



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CAMPUS IZTACALA

"IDENTIFICACION DE *Chlamydia trachomatis*
POR INMUNOFLUORESCENCIA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

MARIA DOLORES RODRIGUEZ DIAZ



IZTACALA

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Director de Tesis:

Dr. Jesús Casasola Flores.

Al honorable jurado:

M. en C. Rodolfo Cárdenas Reygada

M. en C. Agustín Ruiz Cabrera

M. en C. Rocío Vargas Martínez

Biol. Agustín Vargas Vera

Biol. José del Carmen Benitez Flores

Mi agradecimiento por su tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Jesús Casasola Flores.

Por la dirección de esta tesis, su ayuda incondicional y darme la oportunidad de concluir esta etapa.

A la Dra. Josefina Torres Gómez

Por su confianza, apoyo y enseñanzas durante mi formación académica.

A mis grandes Amores:

José Luis Mireles Flores

Luis Armando Mireles Rodríguez

Miriam Stephanie Mireles Rodríguez

Por que han llenado mi vida de felicidad.

A mis padres :

Lucila Díaz de la Torre
Roberto Rodríguez Castro

Por darme la vida y a quienes debo todo lo que soy, especialmente a mi madre por estar siempre a mi lado. Gracias.

A mis hermanos:

Pablo Rodríguez Díaz
Joel Rodríguez Díaz

Por su cariño, apoyo y compartir juntos todos los momentos.

A Maribel Manriquez Barrera:

Por su amistad y brindarme siempre su ayuda, especialmente durante este trabajo.

Mi agradecimiento al Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por permitirme desarrollar la parte experimental de este trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera ayudaron a que este trabajo se concluyera. Gracias.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	8
Objetivos	12
Material y Método	13
Análisis de Resultados y Discusión	18
Conclusiones	43
Recomendaciones	45
Referencias Bibliográficas	46
Apéndice No. 1 Medio de Transporte	55
Apéndice No. 2 Prueba de Reacción de Fijación de Complemento	56
Apéndice No. 3 Prueba de Inmunofluorescencia	59
Apéndice No. 4 Extracción de antígeno de <i>C. trachomatis</i>	61
Apéndice No. 5 Titulación de antígeno	63

Apéndice No. 6	
Eritrocitos de carnero sensibilizados con Hemolisina	64
Apéndice No. 7	
Conjugación de Inmunoglobulinas	65
Apéndice No. 8	
Cultivo Celular	66
Apéndice No. 9	
Inmunofluorescencia Directa	68
Apéndice No. 10	
Expediente Clínico	69
Apéndices No. 11 - 14	
Estadísticos de X^2	70

RESUMEN

Las infecciones son causa de elevada morbimortalidad en niños menores de tres meses. La neumonía es el síndrome más frecuente asociado a estos casos; en investigaciones realizadas se reporta que de 20% a 30% de todos los casos de neumonía en niños menores de 8 semanas es causado por *Chlamydia trachomatis* que adquiere al paso por el canal de parto, en individuos jóvenes y adultos pueden manifestarse diversos cuadros infecciosos.

Se determinó la presencia de *C. trachomatis* en 50 niños menores de tres meses y 20 adolescentes con cuadro clínico con sospecha de infección por *Chlamydia*, se tomaron muestras de exudado o aspirado bronquial, los productos fueron sembrados en células Hep-2 y tipificados por el método de Inmunofluorescencia Directa (IFD) e Indirecta (IFI) y se hizo un estudio comparativo en muestras séricas para el método de Reacción de fijación de complemento (RFC') y se realizaron las mismas pruebas en un grupo control de 30 pacientes con sintomatología diferente.

Se observó una diferencia significativa en los tres métodos utilizados para el diagnóstico en niños menores de tres meses. Los resultados demostraron que el aislamiento de *Chlamydia trachomatis* en células Hep-2 y tipificados por IFD en muestras de exudado y aspirado bronquial tienen una sensibilidad del 91.66% y una especificidad del 96.15%, para IFI un método comparativo a partir de muestras séricas, una sensibilidad de 89.58% y especificidad del 85.96% y para el caso de RFC' una sensibilidad de 47.91% y especificidad de 62.33%.

Para el caso de adolescentes, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los métodos de diagnóstico utilizados.

En pacientes menores de tres meses con sospecha de infección por *C. trachomatis* se logró detectar en los productos referidos del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" la presencia de este microorganismo en un 64% de los casos utilizando IFD y en un 54% por IFI por lo cual se determinó este método laboratorial muy confiable para ser utilizado como recurso para su diagnóstico.

INTRODUCCION

Los organismos clasificados en el género *Chlamydia* presentan cuatro especies *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* (TWAR) y *C. pecorum*. Por años clamidia fue conocida con una gran variedad de nombres según sus características estructurales y metabólicas y de acuerdo a su patología; entre estos podríamos mencionar algunos como: *Bedsonia*, *Colettsia*, *Rickettsia trachomatis* y *Rickettsia formis* entre otros.⁽¹⁾

Las especies del género *Chlamydia* se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados que afectan el epitelio mucoso, por su pequeño tamaño se le consideró por mucho tiempo como virus, no crecen en cultivos bacteriológicos convencionales y existen importantes diferencias entre estos grupos de microorganismos y los virus.^(2,3) *Chlamydia* tiene propiedades que la relacionan con otras bacterias, por ejemplo su pared celular es similar a la de las Gram negativas, presentan una membrana externa compuesta por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos.^(4,5)

Morfología y ciclo de desarrollo.

Son microorganismos cocoides inmóviles que miden aproximadamente 500 nm. Presentan pleomorfismo, su morfología y actividades dependen del estado de desarrollo en el cual se observen, se multiplican únicamente en el citoplasma de la célula huésped mediante un ciclo de desarrollo caracterizado por la alternancia ordenada de cuerpos elementales (CE), especializados para la supervivencia extracelular en cuerpos reticulares (CR) de mayor

tamaño, que intervienen en la multiplicación intracelular y se dividen por fisión binaria.^(2, 5)

Las células hospederas presentan inclusiones características en su citoplasma, cuando la célula madura, las inclusiones se encuentran en las cercanías del núcleo formando una estructura en forma de casco⁽⁶⁾.

El CE es una estructura cocoide con un tamaño aproximado de 0.2 a 0.4 μm mientras que el CR puede ser esférico o irregular presentando un tamaño mayor de 0.6 a 1.0 μm ⁽⁵⁾

Estas formas como las intermedias pueden teñirse con colorante de Giemsa, de Machiavelo, de Castañeda o de Giménez⁽⁷⁾.

En *C. trachomatis* cuando se forman los CE se encuentran en una "matriz", sustancia constituida de glucógeno y presente en el interior de la inclusión. En esta fase, *Chlamydia* penetra a la célula por fagocitosis, una vez dentro, evita la fusión fagolisosomal y continua a la siguiente fase de su ciclo donde se presenta una reorganización estructural dando como resultado la formación del cuerpo inicial, que más tarde se divide por fisión binaria y los cuerpos formados se conocen como CR.^(1,5)

Infecciones por *Chlamydia*.

Las infecciones de *Chlamydia trachomatis* producen enfermedades en hombres, mujeres y niños. Dentro de las enfermedades causadas por esta cepa se encuentran: el tracoma, conjuntivitis crónica, que tiene una reacción folicular marcada e hipertrofia papilar de la conjuntiva; la conjuntivitis de inclusión en

recién nacido, niños y adultos; otitis media; neumonía en niños y en adultos inmunosuprimidos; uretritis no gonocócica; uretritis posgonocócica; epididimitis; síndrome uretral en mujeres; cervicitis mucopurulenta; salpingitis; esterilidad secundaria tanto en hombres como en mujeres; perihepatitis y peritonitis (síndrome de Fitz-Hugh Curtis) en mujeres jóvenes, bartolinitis y endocarditis. Con la cepa LGV se encuentra la enfermedad Linfogranuloma venéreo.^(8,9,10-13)

En las infecciones oculares existen dos formas importantes de enfermedades causadas por *Chlamydia*, el tracoma, enfermedad inflamatoria crónica de los ojos que pueden llevar una cicatrización conjuntiva y corneal siendo una de las causas más comunes de ceguera. El paratracoma incluye conjuntivitis de inclusión de adultos, queratitis difusa y el tracoma endémico. La conjuntivitis de inclusión neonatal también se debe a la infección por cepas genitales de *C. trachomatis* adquiridas en el momento del parto.

C. psittaci. Puede causar infecciones en el hombre, la llamada psitacosis, tiene como huésped natural a una variedad de aves.

C. pneumoniae (TWAR). Es causante de infecciones respiratorias en humanos como neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis; el 10% de los casos de neumonía en adultos es debida a esta bacteria, en niños su presencia se ha encontrado a partir de los cinco años de edad en un 11%.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾

C. pecorum. Es una especie que fue aislada en rumiantes, se le ha atribuido como causante de enteritis.⁽¹⁸⁾

Tipos de antígenos.

Son organismos antigénicamente complejos, poseen antígenos específicos de género, especie, subespecie y serotipos identificados por diversas pruebas. ⁽¹⁹⁾

Todas las cepas de *Chlamydia* presentan un antígeno común de grupo, demostrable por la prueba de fijación de complemento, es soluble en etil-éter, termoestable por 30 minutos a 100° C y está formado por un complejo lipoproteína-polisacárido, el cual es inactivado por tratamiento con peryodato. ^(5,7)

Existen 15 diferentes serotipos causantes de enfermedades en humanos: tracoma endémico (causados por los serotipos A y C) enfermedades transmitidas sexualmente y conjuntivitis de inclusión (causados por los serotipos D y K) y linfogranuloma venéreo (causado por serotipos L 1, L2 y L3). ⁽⁷⁾

Se practican diversos métodos de laboratorio para el diagnóstico de *C. trachomatis*, tales como la observación directa al microscopio de los cuerpos de inclusión por medio de la inoculación en cultivo de células y embriones de pollo ^(1,20). La demostración de cuerpos de inclusión por tinciones puede hacerse por: a) tinción de iodo, b) tinción de Giemsa, c) tinción de Machiavelo y d) tinción de Castañeda. Todas estas técnicas, tienen una sensibilidad y una especificidad muy baja (18%) que en ocasiones pueden dar resultados falsos positivos o falsos negativos.

El método de Inmunofluorescencia es más sensible en la demostración de cuerpos de inclusión, permite visualizar los complejos

inmunofluorescentes⁽²¹⁾. Existen dos procedimientos de inmunofluorescencia:

Método Directo: Que consiste en exponer anticuerpos específicos y conjugados con fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) sobre la preparación antigénica. Se requiere del conjugado específico para cada antígeno, lo cual aumenta considerablemente su especificidad.

Método Indirecto: Después de acoplar el antígeno y el suero problema se agrega antiglobulinas conjugadas con fluoresceína.⁽²²⁾

Con respecto al diagnóstico serológico se cuenta con la prueba de reacción de fijación de complemento la cual demuestra la presencia de anticuerpos contra el antígeno termoestable que es común a todos los microorganismos del género *Chlamydia* y constituye un estudio serológico de empleo muy frecuente.^(18,23,24)

Otra prueba alterna puede ser: Inmunoensayo enzimático^(25,9) (ELISA) e Inmunolectroforesis⁽²⁶⁾.

En la última década se han desarrollado métodos para determinación de *Chlamydia* basados en la amplificación de una secuencia específica de ADN⁽²⁷⁾ y recientemente un plasmido en la reacción cadena ligasa ha sido introducido para la detección de *C. trachomatis*.^(28,29)

Debido a la gama de infecciones que se encuentran asociadas con *C. trachomatis*; se enfatiza la necesidad de contar con pruebas de diagnóstico sensibles y específicas.

ANTECEDENTES

En 1941, Coons describió un procedimiento que permite visualizar los inmunocomplejos en microscopía de emisión de luz ultravioleta y que es altamente específico la Inmunofluorescencia.⁽³⁰⁾

Dentro de las formas que existen para cultivar clamidia se tienen: El cultivo en saco vitelino de embrión de pollo utilizado en 1967 que detectaba todos los tipos de clamidia, pero es un procedimiento laborioso, caro y presenta problemas técnicos como posibles aislamientos equivocados por contaminación cruzada y se requiere de subcultivos para determinar algunas cepas; además su sensibilidad en la demostración de *C. trachomatis* es apenas del 20% sin embargo fue un avance de gran importancia^(2,31). Los avances siguientes sobre epidemiología de infecciones genitales y oculares se vieron limitados debido a la dificultad de cultivar *C. trachomatis* en el laboratorio⁽³²⁾.

La inoculación en ratón, siguió al cultivo en saco vitelino de embriones de pollo y se utiliza para aislamientos de *C. psittaci* y seropositivos de LGV; ahora es poco utilizado en los laboratorios; estas técnicas no son tan sensibles como el cultivo celular.

El cultivo de *C. trachomatis* se hace frecuentemente en células Mc Coy (una línea continua de fibroblasto de ratón) o Hela-229⁽⁹⁾, también se han utilizado otras líneas celulares susceptibles a clamidia como: HeLa M, Hep -2, FT, BHK -21, Vero, MK -2, MPK, LWOA -2. Mc Coy y L -929.^(33,34)

Siendo difícil el cultivo en laboratorio de *C. trachomatis* se desarrollaron métodos serológicos para su diagnóstico. En un principio el método de reacción de fijación de complemento era la única prueba disponible, pero ésta era de poca sensibilidad para detectar infecciones superficiales como conjuntivitis de inclusión y uretritis no gonocócica. ⁽²⁾ IZT.

El método de microinmunofluorescencia (micro-IF) desarrollada por Wang en 1970 se consideró como un avance importante con respecto a las pruebas de fijación de complemento, la cual detecta anticuerpos IgM, IgG o IgA en el suero de pacientes en lagrimas y secreciones genitales, pero las pruebas de micro IF no han sido apropiadas para diagnóstico primario en infecciones genitales por *C. trachomatis*. ⁽²⁾

En la última década las infecciones por *Chlamydia* han despertado un gran interés, debido al desarrollo de métodos más sensibles y específicos para su identificación en diversas entidades clínicas, en las que no se consideraba su participación. ^(10,13,35) Se reporta que en más del 38% de adolescentes sexualmente activos en los Estados Unidos de América se detectó la presencia de *Chlamydia trachomatis* ⁽³⁶⁾, además de ser una de las causas principales de conjuntivitis neonatal. Se ha reportado que la frecuencia de infecciones neonatales por *C. trachomatis* durante el parto por mujeres portadoras es del 50%. De esta manera se han ampliado los estudios de *C. trachomatis* utilizando una diversidad de métodos de laboratorio como inmunoelectroforesis, inmunoadsorción, contraelectroforesis, ELISA e inmunofluorescencia entre otras y en los últimos años los métodos utilizando ADN como la prueba de



Hibridación, Reacción de cadena de polimerasa (PCR) y Ligasa LCR además de la introducción de plásmidos. ^(28,29,37-39)

Existen varios trabajos donde se investigó la presencia de *C. trachomatis* utilizando Inmunofluorescencia directa, en ellos las muestras fueron principalmente exudados de infecciones genitales, algunos de infecciones rectales en hombres y mujeres como los trabajos de Rompalo y colaboradores en 1987⁽⁴⁰⁾. En infecciones respiratorias en infantes por citar algunos trabajos, se encuentran los reportados por Paisley y colaboradores en 1986⁽⁴¹⁾ en nasofaringe, Bell en 1984⁽⁴²⁾, Stamm⁽²¹⁾ y colaboradores en 1984 de los cuales Stamm ha realizado estudios principalmente en adultos ⁽⁴³⁾

En México, la prevalencia de *C. trachomatis* es diversa dependiendo de la población estudiada y del método de identificación utilizado; sin embargo, se considera que es del 4 al 9% en mujeres asintomáticas, del 16 al 20% en mujeres que asisten a clínicas de enfermedades sexuales y grupos de alto riesgo y del 15% en mujeres embarazadas que muestran infecciones cervicovaginales.⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾ La frecuencia de infección de niños nacidos de madres infectadas se estima en un 50 a 70 %; reportándose conjuntivitis en el 20 a 50% de los casos. De todos los pacientes con infección nasofaríngea solo el 30% desarrollará neumonitis. ^(3,10)

Los métodos empleados para la identificación de *C. trachomatis* no son los que regularmente se emplean para otros microorganismos siendo muy limitado el uso de los métodos sensibles y específicos para su detección pues en ocasiones no se cuenta con la infraestructura metodológica y el costo de los métodos de diagnóstico

es elevado. También suele no pensarse en este agente como causante de infecciones.

OBJETIVOS

Identificar *Chlamydia trachomatis* en niños menores de 3 meses y adolescentes con infecciones sospechosas de ser producidas por *C. trachomatis* utilizando los métodos de diagnóstico de Reacción de fijación de complemento e Inmunofluorescencia en cultivo de células.

Determinar la sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos de identificación.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron muestras de 100 pacientes del Hospital Infantil de México (H. I. M.) " Federico Gómez" los cuales se dividieron en tres grupos con las siguientes características y muestras biológicas:

GRUPO No. 1 : 50 niños con rango de edad de 1 a 90 días pacientes de la unidad de cuidados intensivos (U C I N) con sospecha clínica de infección por *Chlamydia trachomatis*.

Muestras: 50 muestras de sangre venosa
40 aspirados bronquiales
6 exudados oculares
4 exudados faríngeos

GRUPO No. 2 20 adolescentes del sexo femenino con rango de edad de 17 a 19 años asistentes al servicio médico del Hospital Infantil también con sospecha por *Chlamydia*.

Muestras: 20 muestras de sangre
20 exudados cervicovaginales

GRUPO No. 3 30 pacientes niños y adolescentes menores de 3 meses y de 17 a 19 años de edad respectivamente

hospitalizados en servicios de Endocrinología, Neurología y Contagiosos con cuadro clínico diferente a infecciones causadas por *Chlamydia*.

Muestras: 30 muestras de sangre
 19 aspirados bronquiales
 3 exudados faríngeos
 4 exudados oculares
 4 exudados cervicovaginales

Las muestras de exudado fueron transportadas en medio M - L 15 (Apéndice No. 1).

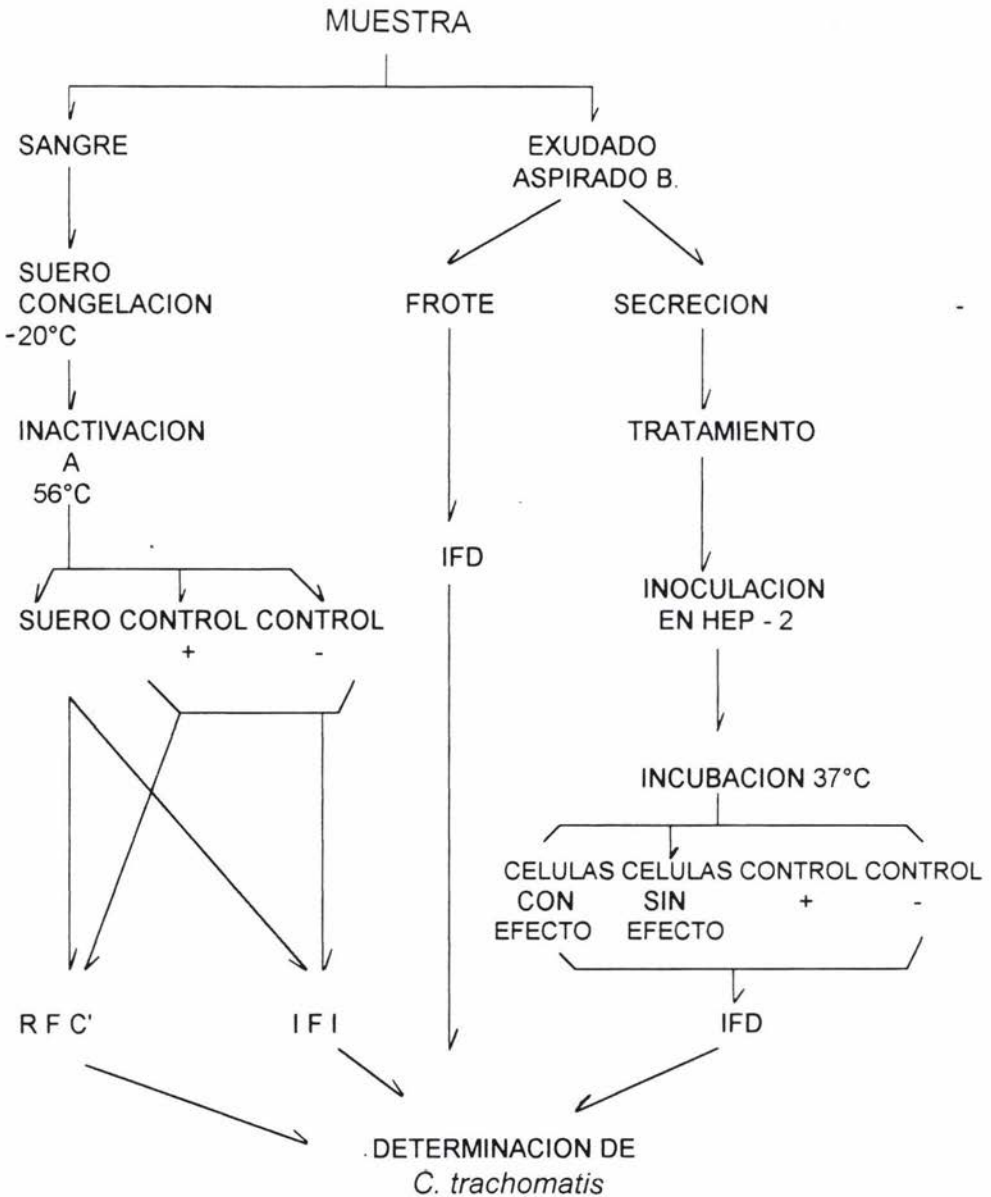
Muestra sanguínea: Se tomaron 3 ml de sangre en tubo de vidrio seco, posteriormente se separó el suero dentro de las 24 horas siguientes a su recolección y se congeló a - 20° C hasta el momento de realizar los ensayos de la prueba de reacción de fijación de complemento (RFC') e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) Apéndice No. 2 y 3; con sus respectivos controles.

Para el método de RFC' se utilizó un antígeno de *C. trachomatis* que se obtuvo a partir de una lesión de un paciente al que se le confirmó clínicamente linfogranuloma venéreo mismo que fue tipificado con el KIT ABBOT 1704M200; después se aisló en células Hep-2, se propagaron y se extrajo el antígeno con éter, este antígeno obtenido dio un título de 1:256 el cual fue utilizado para hacer las pruebas de fijación de complemento en los sueros de los pacientes.

Para la prueba se utilizó complemento de cobayo a una concentración de dos unidades; para revelar la placa se usaron eritrocitos de carnero al 2% (Apéndice No. 6). A los sueros de los pacientes se les hizo también la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.

Se conjugaron los anticuerpos específicos con isotiocianato de fluoresceína, de la Nutritional Biochemical Corporation (Apéndice No. 7) para utilizarlo en la conjugación de anticuerpos en el método de Inmunofluorescencia Directa. El título de anticuerpos fue de 1:80/ con 1:40 de azul de Evans.

Muestras de secreciones. Las muestras de secreción bronquial fueron obtenidas por aspiración introduciendo una sonda de alimentación del No. 19 y posteriormente se colocaron en medio ML-15 al igual que otro tipo de secreciones. Para su conservación se colocan en frío, después se trataron para eliminar moco (Apéndice No. 1) se inocularon 400 μ l de esta muestra tratada en células Hep-2 en una concentración de 3×10^5 cel / ml (Apéndice No. 8) y se incubaron en atmósfera con 5% bióxido de carbono a 37° C y 70% de humedad por un período de 4 a 12 días. Durante la incubación se observaron diariamente los cultivos en un microscopio marca Leitz Watzla Diavert Germany para observar el efecto en los cultivos celulares. En el momento que se observó efecto citopático en un 80% en las células se procedió a desprenderlas pasando a un tubo de 15 ml posteriormente se centrifugó a 1800 r.p.m. en frío (4° C) y las células separadas se trataron con IFD (Apéndice No. 9) con sus respectivos controles, al término de 12 días, los cultivos se declararon como negativos y se les hizo IFD para determinar falsos negativos.



Procesamiento de muestras para determinación de *C. trachomatis*

Para determinar si existía una diferencia entre los métodos, estableciendo la probabilidad de que esa diferencia sea significativa, se utilizó la prueba X^2 de doble entrada con un intervalo de confianza de 95% y un límite de significación de 0.05 comparando los métodos de la siguiente manera.

GRUPO No. 1

RFC' VS IFI

RFC VS IFD

IFI VS IFD

GRUPO No. 2

RFC' VS IFI

RFC' VS IFD

IFI VS IFD

estableciendo que

Hipótesis nula: Con los métodos de diagnóstico IFD, IFI y RFC' para identificar *C. trachomatis* se obtienen los mismos resultados en niños menores de tres meses y adolescentes.

Hipótesis alterna: Con los métodos de diagnóstico IFD, IFI y RFC' para identificar *C. trachomatis* se obtienen diferentes resultados en niños menores de tres meses y adolescentes.

ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

Las infecciones respiratorias son causa de elevada morbimortalidad en infantes, la neumonía es la enfermedad más común asociada a estos casos, caracterizándose por Infiltración difusa bilateral demostrable radiológicamente.⁽⁴⁸⁾ En niños menores de 3 meses *Chlamydia trachomatis* es uno de los microorganismos que con más frecuencia se asocia con el desarrollo de neumonía y conjuntivitis, que adquiere el recién nacido durante el parto en su paso por el canal cervical ^(45,10).

La causa más común de conjuntivitis neonatal (definida como una infección supurativa de la conjuntiva durante el primer mes de vida) ⁽⁴⁸⁾ en Estados Unidos es debida también a *C. trachomatis*. Muchas muertes por neumonía pueden prevenirse, el diagnóstico acertado y una adecuada terapia son importantes ya que el curso de la enfermedad puede ser acortada, de ahí la importancia de diagnosticar oportunamente.

En este estudio se muestrearon niños menores de 3 meses con cuadro clínico que sugiere infección por *Chlamydia*, estos pacientes se incluyeron en el Grupo No.1. Las edades que presentaron mayor frecuencia (Figura No. 1), correspondieron a niños menores de 30 días y en un 48% dentro de las dos primeras semanas de vida, este dato nos muestra la importancia de detectar este microorganismo en

las últimas semanas de embarazo de la madre y dar un tratamiento oportuno tanto a la madre como al bebé.

De los métodos de diagnóstico utilizados en este estudio para determinar *C. trachomatis* en niños menores de tres meses, el mayor número de muestras positivas se obtuvo por IFD (Tabla No. 1) el cual fue de un 64%, por IFI un 54% y para la prueba de RFC' solo un 24%. Los títulos mayores de 1:16 de anticuerpos por RFC' se consideran productos de una infección activa ⁽⁴⁹⁾. Los títulos encontrados en el Grupo No. 1 se presentan en la tabla No. 2. Los resultados negativos para RFC' fueron altos (76%) pero no significan necesariamente la carencia total de anticuerpos, sino que se encuentran en concentraciones inferiores al límite de sensibilidad de la prueba, o que no hay anticuerpos fijadores de complemento ⁽²³⁾. Las muestras que presentaron anticomplementaridad se tomaron como negativas y son debido a adsorción inespecífica del complemento por el mismo suero problema o por extractos de tejidos y otros materiales complejos; por esta razón, es preciso llevar paralelamente controles adecuados del antígeno, suero, complemento y los eritrocitos para observar si se presenta actividad complementaria.⁽²⁰⁾ La prueba de Reacción de Fijación de Complemento se presenta con sus controles en la figura No. 3. El diagnóstico serológico en infantes posee dificultades, ya que el recién nacido puede heredar el nivel de anticuerpos IgG de la madre y también la respuesta de anticuerpos puede ser pobre ⁽⁴⁹⁾. Los anticuerpos fijadores de complemento detectados en el Grupo No. 1 fueron anticuerpos específicos IgM los cuales se consideran como indicadores de una infección activa aunque su respuesta puede ser menor⁽⁴⁹⁾.

El Grupo No. 2 de adolescentes entre 17 y 19 años obtuvo un porcentaje de positividad de 80% por IFD en la determinación de *Chlamydia trachomatis* (Tabla No. 3), un 55% de las muestras positivas para RFC' y un 80% para IFI. Los títulos obtenidos en las adolescentes se muestran en la Tabla No.4, a diferencia del Grupo No. 1 éste, presentó un porcentaje más alto para la prueba de RFC' y los títulos de anticuerpos se detectaron hasta en 1:2048 (a este paciente se le confirmó clínicamente linfogranuloma venéreo) debido probablemente a que este grupo no presenta dificultades en la respuesta de anticuerpos como la que se da en infantes.

El Grupo control conformado por 30 pacientes principalmente niños menores de un año y adolescentes pertenecientes a los servicios de Endocrinología, Neurología y Contagiosos del, "H. I. M." con sintomatología diferente a infecciones por *Chlamydia*, del cual se presentaron dos muestras positivas por IFD las cuales se consideraron falsos positivos.

Se logró identificar *C. trachomatis* en las diferentes secreciones que se obtuvieron de aspirados bronquiales, exudado ocular y exudado faríngeo (Fig. No. 2). Se han reportado aislamientos de clamidia en nasofaringe y recto ^(50,40) en el grupo No. 1 se obtuvo exudados faríngeos positivos a este microorganismo, su presencia es debida tal vez al drenaje del ojo infectado ^(50,51), ya que se ha encontrado en pacientes con conjuntivitis de inclusión, esto resulta importante pues el tratamiento tópico no erradica la infección en estas zonas ⁽¹⁾, y existen investigaciones que sugieren que la neumonía neonatal resulta del drenaje de la bacteria desde la conjuntiva a través

de los conductos lagrimales a la orofaringe y que finalmente baja al tracto respiratorio ⁽⁵¹⁾.

Con respecto a los cultivos celulares en células Hep-2 para la prueba de inmunofluorescencia, se logró obtener en la mayoría de los casos el efecto citopático en un 80% entre el 3^{er} y 4^o día de incubación, el efecto se observa por cambios morfológicos en las células las cuales tienden a un redondeamiento y se desprende la monocapa celular (Figura No. 4); en cambio los cultivos celulares no inoculados conservaron intacta la monocapa celular y sin cambios morfológicos aún después de dos semanas de incubación (Fig. No. 5).

En el desarrollo del método de inmunofluorescencia directa se reportaron positivas las preparaciones que al microscopio de emisión de luz ultravioleta se observaron con inclusiones fluorescentes de color verde en la célula como se aprecia en la figura No. 6. Se reporta que de 1 a 10 inclusiones en una célula o más observadas con fluorescencia se considera que la prueba es positiva ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Las preparaciones negativas no presentaron fluorescencia verde y se observan de color rojo (Figura No. 7). En algunos casos puede presentarse fluorescencia inespecífica debido a presencia de extractos de tejidos lo cual puede observarse en color amarillo, no tiene forma definida y no se presenta en inclusiones dentro de la célula (Figura No. 8).

La sensibilidad de los cultivos celulares que se presentaron en el Grupo No. 1 y 2 a *C. trachomatis* por IFD se muestra en la tabla No. 6, donde tenemos que los cultivos que se observaron con efecto

citopático y negativos a la prueba de IFD pueden corresponder a otro microorganismo diferente, presumiblemente virus. De los cultivos sin efecto citopático 4 de ellos fueron positivos por IFD, por lo que se consideraron falsos negativos. Tomando en cuenta lo anterior en la tabla No. 7, se presenta la sensibilidad y especificidad de la prueba en niños menores de 3 meses, donde la sensibilidad para IFD se calculó tomando el número de falsos negativos en cultivo celular sobre el total de muestras positivas y así se obtuvo una sensibilidad de 91.66% y una especificidad del 96.15% a partir de los falsos positivos. Es generalmente aceptada que la sensibilidad de cultivos celulares para *C. trachomatis* sea menor del 100% ^(48,52,55), ya que existen factores que afectan el crecimiento de clamidia como: muestreos inadecuados, transportación a distancia, especímenes pobres, algún tipo de toxicidad para las monocapas celulares, presencia de anticuerpos que pueden afectar la capacidad del microorganismo para crecer en cultivos celulares y otro tipo de microorganismos no infecciosos ⁽²⁵⁾. Por estas causas se recomienda refrigerar la muestra a 4° C inmediatamente después de obtener el espécimen del paciente y el aislamiento debe darse dentro de las siguientes 24 Hrs. de su recolección ^(55,56). También puede utilizarse la línea celular Hela 229 (células de carcinoma cervicouterino) para aumentar el desarrollo de *C. trachomatis* en muestras cervicales, ya que se ha observado un mejor crecimiento en esta línea celular ⁽⁵⁶⁾. Sin embargo nuestra sensibilidad obtenida de un 91.66% con células Hep-2 es adecuada ya que se reportan sensibilidades buenas en valores de 86% acompañadas de una excelente especificidad de 98% ⁽⁵²⁾ que en este caso fue de 96%. Para el caso de

Inmunofluorescencia Indirecta tuvimos una sensibilidad similar de 89.58% y una especificidad de 85.96% y por el método de RFC' sólo se obtuvo una sensibilidad de 47.91% y una especificidad de 62.33%.

Para establecer si existían diferencias significativas entre los métodos para determinar *C. trachomatis* se realizó la prueba de X^2 de doble entrada con un nivel de significancia de 0.05 y grados de libertad igual a uno. Para el Grupo No. 1 se compararon los métodos de RFC' vs IFI y RFC' vs IFD (Apéndice 11 y 12) y se obtuvo en los dos casos una X^2 mayor a X^2 de tablas⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾, por lo tanto se rechazó la hipótesis nula, así que la determinación de *C. trachomatis* por métodos Inmunofluorescentes y por RFC' son estadísticamente diferentes en niños menores de tres meses. Al comparar la prueba de IFI vs IFD (Apéndice 13) en este mismo grupo la X^2 calculada fue menor que la X^2 de tablas por lo tanto no se rechazó la hipótesis nula y de esta manera podemos decir que los métodos para determinar *C. trachomatis* por IFD e IFI no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Aplicando la prueba de X^2 en el Grupo No. 2 formado por 20 adolescentes se comparó la determinación de *C. trachomatis* por los métodos de RFC' vs IFI y RFC' vs IFD (Apéndice 14 y 15) donde se obtuvo para ambos casos una X^2 calculada menor que la de tablas con un nivel de significancia de 0.05 y un grado de libertad, por lo cual no se rechazó la hipótesis nula, por lo que podemos decir que no existen diferencias estadísticamente significativas para los métodos Inmunofluorescentes y RFC' cuando se trata de adolescentes y por

los métodos de IFD vs IFI se obtuvieron los mismos resultados por este grupo.

De acuerdo a lo anterior podemos decir que para el diagnóstico de *C. trachomatis* en niños menores de tres meses los métodos en los que se obtuvo los mismos resultados estadísticamente en este estudio fueron los métodos por inmunofluorescencia y que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la IFD e IFI.

En el caso del Grupo No. 2 de adolescentes en el cual las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas por los métodos de 'RFC' e Inmunofluorescencia y que no dependió del método de análisis, podría ser revisado en un número mayor de pacientes adolescentes y observar si hay reproducibilidad en una muestra mayor, ya que el tamaño de nuestra muestra para este grupo fue pequeña; sin embargo, es relevante la incidencia que se presentó en adolescentes sintomáticos muestreados para identificación a *C. trachomatis* por métodos inmunofluorescentes lo cual es importante para considerar a este agente dentro de las enfermedades transmitidas sexualmente y que puede adquirir el neonato durante el parto a través de la madre infectada, además de las complicaciones de infecciones por clamidia pueden causar infertilidad, debido a un diagnóstico y tratamiento inadecuados^(52,57). En el caso de los pacientes que resultaron positivos a *Chlamydia trachomatis* recibieron tratamiento por su Médico de acuerdo a su edad y los datos de su expediente clínico (Apéndice No. 10).

Se ha reportado que la prevalencia en muestras de mujeres y hombres es mayor cuando son menores de 25 años lo cual podría presentarse por una mayor actividad sexual y promiscuidad que se

presenta en esta edad ^(44,60) así como causas hormonales los cuales se han considerado como factores de riesgo ^(45,48) en otros países como Estados Unidos se recomienda que adolescentes y adultos de 24 años y menores sean revisados rutinariamente para diagnóstico de *C. trachomatis*.

Existen métodos de diagnóstico que se han desarrollado en los últimos años como alternativa a los cultivos celulares e Inmunofluorescencia, basados en la amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción de cadena de polimerasa y ligasa PCR y LCR que son los métodos más frecuentes basados en el uso de ADN ^(8,28,29,61). Estas pruebas realizadas a hombres y mujeres a partir de la primera orina del día se obtienen los ácidos nucleicos por amplificación y se ha demostrado mayor sensibilidad para el diagnóstico de infecciones por clamidia en adultos, la sensibilidad de LCR va de un 100% en muestras de orina y en muestras cervicales de un 87.5% ⁽²⁹⁾. La muestra de la primera orina es un excelente espécimen para diagnóstico de infección por *C. trachomatis* de vías genitourinarias bajas y sin falsos positivos ⁽³⁹⁾. La orina puede ser contaminada por el contacto con la uretra, vulva e interior de la vagina al orinar ⁽¹⁸⁾ y en hombres para los cuales era muy incomodo la toma de muestra de uretra con hisopo, este muestreo ha favorecido a incrementar el número de pacientes examinados.⁽⁶²⁾ Los cultivos tienen una baja sensibilidad con orina ^(28,61), tradicionalmente el estándar para la diagnosis de *C. trachomatis* en mujeres ha sido el cultivo celular con muestras cervicales ^(6,28) y eventualmente especímenes uretrales en hombres por las razones que ya se

comentaron. Las pruebas de orina por cultivo celular en los mismos individuos muestran un decremento de 70% en sensibilidad que cuando las muestras son cervicales y pruebas de Inmunofluorescencia en sedimentos de orina se han realizado presentando un número bajo de cuerpos elementales siendo difíciles de identificar, pero existe una tasa de concordancia de 98.2% en estudios realizados de PCR e Inmunofluorescencia Directa cuando las muestras corresponden principalmente a muestras endocervicales⁽⁶²⁾.

Los análisis que se han desarrollado en la última década basadas en el uso de ADN presentan mayor sensibilidad y especificidad, favoreciendo el tiempo para la detección de clamidia sobre los cultivos celulares, sin embargo presentan limitaciones, se ha detectado *C. trachomatis* por métodos basados en el uso de ADN en pacientes curados después de completar terapias con antibióticos y los microorganismos ya no son viables, lo cual no sucede con los cultivos celulares los cuales requieren organismos vivos e indican una infección activa y para el caso de los pacientes los métodos de ADN manejan especímenes principalmente de tracto genitourinario y para el caso de neonatos existen muestras principalmente de tracto respiratorio en la cual se presentan problemas por complicaciones de la infección a neumonía, además también se presentan especímenes oculares; en estas infecciones que presentan los neonatos por contaminación de la madre a través del canal de parto, el método de Inmunofluorescencia se presenta aun como una buena alternativa de diagnóstico.

En los casos en los cuales los niños que presentaron infecciones oculares por *C. trachomatis* deben ser evaluados al año ya que estas infecciones suelen ser crónicas ^(54,63).

Tabla No. 1

Determinación de *C. trachomatis* en niños menores de 3 meses por métodos inmunofluorescentes y RFC'

Método	Muestras		Muestras		Total	%
	Positivas	%	Negativas	%		
RFC'	12	(24)	38	(76)	50	(100)
IFD	32	(64)	18	(36)	50	(100)
IFI	27	(54)	23	(46)	50	(100)

RFC' - Reacción de Fijación de Complemento

IFD - Inmunofluorescencia Directa

IFI – Inmunofluorescencia Indirecta

Tabla No. 2

Títulos de anticuerpos obtenidos por RFC' para detección de *C. trachomatis* en niños menores de 3 meses. Grupo No. 1.

Título de anticuerpos	No. de pacientes	%
Sin título (negativos)	33	66
Menores de 1:16 (negativos)	5	10
Mayores de 1:16 (positivos)	12	24
Total	50	100

Tabla No. 3

Determinación de *C. trachomatis* en adolescentes por métodos inmunofluorescentes y de RFC'.

Método	Muestras positivas	% Muestras positivas	Muestras negativas	% Muestras negativas	% Total	%
RFC'	11	(55)	9	(45)	20	(100)
IFD	16	(80)	4	(20)	20	(100)
IFI	16	(80)	4	(20)	20	(100)

Tabla No. 4

Títulos de anticuerpos obtenidos para detección de *C. trachomatis* en adolescentes. Grupo No. 2.

Título de anticuerpos	No. de pacientes	%
Sin título (negativos)	7	35
Títulos menores de 1:16 (negativos)	2	10
Títulos mayores de 1:16 (positivos)	11	55
Total	20	100

Tabla No. 5

Determinación de *C. trachomatis* en 30 pacientes control, por métodos inmunofluorescentes y de RFC'.

Método	Muestras positivas	Muestras negativas	Total
RFC'	0	30	30
IFI	0	30	30
IFD	2	28	30

Tabla No. 6 Sensibilidad de *Chlamydia trachomatis* evaluada por inmunofluorescencia directa. Grupo 1 y 2.

	FRECUENCIA	IFD (+)	IFD(-)
CULTIVO DE CELULAS HEP-2 CON EFECTO CITOPATICO	41	35	6
CULTIVO DE CELULAS HEP-2 SIN EFECTO CITOPATICO	18	4	14
FROTIS	11	9	2
TOTAL	70	48	22

Tabla No. 7 Sensibilidad y especificidad de los métodos para determinación de *C. trachomatis*.

Resultado Del Método	No. de Muestras	IFD		% Sensibilidad	% Especificidad
		Positivo	Negativo		
Positivo	48	44	4	91.66 <hr/> (44/48)	
Negativo	52	2	50		96.15 <hr/> (50/52)
		IFI		89.58	
Positivo	48	43	5	<hr/> (43/48)	
Negativo	57	3	49		85.96 <hr/> (49/57)
		RFC		47.91	
Positivo	48	23	25	<hr/> (23/48)	
Negativo	77	4	48		62.33 <hr/> (48/77)

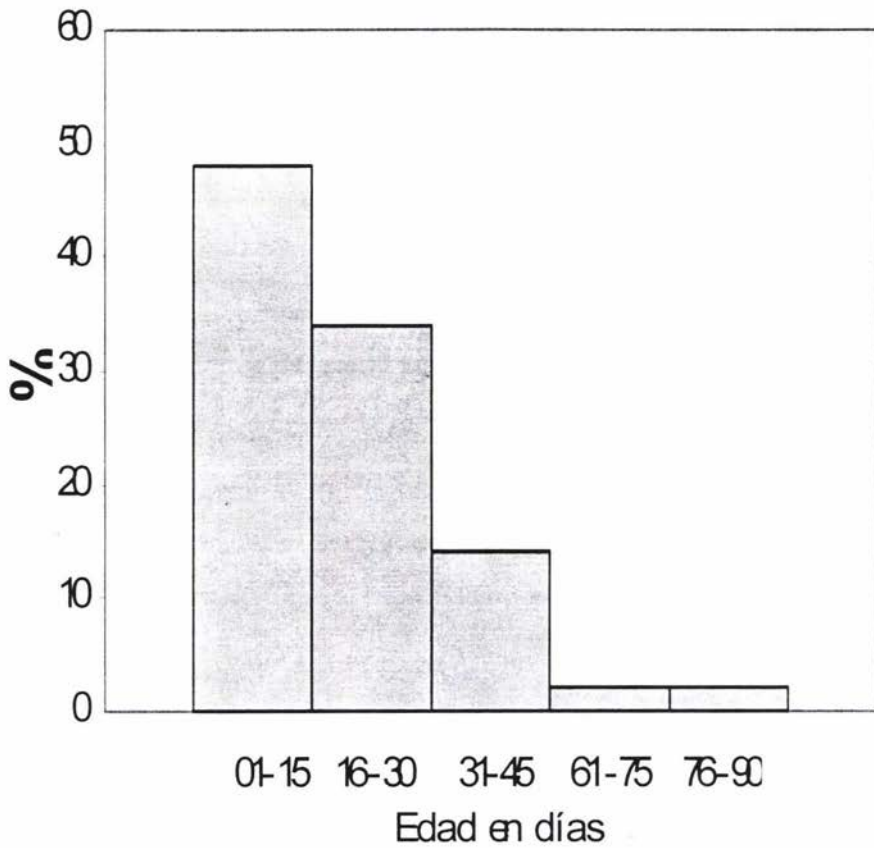


Fig. No. 1 Frecuencia de edades de 50 pacientes menores de tres meses con sospecha de infección por *C. trachomatis* (Grupo 1).

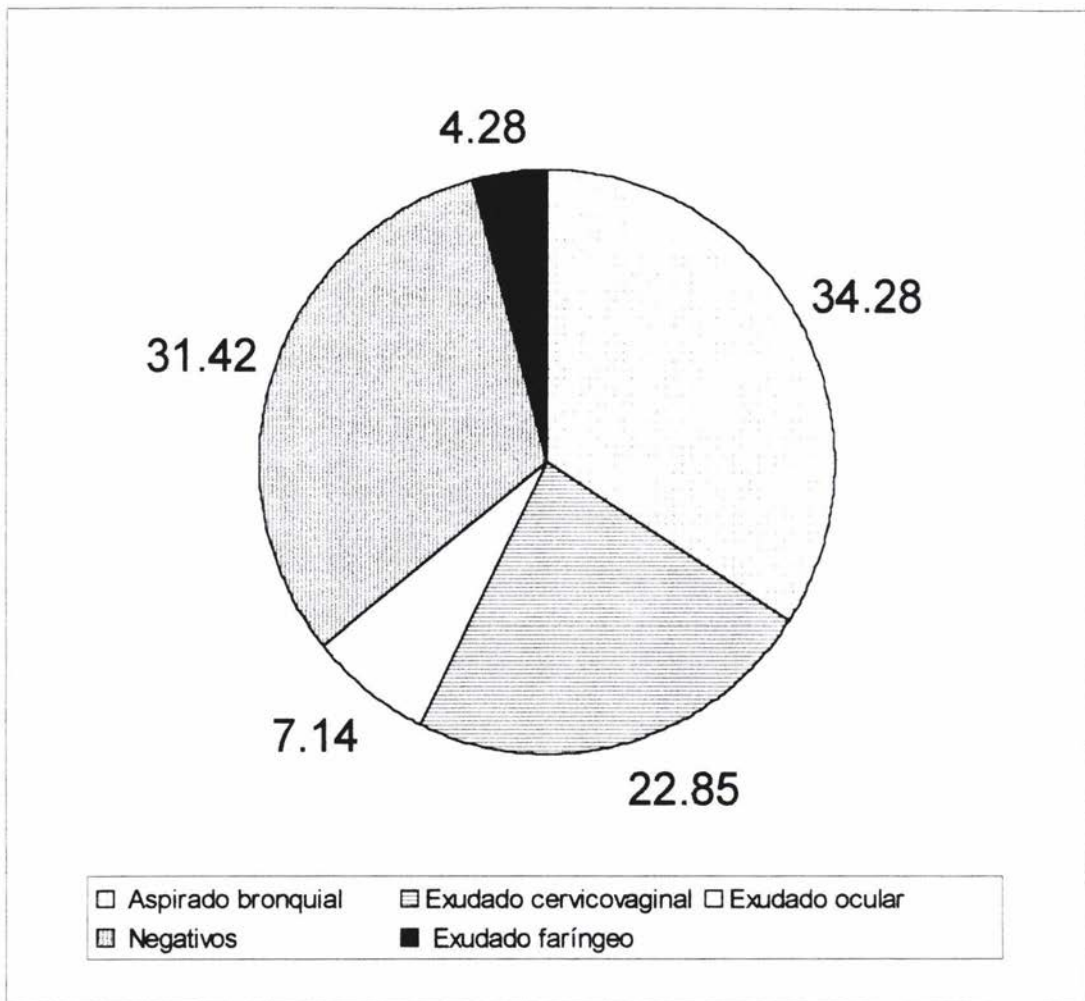


Fig. No.2 Porcentajes de aislamientos de *C. trachomatis* en 70 pacientes sintomáticos.

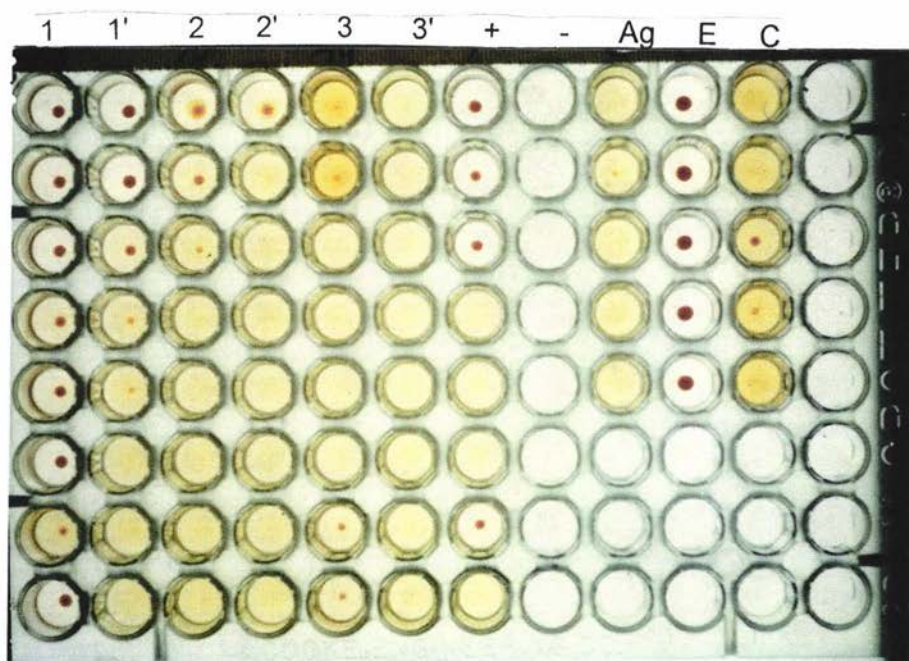


Fig. No. 3 Prueba de Reacción de Fijación de complemento en sueros de pacientes con título de anticuerpos a *C. trachomatis* (botón de eritrocitos muestras 1 y 2) y sin título (lisis total muestra 3) las muestras 1', 2', 3' se corren para detectar anticomplementaridad, en la placa también se muestran los controles de suero positivo, suero negativo, antígeno, eritrocitos y complemento en el orden respectivo.

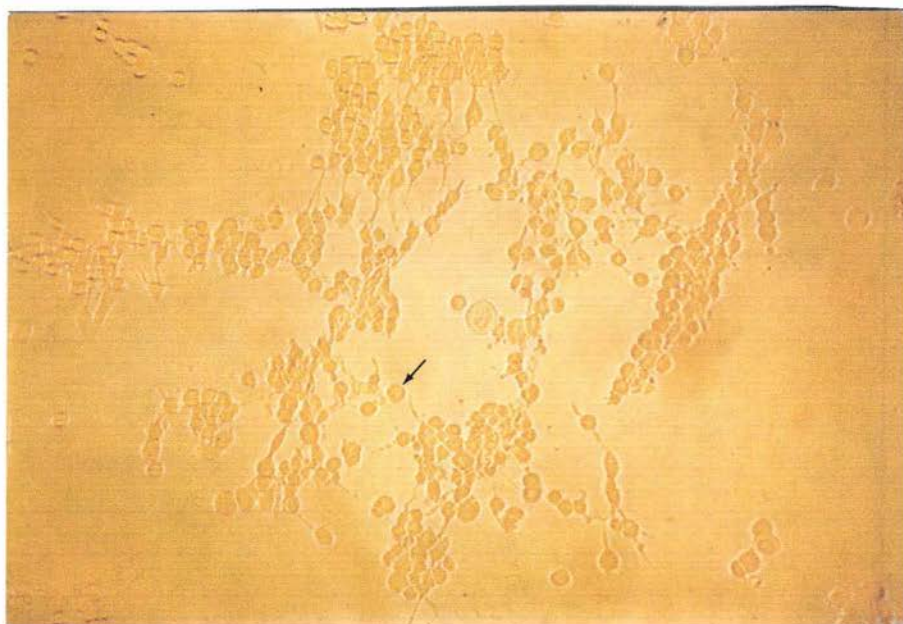


Fig. No. 4 Cultivo celular con efecto citopático de *C. trachomatis* donde se observan células redondeadas, desprendidas y con destrucción de la monocapa celular. Aumento 25x con sistema óptico.



U.N.A.M. CAMPUS

IZT.

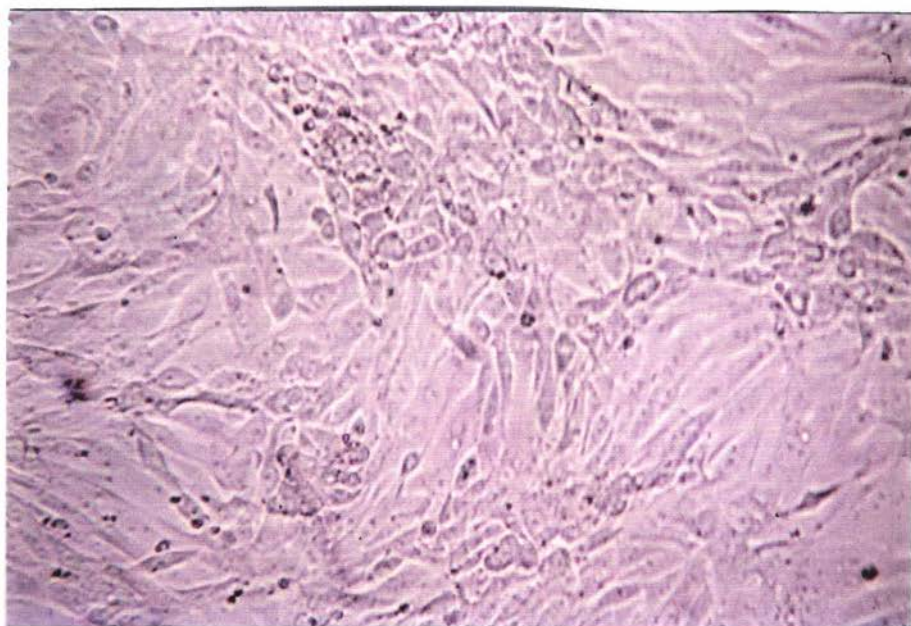


Fig. No 5. Cultivo celular Hep -2 negativo, las cuales conservan intacta la monocapa celular y sin cambios morfológicos. Aumento 40x con sistema óptico invertido Leitz Watzala Diavert Germany.

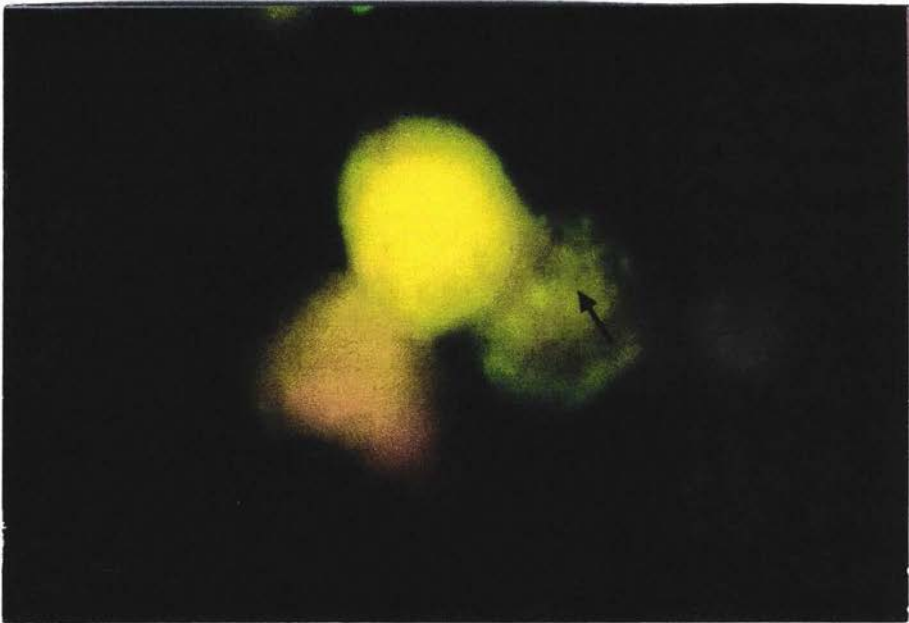


Fig. No. 6 Prueba de inmunofluorescencia positiva en células Hep-2 con efecto citopático, donde se pueden observar cuerpos de inclusión verdes fluorescentes dentro de las células. Aumento 1250x en microscopio de epifluorescencia.



Fig. No.7 Cultivo negativo a *C. trachomatis* por inmunofluorescencia, donde las células se observaron únicamente de color rojo. Aumento 1000x en microscopio de epifluorescencia.

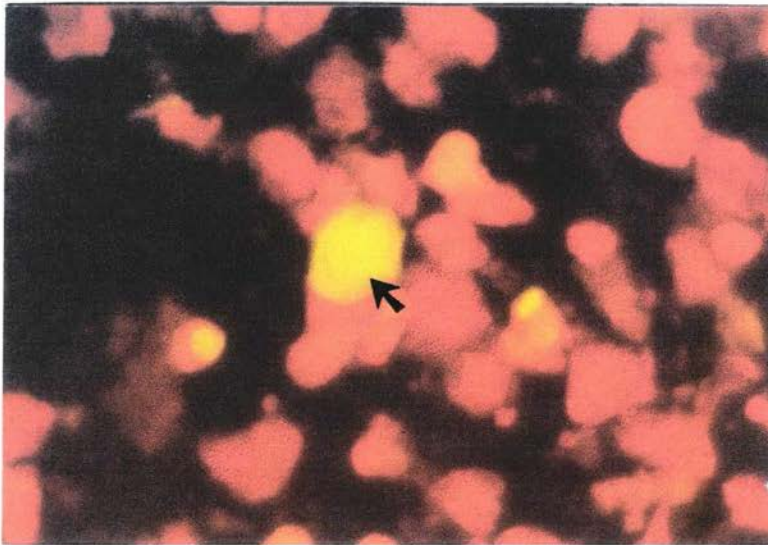


Fig. No. 8 Prueba de inmunofluorescencia negativa donde se observa fluorescencia inespecífica la cual se presenta de color amarillo y de forma irregular. Aumento 1000x.

CONCLUSIONES

La identificación de *C. trachomatis* en muestras de aspirados, bronquiales, exudado ocular, exudado faríngeo y cervicovaginal que se obtuvo en poblaciones de niños menores de tres meses y adolescentes por IFD fue del 64% y 80% respectivamente, demuestra la importancia de considerar a este microorganismo como agente causal de neumonía y conjuntivitis en niños menores de 3 meses y como responsable de enfermedades transmitidas sexualmente, para de esta manera poder dar un tratamiento oportuno.

Se observó una incidencia alta de *C. trachomatis* en nuestras poblaciones de neonatos y adolescentes con sospecha de infección por clamidia. De los métodos de diagnóstico utilizados para determinar *C. trachomatis* en niños menores de tres meses se considera que la Inmunofluorescencia ofrece mejores resultados que otros métodos como la prueba de Reacción de Fijación de Complemento, no así para el grupo de adolescentes, en la cual no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente entre los métodos. Lo cual nos da pauta para revisar este microorganismo en trabajos futuros con una muestra mayor y corroborar estos resultados en adolescentes los cuales presentaron una mayor respuesta inmunológica.

Por el método de IFD en células Hep-2 se obtuvo una sensibilidad de 91.16% y una especificidad de 96.15% para IFI una sensibilidad de 89.58% y especificidad del 85.96% y en el caso de RFC' una sensibilidad de 47.91% y una especificidad de 62.33%, así

podemos decir que el método de Inmunofluorescencia Directa por su sensibilidad y especificidad puede ser utilizado como recurso metodológico para el diagnóstico de *C. trachomatis* en niños menores de 3 meses. Existen métodos de identificación aun más sensibles que los que utilizan cultivos de células, como PCR, para diagnóstico de *C. trachomatis*, el método de IFD es una buena opción para la detección oportuna y confiable en neonatos.

En México la prevalencia de *C. trachomatis* varía, dependiendo del método de identificación y la población estudiada y existen casos de pacientes con infecciones inespecíficas en las que no se determina el agente causal; de los cuales un porcentaje de ellos podría detectarse utilizando métodos de diagnóstico sensibles y específicos como el método de Inmunofluorescencia especialmente en infecciones respiratorias que pueden ser fatales para el paciente y que se presentan con frecuencia durante los primeros meses de vida.

RECOMENDACIONES

Administrar tratamiento médico a los padres de todo niño en el que se identifique infección por *C. trachomatis* y evitar contagio a productos futuros.

Revisar a adolescentes y adultos sexualmente activos de menos de 24 años para diagnóstico de *C. trachomatis*, pues pueden o no presentar síntomas.

Detectar *C. trachomatis* en mujeres embarazadas de menos de 24 años para dar tratamiento y prevenir posibles infecciones al bebé.

Evaluar al año niños que presentaron infecciones oculares por *C. trachomatis* para determinar si se erradicó por completo la infección.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Rodríguez, A.F. 1982. Avances recientes de infecciones por *Chlamydia*. Infectología. 3:195 –201.
- 2.- García, E. G.1987. Biología Molecular e Implicaciones clínicas del género *Chlamydia* (primera de tres partes). Infectología (10):463-473.
- 3.- Santos, J. C. 1982. Enfermedades transmitidas por contacto sexual (segunda de dos partes) Infectología. 2:157-172.
- 4.- Ibarra, C.A. 1982. Aislamiento e identificación de *Chlamydia trachomatis* en exudados uretales. ENCB. IPN. Tesis de licenciatura. pp 1-23, 59-72.
- 5.- Guerra, I. F., López H M.,1999. Mecanismos inespecificos en la eliminación de *Chlamydia trachomatis* . Aspectos microbiológicos y fagocitosis. Perinatol Reprod Hum .1999;13:205-213.
- 6.- Chernesky, M. S., Castriano, J.Sellors, I.Stewart, I. Cunningham. 1990. Detección of *Chlamydia trachomatis* antigens in urine as an alternative to swab an cultures. J. Infect.Dis 161:124-126.
- 7.- García, E.G.1987. Biología molecular e implicaciones clínicas del género *Chlamydia* (segunda de tres partes). Infectología. 11.519-536.
- 8.- Farencena A, Comanducci M, Donati M., Ratti G. and Cevenini R. 1997 Characterization of A New Isolate of *Chlamydia trachomatis* Which Laks the common Plasmid and has properties of Biovar trachoma. Infection and Immunity. p. 2965-69.

- 9.- García, E. G. 1987. Biología molecular e implicaciones clínicas del género *Chlamydia* (tercera de tres partes). *Infectología*. (11): 519-536.
- 10.- Yuriko F. , Solórzano S ., Rendón M., Zuñiga V., Guerra I., Aranda L. 1994. Neumonitis por *Chlamydia trachomatis* en lactantes. *Bol. Med Hosp Infant Méx.* 51(9) :597-600.
- 11.- King, B. R. 2001. Pediatrics, Pneumonia. *Journal Medicine*, 2(8)100-120.
- 12.- Narcio R., Kably A., Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis. 1991. *Perinatol Reprod Hum.* 5(4):181-184.
- 13.- Villegas C., Villanueva D., Solorzano S., Karchmer K. 1989. Esterilidad Conyugal por *Chlamydia trachomatis*. Estudio Ultraestructural. *Perinatol Reprod Hum.* 3(2):70-77 .
363-8.
- 14.- Emre U, Sokolovskaya, Roblin M, Schanter J, Hammerschlag. 1995. Detection of Anti-*Chlamydia pneumoniae* IgE in children with reactive airway disease. *J of Infect Dis* 172:265-7.
- 15.- Ulrich J.H., Krull C; Wuppermann N; Klucken S R; Seybold J; Hegeman H; Jantos A and Suttorp N. 2000. Infection and activation of Airway Epithelial Cells by *Chlamydia pneumoniae*. *J of Infect Dis* 182:1678-87.
- 16.- Salazar L. Martínez R. 1994. Nuevos gérmenes patógenos en vías aéreas inferiores. ¿ Está cambiando el escenario ? *Rev Inst Nal Enf Resp Méx*;7(3):221-223.

- 17.- Grayston T., Campbell L., Cho-Chou Kuo C., Mordhorst p., Thom H and Wang San Pin. 1990. A New Respiratory Tract Pathogen. *Chlamydia pneumoniae* Strain Twar. J of Infect Dis. 161:618-625.
- 18.- Griffith C Platter J, Horigam M and Dawson M .1996. Serological Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion by comparative Inclusion Immunofluorecence Assay, Recombinat Lipopolysacharide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Complement Fixation test. Journal of Clinical Microbiology. 34(6):1512.-1518.
- 19.- Schanter ,J . 1980. Chlamydia. Ann Rev Microbiology. 34:285-308.
- 20.- Rosas S.V.V . 1984. Aislamiento de *Chlamydia trachomatis* en exudados genitales. ENCB. I.P.N. Tesis de Licenciatura. p.p. 14-28.
- 21.- Baudner, S. 1978. Inmunofluorecence Marburg/lahn. Germany. pp. 13-37,51-58,90.
- 22.- Stites P. D. Inmunologia Basica y Clínica .1995 5ª ed. El Manual Moderno México. p.p 342-347,353.
- 23.- Navas, P. 1976., Anticuerpos Fijadores de complemento contra el virus de varicela-zoster. UNAM. Tesis de Licenciatura. pp 46-45
- 24.- Suesa N .N. 1981. Manual de Inmunología General ed. Toray Masson México p.p 117- 120.
- 25.- Chernesy, M.A. Mahony B. James, Seidelman William and Leman C. 1986. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by Enzyme Immunoassay and

immunofluorescence in Genital Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men and Women . J Infectious Diseases. 154(1):141-147.

26.- Caldwell,H.D. Cho-cho Kuo and Kenny George. 1975. Antigenic Analysis of Chlamydiae by two-Dimensional Immunoelectroflorosis. I. Antigenic Heterogeneity Between *C. trachomatis* and *C. psittaci* . J. Immunology. 115(4):963-968.

27.- Mahony J, Luistra K, Sellors J, Chersneky M. 1993. Comparison of Plasmid- and Chromosome Based polymerase Chain Reaction Assays for Detectin *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. Journal of Clinical Microbiology. 31(7): 553-58.

28.- Bassiri M, Domeika M Burczak J, Lee H and P.A Mardh. 1995. Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from women by Ligase chain Reaction journal of Clinical Microbiology. 33(4):898 – 900.

29.- Bassiri M, Mardh P., Domeika M and the European Chlamydia Epidemiology Group. 1997. Multiplex Amplicor PCR S screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women Attending Non-sexually Transmitted Disease Clinics. 35(10): 2556-60.

30.- Letonturier. 1981. Manual de Inmunología General Ed. Masson. Barcelona. p.p.117- 118.

31.- Ibarra C. A., Ojeda López G y Lugo de la Fuente G. 1986. Un ensayo para aislamiento de *C. trachomatis* en exudados uretrales. Lat- Amer Microbiology 28: 95-93.

32.- Oriol, J. D. 1985. Infecciones genitales causadas por *C. trachomatis* ed. Científica PLM. p.p 38-42.

33.- Devitt A, Lund P., Morris A and Pearce John. 1986. Induction of Alpha / Beta Interferon and Dependent Nitric Oxide Synthesis during *Chlamydia trachomatis* Infection of Mc Coy cells in the Absence of Exogenous Cytokine Infection and Immunity. 64(10):3951-56.

34.- Wang, S. P., Kuo, CH and Croy, R.T. 1975. Comparative susceptibility of eleven mammalian cell lines to infection with trachoma organisms. J. of Clinical Microbiology, 1:434-435.

35.- Villegas H. Flores E. 1994. La microscopía electrónica en el diagnóstico de enfermedades infecciosas de transmisión sexual. Experiencia institucional. Perinatol. Reprod Hum. 8(2): 65-71.

36.- Bunnell E. Dahlberg., Rolfs R., Ransom R., Gershman K., Farshy C. Diagnóstico de enfermedades infecciosas de transmisión sexual. Exp; NewHall; Schmid Scott; Stone K and Louis M. 1999. High prevalence and Incidence of Sexually Transmitted Disease in Urban Adolescent Females Despite Moderate Risk Behaviors. Journal of Infect Dis 180:1624-31.

37.- Caldwell H.D. and Cho-Cho kuo. 1977. Purification of *Chlamydia trachomatis* specific antigen by immunoadsorption with monospecific antigen by immunoadsorption with monospecific antibody. J. Immunology. 118(2):437-441.

38.- Caldwell, H.D. and Cho-Cho Kuo. 1977. Serologic diagnosis of Lymphogranuloma Venereum by Counter Immunoelectrophoresis with a *Chlamydia trachomatis*, protein Antigen. J. Immunology. 118(2):442-445

39.- Chernesky M, Lee H, Burczak J., Sellors J and Mahony J. 1994. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. Infections in Men and Women by testing First-Void Urine by Ligase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology. 32 : 2682-85.

40. - Rompalo M.A. Suchland R., Price C. and Stamm W. 1987. Rapid Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Rectal Infections by Direct Immunofluorescence staining. Journal of Infectious Diseases, 155(5):1075.

41.- Paisley. J. W. ,B.A.Laurer, P. Melinkovich, B. A. Gitterman, D. J. Feiten, and S. Berman. 1986. Rapid diagnosis of *Chlamydia trachomatis* pneumonia in infants by direct immunofluorescence of nasopharyngeal secretions. J.Pediatr.109:653-655.

42.- Bell TA, Kuo C, Stamm WE, Tam MR, Stephens RS, Holmes KK, Grayson Jt. 1984. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant *Chlamydia trachomatis* infections. Pediatrics 74:224-228.

43.- Stamm WE, Harrison HR, Alexander E. R. 1984. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by direct immunofluorescence staining of genital secretions. Ann Intern Med 101:638- 41.

- 44.- Ibarra C.A. y Sosa Ceja R. 1991. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres estériles. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. (35):153-159.
- 45.- Paredes, F., Sumano Enriqueta, Escamilla Everardo y Hernández Tomas 1986. Infección genital por *Chlamydia trachomatis* en niñas y adolescentes. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. 43:595-598.
- 46.- Avilés G., Calderón J., Barajas C., Noguerrón S., Valdez C., Marquina G. 1992. Prevalencia de infección cervicovaginal por *Chlamydia trachomatis* en población femenina de la ciudad de Cuernavaca, Morelos. Salud Pública Méx. 34:301-307.
- 47.- Esquivel A. Villanueva G., Castruita L., Cardosa N y Ruiz A. 2000. Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en prostitutas registradas de la ciudad de Durango, México. Salud Pública Méx. 42(1):43-47.
- 48.- Retting M.D. Perinatal Infections with *Chlamydia trachomatis*. 1988. Clinics in Perinatology. 5(2):321-349.
- 49.- Puolakkainen, M., Saikku Pekka, Leinonen M. and Makela H. 1984. *Chlamydia pneumoniae* and its serodiagnosis in Infants. Journal of Infectious Diseases. 149(4):598-604.
- 50.- Hammer, Shlag , M. Roblin P., Cummings C. and Howard L. 1987. Comparison of Enzyme Immunoassays and culture for Diagnosis of Chlamydia Conjunctivitis and Respiratory Infections in Infants. Journal of Clinical Microbiology. 2(12):2306-2308.
- 51.- Madan, E Meyer Michael M.S. Antonio and Amortegui J. 1988. Isolation of genital Mycoplasmas and *Chlamydia trachomatis* in stillborn Neonatal Autopsy material. Arch Pathol Lab. Med. 112(7):749-751.

52.- Evans, L.D. 1988. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Adolescent Females Using Direct Immunofluorescence. *Clinical Pediatrics*. 27(5):223-227.

53.- Tilton, C.R. Judson F, Barnes R, Rya R. and Steingrimsson O. Multicenter. 1988. Comparative Evaluation of two rapid Microscopic Methods and culture for Detection of *Chlamydia trachomatis* in paten Specimens. *J Clinical Microbiology*. 26(2):167-170.

54.- Dawson C., Schacnter S, Sallams, Sheta A. and Washton H. 1997. A comparison of oral Azitromycin with topical oxytetracycline / Polimyxin for the Treatment of trachoma in children. *Clinical Infectious Diseases*. (24):150-154.

55.- Quinn CT. Warfield P., Kappus Elizabeth, Barbaracci M. and Spence M. Screening for *Chlamydia trachomatis*. Infections in a Inner city Population a comparison of Diagnostic Methods. *Journal of Infectious Disease* 152(2):419-423.

56.- Cho Chou and Grayston Thomas. 1988. Factors Affecting Viability and Growth in Hela 229 cells of *Chlamydia sp.* strain twar. *J. Clinical Microbiology*. 26(5)812-815.

57.- Ledesma , A. D. 1972. *Estadística Medica*. ed . Universidad de Buenos Aires Pp.227-260

58.- Murray S .1970. *Teoria y propiedad estadística*. Ed. Mc Graw Hill México p.p. 167,201 217.

59.- Reyes, C.R. *Bioestadística aplicada* 1982. ed. Trillas México p,p 181-185,214.

60.- Ibarra, L.D. Wite Susana and B.S Pauline. 1986. Childhood vaginal infections: association of *Chlamydia trachomatis* whit sexual contac. Pediatric Infectious Disease 5 (2):226-229.

61. - Bauwens, Clarkagnes, Loffelnolz M, Herman S and Stam W. 1993. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Urethritis in men by polymerase Chain Reaction Assay to First-Catch Urine. Journal of clinical Microbiology. 31 (11):3013-16.

62.- Ostergaard L., and Mollers J. 1995. Use of PCR and Direct Immunofluorescence Microscopy for Confirmation of Results Obtained by Syva Micro Trak Chlamydia Enzyme Immunoassay. 33 (10):2620 -2623.

63.- Daruger S. N Andouble 1981. Bind comparison of topical therapy of Chlamydia ocular infection (Tric infection) with rinfampicina Chlortetracyline Br. J. Ophthalmology 65 (8): 549-552.

Apéndice No. 1

Medio de transporte Leibointz(ML-1 5)

- 1.- Transferir 1ml del medio ML-15 con la muestra del aspirado, bronquial, exudado faríngeo, exudado ocular o exudado genital agregar:

Estreptomicina50µg
Penicilina..... 100 µg
Mezcla de Antimicóticos..... 50µg

- 2.- Centrifugar a 3000 r.p.m. por 10 minutos para eliminar moco con hidróxido de sodio al 1.5%.
- 3.- Del sobrenadante tomar 400 µl e inocular a tubos de 22 x 175mm con tapón de rosca de cultivo celular Hep-2, las cuales deben tener una concentración de 3×10^5 cel / ml
- 4.- Incubar a 37° C de 4 a 10 días y observar diariamente

Apéndice No. 2

Prueba de fijación de complemento (8)

1. Inactivar los sueros problema, el control positivo y negativo en un baño serológico a una temperatura de 56°C durante 30 minutos con el objeto de inactivar anticuerpos inespecíficos al cabo de las cuales sacar del baño serológico los sueros y colocar sobre hielo.
2. Preparar material.
3. Rotular las microplacas.
4. Colocar en todas las cavidades que se van a usar de la microplaca (de 96 pozos de poliestireno con fondo en "u") 0.025 ml de solución amortiguadora GVB (gelatina veroral barbital).
5. En las tres primeras cavidades de la microplaca agregar 0.25 del suero- problema y hacer las diluciones correspondientes de 1:2 hasta 1:128.
 - a) La primera hilera horizontal debe corresponder

0.25 ml de GVB

- " de la dilución del suero problema
- " del antígeno de *Chlamydia* a 2 unidades
- " del complemento a 2 unidades

Esta hilera sirve para detectar los anticuerpos presentes en el suero.

b) la segunda hilera horizontal debe contener:

0.25 ml de GVB

- “ de la dilución
- “ del suero problema
- “ del control negativo del antígeno
- “ de complemento a 2U

Esta hilera sirve para comprobar que los anticuerpos presentes en las reacciones positivas corresponden a *Chlamydia* y no a proteínas de las células en las que se replicó *Chlamydia* para preparar el antígeno.

c) La tercera hilera horizontal debe de contener:

0.25 ml de GVB

- “ de la dilución del suero problema
- “ de complemento a 2U.

Esta hilera sirve para comprobar si hay o no anticomplementariedad en el suero problema.

Los tres pasos anteriores deben hacerse para cada suero problema.

6. Junto con los sueros problemas deben correrse los siguientes controles.

- Control de suero positivo.
- Control de anticomplementaridad del suero positivo.
- Control negativo del Ag con el suero positivo.
- Control del suero negativo.

- Control de anticomplementariedad del suero positivo.
 - Control negativo del Ag con el suero negativo.
 - Control del antígeno positivo de *Chlamydia*.
 - Control negativo del antígeno.
 - Control de complemento a diferentes unidades
 - Control de eritrocitos sensibilizados.
7. Agitar perfectamente las placas, taparlas con papel parafilm y refrigerar a 4°C durante 18 a 24 Hrs.
 8. Al cabo de este tiempo colocar las placas a temperaturas ambiente durante 15 minutos aproximadamente.
 9. Para una cantidad adecuada de eritrocitos de carnero sensibilizados añadir a cada cavidad 0.05 ml de eritrocitos.
 10. Agitar nuevamente las placas con el objeto de homogeneizar perfectamente, tapar e incubar a 37°C en cámara húmeda durante 30 a 40 minutos. Con agitación cada diez minutos. Se puede dejar durante 15 minutos a 4°C para interpretarlas, o para mayor rapidez centrifugar a 2000 r.p.m. por 2 o 3 minutos. En centrifuga refrigerada.
 - 11 Leer e interpretar.

Apéndice No. 3

Inmunofluorescencia.

- 1.- Sembrar células Hep - 2 en botella de Rouk Incubar 7 días
- 2.- Lavar la monocapa e infectar con *Chlamydia*, adsorber por 6 min. a 37°C.
- 3.- Agregar 30 ml de medio ML - 15 con 2% de SFT (suero fetal de ternera).
- 4.- Incubar de 3 - 5 días antes de que se desprenda la monocapa.
- 5.- Colocar en frío y desprender la monocapa.
- 6.- Centrifugar y colectar al pellet el sobrenadante, y se guarda ya que es antígeno soluble.
- 7.- El pellet se lava con PBS (solución balanceada de fosfatos pH= 7.3).
- 8.- Contar las células.
- 9.- Colocar en laminillas para fluorescencia aproximadamente 2×10^5 células por pozo (se hace una suspensión del total del paquete en 5 ml de PBS y se colocan 20 μ l de suspensión en cada pozo).
- 10.- Fijar con acetona o acetona metanol por 3 minutos.
- 11.- Guardar en congelación a $- 20^{\circ}\text{C}$

Inmunofluorescencia indirecta

- 1.- Colocar 20 μ l de suero problema.
- 2.- Incubar 45 min. En cámara húmeda a 37°C.
- 3.- Lavar con PBS por cinco min. Dos ocasiones en agitación.
- 4.- Agregar el conjugado 15 μ l por pozo a una concentración de 1:40.
- 5.- Incubar 45 min. En cámara húmeda de 37°C.
- 6.- Lavar con PBS por 5 min. Dos ocasiones con agitación.
- 7.- Montar con glicerina amortiguada
- 8.- Leer.

Apéndice No. 4

Extracción de antígeno de *C. trachomatis*

Se propagan células Hep-2 y se infectaron con una muestra de un paciente que se comprobó clínicamente que estaba infectado con *C. trachomatis*.

Se observó el efecto citopatogénico en las células y cuando hubo un 80% a 90% de él se cosechó por congelación descongela ción brusca.

La extracción del antígeno se hizo de la siguiente manera de Extracción con Tween 80/ éter.

- 1.- Adicionar 0.125 ml de Tween 80 a 100 ml de suspensión de *Chlamydia trachomatis*.
- 2.- Agitar a 4°C por 15 minutos
- 3.- Agregar un volumen igual de etil, éter a la mitad del volumen de antígeno.
- 4.- Agitar a 4°C por 15 minutos.
- 5.- Centrifugar a 1,800 r.p.m. por 30 min. a 4°C.
- 6.- Colectar la fase acuosa y descartar el éter.
- 7.- Burbujear nitrógeno o aire para remover el éter.
- 8.- Demostrar la pureza y eficiencia del antígeno para ensayos biológicos.

Alícuota 2 cosecha del antígeno.

El título del antígeno que se tomará en cuenta estará dado por la más alta dilución del antígeno que se muestre fijación de complemento de 3 - 4 (positivos) a la más alta dilución de suero positivo esto es igual a 1U, para la prueba de fijación de complemento, se requieren 2U.

Fórmula:

$$\frac{\textit{título de antígeno}}{\textit{unidades deseadas}} = 2U$$

Apéndice No. 5

Titulación de antígeno.

El antígeno se diluye en tubos de 13 x 100 desde 1:2 hasta 1:256. Mientras se preparan las diluciones, inactivar el suero control positivo y negativo a 56°C por 30 min.

- 1.- En una microplaca agregar 0.025 ml de GVB en todos los pozos.
- 2.- En la primera hilera vertical de la microplaca agregar 0.025 ml de suero positivo en cada cavidad y con los microdilutores hacer diluciones en sentido horizontal desde 2 hasta 256 descartando el resto de los microdilutores.
- 3.- Agregar el antígeno de la siguiente manera:
a la primera hilera horizontal agregar 0.025 ml de la dilución 1:2 de antígeno y así sucesivamente hasta 128 en cada hilera.
- 4.- Agregar a todos los pozos 0.025 ml de complemento en su dilución óptima. Incubar a 37°C por dos horas, incubar a temperatura ambiente 15 minutos y agregar una suspensión de eritrocitos al 2% sensibilizados con hemolisina (0.05 ml) incubar a 37°C por 30 min. con agitación constante cada diez minutos retirar , refrigerar a 4°C por 15 minutos interpretar.

Apéndice No. 6

Eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina

- 1.- Lavar los eritrocitos tres veces con GVB.
- 2.- Preparar una suspensión de eritrocitos al 2% en GVB.
- 3.- Sensibilizar con hemolisina de la siguiente manera: El título de la hemolisina se ajusta a 2 unidades fijadoras de complemento.
- 4.- Hacer una suspensión 1: 1 del volumen de eritrocitos al 2% más 2 unidades de hemolisina.
- 5.- Incubar a 37°C durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos.

NOTA: Se preparan eritrocitos al momento del ensayo y cada vez que sean necesarios.

Apéndice No. 7

Conjugación de Inmunoglobulinas

La conjugación de las inmunoglobulinas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se realiza dentro de un pH de 9 a 9.5. Se adiciona el FITC seco a una solución que contiene 9µg/ml de proteínas en solución salina y 10% en volumen de buffer de carbonato con el colorante.

La relación colorante proteína es de 2 µcg de (FITC) /9mg/ml.

La mezcla se agita cuidadosamente durante 3 hrs. a temperatura ambiente el pH debe controlarse a valores de 9 a 9.5 se ajusta si es necesario con una solución de buffer de fosfato trisódico. Se mantiene 24 hrs. en refrigeración a 4°C, al término de la conjugación el fluorocromo libre, es eliminado por diálisis con una solución salina isotónica amortiguadora con boratos por 5 días, al concluir el tiempo se realizan pruebas por Espectrofotometría contra el blanco de agua destilada hasta tener la misma absorbancia.

Después se centrifuga en una centrifuga de refrigeración a 5,000 r.p.m. durante media hora a 4°C protegido de la luz hasta el momento de montar el método de Inmunofluorescencia Directa.

Apéndice No. 8

Cultivo celular.

Línea celular Hep - 2 (células de carcinoma laríngeo humano)

- 1.- Desprender con tripsina al 0.25% aproximadamente 4 ml, cuando se trata de una botella de 250 ml y cuando sean 75 ml se utilizan 0.5 ml de tripsina.
- 2.- Incubar por 10 minutos a 37°C y desprender en 10 ml de medio golpeando vigorosamente a expeler el medio (20 a 30 pipeteos).
- 3.- De una botella de falcon de 75 ml., sacar 4 botellas del mismo volumen hacer para pase. Estas estarán en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 4 días.

Observar diariamente para saturación de la monocapa.

MEM en base EARLE.....	100 ml
Suero de ternera.....	10 ml
Antibióticos	1 ml
Gentamicina 50 µg/ml.....	1 ml
Penicilina 100 µg/ml	
Fungizona.....	1 ml
Bicarbonato 4.4.....	1 ml

Preparación de Tubos.

Las células de una botella de falcon de 75 ml diluir en 40 ml de medio y agregar 1 ml por tubo de 16 x 150 con tapón de rosca. Una vez sembradas las células colocar hacia arriba la etiqueta. La concentración de células es de aproximadamente 3×10^5 células/ ml

Para inoculación de tubos

- 1.- Descartar el medio sobrenadante.
- 2.- Agregar el inculo aproximadamente en 0.5 ml y dejar absorber por 10 minutos y agregar 1 ml de medio de sostén. Inocular y observar cada 24 horas hasta por 6 días. Es recomendable hacer el inculo por triplicado considerando los controles.

Medio de sostén o soporte.

M - 199.....	100 ml
Suero de ternera	3 ml
Bicarbonato.....	1.6%
Antibióticos	3 ml

Apéndice No. 9.

Inmunofluorescencia Directa

- 1.- Fijar frótis de células de los pacientes con acetona metanol por 3 min.
- 2.- Congelar a -20°C
- 3.- Preparar conjugado 1:60
- 4.- Agregar 20 μl . por laminilla
- 5.- Incubar a 37°C por 45 minutos.
- 6.- Lávar dos veces durante 5 minutos con PBS
- 7.- Montar con glicerina.
- 8.- Leer.

Apéndice No. 10

INFECCION NEONATAL POR Chlamydia (1988)

NOMBRE _____ REG _____ FECHA ING. _____ EDAD _____
 E.GEST. _____ SEXO _____ PESO _____ TALLA _____
 HOSPIT. PREVIA _____ DIAS _____ MEDICAMENTOS _____
 MADRE EDAD _____ LEUCORREA _____ SINT. URINARIOS _____
 CULTIVOS _____ SEROLOGIA _____ IF _____
 NEONATO: FIEBRE _____ HIPOTERMIA _____ APNEAS _____ TOS _____
 DIF. RESPIR. _____ VENTILADOR _____ COMPLIACIONES _____
 IRRITABILIDAD _____ LETARGIA _____ CONVULSIONES _____
 VOMITOS _____ DIARREAS _____ RECHAZO V.O. _____
 DIST. ABDOMINAL _____ SECRE. CONJUNTI _____ HEPATOMEG _____
 ESPLENOMEG _____ ICTERICIA _____ EXANTEMA _____
 HEMORRAGIA EN: _____ HIPOTENSION _____ CHOQUE _____ ENTEROC _____
 BNEUM _____ -MENING _____ OTITIS _____ LEUCOC _____
 SEGM _____ BANDAS _____ JUVEN _____ PLAQ _____
 VSG _____ PROT. SER. (A/G) _____ BIL. INDRIB _____
 BIL. DIR _____ ACIDOSIS _____ MET _____
 RESP _____

CULTIVOS	FECHA	AGENTE
SANGRE	_____	_____
LGR	_____	_____
ASPIR. BRONQ	_____	_____
CONJUNTIVITIS	_____	_____
OTROS	_____	_____

SEROLOGIA _____ IF _____

RX	FECHA	HALLAZGOS
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

FECHA EGRESO _____ CURACION _____ MUERTE _____

OBSERVACIONES _____

Apéndice No. 11

Análisis estadístico X^2 con niños < 3 meses
comparando R F C' VS I F I para C. trachomatis
 X^2

Método	Positivos o e	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
R F C'	12	38	50	2.88	1.884	4.764
	19.5	30.5				
I F I	27	23	50	2.88	1.884	4.764
	19.5	30.5				
TOTAL	39	61	100	5.76	3.768	9.52

R F C' - Reacción de Fijación de complemento.

I F I - Inmunofluorescencia Indirecta

o - Observados

e - esperados

$X^2 = 3.84$ (tablas) $X^2 c = 9.52$ (calculada)

0.05 $X^2 c > X^2 t$

Apéndice No. 12 Análisis estadístico χ^2 con niños < 3 meses
comparando R F C' VS I F D para C. trachomatis

17

Método	Positivos		Negativos		Total	Positivos	Negativos	Total
	o	e						
R F C'	12		38		50	4.545	3.571	8.116
		22		28				
I F D	32		18		50	4.545	3.571	8.116
		22		28				
TOTAL	44		56		100	9.09	7.147	16.23

R F C' - Reacción de Fijación de complemento.

I F D - Inmunofluorescencia Directa

o - Observados

e - esperados

$\chi^2 t = 3.84$ (tablas) $\chi^2 c = 16.23$

0.05

$\chi^2 c > \chi^2 t$

Apéndice No. 13 Análisis estadístico χ^2 con niños < 3 meses
comparando IFI VS IFD para C. trachomatis χ^2

Método	Positivos o	Positivos e	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
IFI	27		23	50	0.211	0.3048	0.5158
		29.5					
			20.5				
IFD	32		18	50	0.211	0.3048	0.5158
		29.5					
			20.5				
TOTAL	59		41	100	0.4228	0.6096	1.032

IFI - Inmunofluorescencia Indirecta.

IFD - Inmunofluorescencia directa

o - Observados

e - esperados

$\chi^2 t = 3.84$ (tablas) $\chi^2 c = 1.032$

0.05

$\chi^2 c > \chi^2 t$

Apéndice No. 14 Análisis estadístico X^2 en adolescentes
comparando R F C' VS I F I para C. trachomatis X^2

Método	Positivos o e	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
R F C'	11	9	20	0.4629	0.96153	1.424
	13.5	6.5				
I F I	16	4	20	0.4629	0.96153	1.424
	13.5	6.5				
TOTAL	27	13	40	0.4629	1.92306	2.848

R F C' - Reacción de Fijación de complemento.

I F D - Inmunofluorescencia Indirecta

o - Observados

e - esperados

$X^2 t = 3.84$ (tablas)
0.05

$X^2 c = 2.31$

$X^2 c > X^2 t$

Análisis estadístico X^2 en adolescentes
comparando R F C' VS I F D para C. trachomatis
 X^2

Método	Positivos o e	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
R F C'	11	9	20	0.4629	0.96153	1.424
	13.5	6.5				
I F D	16	4	20	0.4629	0.96153	1.424
	13.5	6.5				
TOTAL	27	13	40	0.9259	1.92306	2.848

R F C' - Reacción de Fijación de complemento.

I F D - Inmunofluorescencia Directa

o - Observados

e - esperados

$X^2 t = 3.84$ (tablas)

$X^2 c = 2.31$

0.05

$X^2 c > X^2 t$