiene la enfermedad o características dadas y Verdadero negativo cuando se considera que no la tiene.

No es posible afirmar que una prueba de diagnóstico es buena sólo porque es muy sensible, es decir que en casi todos los enfermos resulte positiva. Para que una prueba se considere buena es necesario que sea específica, esto es que pueda detectar como negativo a los casos sin enfermedad.

La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad, y se representa como $P(+|E)$ (probabilidad P , de que la prueba sea positiva, +, dado E , que el individuo está enfermo, E).

La especificidad es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando el individuo realmente no tiene la enfermedad, y se representa como $P(-|\bar{E})$ (probabilidad P , de que la

prueba sea negativa, - , dado, I , que el individuo no está enfermo, \bar{E}). (13-b)

El procedimiento nosológico se usa para validar una prueba - comparándola como una prueba de referencia. Para calcular las características de sensibilidad y especificidad es necesario elaborar una tabla de contingencia como la siguiente.

PRUEBA DE REFERENCIA

	+ E	- E	Total
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

a = es el número de casos verdaderos positivos.

b = es el número de casos falsos positivos.

c = es el número de casos falsos negativos.

d = es el número de casos verdaderos negativos.

$S = \frac{a}{a + c}$ da una idea del valor de P (+ | E)

$E = \frac{d}{b + d}$ da una idea del valor de P (- | \bar{E})

TOMA DE PRODUCTOS:

Previa aplicación de un espejo vaginal se tomó por aspiración con una pipeta vaginal, una muestra de exudado del fondo de saco posterior el cual se colocó en un tubo que contenía 1 ml. de caldo enriquecido, otro tubo que tenía 1 ml. de solución salina isotónica al 0.85% que debería ser mantenido a temperatura de 37°C en baño María. Inmediatamente después se tomó una muestra de raspado de las paredes vaginales, con un hisopo, se hicieron 4 frotis depositando el material en el centro de la laminilla en un área no mayor de 1 cm. de diámetro y otro hisopo para el tubo con medio de transporte Chlamydiazyme (del equipo de ELISA) que se conservó en refrigeración en no más de 5 días después de haberse tomado la muestra.

Empleando los mismos medios de transporte requeridos para la colección del exudado vaginal, se tomaron muestras de exudado uretral introduciendo los hisopos en el meato urinario y practicando movimientos de rotación durante 2 a 3 segundos. Cada uno de los hisopos se colocó en el medio recomendado para su procesamiento con las mismas instrucciones que el anterior. Los tubos se etiquetaron cuidadosamente.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

El tubo I con medio de transporte Chlamydiazyme, permanece estable hasta las 48 horas después de la toma; posteriormente se refrigeró de 2 a 8°C, se procesó antes de 5 días.

Del tubo II con medio de transporte Soya-Trypticase con 5% de albúmina bovina, se sembró en los medios de agar sangre, agar chocolate, agar Mc Conkey y el sobrante del medio se pasó a otro tubo de tioglicolato para la resiembra. Se incubó a 37°C, durante 24 horas, excepto agar chocolate que se colocó en una jarra de anaerobiosis con cámara de CO₂ por 48 horas.

Posteriormente se identificaron las colonias bacterianas con ayuda del microscopio estereoscópico y se montaron las bioquímicas utilizando el sistema API-20 para los Gram negativos y bioquímicas para los cocos Gram positivos catalasa positiva y negativa. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se identificó a la bacteria en género y especie, de acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas.

El tubo III con solución salina se sometió a estudio bacterioscópico en fresco para buscar: Trichomonas, levaduras, -- leucocitos, piocitos, eritrocitos por campo; apreciación de

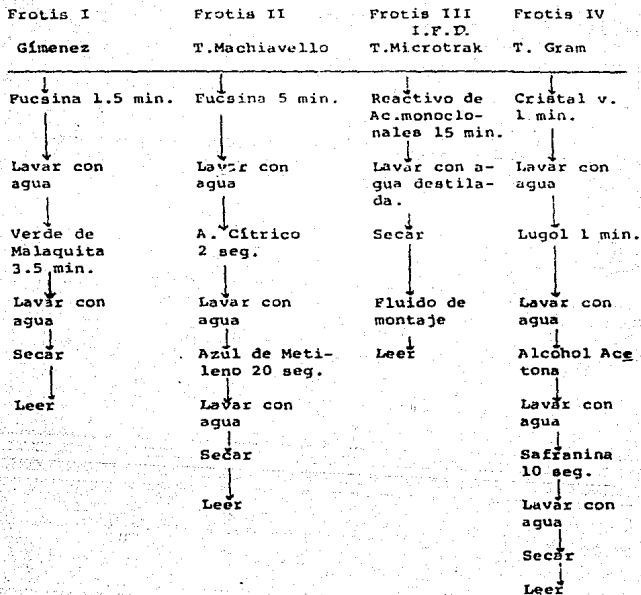
la proporción de bacterias, células clave y/o cualquier otro elemento ó parásito. Esto se leyó en un tiempo no mayor a una hora, ya que las Trichomonas se mueren.

De los frotis uno se tiñe por el método de Gram, los otros - para búsqueda de C. trachomatis, por los métodos de tinciones tradicionales Gimenez y Machiavello. Y MicroTrak (método comercial SYVA).

DIAGRAMA DE FLUJO
MUESTRA CLINICA
EXUDADO URETRAL Y VAGINAL

Tubo I	Tubo II	Tubo:III
Chlamydiazyme	Soya tripticasa + 5% Albumina bovina	Sol. salina
Tubo + diluyente Reposo y agitación	Agar sangre Agar chocolate Agar McConkey	Observación en fresco;
↓ 200 µl sobrenadante al pozo de la placa	↓ Incubar 37°C 24 horas	↓ Bacterias, eritrocitos, leucocitos, levaduras, Trichomonas.
↓ Adherir la perla y sellar. Inc. a 37°C por 1 hora	↓ Observación macroscópica de colonias	
↓ Lavar en 4 tiempos	↓ Pruebas bioquímicas Inc. 37°C/24 horas	
↓ Adicionar 200 µl anti- <u>C. trachomatis</u> Inc. 37°C 1 hora	↓ Identificación de género y especie	
↓ Lavar en 4 tiempos		
↓ Adicionar 200 µl del conjugado Inc. 37°C 1 hora		
↓ Lavar en 4 tiempos		
↓ Pasar perlas a caja reacción + 300 µl de P.Alcalina OPD Inc. 30 minutos a temp. ambiente		
↓ Adicionar 1 ml de H ₂ SO ₄ 1N		
↓ Leer		

DIAGRAMA DE FLUJO
MUESTRA CLINICA
EXUDADO URETRAL Y VAGINAL



PREPARACION DE MUESTRA PROBLEMA Y CONTROLES PARA ANALISIS:

- 1.- Poner los tubos de Chlamydiazyme a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.
- 2.- Adherir 1 ml. de solución diluyente a cada tubo etiquetado como muestra problema y a los controles.
- 3.- El hisopo debe permanecer sumergido por lo menos 10 a 15 minutos.
- 4.- Agitar los tubos en vortex por 3 ciclos de 15 segundos cada uno.
- 5.- Inmediatamente después de agitar quitar el exceso de fluido por presión y rotación de la porción de algodón del hisopo contra la pared del tubo. Descartar el hisopo en forma adecuada.

CONTROLES:

- 1.- Se corren en cada prueba un control positivo y tres controles negativos, bajo las mismas condiciones.
- 2.- Agitar el control positivo vigorosamente al menos por un minuto, tomar 200 μ l, del control positivo y colocarlo en un tubo etiquetado y adherir 1 ml. de amortiguador diluyente.
- 3.- El mismo tratamiento para el control negativo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1a. Incubación:

- 1.- Colocar 200 μ l de muestra problema y controles acabados de preparar dentro del pozo apropiado de la placa de polietileno.
- 2.- Colocar una perla con el dispensador para cada pozo conteniendo muestra control, evitando la formación de burbujas.
- 3.- Sellar la placa.
- 4.- Incubar a 37°C, \pm 2°C. por 60 \pm 3 minutos.
- 5.- Retirar la cubierta cuidando de no salpicar, aspirar el líquido y lavar cada perla 4 veces con 4 a 6 ml. de agua bidestilada utilizando el "pentawash".

2a. Incubación:

- 1.- Colocar 200 μ l, de anti-C. trachomatis dentro de cada pozo de reacción.
- 2.- Sellar la placa, golpeando suavemente la placa para quitar burbujas de aire.
- 3.- Incubar a 37°C, \pm 2°C, por 60 \pm 3 minutos.
- 4.- Retirar la cubierta y lavar en la misma forma.

3a. Incubación:

- 1.- Colocar 200 ml. del conjugado en cada pozo de reacción.
- 2.- Sellar la placa y quitar las burbujas.
- 3.- Incubar a $37^{\circ}\text{C.} \pm 2^{\circ}\text{C.}$ por 60 ± 3 minutos.
- 4.- Preparar la solución de OPD necesaria para el número de muestras 5 a 10 minutos antes de su uso. Por cada 5 ml. de diluyente una tableta. Mantenerlo en frasco ambar al abrigo de la luz y agitar suavemente antes de su uso.
- 5.- Retirar la cubierta y lavar en la misma forma.

4a. Incubación:

- 1.- Pasar las perlas a los tubos de la caja reacción identificados previamente.
- 2.- Colocar 300 ml. de solución sustrato OPD previamente preparado, colocando un tubo adicional, para usarse como blanco.
- 3.- Sellar y cubrir la caja reacción al abrigo de la luz.
- 4.- Incubar a temperatura ambiente por 30 ± 2 minutos.
- 5.- Adherir a cada tubo 1 ml. de ácido sulfúrico 1 N. y mezclar.
- 6.- Leer en espectrofotómetro a una absorbancia de 492 nm. Dentro de los 30 minutos siguientes.

PRECAUCIONES:**a) MUESTREO:**

- 1.- Utilizar los hisopos por separado, si se requieren - pruebas adicionales.
- 2.- La prueba se aplica a muestras endocervicales o uretrales.
- 3.- Las muestras a temperatura ambiente duran 48 horas en los tubos de transporte. No deben ser congeladas.
- 4.- Si la muestra diluida no se procesa en las siguientes 4 horas, refrigérese de 2 a 8°C por no más de 48 horas, lleve entonces a temperatura ambiente y agite - antes de procesar

b) REACTIVOS:

- 1.- No usar reactivos de diferentes lotes, ni ya caducados. Evitar la contaminación de los reactivos o --- reacciones cruzadas usando puntas por separado.
- 2.- Mantener los reactivos en refrigeración, antes de usarse llevarlos a temperatura ambiente y refrigerarse inmediatamente después de su utilización.
- 3.- El diluyente de OPD no debe presentar coloración roja naranja, de lo contrario debe evitarse su uso por descomposición.

c) PROCESAMIENTO:

- 1.- No salpicar de un pozo a otro durante el manejo o lavado.
- 2.- Checar previamente el sistema de lavado, succión y rocío de agua bidestilada.
- 3.- Eliminar el exceso de agua de los pozos.
- 4.- Evitar la formación de burbujas en los tubos de ensaye para que no haya interferencias en la lectura de absorcias.

EVALUACION 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 ≤ 0.8 de lo contrario se repetirá la prueba.

Si el valor (positivo) - (negativo) es bajo puede sospecharse

del deterioro de los reactivos.

INMUNOFLUORESCENCIA C. trachomatis Directa SYVA MicroTrak:

Reactivo y diluyente de reconstitución.

El reactivo contiene anticuerpos monoclonales de murinos, purificados específicos marcados con fluoresceína, contra C. trachomatis, con ratinación de zulo de Evans y un supresor de coloración no específica en una solución amortiguadora de proteína estabilizada.

El diluyente de reconstitución contiene 0.1 % de azida de sodio en agua desionizada.

FLUIDO DE MONTAJE:

Fluido de montaje a pH 9.4 amortiguador de fosfato, glicerol y un agente para retardar la decoloración.

PREPARACION DE LA MUESTRA:

- 1.- Hacer el frotis girando el hisopo en el área marcada del portaobjeto.
- 2.- Dejar que la muestra se seque completamente al aire.
- 3.- Reconstituir el reactivo liofilizado, con 2.0 ml del diluyente de reconstitución, tapar y agitar suavemente, -- mantener el reactivo a la temperatura ambiente durante - 30 minutos antes de su empleo.

- 4.- Fijar el frotis en acetona, dejando que se evapore completamente.
- 5.- Añadir 25 ul. de reactivo a cada muestra asegurándose que se haya cubierto toda el área.
- 6.- Incubar las preparaciones durante 15 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- 7.- Quitar el exceso de reactivo, lavando suavemente con agua destilada durante 10 segundos.
- 8.- Dejar que se sequen los portaobjetos exponiéndolos al aire.
- 9.- Añadir una gota de fluido de montaje, colocar un cubre - objeto encima de la gota y eliminar todas las burbujas de aire.
- 10.- Leer muestras utilizando un microscopio de fluorescencia en este caso utilizamos un objetivo de planacromático 63/1.4 Zeiss.

PRECAUCIONES:**MUESTREO:**

- 1.- Una ejecución óptima de este análisis depende de la obtención de una buena muestra del paciente y de una correcta técnica en la aplicación al portaobjeto.
- 2.- Es preferible que el paciente no haya orinado durante una hora antes de la obtención de la muestra.
- 3.- Dejar que el reactivo y las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de emplearlos.
- 4.- Si es necesario, cubrir el frotis con reactivo utilizando para ello la punta de la pipeta, teniendo cuidado de no alterar la muestra fijada y cambiar la pipeta.
- 5.- No dejar que se sequen los anticuerpos en las muestras, el secado provocará una unión no específica, por lo tanto controlar periódicamente la cámara en lo que concierne a la humidificación adecuada.
- 6.- Si no es posible leer inmediatamente las preparaciones después de la coloración almacenarlos en un lugar oscuro de 2 a 8°C , y leerlos dentro de las 24 horas siguientes a fin de obtener mejores resultados. Dejar que las preparaciones alcancen la temperatura ambiente antes de

la lectura o habrá condensación, provocándose el oscurecimiento de las muestras.

- 7.- Una dilución o adulteración del reactivo de trabajo puede acarrear una pérdida de sensibilidad.
- 8.- El diagnóstico tendrá que basarse solamente en la presencia de C. E. Utilizar siempre la preparación de control positivo como guía en lo que concierne a modelo y tamaño, forma y coloración de los cuerpos elementales.
- 9.- El diagnóstico efectivo de muestras urogenitales y conjuntivales, se realiza cuando las muestras coloreadas y fijadas muestran a lo menos 10 cuerpos elementales de *Clamidia* con el objeto de asegurar una lectura exacta de la muestra.
- 10.- El microscopio de Fluorescencia debe estar equipado con un sistema de filtros para observar isotiocinato de -- Fluoresceína (FITC)
- 11.- Una coloración amarilla indica autofluorescencia y tiene que desecharse las muestras.
- 12.- Cuando no se utilice el reactivo, almacenarlo de 2 a 8°C
No congelar ni exponer a temperatura superior a los 32°C
No exponer a la luz fuerte. Cuando se procede como se indica, el reactivo de reconstitución se puede utilizar

durante 12 semanas. Registrar la fecha de reconstitución en la etiqueta del frasco y mantenerlo a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su empleo.

TINCION DE GIMENEZ MODIFICACION DE LA TECNICA DE MACHIAVELLO

Solución stock:

- 1.- 10% (peso/vol) Fucsina básica en 95% etanol ----- 100 ml
 4% (peso/vol) Fenol acuoso ----- 250 ml
 Agua destilada ----- 650 ml
- 2.- Solución amortiguadora de fosfato de sodio (0.1M) a
 pH 7.45 (mezclar 3.5 ml. de 0.2 M NaH_2PO_4 , 15.5 ml. de
 0.2 M Na_2HPO_4 y 19 ml. de agua destilada)
- 3.- Oxalato verde de Malaquita acuoso 0.8%
- 4.- Para preparar una solución de trabajo Carbol-Fucsina, -
 mezclar 4 ml de solución stock con 10 ml de amortiguador
 (pH 7.45); filtrar inmediatamente y filtrar otra vez an-
 tes de cada tinción. La solución de trabajo permanece
 estable cerca de 40 horas.

TINCION DE GIMENEZ:

- 1.- Hacer un frotis delgado
- 2.- Dejar que la muestra se seque completamente al aire.
- 3.- Fijar el frotis al calor
- 4.- Cubrir el frotis con la solución de trabajo 1.5 minutos.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Cubrir el frotis con verde de Malaquita 3.5 minutos

- 7.- Lavar con agua.
- 8.- Secar con ayuda de papel absorbente.
- 9.- Leer muestras al microscopio de luz, con objetivo 100 X.
Los C. E. son teñidos de rojo sobre la base de color ver
de.

TINCION DE MACHIAVELLO

Solución stock:

- 1.- Fucsina básica 0.25 g. en 100 ml. de agua destilada.
- 2.- Acido cítrico 0.5 g. en 200 ml. de agua bidestilada.
- 3.- Azul de metileno 1.0 g. en 100 ml. de agua bidestilada.

PREPARACION:

- 1.- Hacer un frotis delgado.
- 2.- Dejar que la muestra se seque completamente al aire.
- 3.- Fijar el frotis al calor.
- 4.- Cubrir el frotis con la solución fucsina básica, por 5 minutos.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Decolorar con solución de ácido cítrico por 2 segundos.
- 7.- Lavar con agua cuidadosamente.
- 8.- Cubrir el frotis con azul de metileno al 1% por 20 seg.
- 9.- Lavar con agua y dejar secar la muestra al aire

10.- Leer muestras al microscopio de luz, con objetivo de 100 X.

Los cuerpos elementales son teñidos de rojo, sobre la base de color azul.

PRECAUCIONES:

- 1.- La solución de fucsina básica debe cambiarse cada mes
- 2.- La solución de ácido cítrico debe ser fresca, se debe de cambiar cada semana por lo menos.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS:

- 1.- De 0 a 15 clamidias / 10 campos = NEGATIVO
- 2.- De 1 a 5 clamidias / 1 campo = DUDOSO
- 3.- De 6 a 10 clamidias / 1 campo = ESCASA
- 4.- De 10 a 15 clamidias / 1 campo = MODERADO
- 5.- De 16 a 20 clamidias / 1 campo = ABUNDANTES

NOTA: Esta evaluación de los resultados es para las dos tinciones de rutina: Gimenez y Machiavello.

A partir de MODERADO se considera POSITIVO

RESULTADOS

La identificación de infección por C. trachomatis en exudados urogenitales fué del 20% en el total de 314 muestras. Al -- subdividirlo en los grupos de mujeres embarazadas, no embarazadas y hombres clínicamente sanos, se observó que el 15.4% de las clamidias positivas correspondieron al grupo de las mujeres embarazadas. La más alta frecuencia se obtuvo con la prueba de ELISA, que en comparación a la tinción de Giménez, Machiavello e Inmunofluorescencia, fué prácticamente del doble o triple. (Cuadro 3)

En el grupo de mujeres no embarazadas se obtuvieron resultados similares en una proporción de 24/100 de pruebas positivas por ELISA; cifra mayor que con las técnicas restantes -- que fueron de 1.0% y 7.0% con las técnicas de Giménez y Machiavello respectivamente y 10% de Inmunofluorescencia. - (Cuadro 4)

En la población de hombres clínicamente sanos 52, se obtuvieron resultados negativos para las tinciones de Giménez y Machiavello y datos positivos en el 5.7% y 26.9% empleando las pruebas de Inmunofluorescencia y ELISA respectivamente. (Cuadro 5)

CUADRO 3

FRECUENCIA DE IDENTIFICACION DE C. trachomatis EN
162 MUESTRAS DE EX. VAGINAL DE MUJERES EMBARAZADAS

METODO	CLAMIDIAS POSITIVAS	PORCENTAJE
T. Gímenez	3	1.8
T. Machiavello	3	1.8
T. Inmunofluorescencia	8	4.9
ELISA	25	15.4

CUADRO 4

FRECUENCIA DE IDENTIFICACION DE C. trachomatis EN
100 MUESTRAS DE EX. VAGINAL DE MUJERES NO EMBARAZADAS

METODO	CLAMIDIAS POSITIVAS	PORCENTAJE
T. Gimenez	1	1.0
T. Machiavello	7	7.0
T. Inmunofluorescencia	10	10.0
ELISA	24	24.0

CUADRO 5

FRECUENCIA DE IDENTIFICACION DE C trachomatis EN 52
MUESTRAS DE EX. URETRAL DE HOMBRES CLINICAMENTE SANOS

METODO	CLAMIDIAS POSITIVAS	PORCENTAJE
T. Gímenez	0	0.0
T. Machiavello	0	0.0
T. Inmunofluorescencia	3	5.7
ELISA	14	26.9

Por todo ello nosotros analizamos nuestra sensibilidad y especificidad, valores predictivos positivos y negativos de los diferentes métodos empleados, usando como técnica de referencia el ELISA. Según los Cuadros 6 y 7, las pruebas de Machiavello y Gímenes dieron una baja sensibilidad, pero alta especificidad.

SENSIBILIDAD TEORICA:

T. Machiavello \leq T. Gímenes \leq T. Inmunofluorescencia \leq ELISA

CUADRO 6

Análisis de Sensibilidad y Especificidad considerando como método de referencia el ELISA y método de diagnóstico T.de Machiavello.

ELISA

TEC.			
M A C H I A V E L L O	+ E	- E	Total
+	8	2	10
-	55	249	304
Total	63	251	314

$$S = \frac{a}{a + c} \quad S = \frac{8}{8 + 55} = 12.6\%$$

$$E = \frac{d}{b + d} \quad E = \frac{249}{2 + 249} = 99.2\%$$

CUADRO 7

Análisis de Sensibilidad y Especificidad considerando como método de referencia el ELISA y método de diagnóstico T. de Gímenez.

ELISA

TEC. G I M E N E Z	+ E		- E		Total	
	+	3	1	4		
-	60	250	310			
Total	63	251	314			

$$S = \frac{a}{a + c} \quad S = \frac{3}{3 + 60} = 4.7 \%$$

$$E = \frac{d}{b + d} \quad E = \frac{250}{1 + 250} = 99.6 \%$$

En el cuadro 8, se describe la sensibilidad y especificidad para la prueba de Inmunofluorescencia, resultando que es de más alta sensibilidad que las pruebas con colorantes ordinarios.

CUADRO B

Análisis de Sensibilidad y Especificidad considerando como método de referencia el ELISA y método de diagnóstico T. de Inmunofluorescencia.

ELISA

TEC.
I
N
M
U
N
O
F
L
U
O
R
E
S
C
E
N
C
I
A

	+ E	- E	Total
+	15	6	21
-	48	245	293
Total	63	251	314
S =	$\frac{a}{a + c}$	S = $\frac{15}{15 + 6}$	= 23.8%
E =	$\frac{d}{b + d}$	E = $\frac{245}{6 + 245}$	= 97.6%

Al analizar a las mujeres embarazadas, no embarazadas y hombres clínicamente sanos, de acuerdo a la identificación positiva de Clamidias se obtuvieron los siguientes resultados. La incidencia de Clamidias positivas en las 262 muestras de exudados vaginales; correspondientes a 162 mujeres embarazadas y 100 a mujeres no embarazadas fue de 18.7% (CUADRO 9) La incidencia de C. trachomatis positivas en 52 muestras de exudados uretrales tomadas al azar, de hombres clínicamente sanos fue de un 26.9% (CUADRO 10).

A continuación estudiamos la coincidencia de otros gérmenes con las clamidias positivas. En el CUADRO 11 se muestra la incidencia de C. trachomatis positivas, en 63 muestras de exudados urogenitales asociada a otros microorganismos patógenos los agentes que se registraron con mayor frecuencia fueron: Streptococcus sp. grupo D-Enterococo (41.2 %), Staphylococcus aureus (28.5%), Escherichia coli (17.4%), Candida albicans (14.2%), Streptococcus Beta hemolíticos grupo B (6.3%) Proteus mirabilis (4.7%), Gardnerella vaginalis (3.1%), Klebsiella pneumoniae (3.1%).

En el CUADRO 12, se expone la incidencia de aislamiento de microorganismos en 251 muestras de exudados urogenitales, - en los que no se detectó C. trachomatis, encontrándose en - el siguiente orden: Staphylococcus aureus (25.4%), Streptococcus sp. grupo D, Enterococo (21.9%), Escherichia coli -- (20.7%), Candida albicans (19.5%), Proteus sp. (5.5%), Klebsiella pneumoniae (4.7%), Gardnerella vaginalis (3.9%), Streptococcus Beta hemolítico grupo B (1.9%), Pseudomonas sp. -- (1.5%).

CUADRO 9

Incidencia de *C. trachomatis* en 262 muestras de exudados vaginales, de pacientes con problemas de vaginitis (mujeres embarazadas y no embarazadas)

NO. de muestras = 262	Clamidias (+) = 49
262	- 100%
49	- X
	X = 18.7 %

CUADRO 10

Incidencia de *C. trachomatis* en 52 muestras de exudados uretrales en sujetos clínicamente asintomáticos.

No. de muestras = 52 Clamidas (+) = 14

52 - 100 %

14 - X

X = 26.9 %

CUADRO 11

Frecuencia de C. trachomatis positivos en 63 muestras de exudados urogenitales, asociada a otros microorganismos.

Microorganismos	Núm de muestras	%
<u>Streptococcus</u> sp. grupo <u>D-Enterococo</u>	26	41.2
<u>Staphylococcus aureus</u>	18	28.5
<u>Escherichia coli</u>	11	17.4
<u>Candida albicans</u>	9	14.2
<u>Streptococcus</u> <u>Beta hemolíticos grupo B</u>	4	6.3
<u>Proteus mirabilia</u>	3	4.7
<u>Gardnerella vaginalis</u>	2	3.1
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2	3.1

CUADRO 12

Incidencia de otros microorganismos en 251 muestras de exudados urogenitales, en los que no se diagnosticó C. trachomatis

Microorganismos	No. de muestras	%
<u>Staphylococcus aureus</u>	64	25.4
<u>Streptococcus sp. grupo D-Enterococo</u>	55	21.9
<u>Escherichia coli</u>	52	20.7
<u>Candida albicans</u>	49	19.5
<u>Proteus sp.</u>	14	5.5
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	12	4.7
<u>Gardnerella vaginalis</u>	10	3.9
<u>Streptococcus Beta hemolíticos grupo B</u>	5	1.9
<u>Pseudomonas sp.</u>	4	1.5

Finalmente una vez obtenidos los porcentajes de positividad para cada prueba se procedió a comparar si los grupos estudiados diferían significativamente aplicando una prueba de hipótesis de dos proporciones poblacionales. (22a)

Encontramos que las mujeres embarazadas comparadas con las no embarazadas tenían una diferencia estadística ($P < 0.01$) al ser estudiadas por la Técnica de Machiavello. Esta diferencia no se observó ($P < 0.06$) al realizar la misma comparación con la prueba de Inmunofluorescencia directa.

En cambio con el ELISA tal diferencia se acrecentó ($P < 0.04$). Ésto indica que la prueba ELISA permite establecer una diferencia entre grupos positivos y negativos para clamidias, en mayor proporción que las pruebas convencionales.

DISCUSION

Las infecciones genitales por clamidias son altamente prevalentes. No puede dudarse que este padecimiento se transmite por las relaciones sexuales y si bien en los años anteriores las infecciones por clamidia no era identificadas tan frecuentemente como la Neisseria gonorrhoeae, actualmente puede decirse que es una de las enfermedades venéreas más importantes. En general esta infección es transmitida en relaciones heterosexuales y con mucho menos frecuencia en la relación sexual entre varones homosexuales. Actualmente se reconoce que C. trachomatis es responsable del 40 al 50% de los casos de Uretritis no gonocócica (UNG) en los hombres y que en las mujeres puede estar presente aún en pacientes asintomáticas. Además este germen puede persistir y manifestarse como una infección crónica durante años. Este tipo de infecciones permanecen potencialmente infecciosos hasta que el paciente es tratado. Por otra parte existe una posibilidad del 50% de que una mujer embarazada con una infección genital por C. trachomatis la trasmite al producto, produciéndoles conjuntivitis y la mitad de los niños con estas infecciones oculares pueden desarrollar neumonía u otras enfermedades generalizadas.

La infección por clamidia puede diseminarse desde las áreas infectadas inicialmente y producir complicaciones entre las cuales las más importantes son la epididimitis y la salpingitis. (66)

El establecimiento del perfil para los pacientes con riesgo elevado de tener una infección genital causada por C. trachomatis, puede basarse en múltiples criterios: la edad, - el número de compañeros sexuales, el estado socioeconómico y las preferencias sexuales. Además de estos datos y el -- examen clínico, se debe establecer con certeza el agente - causal de la infección, para lo cual se requiere de exáme-- nes de laboratorio. (69)

En el presente estudio se compararon diferentes métodos, con el objeto de evaluar el método de diagnóstico idóneo para - identificar C. trachomatis. Las técnicas que se analizaron fueron tinciones con colorantes comunes (Gimenez y Machiavello), tinción con Inmunofluorescencia y ELISA, cuyas características generales se discuten a continuación. Las pruebas de Gimenez y Machiavello tienen como ventajas la simpli-- cidad del proceso, particularmente porque se usa el micros-- copio de luz y son de bajo costo. La desventaja es la po-- bre sensibilidad, por lo que esta citología es de escaso va

lor como ayuda diagnóstica en las infecciones genitales por clamidias.

La tinción de fluorescencia con Ac. monoclonales nos dan una mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas anteriores; además de que es una técnica rápida y el manejo, transporte y almacenamiento de los reactivos es fácil. Entre sus desventajas podemos considerar el uso de un microscopio de fluorescencia, así como su costo elevado.

La prueba de ELISA es la más sensible y fue la que nos dió un mayor porcentaje de positividad en los tres grupos de población estudiadas y por ello se seleccionó como el método de referencia, para compararla con las restantes.

Las ventajas del ELISA son: mayor sensibilidad y especificidad que las anteriores, posibilidad de manejo de un número grande de muestras, facilidad en el transporte y almacenamiento de las muestras y obtención de los resultados en aproximadamente 6 horas. Los problemas de esta prueba son la imposibilidad de corroborar lo adecuado de la muestra, su costo elevado y además el uso de implementos como el dispensador de perlas y el sistema de lavado "pentawash" no siempre accesible en un laboratorio clínico.

Los resultados que se obtuvieron por las pruebas de Gímenez y Machiavello mostraron una menor sensibilidad y una alta especificidad como observamos en los cuadros 6 y 7.

Le siguió en orden de importancia la tinción de Inmunofluorescencia de mayor magnitud que los dos anteriores con alta sensibilidad y especificidad.

En estudios previos se han establecido diferentes resultados a los nuestros. Lefebvre (31) ha reportado una sensibilidad respectiva de tinción de Inmunofluorescencia y ELISA de 81 y 78.4 % y una especificidad respectiva de 97.7 y 96.8 % usando como referencia al Cultivo Celular, lo que explica las diferencias respecto al presente trabajo. (22, 27, 53, 65)

En lo que respecta a las poblaciones de mujeres embarazadas y no embarazadas el ELISA nos dió un mayor porcentaje de positividad en comparación con la tinción de Inmunofluorescencia. Smith (55), ha reportado alta sensibilidad con tinción de Inmunofluorescencia y ELISA para mujeres embarazadas (84.6 y 85.7%) que para mujeres no embarazadas (65.5 y 60 %), mientras que la especificidad de ambos métodos fué --cerca del 95% . Nuestros resultados presentaron la misma --tendencia que los trabajos referidos aunque el porcentaje fué menor.

Stamm y otros investigadores compararon la tinción de Inmunofluorescencia con Cultivo Celular obteniendo una alta sensibilidad y especificidad, (11, 14, 26, 31, 32, 33, 47, 48, 62). En conjunto estos estudios muestran una alta sensibilidad al usar como referencia al Cultivo Celular y una alta especificidad, que supera el 96 %, lo cual es comparable al 97.6 % obtenido en el presente trabajo.

Con respecto a la asociación con otros microorganismos se puede decir que la infección de clamidias en las 3 poblaciones - se vió relacionada con la presencia de una gran diversidad de gérmenes como: Streptococcus sp. grupo D-Enterococo, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, Streptococcus Beta hemolítico grupo B, Proteus mirabilis, Gardnerella vaginalis, Klebsiella pneumoniae. En estudios previos se ha establecido que la asociación a microorganismos no es determinante para que ocurran las infecciones por clamidias (43,51,56), pero su presencia puede dar pruebas falsas positivas al emplear el ELISA, por la alta sensibilidad, detecta antígenos que cruzan con clamidia.

La justificación de realizar este estudio con tinciones tradicionales, fue comparar₂ pruebas de bajo costo de uso común -

en el laboratorio clínico. Con los métodos de tinción de Inmunofluorescencia y ELISA que requieren una mayor infraestructura de laboratorio, son realizados menos frecuentemente y son más caros, todo ello con el objeto de establecer su utilidad en poblaciones grandes de pacientes.

La tinción de Inmunofluorescencia fué ciertamente útil para detectar clamidia y superó en porcentaje los resultados obtenidos por Gimenez y Machiavello, lo cual es similar a la comparación de la tinción de Inmunofluorescencia con las técnicas de Giemsa, Iodo; obtenidos por otros autores (5, 11, 35), también Taylor y otros investigadores compararon la tinción de Inmunofluorescencia con tinciones de Giemsa, Iodo contra Cultivo Celular y han reportado una mayor sensibilidad y especificidad para la tinción de Inmunofluorescencia (57, 58, 60, 66, 71)

Las tinciones de Papanicolau no son suficientemente sensibles o específicas para usarlas rutinariamente en el escrutinio de infecciones por clamidias, (18, 29, 32). Sin embargo, las pacientes cuyos papanicolaus muestren ciertos cambios inflamatorios deben someterse a una prueba diagnóstica más específica para clamidia.

Tradicionalmente en el laboratorio se han empleado las prue-

bas de Gimenez y Machiavello. Más recientemente se ha empleado la tinción de Inmunofluorescencia directa, que en particular ha mostrado gran utilidad en infecciones oculares y pulmonares apreciando un notable incremento de la identidad de este germen (12, 15, 36, 47, 50, 60), ésto obedece a una alta sensibilidad por el uso del principio I. F. y Ac. monoclonales.

En años recientes el ELISA ha desplazado a la tinción de Inmunofluorescencia debido a las ventajas que se han enumerado anteriormente y la gran aplicación para las determinaciones tanto del Ag. como del Ac.

La prueba de Inmunofluorescencia también se ha aplicado para determinaciones tanto del Ag. como del Ac., pero su estandarización es más complicada debido a que la observación es -- subjetiva, además cuando la lámpara se va gastando (en horas uso) la fluorescencia baja y es necesario que el personal - tenga amplia experiencia lo que implica estar entrenando con tinuamente a dicho personal con la consiguiente inversión de tiempo.

Finalmente es importante señalar que recientemente se han -- aplicado otros métodos de detección de clamidias como: Electroforesis de poliacrilamida, análisis de restricción con en

donuclease e hibridización de DNA con fragmentos "TWAR" clonados al azar, así como tinciones de inmuno-oro, inmunofluorescencia para lipopolisacárido, inmunofluorescencia por Kalletad, cromatografía de gas líquido (CGL), cultivo celular contra T. fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP), cultivo en bazo y pulmón de ratones, cultivo en células HeLa y T. I. de bazo, hígado y pulmón de ratones, (4, 6, 7, 8, 16, 35, 62, 63, 70, 72).

Actualmente no ha sido posible elaborar una vacuna efectiva para infecciones clamidiales y a la fecha ciertas investigaciones se orientan al aspecto terapéutico y preventivo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se logró establecer que el ELISA fue el método idóneo, para la identificación de C. trachomatis, ya que sensibilidad y especificidad son altas.
- La prueba de Inmunofluorescencia directa le siguió en sensibilidad y especificidad.
- La incidencia de C. trachomatis en pacientes con vaginitis fue menor en mujeres embarazadas respecto al total de la población estudiada
- La incidencia de C. trachomatis en los hombres clínicamente asintomáticos fué muy semejante a la del grupo de mujeres no embarazadas con sintomatología vaginal.
- La asociación de C. trachomatis con otros microorganismos fué frecuente con los siguientes gérmenes: Streptococcus sp grupo D-Enterococo, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, Streptococcus Beta hemolítico grupo B, -- Proteus mirabilis, Gardnerella vaginalis y Klebsiella pneumoniae.
- Otras infecciones independientes de C. trachomatis tuvieron como etiología: Staphylococcus aureus, Streptococcus sp. -- grupo D-Enterococo, Candida albicans, Proteus sp. Klebsie-

lla pneumoniae, Gardnerella vaginalis, Streptococcus Beta hemolítico grupo B, Pseudomonas sp.

- Además de establecer el método idóneo para identificar C. trachomatis, se encontró que el agente causal más frecuente asociado con esta infección fué el Streptococcus sp grupo D. Enterococo.
- La determinación de C. trachomatis debe realizarse como una prueba de rutina en los exudados vaginales y uretrales, por su alta frecuencia en la población general.
- Queda por definir si nuestros resultados coinciden con otros datos epidemiológicos en otras poblaciones que presenten infecciones por C. trachomatis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bailey G. J. J., Heppleston C. and Richmon J. S.: Comparison of the In Vitro Activities of Ofloxacin and Tetracycline Against Chlamydia trachomatis as Assessed by Indirect Immunofluorescence.
Ant. Agents and Chemother. 26, 1: 13-16 July 1984
- 2.- Becker Y.: The Chlamydia: molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryocytes.
Microbiol. Rev. 42: 274 - 306 1978
- 3.- Benes S. McCormack M. W.: Inhibition of Growth of Chlamydia trachomatis by Nonoxynol 9 In Vitro.
Ant. Agents and Chemother. 27, 5: 724 - 726 May 1985
- 4.- Birkelund S., Lundemoose G. A. and Christansen G.: Chemical Cross-Linking of Chlamydia trachomatis.
Inf. and Imm. 56, 3: 654 - 659 Mar. 1988
- 5.- Bump C. R.: Chlamydia trachomatis as a Cause of Prepubertal Vaginitis.
Obstet. Gynecol. 65, 3: 384 - 388 Mar. 1985
- 6.- Campbell L. A., Kuo Ch. Ch. and Grayston J. T.: Characterization of the New Chlamydia Agent, TWAR, as a Unique Organism by Restriction Endonuclease Analysis and DNA DNA Hybridization.
J. Clin. Microb. 25, 10: 1911 - 1916 Oct. 1987

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 7.- Chou K Ch., and Chi Y. E.: Ultrastructural Study of -
Chlamydia trachomatis Surface Antigens by Immunogold
Staining with Monoclonal Antibodies.
Inf. and Imm. 55, 5: 1324 - 1328 May 1987
- 8.- Cles D. L., Bruch K. and Stamm E. W.: Staining Characteristic of Six Commercially Available Monoclonal Immunofluorescence Reagents for Direct Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections.
J. Clin. Microb. 26, 9: 1735 - 1737 Sept. 1988
- 9.- Collier L. H., Duke-Elder, S. and Jones B. R.: Experimental trachoma produced by cultured virus.
Brit. J. Ophthalmol. 42: 705-720 1958
- 10.- Collier L. H. and Sowa J.: Isolation of trachoma virus embryonate eggs.
Lancet. 1: 993 - 996 1958
- 11.- Coudron E. P., Federico P. D., Dawson S. M., Kaplowitz G. L., Brookman R. R., Dalton P. H., and Dabis A. B.: Detection of Chlamydia trachomatis in Genital Specimens by the Microtrak Direct Specimen Test.
Am. J. Clin. Pathol. 85, 1: 89 - 92 March 1985
- 12.- Dawson R. Ch., Schachter J.: Sexually Transmitted Chlamydial Eye Infections Are Not Trachoma.
JAMA 239, 17: 1790 - 1791. April 1978.

- 13.- Dwyer, R.St.J., Treharne, J.K., Jones B.R., Herring J.,
Results of micro-Immunofluorescence tests for the detec-
tion of type specific antibody in certain chlamydial in-
fections.
British J. Venr.Dis. 48:452-459 1972
- 13a- Engvall, E., and Perlmann, P.:Enzyme-linked immunosorbent
assay (ELISA) Quantitative assay of IgG.
Immunochemistry. 8:871-874 1971.
- 13b- Erwin Kreyszig. Introducción a la estadística matemática.
Principios y Métodos. Pruebas de Hipótesis, Capítulos 11,
12, 13. Editorial Limusa 1979.
- 14.- Forbes A.B., Bartholoma N., McMillan J., Roefaro N.M.,
Weiner L., and Welych L.:Evaluation of a Monoclonal Anti-
body Test to Detect Chlamydia in Cervical and Urethral
Specimens.
J.Clin.Microb. 23.6:1135-1137 June 1986.
- 15.- Gerber A.M., Ryan W.R., Tilton C.R., and Watson E.J.:
Role of Chlamydia trachomatis in Acute Pharyngitis in -
Young Adults.
J.Clin.Microb. 20,5: 993-994. Nov. 1984.

- 16.- Gravett G. M., Preston H. N., Roven T., Cristchlow C., Eschenback A. D., Holmes K. K.: Independent Association of Bacterial Vaginosis and Chlamydia trachomatis Infection with Adverse Pregnancy outcome.
JAMA. 256, 14: 1899 - 1903 Oct. 1986
- 17.- Greemberg B. S., Harris D., Giles P., Martin R. R. and Wallace J. R.: Inhibition of Chlamydia trachomatis Growth In McCoy, HeLa, and Human Prostate Cells by Zinc. Ant. Agents and Chemother. 27, 6: 953 - 957 June 1985
- 18.- Gupta K. P., Lee F. E., Erozan S. Y., Frost K. J., Geddies T. S., Donovan A. P.: Cytologic Investigations in Chlamydia Infection.
Acta Cytologia. 23, 4: 315 - 320 July-August 1979
- 19.- Hammerschlag R. M.: Infecciones por Clamídias.
Pediatrics in Review American Academic of Pediatric.
Vol. 1 No. 3 Año 1.
- 20.- Hanssen W. P., Westrom L., and Mardh P. A.: Perihepatitis and Chlamydial Salpingitis.
Obstet Gynecol. Lancet 1, 901: 44 - 45 1980
- 21.- Harper I. A., Dwyer R. St. C., Garland J. A., Jones B. R., Treharne J. D., Dunlop E. M. C., Freedman A. and Race J. W.: Infection by Bedsoniae and the possibility

- of spurious isolation: I cross infection of eggs during culture. Am. J. Ophthalmol. 63, 1064 - 1073 1967
- 22.-Howard V. L., Coleman F. P., England J. B., and Herrmann E. J.: Evaluation of Chlamydiazyme for the Detection of Genital Infections Caused by Chlamydia trachomatis. J. Clin. Microb. 23, 2: 329 - 332 Feb. 1986
- 22a-Ignacio Mendez Ramírez
EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION
Lineamientos para su elaboración y análisis.
Diseño estadístico Pág. 111 - 187
- 23- James P. S. Graeff S. A., Zeitz M., Kappus E., and -- Quinn C. T.: Cytotoxic and Immunoregulatory Function of Intestinal Lymphocytes in Chlamydia trachomatis Proctitis of NonHuman Primates.
Inf. and Imm. 55, 5: 1137 - 1143 May 1987
- 24- Jones B. R., Collier L. H. and Smith C. H.: Isolation of virus from inclusion blennorrhoea.
Lancet 1, 902 - 905 1959
- 25- Jones B. R., Ardery R. B., Hui L. S., and Cleary E. R.: Correlation between Serum Antichlamydial Antibodies and Tubal Factor as a Cause of Infertility
Fertil Steril 38, 553: 175 - 176 1982

- 26.- Jones B.R., Bruins C.S., and Newhall J.W.: Comparison of Reticulate and Elementary Body Antigens in Detection of Antibodies Against Chlamydia trachomatis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
J.Clin.Microb. 466-467 Mar. 1983
- 27.- Jones F.M., Smith F.T., Houghlum J.A., and Herkmann E.J.: Detection of Chlamydia trachomatis in Genital Specimens by the Chlamydiazyme Test.
J.Clin.Microb. 20,3:465-467 Sept. 1984
- 28.- Kelly P.J., Reynolds B.R., Stagno S., Louv C.W., and Alexander J.W.: In Vitro Activity of the Spermicide Nonoxynol-9 Against Chlamydia trachomatis
Ant.Agents and Chemother 27:760-762 May 1985
- 29.- Kiviat B.N., Paavonen A.J., Brockway J., Critchlaw W.C., Brunham C.R., Stevens E.Cl., Stamm E.W., Kuo Ch. DeRoven T., Holmes K.K.: Cytologic Manifestations of Cervical and Vaginal Infections. (Epithelial and Inflammatory Cellular Changes)
JAMA 253, 7:989-996 Feb. 1985.
- 30.- Koussa M.: Evidence of Chlamydial involvement in the development of Arthritis.
J.Inf.Dis. (suppl) 32: 116-121. 1982.

- 31.- Lefebvre J., Laperriere H., Rousseau H., and Massé R.:
Comparison of three Techniques for Detection of Chlamy-
dia trachomatis in Endocervical Specimens from Asymptomatic Women.
J. Clin. Microb. 26, 4: 726 - 731 Apr. 1988
- 32.-Lindner E. L., Geerling S., Nettum A. J., Miller L. S.
Altman H. K., and Wechter R. S.: Identification of Chlamydia in Cervical Smears by Immunofluorescence: Technic, Sensitivity, and Specificity.
Am. J. Clin. Pathol. 85, 2: 180 - 185 Feb. 1986
- 33.-Lipkin S. E., Moncada V. J., Shafer A. M., Wilson E. T.
and Schachter J.: Comparison of Monoclonal Antibody Staining and Culture in Diagnosing Cervical Chlamydial Infection. J. Clin. Microb. 23, 1: 114 - 117 Jan. 1986.
- 34.-Lombard M., Precausta P., Tixier G., and Chomel B.: The application of the ELISA Technique to the serology of Chlamydiosis in goats: statistical evaluation on a method.
J. Biolog. Standardization 15, 293 -304 July 1986
- 35.-Mahony B. J., Sellors J., and Chernesky A. M.: Detection of Chlamydial Inclusions in Cell Culture or Biopsy Tissue by Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase Staining.

- J.Clin.Microb. 25,10:1864-1867 Oct. 1987.
- 36.- Moncada V.J., Schachter J., and Wofsy C.:Prevalence of Chlamydia trachomatis Lung Infection in Patients with Acquired Immune-Deficiency Syndrome.
J.Clin.Microb. 23,5:986 May 1986.
- 37.- Moulder W.J.: The psittacosis group as bacteria:
Ciba lectures in Microbiology and Biochemistry. New York 1964.
- 38.- Moulder W.J.: The relation of the psittacosis group (Chlamydia) to bacteria and viruses.
Annual Review of Microb. 20, 107-130 1966.
- 39.- Moulder W.J.:ORDER II. CHLAMYDIALES., FAMILY I CHLAMYDIACEAE.
MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY BERGEY'S. 9a. ED., BALTIMORES: 729-739. 1984.
- 39a- Munday, P.E., Johnson L.P., Thomas B.J. and Taylor-Robinson, D: A comparison of the sensitivity of the immunofluorescence and Giemsa for staining Chlamydia trachomatis inclusions in cycloheximide treated McCoy cell.
J.Clin.Path.33, 177-179 1980.
- 40.- Muyltjens L.H., and Heessen A.W.F.:In Vitro Activities of Thirteen β -Lactam Antibiotics Against Chlamydia trachomatis.

Ant. Agents and Chemother. 22,3:520-521 Sept. 1982

- 41.- Nichol L. R., and Blith A. W.: Chlamydia.

TRATADO DE MICROBIOLOGIA; Davis D.B., Dulbecco R., Eisen
N.H., Ginsberg S.H., Wood B.W.

2a. Ed. Editorial Salvat 39, 937 1978.

- 42.- Oriol J. D., and Ridway G.L.

GENITAL INFECTION BY CHLAMYDIA TRACHOMATIS.

Editorial Cientifica PLM, S.A. de C.V. México, D.F. 1985.

- 43.- Oriol J. D., Hohnson A. L. Barlon, D. Thomas B.J., Naygar K.

and Reeve P.: Infection of the uterine cervix with Chlamy
dia trachomatis.

J. Inf. Dis. 137, 443-451 1978.

- 44.- Page L. A.: Revision of the family Chlamydiaceae (RAKE)

Int. J. Systematic Bacteriol. 16, 223-252 1966

- 45.- Page L. A.: Proposal for the recognition of two species
in the genus Chlamydia.

Int. J. Systematic Bacteriol. 18, 51-66 1968

- 46.- Page L. A.: Obligately intracellular bacteria: The genus

Chlamydia. EN: Starr M.P., Stolp H., Gtruper, Belows A.

Schlegel, (Eds). The Prokaryotes. USA: Springer-Verlang
Barlin Heidelberg, 2210-2222 1981.

- 47.- Paisley W.J., Lauer A.B., Melinkovick P., Gitterman A.B., Feiten J.D., Berman S.: Rapid diagnosis of Chlamydia trachomatis pneumonia in infants by direct immunofluorescence microscopy of nasopharyngeal secretions.
J.Pediatrics. 109, 4:653-655 Oct. 1986
- 48.- Pouletty P., Martin J., Catalan F., Garcia G.M., Morellet I., Bettinger S., and Kadoche J.: Optimization of a Rapid Test by Using Fluorescein-Conjugate Monoclonal Antibodies for Detection of Chlamydia trachomatis in Clinical Specimens.
J.Clin.Microb. 26,2:267-270 Feb. 1988.
- 49.- Puolakkainen M., Vesterinen E., Purola E., Saikku P., and Paavonen J.: Persistence of Chlamydial Antibodies after - Pelvic Inflammatory Disease.
J.Clin.Microb. 23,5:924-928 May 1986.
- 50.- Rapoza A.P., Quinn C.T., Kiessling L.A., Taylor R.H.: Epidemiology of Neonatal Conjunctivitis.
Ophthalmol. 93,4:456-460 April 1986.
- 51.- Robinson-Taylor:, Thomas J.B., Osborn F.M.: Evaluation of enzyme immunoassay (Chlamydiazyme) for detecting Chlamydia trachomatis in genital tract-specimens.
J.Clin.Pathol. 40: 194-199 1987.
- 51a-Sawicki L.:Laboratory methods for the Chlamydia.

Lab. Management. 18: 42 - 47 1980.

- 52.- Schachter J.: Chlamydiae (Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma Group)

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY: Lennette H. E., Bawls. E., William J. H. Jr., Shadomy H. J.

8th Edition Chapter 85: 856 - 862 1985

- 52a.- Schachter J., and Dawson C. R.: Comparative efficiency of various diagnostic methods for chlamydial infection, in Hobson D and Holmes KK (eds); Nongonococcal Urethritis and Related Infections.

American Society for Microb. 337 - 341 1977

- 53.- Schachter J., and Martin H. D.: Failure of Multiple Passages To Increase Chlamydial Recovery.

J. Clin. Microb. 25, 10: 1851 - 1853 Oct. 1987

- 54.- Schuch J. R., Musich R. J., and Nelson I. R.: Chlamydial Proctitis Unusual Presentation As A Symptomatic Vaginal Mass.

Obstetric & Gynecology. 63, 1: 132 - 134 Jan. 1984

- 55.- Smith W. J., Rogers E. R., Katz P. B., Brickler F. J., Lineback L. P., Van Der Pol B., and Jones B. R.: Diagnosis of Chlamydial Infection in Women Attending Ante-

natal and Gynecologic Clinics.

J. Clin. Microb. 25, 5: 868 - 872 May. 1987

- 56.- Smith F. T., Weed A. L., Segura W. J., Pettersen R. C.,
Washington A. J.: Isolation of Chlamydia From Patients
With Urethritis.

Mayo Clin. Proc. 50, 105 - 109 Mar. 1975

- 57.- Stamm E. W., Tam M., Koester M., and Cies L.: Detection
of Chlamydia trachomatis Inclusions in McCoy Cell Cul-
tures with Fluorescein-Conjugated Monoclonal Antibodies.
J. Clin. Microb. 17, 4: 666 - 668 Apr. 1983

- 58.- Stephens S. R., Kuo CH. CH., and Tam R. M.: Sensitivity
of Immunofluorescence with Monoclonal Antibodies for De-
tection of Chlamydia trachomatis Inclusions in Cell Cul-
ture.

J. Clin. Microb. 16, 1: 4 - 7 July 1982

- 59.- Swett L. R., Blankfort-Doyle M., Robbie O. M., Schacter
J.: The Occurrence of Chlamydial and Gonococcal Salpin-
gitis During The Mestrual Cycle.

JAMA. 225, 15, 2062 - 2064 April 1986

- 59a.- Tam M.: Direct slide assay for Chlamydia trachomatis with fluorescein-labeled monoclonal antibody. (abstract) Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microb. 335 1983
- 60.- Taylor R. H., Agarwala N., and Johnson L. S.: Detection of Experimental Chlamydia trachomatis Eye Infection in Conjunctival Smears and in Tissue Culture by Use of Fluorescein-Conjugated Monoclonal Antibody. J. Clin. Microb. 20, 3: 391 - 395 Sept. 1984
- 60a.- Thomas B. J.: Early detection of chlamydial inclusions combining the use of cycloheximide-treated -- McCoy cells and immunofluorescence staining. J. Clin. Microb. 6: 285 - 292 1977.
- 61.- Thygeson P., and Mergert W. F.: The Virus of inclusion Conjunctivitis Further observations. Archives of Ophthalmol. 15, 377 - 410 1936
- 62.- Tilton C. R., Judson N. F., Barnes C. R., Gruninger P. T., Ryan R., and Steingrimason O.: Multicenter Comparative Evaluation of two Rapid Microscopic Methods and Culture for Detection of Chlamydia trachomatis in Patient Specimens. J. Clin. Microb. 26, 2: 167 - 170 Feb. 1988

- 63.- Timms P., Eaves W. F., Girjes A. A., Lavin F. M.:
Comparison of Chlamydia psittaci Isolates by Restriction Endonuclease and DNA Probe Analyses.
Inf and Imm. 56, 1: 287 - 290 Jan 1988
- 64.- Tjiam H. K., van Heijst M. Y. B., van Zuuren A., Wagen voort T. H. J., van Joost T., Stolz E., and Michel F. M.: Evaluation of an Enzyme Immunoassay for the - -
Diagnosis of Chlamydial Infections in Urogenital-Specimens.
J. Clin. Microb. 23, 4: 752 - 754 April 1986
- 65.- Tjiam H. K.: Letter to the Editor: Cell Culture
versus IDEIA for Detection of Chlamydia trachomatis.
J. Clin. Microb. 25, 2032 - 2034 1987
- 66.- Uyeda T. Ch., Weidorn P., Ellison-Birang N., Shunk K., and Tsaouse B.: Rapid Diagnosis of Chlamydial
Infections with the MicroTrak Direct Test.
J. Clin. Microb. 20, 5: 948 - 950 Nov. 1984
- 67.- Wang S. P.: A micro-Immunofluorescence method Study
of Antibody response to TRIC organisms in mice. IN:
Trachoma and related disorders caused by Chlamydial
agents.
Edited by Nichol R. L., Excerpta Medica, Amsterdam

- 273 288. 1971
- 68.- Wiss E., Myers W. F., Dressler H. R., and Chun-Hoon H.:
Glucose metabolism by agents of the Psittaci-Trachoma-
group. Vir. 22, 551 - 562 1964
- 69.- Wiesmeir E., Lovett A. M., and Forsythe B. A.: Chlamydia
trachomatis Isolation in a Symptomatic University Stu-
dent Population.
Obstetrics & Gynecology. 63, 1: 81 - 83 Jan. 1984
- 70.- Williams M. D., Schachter J., and Grubbs B.: Role of
Natural Killer Cells in Infection with the Mouse Pneu-
monitis Agent (Murine Chlamydia trachomatis).
Inf. and Imm. 55, 1: 223 - 226 Jan 1987
- 71.- Yong T. C. D., and Paul R. N.: Micro Direct Inoculation
Method for the Isolation and Identification of Chlamydia
trachomatis.
J. Clin. Microb. 23, 3: 536 - 638 Mar. 1986
- 72.- Zhong G., Peterson M. E., Czarnieckj W. Ch., and De La
Maza M. L.: Recombinant Murine Gamma Interferon Inhibits
Chlamydia trachomatis Serovar L1 In Vivo.
Inf. and Imm. 56, 1: 283 - 286 Jan. 1988