

11234
6
EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

E INVESTIGACION

HOSPITAL REGIONAL 20 DE NOVIEMBRE

I. S. S. S. T. E.

FACULTAD DE MEDICINA

MAYO 19 1993

SECRETARIA DE SERVICIOS
DEPARTAMENTO DE POSGRADO

**ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS DE
LABORATORIO PARA LA DETECCION DE LA
CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN LA
CONJUNTIVITIS FOLICULAR**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

E S P E C I A L I S T A E N :

O F T A L M O L O G I A

P R E S E N T A :

DRA. MARIA AIDA GISELLE FABIOLA
 BERENICE CASTILLO TORRES



ISSSTE México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
OBJETIVO	2
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS.	8
DISCUSION	10
CONCLUSIONES	11
RESULTADOS	12
FIGURAS	13
BIBLIOGRAFIA	17

R E S U M E N

Se evaluó la sensibilidad y la especificidad del método de GIEMSA-ELISA, tomando como referencia el de Inmunofluorescencia para la detección de la Chlamydia trachomatis como agente causal de la conjuntivitis folicular crónica de acuerdo a los criterios de Mc. Callan.

Se encontró como hallazgo clínico principal el de foliculos conjuntivales a nivel del tarso superior (OD: 43.3% OI:47.5%) detectándose como casos positivos para el método de Giemsa 48.33%, positivos por ELISA 40%, positivos por Inmunofluorescencia 61.67%.

Se obtuvo una incidencia en cada 1000 pacientes por año con conjuntivitis detectada por Giemsa de 22, por ELISA de 18 y por Inmunofluorescencia de 28.

O B J E T I V O

Tratar de seleccionar un método de rutina de los ya establecidos --- (Giemsa, ELISA, Inmunofluorescencia) para la detección de la Chlamydia - trachomatis en la conjuntivitis folicular, para determinar la sensibilidad y la especificidad de cada uno de estos métodos.

I N T R Ó D U C C I O N

ESTRUCTURA DEL FOLICULO.

DEFINICION.- El folículo es una densa infiltración de linfocitos mononucleares localizados en el tejido subepitelial (1)

No existe una cápsula verdadera en los folículos iniciales, pero en la etapa avanzada del tracoma, una excesiva formación de tejido conectivo precede a los cambios cicatriziales. Mientras existe ausencia de vasos sanguíneos en los folículos iniciales, en la conjuntivitis folicular crónica, una malla vascular rodea a los mismos en forma de una delgada red, y cuyos vasos desaparecen en el centro del folículo.

GENERALIDADES.

Las CHLAMYDIACEAE son una familia de parásitos bacterianos intracelulares obligados (2)

Las Chlamydias producen infección en algunos mamíferos en forma de queratoconjuntivitis, cuyos estudios fueron realizados por Storz y colaboradores en 1950-1951 (3) demostrando también que ocasionaban poliartritis en el ganado vacuno.

También en 1950-1951 Storz y asociados concluyeron que el grupo --- Psitacosis, Lymphogranuloma Venereum, Trachoma (PL) utilizaban el tracto intestinal como un hábitat natural, y cuya infección se generalizaba --- atravesando la barrera líquido sinovial-sangre. (4)(5)(6)(7)

Los excelentes trabajos de Dickinson y Cooper (8) quienes notaron que las infecciones oculares pueden acompañarse de poliartritis en las ovejas.

De acuerdo a los estudios realizados por Philip en perros (9) que --- habían ingerido salmón o trucha infestada con Metacercaria desarrollaban fiebre, y se aisló de las heces de estos animales Troglotrema Salmonicola el cual a su vez estaba infestado por microorganismos del grupo PL, y --- concluyeron que el causante de la enfermedad en el perro en realidad era ocasionada por este último microorganismo, y el trematodo Troglotrema --- Salmonicola funciona como un huésped intermediario obligado en el ciclo de la enfermedad de los perros.

Algunos trabajos de los últimos 36 años han demostrado que los agentes PL parasitan a 130 especies de pajaros (10), y en conexión con algunas preguntas dentro de la epidemiología, por enfermedad en algunas aves y pavos, se descubrió que el excremento de estos últimos utilizado como fertilizante, el cual se mantenía a temperatura ambiente contenía agentes del grupo PL, y que varios artrópodos que habitaban en estos desechos orgánicos se llegaban a contaminar con dichos agentes PL. (3)

Tres especies de garrapatas, una suave (*Ornithodoros Coriaceus*) y dos duras (*Ixodes Pacificus* y *Dermacentor Occidentalis*) portan agentes PL (3)

Los cuerpos elementales y los cuerpos iniciales, se pueden distinguir a través del microscopio electrónico, existiendo transición de formas. Los cuerpos elementales son generalmente redondos o elípticos en su forma y -- con una medida de 200 a 300 m (11), los cuerpos iniciales son redondos -- ú ovales en su forma y su medida es superior a 800 m (12).

La *Chlamydia* utiliza mecanismos endocíticos para producir infección, -- los mecanismos de fagocitosis y de pinocitosis fueron sometidos a filtros -- y en el caso de la *Chlamydia T.* la fracción L2/434/bU y para la C. Psi -- ttaci la fracción GPIC, demostraron que las propiedades intrínsecas son -- importantes para ocasionar infección (13) al igual que los mecanismos --- endocíticos.

Se observan diferencias entre las *Chlamydias Psittaci*, *Pneumoniae*, y *trachomatis*, de acuerdo a las reacciones de las cadenas de polimerasas --- (PCR). Estas PCR contiene la región variable de los respectivos genes --- ricos en 60 kilodaltons de cisteína (60-KDa CrP) (14)

Las *chlamydias* son destruidas por los leucocitos polimorfonucleares -- humanos (HPMN), pero las paredes celulares persisten en la degradación --- induciendo la producción de radicales de oxígeno, los cuales pueden ser -- demostrados induciendo una cadena de DNA en las células blanco Hela. Esto puede indicar el mecanismo de la persistente infección por *chlamydia* con -- la interacción de los microorganismos fagocíticos (15).

Las *chlamydias* son bacterias intracelulares obligadas y son depen--- dientes de las células huésped eucarióticas para el ribonucleosido de trifosfato, pero no para el deoxyribonucleotido de trifosfato. La ribonucleo --- tido reductasa es la única enzima conocida para catalizar la conver--- sión directa de un ribonucleotido reductasa por inactivación del radical -- libre de tirosina presente en las pequeñas subunidades de las enzimas (16)

La concentración de los lípopolisacáridos (LPS) de las membranas de las chlamydias son constantes durante su desarrollo, pero las cuales pueden cambiar de la parte superficial de la célula a la parte sub-superficial de las mismas. Esto fué comprobado por microscopía inmunoelectrónica (17)

Estudios recientes pueden indicarnos que la Chlamydia trachomatis puede ser neutralizada por anticuerpos Fab Monovalentes específicos hacia la proteína mayor de la membrana externa (18). Estos hallazgos excluyen la agregación de la Chlamydia como un mecanismo de neutralización de anti MOMP y proporcionan evidencia adicional en el soporte de los MOMP como un mecanismo de adhesión a la chlamydia.

El código de DNA de la proteína mayor de la membrana externa de la Chlamydia trachomatis por medio del seguimiento de las secuencias de L3 y cuya amplificación se realizó por medio de la reacción de las cadenas de polimerasa, en comparación con un aminoácido (aa) y cuya secuencia mostró que el tipo L2 en comparación con el L3, que éste último tuvo tres extra (aa) y con 55 sustituciones de (aa) (19)

Se ha determinado que la mayor proteína de la membrana externa (MOMP) de la Chlamydia trachomatis es una glicoproteína, estudios basados en la susceptibilidad para la digestión de la glicosidasa y la presencia de carbohidratos etiquetados con radio (20)

Existen datos sugestivos de que los antígenos clase II de los complejos de histocompatibilidad pueden anteceder clínicamente a la enfermedad activa que conducen a los cambios de la cicatrización conjuntival y corneal en el trachoma, y ésta clase II persiste después de que cesa la enfermedad (21)

Los cuerpos elementales de las Chlamydias trachomatis (EBs) tienen una proteína de 38 KDa, que une selectivamente los cultivos de las monocapas de las células HeLa. Esta proteína es denominada cytoadhesina de chlamydia (CCA) y la cual se encuentra presente en la superficie de los EBs, de tres tipos de C. Trachomatis (B, E, y L1). Dichos hallazgos indican que la CCA es termolábil, ya que por medio del calentamiento la CCA pierde la habilidad de unirse a la célula huésped, en éste caso las células HeLa preincubadas con CCA y que contenían extractos de Chlamydia mostraron reducción de la habilidad para unirse a los EBs etiquetados y por

consiguiente para desarrollar inclusiones citoplasmáticas despues de la -- infección (22)

Las Chlamydias son parásitos intracelulares procarióticos obligados- que sufren un ciclo de vida bifásico comprometiendos procesos infecciosos,- las formas extracelulares conocidas como cuerpos elementales y las formas- de replicación llamadas cuerpos reticulares. Una proteína específica de -- los cuerpos elementales con una aparente masa molecular de 18 KDa, determi- nó la secuencia de la N-terminal de amino ácidos, así como los códigos de- genes de las clonas, presentan un alto contenido de lisina (29%), un homó- logo sememjante a la clase H1 de las histonas eukarióticas, así como un -- anticuerpo monoclonal análoga a la histona de la chlamydia, con la exposi- ción del inmunoblot y la especificidad antinuclear sugieren la reactividad cruzada para las histonas H1. Los genes se expresan sólo durante las eta- pas tardías del ciclo de vida de la chlamydia, con la reorganización de -- los cuerpos reticulares dentro de los cuerpos elementales, sugiriendo --- que las proteínas HCL juegan un papel en la condensación de la cromatina durante la diferenciación celular (23)

La reacción de las cadenas de polimerasa amplian una parte del genoma de la Chlamydia, así como los cuatro dominios variables de la proteína ma- yor de la membrana externa (MOMP) de los 15 serotipos de Chlamydia tracho- matis. La amplificación del DNA digerida con restricción de la endonu--- cleasa AluI y del MsPI y los resultados de los fragmentos se separan so- bre gel de polyacrilamida al 10%, y demuestran un total de 13 caracterfísti- cos patrones de los 15 serotipos (24)

Por medio de la recombinación de la Lambda gt11 de la chlamydia tra- chomatis de los serotipos L2 del DNA cromosómico a través de un 29 mer -- oligonucleotido sintético específico para la N-terminal del amino ácido -- de una proteína predominante la 18-1Da, y junto con la recombinación de -- una clona designada lambda gt11/L2/RKA10 e hibridizandolas, e insertando un 2,633bp; lo cual permite leer el armazon (ORF2), y en forma parcial -- otros dos ORFs (ORF1 y ORF3), deduciendo la secuencia de amino ácidos - del ORF2 con su N-terminal, así el 375-bp ORF es capaz de codificar una- proteína de 125 amino ácidos con una masa molecular de 13,689; la cual es- una secuencia compatible con el sitio de unión del ribosoma Dalgarno, -- unidos a los sitios del ribosoma se localizaron 9bp de la iniciación del -

codon, y la secuencia distal del ORF2 revela una terminación independiente así la proteína designada como CTH1, posee un PI de 10.71 debido a su gran contenido de lisina. Esta proteína básica no contiene triptofano, fenilalanina, y existe homogeneidad entre la CTH1 y la Histona H1 (25)

La recombinación del plásmido codificó ORF2 el cual expresó un gen de aproximadamente 18 KDa, semejante a la proteína nativa de la Chlamydia. Esta proteína parece representar una de las pocas proteínas parecidas a las histonas de las células eucarióticas y descritos también en los procariontes (25)

La secuencia de los nucleótidos de los segmentos variables (VS) 1, 2 y 4 para el mayor gen de la proteína de la membrana externa (omp) se determinaron serológicamente definiéndose los subtipos D', I', y L2. La amplificación asimétrica del DNA se utilizó para producir un solo DNA por secuencia directa. Las sustituciones de los aminoácidos fueron detectadas en VS1, VS2, y VS4 para I'; En VS2 para L2' y en VS4 para D'. La secuencia de las regiones variables omp pueden ser un método importante para la evaluación de la epidemiología molecular de la Chlamydia (26)

La secuencia del DNA reveló una estructura genética semejante al operon, codificando un 11-122 y una proteína 57, 956-Da. La traducción de la secuencia de los aminoácidos mostró un alto grado de homogeneidad con las secuencias conocidas para el HSP-60 de varias especies de bacterias, así como en las secuencias de los humanos y de las plantas. Usando las secuencias de los nucleótidos, los fragmentos de los genes que fueron clonados dentro del plásmido pGEX para la expresión como la fusión de las proteínas consistiendo de glutatión S-transferasa y las porciones peptídicas de la chlamydia HSP-60 de los antígenos identificados se confirmó por un inmunoblot con suero de conejo anti HSP-60, y el suero de los pacientes que fueron previamente protegidos y no reactivos para la chlamydia nativa HSP-60 pero que tuvieron títulos altos de antichlamydia. Los reconocidos epitopes HSP-60 pueden proporcionar una protección para aquellos pacientes con infecciones de Chlamydia t., que pueden desarrollar secuelas, y esto también es una herramienta para el estudio de los mecanismos inmunopatogénicos de las enfermedades inducidas por Chlamydia (27)

MATERIAL Y METODOS

MUESTRAS CLINICAS.- Se evaluaron 60 pacientes que presentaron conjuntivitis folicular, basados en la clasificación de Mc. Callan (28), de ambos sexos. Mayores de 15 años, a los cuales se les tomó una muestra con isopo para tinción con Inmunofluorescencia, (29) (30) previo a haber anestesiado localmente con clorhidrato de proparacaina al 5% en forma de gotas oftálmicas, de la conjuntiva tarsal superior e inferior extendiéndose en una laminilla que se fijó con methanol 0.5 ml, y otra muestra que se tomó con hoja de bisturí número 15 de la conjuntiva tarsal superior e inferior y dicha muestra se colocó en una laminilla la cual solo se sometio para valoración de Giemsa (31) (32). Se tomó una muestra de sangre para detectar la presencia de Acs. anti chlamydia en sangre por metodo de ELISA -- (33) (34) (35).

TECNICA DE TINCION PARA CHLAMYDIA SEGUN GIMENEZ.-

- 1.- Fijar con el color.
- 2.- Teñir con la solución de trabajo de Fuchsin por 1.5 min.
- 3.- Lavado con agua de la llave.
- 4.- Tinción con la solución verde de Malaquita por 6 o 9 min.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Las Chlamydias y los cuerpos de inclusión aparecen de color rojo en fondo verde, cuya presencia se consideró como positiva.

TECNICA DE LABORATORIO PARA LA DETECCION DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA.- Se realizó mediante la toma de la conjuntiva tarsal superior e inferior a través de un isopo y se colocó la muestra sobre de una laminilla, fijándose con metanol, y se le agregaron anticuerpos fluoroscenados que se incubaron a 35 grados C. durante 30 minutos al cabo de los cuales se colocó un cubre objetos y se examinó a 200 y 400 de poder por campo, con microscopio fluorescente, evaluándose la presencia o ausencia de los cuerpos elementales, cada laminilla fué examinada consi-

derandose como positivos por la presencia de cuerpos elementales y los --
cuales tenían un borde marcado en forma de disco verde fluorescente. (36)-
(37) (38).

TECNIA DE ELISA.- Se depositó 10 μ l del suero de cada paciente dentro --
del pozo ó compartimento A, colocando la tarjeta del inmunocomb desde el
compartimento A hasta el compartimento E.

En el compartimento A se llevó a cabo la reacción de Ag-Ac por espacio
de 10 minutos.

En el compartimento B se efectuó lavado por 2 minutos.

En el compartimento C dilución de Acs. Anti IgG conjugados con fosfatasa-
alcalina.

En el compartimento D y E lavado por dos minutos en cada uno.

En el compartimento F conteniendo nitro azul de tetrazolium (NBT) y 5-bro-
mo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

Se interpretaron como valores positivos los títulos arriba de 1:64 de ---
acuerdo a la lectura de la densidad del color de los spots obtenidos en la
tarjeta del inmunocomb (39) (40).

D I S C U S I O N

En el presente estudio se compararon diferentes métodos, con el objeto de evaluar un método más idóneo para la identificación de la *Chlamydia trachomatis*, la técnica de Giemsa tiene como ventaja su simplicidad del -- proceso, particularmente porque se utiliza un microscopio de luz y resulta de bajo costo, su desventaja es la pobre sensibilidad por lo que es de --- poco valor diagnóstico en la infección por *Chlamydia*.

Con los métodos de ELISA y de Inmunofluorescencia se requiere una ma yor infraestructura y resultan de mayor costo, pero son de gran utilidad para ser aplicados en poblaciones de pacientes que acuden al servicio-- de consulta externa.

De los 60 pacientes que se estudiaron se encontró que un 60% no ---- presentaban alteración .genitourinaria, y que seguramente la vía de ---- transmisión era debida a fomites, que bien pudieron ser el empleo de cos-- méticos, ú otras forma tópicas de contaminación.

C O N C L U S I O N E S

1.- Podemos decir que es de gran utilidad el utilizar como método de diagnóstico en la conjuntivitis folicular a la inmunofluorescencia, el cual es fácil de efectuar en su toma y en su procedimiento.

2.- De los pacientes que resultaron positivos por el método de inmunofluorescencia y cuya ELISA fué negativa, nos indicó que su transmisión fué por fomites.

3.- No todos los pacientes que presentaban conjuntivitis folicular tenían como agente causal a la Chlamydia trachomatis.

4.- Hacemos énfasis en que NO resulta de alto costo el procedimiento de Inmunofluorescencia, y que a pesar de tener presente que existe el factor de erro humano en la lectura del procedimiento, es un método muy accesible para realizarse en un laboratorio adecuado.

R E S U L T A D O S

Se evaluaron 60 pacientes de los cuales 32 correspondieron al sexo --femenino, con una edad media de 34.6 + - 10.3 y 28 del sexo masculino con una edad media de 31.6 + - 9.6 (Fig.1)

De los cuales se encontraron 37 pacientes positivos por inmunofluorescencia a Chlamydia trachomatis, y los cuales se consideraron nuestro grupo de referencia. En 23 pacientes la causa de la conjuntivitis fué --debida a otros agentes (Fig. 2)

Por Giemsa se detectaron 29 pacientes positivos, que correspondieron al 48.33%, por el método de ELISA 24 pacientes positivos (40%) y por el método de Inmunofluorescencia 37 pacientes (61.67%) (FIG 3)

Los hallazgos oftalmológicos más relevantes en la exploración ---- fueron: Secreción (OD:32.5% OI:34.17%), Hiperemia bulbar (OD:36.7%-OI:30%), folículos conjuntivales en el tarso superior (OD:43.3% OI:47.5%) folículos conjuntivales en el tarso inferior (OD:40.8% OI:33.3%), pannus--(OD:39.17% OI:35%) (Fig. 4)

La sensibilidad del método de Giemsa fué del 64.9% y la especificidad fué del 78.3% considerando como método de referencia al de Inmunofluorescencia.

La sensibilidad para el método de ELISA fué del 48.6% y la especificidad fue del 73.9% tambien considerando como método de referencia el de Inmunofluorescencia.

Se obtuvo una incidencia de los casos reportados en aproximadamente 1 000 pacientes por año que acuden con diagnostico de conjuntivitis y de estos que corresponden al tipo folicular de 22 para Giemsa, 18 por el método de ELISA y 28 por Inmunofluorescencia.

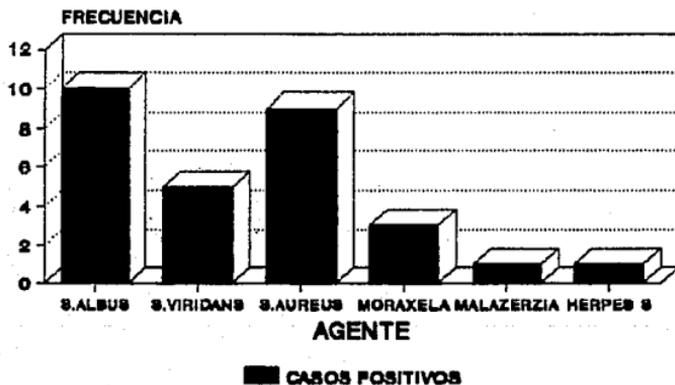
EQAD			SEX	
	I	F	M	Total
19	1	1	1	2
20	0	2	1	2
21	2	1	1	3
22	2	1	1	3
23	2	0	1	2
24	1	1	1	2
25	0	1	1	1
26	0	2	1	2
27	0	4	1	4
28	3	1	1	4
27	1	2	1	3
30	2	1	1	3
31	1	1	1	2
32	0	1	1	1
34	2	0	1	2
35	1	0	1	1
36	0	1	1	1
37	1	0	1	1
38	1	0	1	1
39	2	0	1	2
40	0	1	1	1
41	0	2	1	2
42	1	1	1	2
43	0	1	1	1
44	2	0	1	2
46	2	0	1	2
47	0	1	1	1
48	1	0	1	1
49	2	0	1	2
50	0	1	1	1
51	1	0	1	1
52	1	0	1	1
54	0	1	1	1
Total	I	32	28	60

SEX	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev	
F	32	1107	34.594	105.797	10.285	
M	28	884	31.571	92.328	9.609	
Difference			3.022			
SEX	Minimum	25%ile	Median	75%ile	Maximum	Mode
F	17.000	26.000	34.000	44.000	53.000	25.000
M	19.000	25.500	28.500	40.500	54.000	27.000

ANOVA
(For normally distributed data only)

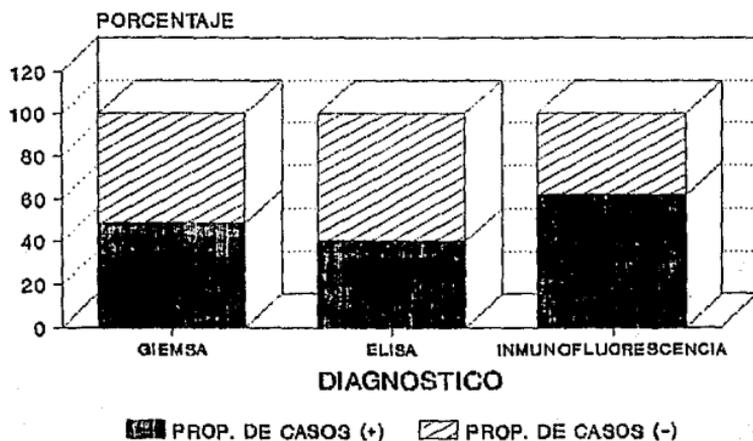
- FIGURA 1 -

OTROS AGENTES CAUSALES EN LA CONJUNTIVITIS FOLICULAR



- FIGURA 2 -

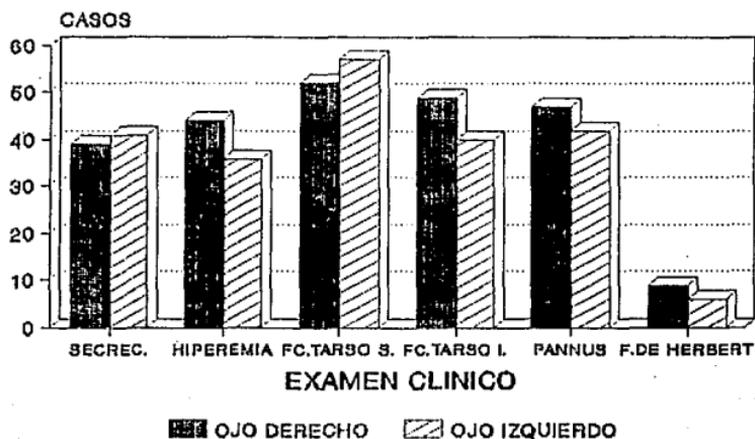
EXAMENES DE DIAGNOSTICO COMPARACION DE RESULTADOS (+) VS (-)



AGENTE CAUSAL: CHLAMYDIA TRACHOMATIS

- FIGURA 3 -

RESULTADOS DEL EXAMEN CLINICO SERVICIO DE OFTALMOLOGIA



DETECCION DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS

- FIGURA 4 -

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Myron Yanoff, Ben S. Fine. Ocular Pathology. Third Edition -----
J.B. Lippincott company Philadelphia. Página 219-220-221.
- 2.- Gordon FB, Quan AI, Trimmer Rw: Morphological observation on trachoma
virus in cell cultures. Science 131-733,1960.
- 3.- K.F. Meyer, MD. The Host Spectrum of Psittacosis-Lymphogranuloma Ve---
nereum (PL) Agents. American Journal of Ophthalmology P: 1225-1245 -
May. 1967.
- 4.- Storz, J: Ueber eine natürliche Infektion eines Meer scwinchen bestan-
des mit einem Erreger aus des Psitakose-Lymphogranuloma groupe. Zbl.
Bakt. Orig. 193: 432, 1964.
- 5.- Storz, J. and Mc Kercher, D.G.: Etiological studies on episootic bovi-
ne abortion. Abl. Veterinaarmed, 9: 411; 520, 1962.
- 6.- Storz, J., Smart, R.A. and Shupe, J.L.: Virusbedingte Polyarthriti --
bei Kälbern. III. Internat. Meeting Diseases Cattle, Copenhagen, 1964
pp. 109-115.
- 7.- Storz, J., Smart, R.A., Marriott, M.E. and Davis, R. V.: Polyarthri-
tis of calves, isolation of psittacosis agent from affected joints. --
Am. J. Vet. Res. 27: 633, 1966.
- 8.- Dickinson, L. and Cooper, B. S.: Contagious conjunctivo-keratitis of--
sheep. J. Path. Bact. 78: 257, 1959.
- 9.- Philip, C. B.: There's always something new under the "Parasitologi --
cal" sun (The unique story of helm inth borne salmon poisoning ---
disease) J. Parasit. 41: 125, 1955.

- 10.- Page, L.A.: Interspecies transfer of psittacosis-Lymphogranuloma --- Venereum- trachoma agents: Pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. Am. J. Vet. Res. 27:397, 1966.
- 11.- Mitsui, Y.; Tsutsui, J., and Tanaka, C.: Electron Microscopic Study-- of Chlamydozoon trachomatis, Brit J. Ophth. 36: 582-585, 1952.
- 12.- Yukihiro Mitsui, M.D. and Akihisa Suzuki, M.D. Electron Microscopy -- of Trachoma Virus in Section. Archives of Ophthalmology 56:429,1956.
- 13.- Reynolds DJ; Pearce JH. Endocytic mechanisms utilized by Chlamydiae and their influence on induction of productive infection. Infect --- Immun; 1991 Sep; 59 (9); P 3033-9
- 14.- Watson MW; Lambden PR; Clarke IN. Genetic Diversity and identifica--- tion of human infection by amplification of the Chlamydial 60-Kilodal~~l~~ ton cysteine- rich outer membrane protein gene.
- 15.- Sarov I; Geron E; Shemer-Avni Y; Manor E; Zvillich M; Wallach D; -- Schmitz E; Holtman H. Implications for persistent Chlamydial infec -- tions of phagocyte-microorganism interplay Eur-J-Clin-Microbiol-In__fect-Dis; 1991 Feb; 10(2); P 119-23
- 16.- Tipples G; Mc Clarty G. Isolation and initial characterization of a series of Chlamydia trachomatis isolates selected for hydroxyurea -- resistance by a stepwise procedure. J-Bacteriol; 1991 Aug; 173(16) - P 4932-40
- 17.- Hearn Sa; Mc Nabb GI. Immunoelectron microscopic localization of -- chlamydial lipopolysaccharide (LPS) in Mc Coy cells inoculated with Chlamydia trachomatis. J-Histochem-Cytochem 1991 Aug; 39 (8); -- P 1067-75.

- 18.- Su H; Caldwell HD. In vitro neutralization of Chlamydia trachomatis by monovalent Fab antibody specific to the major outer membrane protein. Infect-Immun; 1991 Aug; 59 (8) P 2843-5
- 19.- Fielder TJ; Peterson EM; de la Haza I.M. Nucleotide sequence of DNA encoding the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis serovar L3. Gene; 1991; May 15; 101 (1); P 159-60.
- 20.- Swanson AF; Fuo CC. Evidence that the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis is glycosylated. Infect. Immun; 1991 Jun 59 (6); P 2120-5
- 21.- Mabey DC; Bailey RL; Dunn D; Jones D; Williams JH; Whittle HC; -- Ward ME. Expression of MHC class II antigens by conjunctival --- epithelial cells in trachoma; implications concerning the pathogenesis of blinding disease. J-Clin-Pathol; 1991 Apr;44 (4); P 285 - 9 -
- 22.- Joseph TD; Bose SK. A heat labile protein of Chlamydia trachomatis binds to HELA cells and inhibits the adherence of Chlamydia. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A; 1991; Mayo 1; 88 (9); P 4054-8
- 23.- Hackstadt T; Baehr W; Ying Y. Chlamydia trachomatis developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A ; 1991 May 1; 88 (9) P 3937-41
- 24.- Frost EH; Deslandes S; Veilleux S; Bourgaux - Ramoisy D. Typing-- Chlamydia trachomatis by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. J. Infect - Dis ; 1991 May : 163 (5); P 1103 - 7
- 25.- Too S; Kaul R; Wenman WM. Identification and nucleotide sequence of a developmentally regulated gene encoding a eukaryotic histone-H1- like protein from Chlamydia trachomatis. J- Bacteriol; 1991 -- May; 173 (9) ; P 2818 - 22

- 26.- Dean B; Patton M; Stephens RS. Direct sequence evaluation of the - major outer membrane protein gene variant regions of Chlamydia -- trachomatis subtypes D', I', and L2. Infect- Immun; 1991 Apr; 59- (4); P 1579 - 82.
- 27.- Cerrone MC; Ma JJ; Stephens RS. Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis an immunolo-- gical reactivity of the protein. Infect Immun; 1991 Jan; 59(1) - P 79-90
- 28.- Jack J. Kanski. Oftalmología Clínica. Segunda Edición. Edito--- rial Doyma. 1992. Página 54-55.
- 29.- Thomas A. Bell, MD, MPH. Cho-Cho Kuo, MD, PhD, Walter E. Stamm, MD Milton R. Tam, PhD, Richard S. Stephens, MSPH. King K. Holmes, - MD, PhD, and J. Thomas Grayston, MD. Direct Fluorescent Monoclonal Antibody Stain for Rapid Detection of Infant Chlamydia trachomatis infection. Pediatrics Vol. 74 No 2. August 1984; P 224-228
- 30.- Wang S-P, Grayston JT. Immunologic relation ship between genital - TRIC, Lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new -- microtiter indirect immunofluorescence test. Am. J. Ophthalmology - 1970; 70: 367-74
- 31.- Gupta Pk, Lee EF, Erozan YS. Frost JK, Geddes ST, Donovan PA. -- Cytologic investigations of Chlamydia infection. Acta Cytol. 1979 -23-: 315-20
- 32.- Paik, G. 1980. Reagents, stains and miscellaneous test procedures, p. 1000 - 1024. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., - and J.P. Truant (ed) Manual of Clinical microbiology, 3rd ed. -- American Society for Microbiology, Washington, D . C.
- 33.- Kuo C. Tam M.R. Immunological Diagnosis of Chlamydia trachomatis- infection. In: Hugh H. Mc. Millan A. eds. Immunological Diagnosis-

Diagnosis of Sexually transmitted Diseases. Marcel Dekker, New --
York. 191-211, 1988.

- 34.- Csángó PA, Sarov B. Shiotz H. Sarov I. Comparison between cell ---
culture and serology for detecting Chlamydia trachomatis in women-
seeking abortion. J. Clin. Pathol 41: 89 - 92, 1988
- 35.- Sarov I. Kleinman D. Holcman D. Potshnik G. Insler V. Cevenini -
R. Sarov B. Specific IgG and IgA antibodies to Chlamydia tracho-
matis in infertile women. Int. J. Fertil. 31: 193-197; 1986
- 36.- Nowinski RC. Tam MR. Goldstein LC, et al. Monoclonal antibodies -
for diagnosis of infectious diseases in humans Science. 1983; 219-
637-44
- 37.- Tam MR, Stephens RS, Kuo CC, Homes KK, Stamm WE, Nowinski RC. --
Use of monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis as immuno--
diagnostic regents. In Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Piot P. ---
Schachter J, eds. Chlamydia infections. Amsterdam : Elsevier Biome-
dical; 1982: 317 - 20
- 38.- Hayashi H, Sheth PK. Simplified method for chlamydia trachomatis -
isolation using multi well plate. Am. J. Public Health 1982; 72:--
1406-7
- 39.- Bialasiewicz AA, Jahn GJ. Evaluation of diagnostic tools for ---
adult chlamydial keratoconjunctivitis. Ophthalmology 94-532,537,--
1987.
- 40.- Schachter J. Chlamydiae. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds.
Manual of Clinical Laboratory Immunology-Third edition American --
Society for Microbiology, Washington DC. 587-592, 1986.