

Instituto Nacional de Endocrinología

DETECCIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN MUESTRAS DE EXUDADO ENDOCERVICAL POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Lic. Maydelín Frontela Noda,¹ Lic. Isis Amores Sánchez,² Dra. Sanda Yépe Oliveros,³ Dra. Vivian Kourí,⁴ Lic. Raúl Ferreira Capote⁵ y Dr. Lorenzo Mallea Sánchez⁶

RESUMEN

Se procesaron 59 muestras de exudado endocervical, de mujeres que asistieron a 2 clínicas de infertilidad y a consulta de regulación menstrual de Ciudad de La Habana, para evaluar el desempeño de un método de detección de *Chlamydia trachomatis*, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores KL1 y KL2, específicos para el plásmido. Las muestras se ensayaron por PCR-plásmido, por cultivo de células y por otro método de PCR basado en la amplificación de una región de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) de la *Chlamydia*, este se utilizó como ensayo confirmatorio. Se comprobó que en 43 muestras los resultados coincidían entre el cultivo y el PCR-plásmido: 4 positivas y 39 negativas. Las 16 restantes brindaron resultados discordantes. Se les realizó un estudio de inhibición a las 8 muestras cultivo positivas/PCR-plásmido negativas y se comprobó que 2 de ellas presentaban inhibidores, cuya acción fue revertida al adicionar BSA a la mezcla de reacción. De las 8 discordantes, cultivo negativo/PCR-plásmido positivas, 5 se confirmaron como positivas después del procesamiento por PCR-MOMP. Tomando como criterio de verdadero positivo la coincidencia de al menos 2 de los 3 métodos ensayados, se obtuvo sensibilidad del 100 % y especificidad del 94% para el PCR-plásmido en comparación con el 54 y 87 %, respectivamente para el cultivo. El PCR-plásmido presentó un valor predictivo positivo de 79 % y negativo de 100 %, mientras que para el cultivo fue de 50 y 89%, respectivamente. Se demostró que el PCR-plásmido, en nuestras condiciones de laboratorio, brinda resultados confiables en el diagnóstico de la *Chlamydia* en muestras de exudado endocervical.

DeCS: CHLAMYDIA TRACHOMATIS; REACCION EN CADENA POR POLIMERASA/métodos; PLASMIDOS; TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO; ENFERMEDADES SEXUALMENTE TRANSMISIBLES.

- ¹ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instituto Nacional de Endocrinología.
- ² Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras."
- ³ Especialista de I Grado en Inmunología. Investigadora Agregada. Instituto Nacional de Endocrinología.
- ⁴ Especialista de I Grado en Microbiología. Master en Virología. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí."
- ⁵ Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras."
- ⁶ Especialista de I Grado en Inmunología. Investigador Agregado. Instituto Nacional de Endocrinología.

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, anualmente se detectan 89 000 000 de nuevas infecciones por *Chlamydia trachomatis* en el mundo.¹ Esta infección provoca uretritis y cervicitis, y las secuelas incluyen enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico, infertilidad por daño tubárico, epididimitis, proctitis y artritis reactiva.² Se considera principalmente un problema de salud en la mujer, en ella las manifestaciones y consecuencias son más dañinas para la salud reproductiva.³ Los individuos infectados con *Chlamydia trachomatis* pueden portar el microorganismo por meses o años y transmitir la enfermedad a sus parejas sexuales. Su diagnóstico sigue siendo un reto, ya que quienes la padecen presentan síntomas muy leves o son portadores asintomáticos.⁴

Tradicionalmente, el cultivo celular se ha considerado el método de elección para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, sin embargo, los requerimientos especiales para el manejo de las muestras, el tiempo consumido para llegar al resultado y su baja sensibilidad propiciaron la introducción de los métodos serológicos. Aunque estos últimos no superan la sensibilidad del cultivo, constituyen una opción más asequible para el diagnóstico. Actualmente, con la introducción de las técnicas de amplificación del ADN se cuenta con un ensayo relativamente simple y de mayor sensibilidad que el método tradicional.⁵ Las pruebas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no están exentas de desventajas, por ejemplo, su tendencia a brindar resultados falsos positivos por contaminación cruzada y su alto costo; sin embargo, el uso de estos ensayos disminuye los gastos asociados al tratamiento de las secuelas producidas por *Chlamydia trachomatis* y al empleo de tecnologías médicas altamente costosas,

como la fertilización *in vitro* y la cirugía ginecológica de mínimo acceso.⁶

En Cuba se han realizado escasos y limitados estudios de prevalencia de esta infección y el diagnóstico no está disponible en nuestros servicios de salud. Este trabajo de colaboración entre el Hospital Clínicoquirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” y el Instituto Nacional de Endocrinología tuvo como objetivo evaluar el desempeño, en nuestras condiciones de laboratorio, de un método de detección de *Chlamydia trachomatis* por PCR en muestras de exudado endocervical, y de esta forma crear las bases para la realización de futuros trabajos asistenciales e investigativos en la población cubana.

MÉTODOS

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Estudiamos 59 mujeres (rango de edad: 15 a 42 años), 38 de la Consulta de Regulación Menstrual del Hospital “Ramón González Coro” y 21 de las consultas de Infertilidad del Hospital “Hermanos Ameijeiras” y del Instituto Nacional de Endocrinología. Utilizamos un hisopo plástico estéril para el exudado endocervical y lo colocamos en 2 mL de medio de transporte sacarosa fosfato (2SP). Almacenamos las muestras a -70 °C y en el momento de procesarlas las descongelamos y las dividimos en 2 alícuotas de igual volumen para cultivo y PCR.

CULTIVO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Utilizamos células McCoy tratadas con cicloheximidina en placas de 24 pozos, y

detectamos las inclusiones mediante el uso de un anticuerpo monoclonal antiproteína principal de la membrana externa de la *Chlamydia* conjugado con fluoresceína (Imagen TM *Chlamydia*, DAKO), según se describió previamente.⁷

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA PCR

Centrifugamos una alícuota de 1 mL de exudado endocervical en medio 2SP a 10 000 rpm durante 10 min. Resuspendimos el precipitado en 50 mL de tampón de lisis celular (Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 1 %, proteinasa K 0.2 mg/mL) y lo incubamos por 1 h a 56 °C y toda la noche a temperatura ambiente. Inactivamos la proteinasa K calentando a ebullición durante 10 min. Conservamos las muestras a -20 °C hasta la realización del ensayo de PCR.

PCR-PLÁSMIDO⁸

Utilizamos los cebadores KL1 y KL2 para amplificar un fragmento de 24 pb del plásmido críptico de la *Chlamydia* (KL1: 5' TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA 3' y KL2: 5' AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT 3'). Realizamos la PCR en un volumen de reacción de 25 mL y la mezcla contenía MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9), KCl 50 mM, Tritón X-100 al 1 %, desoxinucleótidos trifosfatos 200 mM, cebadores 1 mM, Taq DNA polimerasa 1 U (Promega). Utilizamos 2,5 mL de muestra de exudado endocervical procesada como se describió previamente.

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo incluyó un paso de desnaturalización

a 94 °C por 1 min, un paso de unión a los cebadores a 55 °C por 1 min y un paso de elongación a 72 °C por 2 min. El paso de elongación final fue de 5 min.

NESTED-PCR-MOMP⁹

El término Nested-PCR, cuya traducción del inglés es PCR-anidado, se utiliza para designar un ensayo de PCR que se realiza en 2 etapas. En la primera se amplifica un fragmento grande del gen seleccionado con un juego de cebadores específicos, y en la segunda, uno más pequeño, a partir del producto amplificado obtenido en el primer paso, con un juego de cebadores diferentes.

En la primera etapa utilizamos los cebadores FLS y FLA para amplificar un fragmento de 1 200 pb del gen que codifica para la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (FLS: 5' CTC TTG AAA TCG GTA TTA GTA TTT GCC GCT 3' y FLA: 5' TTA GAA GCG GAA TTG TGC ATT TAC GTG AGC 3'). En la segunda etapa, utilizamos los cebadores Nest 2 y Nest 4 para amplificar un fragmento de 345 pb a partir de 1 mL del producto amplificado obtenido en la primera etapa (Nest 2: 5' CAT GAG TGG CAA GCA AGT TTA 3' y Nest 4: 5' GCT CTC TCA TCG ATC AAG CG 3'). Realizamos la PCR en un volumen de reacción de 50 mL y la mezcla contenía MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9), KCl 50 mM, Tritón X-100 al 1 %, desoxinucleótidos trifosfatos 200 mM, cebadores 0,5 mM, Taq DNA polimerasa 1 U (Promega). Utilizamos 5 mL de muestra de exudado endocervical procesada como se describió previamente.

La primera etapa de amplificación consistió en una desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo incluyó un paso

de desnaturalización a 94 °C por 1 min, un paso de unión a los cebadores a 60 °C por 1 min y un paso de elongación a 72 °C por 2 min. El paso de elongación final fue de 7 min. En la segunda etapa de amplificación utilizamos una temperatura de unión a los cebadores de 46 °C.

Paralelamente a las muestras, ensayamos controles negativos y positivos (DNA del serovar L2) en ambos métodos de PCR. Finalmente, analizamos 10 mL del producto amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1,5 % y tinción con bromuro de etidio 0,2 mg/mL.

ESTUDIO DE INHIBICIÓN¹⁰

Después de reanalizar las muestras con un resultado positivo por cultivo y negativo por PCR -plásmido, realizamos un estudio para verificar la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa. A las muestras no diluidas se les añadió 30 UFI de una cepa del serovar L2 de la *Chlamydia* y se les realizó PCR-plásmido. Diluimos desde $\frac{1}{2}$ hasta $\frac{1}{10}$ aquellas muestras que presentaron inhibición para comprobar si la acción de los inhibidores desaparecía al disminuir su concentración. Adicionalmente, se analizaron las muestras por PCR-plásmido en presencia de BSA (167 μ g/mL).

ANÁLISIS DE RESULTADOS DISCORDANTES

A las muestras con un resultado negativo por cultivo y positivo con PCR -plásmido se les realizó otro PCR basado en la amplificación de una región del gen que codifica para MOMP. Un resultado positivo por PCR-MOMP demostró que la muestra contenía DNA que codificaba para MOMP además del DNA del plásmido críptico. El

ensayo de PCR-MOMP se le realizó a todas las muestras (n = 59), no sólo a las discordantes, y se utilizó como criterio de verdadero positivo la coincidencia de al menos 2 de los 3 métodos ensayados: cultivo, PCR-plásmido o PCR-MOMP.

RESULTADOS

La figura muestra los productos típicos que se obtienen con los 2 métodos de amplificación utilizados, empleando DNA del serovar L2 de la *Chlamydia* que se utiliza como control positivo de los ensayos. De las 59 muestras estudiadas, 43 presentaron resultados coincidentes entre el cultivo y el PCR-plásmido: 4 positivas y 39 negativas. Las 16 restantes brindaron resultados discordantes (tabla 1).

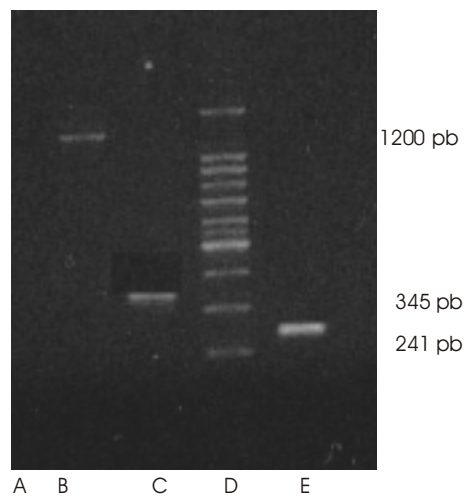


FIG. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación típicos que se obtienen por los 2 métodos de amplificación, utilizando DNA del serovar L2 de la *Chlamydia* como control positivo A) Control negativo, B) PCR-MOMP (primera etapa), C) PCR-MOMP (segunda etapa), D) Marcador de peso molecular 100 pb, E) PCR-plásmido.

TABLA 1. Resultados del cultivo y PCR-plásmido para detectar *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudado endocervical (n = 5)

Cultivo	PCR-plásmido		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	8	12
Negativo	8	39	47
Total	12	47	59

Las 8 muestras positivas por cultivo, pero negativas por PCR-plásmido se analizaron para verificar la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa (tabla 2). Primero se les añadió una cantidad conocida de cepa de *Chlamydia trachomatis* (serovar L2), de manera que si estaban presentes las sustancias inhibitorias no se obtuviera producto amplificado. Con este experimento demostramos la presencia de inhibidores en las muestras 56 y 57, que representan el 3,3 % (2/59) de la muestra total. Realizamos varias diluciones de estas muestras para disminuir la concentración de los inhibidores, pero no se obtuvo un resultado positivo a ninguna de las diluciones. Posteriormente, se añadió BSA a la mezcla de reacción y ambas muestras se convirtieron en positivas.

De las 8 muestras negativas por cultivo, pero positivas por PCR-plásmido: 5 se

confirmaron como positivas al utilizar un segundo ensayo de PCR con cebadores dirigidos a amplificar una región del gen de MOMP, se excluyó la posibilidad de que el resultado positivo de la PCR original fuera por contaminación cruzada (tabla 3). Estas 5 muestras las consideramos falsas negativas del cultivo, teniendo en cuenta que es un método menos sensible, ya sea por razones técnicas o por las condiciones especiales que requiere para la transportación de las muestras. El resto de las muestras (3/59) las consideramos falsas positivas del PCR-plásmido.

TABLA 3. Procesamiento de muestras discordantes cultivo negativas / PCR-plásmido positivas

No. de muestra	Cultivo	PCR-plásmido	PCR-MOMP
32	-	+	-
36	-	+	+
37	-	+	-
41	-	+	+
42	-	+	+
45	-	+	+
59	-	+	+
61	-	+	-

TABLA 2. Estudio de inhibición

Número de muestra	Cultivo	PCR-plásmido	Estudios de inhibición		
			Añadiendo cepa L2	Diluciones (1/2 – 1/10)	Añadiendo BSA
11	+	-	No Inh		-
13	+	-	No Inh		-
17	+	-	No Inh		-
35	+	-	No Inh		-
40	+	-	No Inh		-
51	+	-	No Inh		-
56	+	-	Inhibición	-	+
57	+	-	Inhibición	-	+

TABLA 4. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del cultivo, PCR-Plásmido y PCR-MOMP para detectar *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudado endocervical

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Cultivo	54	87	50	89
PCR-MOMP	64	100	100	92
PCR-plásmido	100	94	79	100

Criterio de verdadero positivo: Coincidencia de al menos 2 de los 3 métodos ensayados

En la tabla 4 se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, predictivo positivo y negativo del cultivo, el PCR-plásmido y el PCR-MOMP obtenidos en nuestro trabajo, teniendo en cuenta como criterio de verdadero positivo la coincidencia de al menos 2 de los 3 métodos estudiados. El cultivo presentó una baja sensibilidad (54 %) comparado con el PCR-plásmido (100 %).

DISCUSIÓN

Una de las inquietudes de los investigadores sobre el uso de las tecnologías de amplificación del DNA en el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual, es la presencia de inhibidores de la actividad de la DNA polimerasa en las muestras de exudado y en la orina. Aunque se sabe que el grupo hemo inhibe la PCR, se desconoce la naturaleza de todas las sustancias inhibitorias presentes en estas muestras. Algunos procedimientos se han utilizado con éxito en la eliminación de los inhibidores -como la dilución, el calentamiento a temperaturas mayores de 95 °C o la congelación a -70 °C.¹¹⁻¹³ El bajo porcentaje de inhibición (3,3 %) encontrado en nuestro trabajo puede explicarse por el procesamiento de las muestras previo a la PCR, donde se incluyen 2 pasos que pueden contribuir a la eliminación de los inhibidores,

como la congelación a -70 °C y el calentamiento a ebullición para inactivar la proteinasa K. Algunos compuestos como el dimetilsulfóxido, el glicerol y la espermidina, entre otros, se han utilizado para contrarrestar el efecto inhibitorio de algunos componentes de las muestras clínicas, ya que se ha demostrado que pueden potenciar la reacción de amplificación.¹⁴ En este trabajo, la adición de BSA acetilada a la mezcla de reacción, que funciona como un estabilizador de la enzima, revirtió el efecto inhibitorio en 2 de las muestras, por lo que sugerimos introducir esta modificación en el ensayo de rutina.

Como se demostró experimentalmente, el hecho de que 6 muestras positivas por cultivo continuaran brindando un resultado negativo por PCR no puede ser explicado por la presencia de inhibidores. Podríamos pensar que la negatividad por PCR-plásmido se debió a una insuficiente cantidad de DNA en la alícuota destinada a la PCR, suponiendo que en estas muestras estuviera presente sólo un reducido número de bacterias y que la homogeneización en estos casos fue inadecuada. Otra posible explicación de este resultado podría ser la presencia de artefactos fluorescentes o uniones inespecíficas del anticuerpo monoclonal que pudieran confundir al observador y brindar resultados falsos positivos por cultivo.¹⁰

Otra preocupación acerca del uso de la PCR en los laboratorios clínicos es la posibilidad de brindar resultados falsos positivos por la contaminación cruzada o por la alta sensibilidad intrínseca del ensayo. En este estudio, el PCR-plásmido brindó 3 resultados falsos positivos, a pesar de haber cumplido con las medidas recomendadas para minimizar la contaminación cruzada, como la separación de las áreas de preamplificación y posamplificación, y la utilización de un flujo de trabajo unidireccional.¹⁵

En el pasado, el cultivo celular se consideró como la regla de oro para evaluar el diagnóstico de *Chlamydia*, sin embargo, en la actualidad es aceptado universalmente que el cultivo no puede ser utilizado como método de referencia, ya que aun en los laboratorios más experimentados su sensibilidad es de 75 a 85 %.¹⁶

El análisis de resultados discordantes, que utiliza un método alternativo para identificar las muestras verdaderas positivas, no detectadas por el cultivo, es un intento por mejorar el desempeño del método de referencia, sin embargo, si esas muestras con resultados discordantes sólo se analizan por el método confirmatorio, se introduce un sesgo,¹⁷ ya que teóricamente se puede favorecer el desempeño de la prueba que se está evaluando.¹⁶ Se ha sugerido la utilización de varios ensayos de referencia imperfectos para definir una mejor regla de oro en la evaluación de un nuevo ensayo.¹⁸

En este estudio obtuvimos una baja sensibilidad para el cultivo (54 %) en comparación con la del PCR-plásmido (100 %). La sensibilidad de los *test* comerciales, que se basan en la amplificación de una región del plásmido críptico de la *Chlamydia*, es mayor del

90 % y varía en dependencia del tipo de ensayo y del tipo de muestra que se utiliza para el análisis.

Un estudio llevado a cabo para evaluar el *test* AMPLICOR para la detección de *Chlamydia*, que involucró a 6 laboratorios de los Estados Unidos, mostró una alta variabilidad en las sensibilidades del cultivo (20 %-93 %).⁴ Esta variación puede deberse a las diferencias en la habilidad para colectar la muestra, en el transporte, en las condiciones de almacenamiento y en la destreza de los laboratorios. Afortunadamente, la sensibilidad del PCR presentó muy poca variación, lo cual sugiere que este método es menos dependiente de esos factores, esto representa otra ventaja del PCR sobre el cultivo celular.

En resumen, el PCR-plásmido demostró ser un método sensible y específico para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en nuestras condiciones de laboratorio. No obstante, para lograr una mayor confiabilidad en los resultados, recomendamos introducir un control interno del ensayo, que consiste en la amplificación de una región del gen de la β -globina, proteína que se expresa en las células epiteliales humanas que funcionan como hospederos de esta bacteria. Aunque no constituye un objetivo de nuestro trabajo, el 15 % de los individuos seleccionados para este estudio fueron positivos a *Chlamydia*, y si tenemos en cuenta sólo la población menor de 24 años, los individuos infectados fueron el 23 %. Estos datos deben ser analizados con cautela porque el tamaño de la muestra es muy pequeño, pero nos indican la necesidad de realizar estudios más abarcadores sobre la prevalencia de esta infección, sus efectos sobre la salud reproductiva, así como los factores de riesgo asociados a ella.

SUMMARY

59 samples of endocervical exudate from women that were seen at infertility clinics and at the consultation room of menstrual regulation, in Havana City, were processed to evaluate the performance of a method to detect *Chlamydia trachomatis*, based on polymerase chain reaction (PCR) with primers KL1 and KL2 specific for the plasmid. The samples were assayed by PCR-plasmid, by cell culture and by another method of PCR based on the amplification of a region of the main protein of the external membrane (MOMP) of *Chlamydia*, which was used as a confirmatory trial. It was observed that in 43 samples the results of the culture and of the PCR-plasmid coincided: 4 positive and 39 negative. The other 16 had discordant results. An inhibition study was conducted in the 8 culture negative/PCR-plasmid positive samples and it was proved that 2 of them had inhibitors, whose action was reverted on adding BSA to the reaction mixture. Of the 8 negative culture/positive PCR-plasmid discordant samples, 5 were confirmed as positive after being processed by PCR-MOMP. Taking the coincidence of at least 2 of the 3 assayed methods as a positive true criterion, 100 % of sensitivity and 94 % of specificity were obtained for PCR-plasmid compared with 54 % and 87 % for the culture, respectively. The PCR-plasmid presented a positive predictive value of 79 % and a negative predictive value of 100 %; whereas the culture had 50 % and 89 %, respectively. It was proved that the results of the PCR-plasmid under our laboratory conditions are reliable in the diagnosis of *Chlamydia* in samples of endocervical exudate.

Subjwect headings: CHLAMYDIA TRACHOMATIS; POLYMERASE CHAIN REACTION/methods; PLASMIDS; LABORATORY TECHNIQUES AND PROCEDURES; SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rowe PJ. Reproductive tract infectious. Annual Technical Report. Human Reproduction Programme, WHO, 1998:186-90.
2. Schachter J. Chlamydial infections (in three parts). N Engl J Med 1978; 298, 428-35; 490-5; 540-9.
3. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. Hum. Reprod Up 1999;5:433-47.
4. Van der Pol B, Quinn TC, Gaydos CA, Crotchfelt K, Schachter J, Moncada J et al. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG test for detection of Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol 2000;38(3):1105-12.
5. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: What tests should be used for diagnosis of Chlamydia infections? Immunol Invest 1997; 26 (1 and 2):157-61.
6. Paavonen J, Puolakkainen M, Paukku M, Sistonen H. Cost-benefit analysis of first-void urine Chlamydia trachomatis screening program. Obstet Gynecol 1998;92(2):292-8.
7. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of Chlamydia trachomatis inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1983;17:666-8.
8. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol 1993;31(7):1753-8.
9. Ngeow YF, Hema V, Zakaria M, Lee CH, Ramachandran S. Detection of Chlamydia trachomatis in urine samples by polymerase chain reaction and enzyme immunoassay. Malaysian J Pathol. 1997;19(2):127-32.
10. Mouton JW, Verkooyen R., van der Meijden WL., van Ryssoort-Vos TH., Goessens WHF, Kluytmans JAJW et al. Detection of Chlamydia trachomatis in male and female urine specimens by using the amplified Chlamydia trachomatis test. J Clin Microbiol 1997; 35(6):1369-1372.

11. Bianchi A, Scieux C, Brunat N, Vexiau D, Kermanach M, Pezin P et al. An evaluation of polymerase chain reaction AMPLICOR Chlamydia trachomatis in male urine and female urogenital specimens. *Sex. Transm. Dis* 1994;21:196-200.
12. Bass CA, Jungkind DL, Silverman NS, Bondi JM. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay for detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:2648-53.
13. Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA et al. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2847-51.
14. Old J.M. Fetal DNA analysis. En: *Human Genetic Disease Analysis. A practical approach*. 2ed. K.E.DAVIES, Oxford University Press, 1993:23-5.
15. McCreedy BJ, Callaway TH. Laboratory design and work flow. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (ed.). *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993:149-59.
16. Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, Suhonen S, Lähteenmäki P, Lehtinen M. Comparison of performances of two commercially available test, a PCR assay and ligase chain reaction test, in detection of urogenital Chlamydia trachomatis infection. *J Clin Microbiol* 1998;36(6):1489-93.
17. Hadgu A. The discrepancy in discrepant analysis. *Lancet* 1996;348:592-3.
18. Alonzo TA, Pepe MS. Using a combination of reference tests to assess the accuracy of a new diagnostic test. *Stat Med* 1999;18(22):2987-3003.

Recibido: 2 de julio de 2002. Aprobado: 22 de agosto de 2002.

Lic. *Maydelin Frontela Noda*. Instituto Nacional de Endocrinología. Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10400.