

Normalización de dos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK)

Dianelys Rivero¹, Vivian Kourí², Consuelo Correa³, Isabel Martínez Motas⁴, Rafael Llanes⁵, Ángela Gala⁶, Edel García⁷

¹Médico Especialista de 1er. Grado en Microbiología, Máster en Ciencias; ²Médico Especialista de 2do. Grado en Microbiología, Doctora en Ciencias Médicas; ³Médico Especialista de 1er. Grado en Microbiología, Máster en Ciencias; ⁴Médico Especialista de 2do. Grado en Microbiología, Doctora en Ciencias Médicas, Instituto Finlay; ⁵Médico Especialista de 2do. Grado en Microbiología, Máster en Ciencias; ⁶Médico Especialista de 1er. Grado en Higiene y Epidemiología, Máster en Ciencias; ⁷Médico Especialista de 1er. Grado en Microbiología, Máster en Ciencias, Hospital Militar Central "Dr. Luis Díaz Soto".

RESUMEN

Objetivo: Normalizar dos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) complementarios al plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* y evaluar su desempeño en muestras de exudado endocervical de mujeres con dolor abdominal bajo (DAB).

Métodos: Se normalizaron dos ensayos de RCP simple del plásmido críptico de *C. trachomatis* (ensayos K y T) y se determinó la sensibilidad de los mismos frente a la cepa L2 de *C. trachomatis*. Posteriormente, se evaluó su desempeño en 50 muestras de exudado endocervical de mujeres con dolor abdominal bajo, del municipio "10 de Octubre". Se calculó, además, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de ambos ensayos, tomando como referencia una RCP de MOMP (del inglés major outer membrane protein) en tiempo real comercial.

Resultados: Ambos ensayos de RCP mostraron buena sensibilidad. Con el ensayo K se detectó 10 UFI/mL de la cepa L2 de *C. trachomatis*, mientras que el T mostró una mayor sensibilidad pues detectó menos de 1 UFI/mL. El 8% (4/50) de las muestras ensayadas por la RCP en tiempo real, así como el 6% (3/50) de las evaluadas por los ensayos K y T, resultaron positivas. Se obtuvo una sensibilidad de 75% y especificidad de 100% con las RCP de plásmido críptico, así como un VPP de 100% y VPN de 97,9%.

Conclusiones: Este estudio demuestra que los ensayos de RCP normalizados, en nuestras condiciones de laboratorio, brindan resultados confiables para el diagnóstico de *C. trachomatis*.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*/aislamiento&purificación; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Infecciones por *Chlamydia*/diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Chlamydia trachomatis* se considera la más común de las infecciones de transmisión sexual (ITS) de origen bacteriano. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se notifican en el mundo alrededor de 90 millones de casos nuevos (1).

En la mujer esta infección ocasiona con frecuencia uretritis e infección cervical. No obstante, el 70 a 90% de los casos tiene un curso asintomático (2), por lo que el diagnóstico tardío favorece el desarrollo de la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y desencadena complicaciones como el embarazo ectópico, el dolor pélvico crónico y la infertilidad.

De ahí la importancia de un diagnóstico preciso y rápido para evitar la transmisión de la infección y la aparición de posibles secuelas (3).

El cultivo celular es el método más específico para el diagnóstico de *C. trachomatis*; sin embargo, su elevado costo y baja sensibilidad conducen a la utilización de otros métodos de diagnóstico más rápidos y sensibles (2, 4). Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, del inglés Nucleic Acid Amplification Tests) logran este propósito y constituyen, en la actualidad, el nuevo patrón de referencia para el diagnóstico de *C. trachomatis* a partir de muestras uretrales, cérvix y orina (5). Entre estas pruebas cobra mayor importancia la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y, específicamente, la RCP en tiempo

real, por su elevada sensibilidad y especificidad, facilidad de empleo, mayor rapidez y menor riesgo de contaminación (6).

En Cuba solo existen limitados reportes de estudios sobre la prevalencia o incidencia de *C. trachomatis*. Los primeros trabajos publicados refieren el empleo de técnicas de RCP para estudiar mujeres con antecedentes de infertilidad (7), así como seropositivas al VIH (8). Más recientemente Ortiz y colaboradores, realizan un estudio en el Hospital Ginecobstétrico "Ramón González Coro", donde emplean una prueba de diagnóstico rápido (Chlmy-check-1), para identificar la infección en mujeres con complicaciones ginecológicas donde se detectaron altos porcentajes de infección (45,2%) (9). Sin embargo, se conoce que los métodos rápidos pueden generar resultados falsos positivos, por lo que siempre deben ser confirmados mediante métodos de referencia (10-12).

Teniendo en cuenta la importancia que reviste el estudio de esta infección y su actualización diagnóstica, así como el seguimiento adecuado de las pacientes sintomáticas, se realizó la presente investigación con el objetivo de normalizar dos ensayos de RCP del plásmido críptico de *C. trachomatis*, así como evaluar el desempeño de los mismos en muestras de exudado endocervical, de mujeres con dolor abdominal bajo (DAB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación y determinación del título infectivo de la cepa L2 de *C. trachomatis* en el cultivo de células Línea celular y cepa:

- Línea celular: Se utilizó la línea celular McCoy (fibroblastos de ratón), ATCC (del inglés American Type Culture Collection), subcultivo número 15-18, con un pase semanal a razón de 80 000 cél/mL, en el medio de crecimiento RPMI 1640 (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 2%.

- Cepa de referencia: Se utilizó la cepa L2 de referencia de *C. trachomatis*, donada por la ATCC (VR 902B) con cinco pases en células McCoy.

Para lograr una multiplicación a mayor escala de la cepa L2 se procedió a cultivarla por duplicado en frascos de 25 cm², según el procedimiento descrito en Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections (13). Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas en base 10 de la cepa L2 de *C. trachomatis*, partiendo de la cepa sin diluir, hasta la dilución 10⁻⁵, con el objetivo de obtener el título infectivo.

La titulación se realizó en placas de poliestireno de 24 pocillos, que contenían células McCoy en monocapa semiconfluente. Se realizaron cinco réplicas de cada dilución de la cepa y tres réplicas sin inocular (control celular), procediéndose al cultivo de manera similar a lo descrito con anterioridad (13). Al observar el efecto citopático (ECP) característico, se procedió a la identificación mediante inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando un anticuerpo monoclonal específico del lipopolisacárido de

Chlamydia (IMAGENTM *Chlamydia*, DAKO Cytomation, Dinamarca), según el protocolo descrito por el fabricante. Al final, se realizó la lectura y el conteo de las inclusiones fluorescentes típicas de *C. trachomatis* en las cinco réplicas de cada dilución, empleando para ello el microscopio de fluorescencia invertido (Olympus BX51, Alemania). El título infectivo se definió como el promedio de las Unidades Formadoras de Inclusiones (UFI/mL) observadas en las cinco réplicas correspondientes a la mayor dilución en la que se observó al menos 10 UFI/mL, según el método descrito por Shank y colaboradores (14).

Normalización de dos ensayos de RCP simple del plásmido críptico de *C. trachomatis*

Extracción de ADN de las diluciones de la cepa L2 de *C. trachomatis*

Antes de realizar las extracciones de ADN de cada una de las diluciones de la cepa, estas se extendieron hasta la dilución 10⁻⁷. A partir de cada dilución se realizó la extracción de ADN mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania).

Aplicación de los ensayos de RCP a las diluciones de la cepa L2 de *C. trachomatis*

Se emplearon dos ensayos de RCP complementarios a dos zonas del plásmido críptico presente en *C. trachomatis*, el ensayo K (cebadores KL1-KL2) y el ensayo T (cebadores T1-T2) que amplifican fragmentos con tallas de 241 y 517 pares de base (pb), respectivamente (15, 16). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 50 µL, con una mezcla constituida por: 5 µL de tampón de la enzima (Tris-HCL 10 mM pH=9), 8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,8 µL dNTPs (25 mM), 1 µL (10 pmoles) de cada cebador específico, 0,5 µL de enzima Taq ADN polimerasa (5U/µL) (Roche, Alemania) y agua libre de ARNasas y ADNasas para completar el volumen final. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (VWR, Doppio, Bélgica) siguiendo los ciclos previamente publicados para cada ensayo (15, 16). Como sustrato de cada reacción se empleó 5 µL de ADN correspondiente a cada dilución de la cepa L2 de *C. trachomatis*. Se incluyó además, un control negativo que contenía agua libre de ARNasas y ADNasas.

Una vez obtenidos los productos de las RCP se observaron en un gel de agarosa al 2%. Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Uvitec, Francia) y se definieron sus tamaños para cada una de las diluciones, empleando un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (ADN Ladder, Promega, EUA). Se determinó el límite de sensibilidad de ambos ensayos mediante la lectura visual de las bandas correspondientes a las diferentes UFI/mL de cada una de las diluciones.

Evaluación de los ensayos de RCP del plásmido críptico de *C. trachomatis*, frente a las muestras clínicas

Muestras clínicas

Para la evaluación de los ensayos (K y T) se analizaron 50 muestras de exudado endocervical. Las muestras fueron seleccionadas de mujeres en edad reproductiva (15-49 años), que acudieron con DAB a las consultas de ITS y de ginecología de algunas áreas de salud del municipio "10 de Octubre", en el período comprendido entre los meses de abril y septiembre de 2010.

La toma de la muestra endocervical se realizó mediante un raspado vigoroso del epitelio columnar del canal endocervical. Para ello se utilizó un hisopo plástico estéril, que se suspendió en 3 mL del medio de transporte (UTM-RT, del inglés Universal Transport Medium-Room Temperature) (Copan Diagnostics Inc).

Aspectos éticos

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética del IPK y cumple con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, según lo establecido por la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial. A todas las pacientes se les explicó el propósito del estudio y a aquellas que accedieron de manera voluntaria a participar en él, se les solicitó por escrito su consentimiento informado.

Extracción de ADN de las muestras clínicas

Se realizó la extracción de ADN de las 50 muestras clínicas a partir de un volumen de 200 μ L del medio de transporte UTM-RT, previa centrifugación a 14 000 x g, a 4 °C durante una hora y suspensión de pellet; posteriormente, se siguió el mismo protocolo utilizado con la cepa L2 de referencia. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta la realización de las RCP.

Aplicación de la RCP en tiempo real del gen de la β -globina humana

Como control interno de la extracción de ADN de las muestras clínicas se realizó una RCP en tiempo real (metodología TaqMan) empleando un juego de cebadores complementarios a una región del gen que codifica para la proteína β -globina humana, según el protocolo descrito por Schmitz y colaboradores (17). Este protocolo de RCP se manejó desde el punto de vista cualitativo, considerando que la muestra era positiva (ausencia de inhibición) si se observaba la aparición de una curva de fluorescencia con un punto de corte (C_p) inferior al ciclo 40. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 20 μ L, compuestos por: 4 μ L de la mezcla Master Mix (Roche, Alemania), 3 μ L de cebadores y sonda de hidrólisis, 8 μ L de agua y 5 μ L del ADN extraído de cada muestra clínica. Se usó como control positivo 5 μ L de ADN extraído de fibroblastos humanos y como control negativo 5 μ L de agua libre de ARNasas y ADNasas. El proceso se llevó a cabo en un equipo LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Alemania) y los parámetros de los ciclos fueron los recomendados por la casa comercial Roche.

Aplicación de la RCP de MOMP en tiempo real, como prueba de referencia para el diagnóstico de *C. trachomatis*

Esta RCP constituye un ensayo en tiempo real que amplifica y detecta un fragmento de 136 pb del gen que codifica para la MOMP (del inglés *Major Outer Membrane Protein*) de *C. trachomatis*, empleando el estuche comercial LightMix Kit *C. trachomatis* (TIB MOLBIOL, Alemania). El mismo contiene una mezcla de cebadores y probe de hibridación (Light Mix), un control interno (IC Mix) y un estándar de *C. trachomatis* constituido por un fragmento de ADN del gen que codifica para la MOMP, clonado y purificado, con una concentración en el rango de 10^6 copias/ μ L-10 copias/ μ L. Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias/ μ L de *C. trachomatis*.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 20 μ L, compuestos por: 2 μ L de Master Mix (FastStar DNA Master HybProbe, Roche, Alemania), 2,4 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 2 μ L de Light Mix, 2 μ L de IC Mix, 6,6 μ L de agua y 5 μ L de ADN extraído de cada muestra clínica, siguiendo las indicaciones de la casa comercial TIB MOLBIOL. La amplificación se realizó en un equipo LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Alemania), siguiendo los parámetros de ciclaje recomendados por la casa comercial.

El análisis y la cuantificación de las muestras se realizaron de manera automática, empleando el método de la derivación secundaria máxima, versión 3.3 del programa del LightCycler 1.5.

Aplicación de los ensayos de RCP de *C. trachomatis*

Se aplicaron 5 μ L de ADN de las muestras clínicas a cada una de las mezclas de reacción de los dos ensayos de RCP de plásmido críptico (K y T) previamente normalizados para la detección de *C. trachomatis*, siguiendo los protocolos descritos con anterioridad (15, 16).

Análisis estadístico

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los ensayos de RCP evaluados, para ello se utilizó el programa estadístico Epidat versión 4.0 para windows. También se realizó cálculo de frecuencia expresada en porcentaje para la presentación de los resultados.

RESULTADOS

Titulación de la cepa L2 de *C. trachomatis*

Después de inoculadas las diluciones de la cepa L2 de *C. trachomatis* en las células McCoy se observó, a las 48 horas de incubación el ECP característico (redondeamiento intracelular con vacuolización). La titulación de la cepa L2 se realizó mediante la técnica de IFD, a través del cálculo del promedio de las UFI/mL en cada una de las diluciones en las que fue posible realizarlo (desde 10^{-3} hasta 10^{-5}), ya que en las menores diluciones el número de inclusiones eran incontables. Se identificó un promedio de 12 UFI/mL en la dilución 10^{-5} (figura 1).

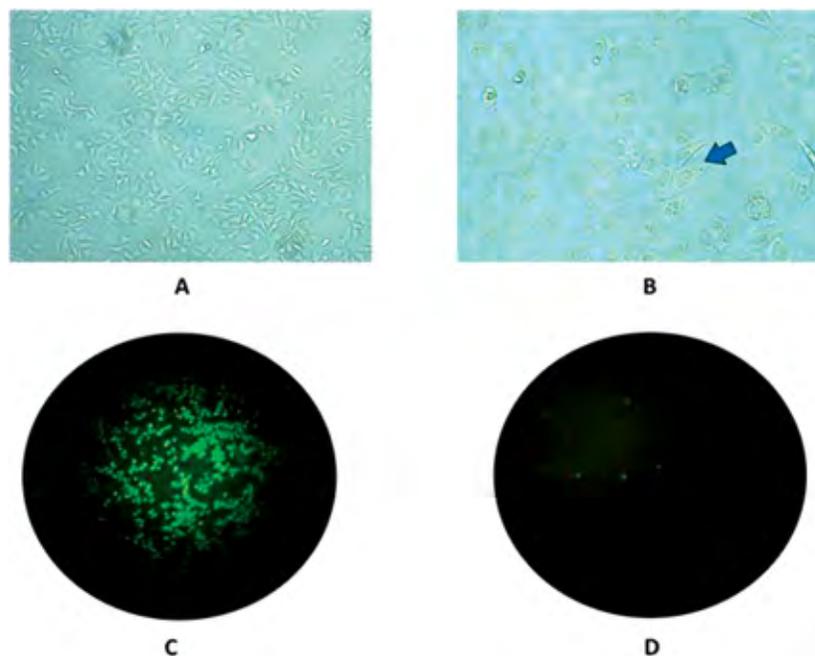


Figura 1. Cultivo de células McCoy y técnica de IFD. A) Células McCoy sin inocular, B) ECP en las células McCoy inoculadas con la cepa L2 de *C. trachomatis*, C) Inclusiones de la cepa L2 de *C. trachomatis* pura, D) Inclusiones de la cepa L2 de *C. trachomatis* en la dilución 10^{-5} .

Normalización de los ensayos de RCP simple del plásmido críptico de *C. trachomatis*

Para el ensayo que usó los cebadores KL1 y KL2 (ensayo K) se obtuvo amplificación evidente hasta la dilución 10^{-5} lo que se correspondió con 10 UFI/mL en el cultivo celular. Mientras que con el ensayo T (cebadores T1 y T2), se obtuvo amplificación hasta la dilución 10^{-7} equivalente a 0,1 UFI/mL. En esta ocasión se aproximó el título de la cepa L2 de *C. trachomatis* a 10 UFI/mL, para una mejor interpretación del resultado una vez que se aplicaron ambos ensayos de RCP a cada una de las diluciones (figura 2).

Evaluación de los ensayos de RCP del plásmido críptico de *C. trachomatis* frente a las muestras clínicas

Al determinar la calidad del ADN extraído de las muestras clínicas mediante la detección de un fragmento del gen que codifica para la proteína β -globina, se encontró que todos los ADN generaron curvas de amplificación (indicador de la producción de amplicones), con C_p entre los ciclos 22-28, lo cual indicó que no existía ninguna muestra inhibida y que tenían cantidades suficientes de ADN por lo que eran útiles para aplicar los dos métodos de RCP. La RCP de MOMP en tiempo real de *C. trachomatis*, utilizada como prueba de referencia, se aplicó a los 50 ADN extraídos de las muestras clínicas, detectándose cuatro muestras positivas (8%), con niveles variables de carga bacteriana: muestra 13: $1,4 \times 10^2$ copias/ μ L, muestra 33: $8,4 \times 10^2$ copias/ μ L, muestra 44: $8,5 \times 10^3$ copias/ μ L y muestra 34: $8,5 \times 10^2$ copias/ μ L (figura 3).

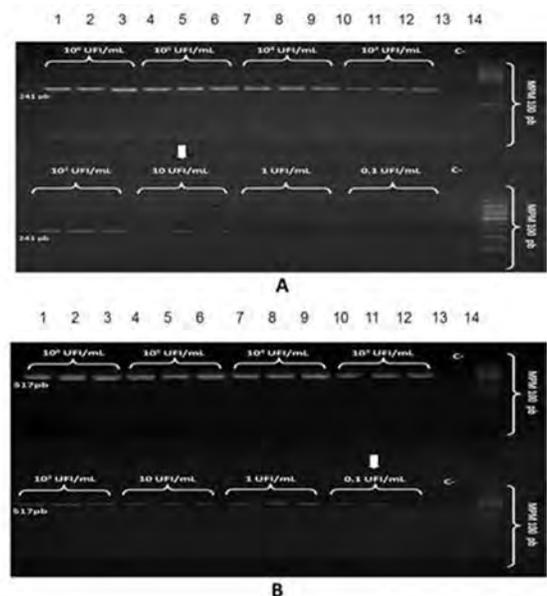


Figura 2. Geles de agarosa al 2% donde se muestran las bandas de amplificación por triplicado obtenidas al emplear los dos ensayos de RCP simple del plásmido críptico de *C. trachomatis*. A) Cebadores KL1-KL2, B) Cebadores T1-T2, a partir del ADN de las diluciones de la cepa L2. Carriles 1-12 y 15-26, diluciones de la cepa L2 hasta la dilución 10^{-7} . Carriles 13 y 27, control negativo. Carriles 14 y 28, MPM de 100 pb (ADN Ladder, Promega, EUA).

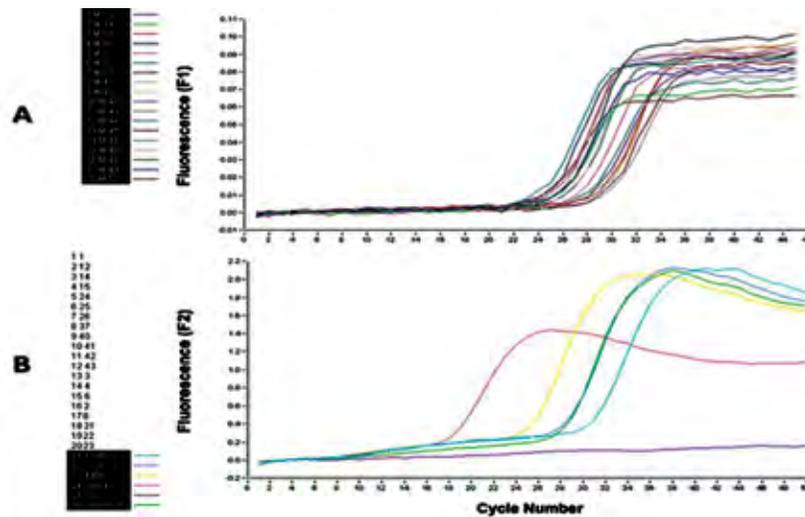


Figura 3. Resultado de los 2 métodos de RCP en tiempo real utilizados. A) RCP en tiempo real aplicada a las muestras clínicas (1-18). Los ADN extraídos de las muestras clínicas mostraron curvas de amplificación con puntos de corte (Cp) entre los ciclos 22-28. B) RCP de MOMP en tiempo real aplicada a algunas muestras clínicas. Los ADN extraídos de las muestras clínicas positivas mostraron curvas de amplificación con Cp entre los ciclos 24-32.

Al aplicar los dos ensayos de RCP del plásmido críptico de *C. trachomatis*, amplificaron tres muestras (6%), coincidiendo con tres de las cuatro muestras que habían amplificado mediante la RCP de MOMP en tiempo real (muestras 13, 33 y 44) (figura 4).

Esta técnica mostró valores de sensibilidad y especificidad de 75 y 100%, respectivamente; así como un VPP de 100% y VPN de 97,9%.

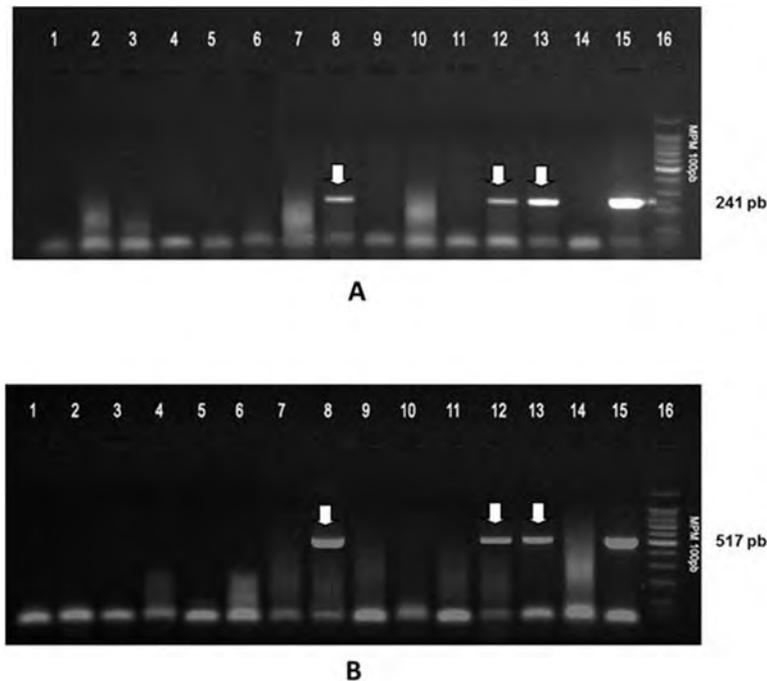


Figura 4. Geles de agarosa al 2% donde se muestran las bandas de amplificación obtenidas al emplear los dos ensayos de RCP simple del plásmido críptico de *C. trachomatis*. A) Cebadores KL1-KL2, B) Cebadores T1-T2, a partir de las muestras clínicas de exudado endocervical. Carriles 1-7, 9-11 y 14, muestras clínicas negativas. Carriles 8, 12 y 13, muestras clínicas positivas (13, 33 y 44, respectivamente). Carril 15, Control positivo. Carril 16, MPM de 100 pb (ADN Ladder, Promega, EUA).

DISCUSIÓN

La infección por *C. trachomatis* constituye un importante problema de salud pública mundial y en los últimos años se ha elevado su prevalencia en Estados Unidos y Europa. De ahí que en varios países se incorpore el tamizaje de esta infección en la población de riesgo (3).

En Cuba se desconoce su prevalencia pues no se considera una enfermedad de declaración obligatoria, y por las características del microorganismo (intracelular obligado), resulta difícil y costoso contar con métodos de alta sensibilidad, disponibles en la atención primaria de salud. Por esta razón tradicionalmente ha existido una escasa cobertura diagnóstica en el país y se cuenta con pocos informes de estudios realizados en mujeres (7-9). Sin embargo, en los últimos años se han adquirido pruebas de diagnóstico rápido que, si bien facilitan realizar un diagnóstico de *C. trachomatis*, necesitan la confirmación de todos los casos positivos mediante pruebas de alta sensibilidad y especificidad (10-12). Basado en estos antecedentes, se realizó el presente estudio de normalización de dos ensayos de RCP del plásmido críptico de *C. trachomatis*, para complementar y fortalecer el diagnóstico de esta infección.

El cultivo celular constituye el método de mayor especificidad (100%) para el diagnóstico de *C. trachomatis* (5). En este trabajo se multiplicó la cepa de referencia de *C. trachomatis* (L2) en cultivo de células para mejorar su viabilidad. Posteriormente, se realizó la titulación de la misma mediante la técnica de IFD, considerada como referencia para identificar las inclusiones de *C. trachomatis* (18-20). Varios autores reafirman este criterio al comparar dicho método con la tinción de yodo y plantean, además, que la incubación del cultivo celular durante 48 horas propicia el crecimiento óptimo de las inclusiones típicas de *C. trachomatis* (21, 22).

Durante la normalización de los ensayos de RCP (K y T), se demostró la utilidad de ambos para el diagnóstico de *C. trachomatis* y particularmente del ensayo T, que reveló una mayor sensibilidad al detectar menos de 1UFI/mL, resultado que corrobora la sensibilidad de los sistemas de diagnóstico molecular y su capacidad para detectar el genoma del agente infeccioso aun sin estar el mismo viable. Mahony y colaboradores, en Canadá, al utilizar diluciones del ADN de la cepa L2 de *C. trachomatis* demuestran que la RCP de plásmido críptico es 10 a 100 veces más sensible que la RCP dirigida a la MOMP y reportan además, un incremento de la especificidad de la técnica (98,9 a 100%), mediante la utilización del ensayo T como confirmatorio (23). Asimismo, en el año 1993, al comparar cinco ensayos de RCP aplicados a muestras urogenitales, dos dirigidos al plásmido críptico (ensayos K y T), dos a la MOMP y uno al ARNr, se comprueba que los ensayos basados en el plásmido críptico tienen una mayor sensibilidad, pues detectan 1 UFI de la cepa L2 de *C. trachomatis*, contrario a las 10 a 100 UFI que develan los otros ensayos; su

mayor sensibilidad se debe, en parte, a la presencia de múltiples copias del plásmido críptico de *C. trachomatis* (de 7 a 10, aproximadamente), no así del gen de la MOMP y del ARNr (16). En el año 1995, estos mismos autores diseñan una RCP múltiple para la detección simultánea de *C. trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, en muestras urogenitales, donde utilizan ambos ensayos, y obtienen un 100% de sensibilidad y especificidad (24).

La aplicación de un sistema de control interno del material genético permitió determinar la integridad de las muestras clínicas y por tanto brindó una mayor confiabilidad de los resultados, pues estos sistemas son capaces de detectar un número bajo de copias de ácidos nucleicos, cuando falla la extracción de los mismos, cuando no hay suficiente celularidad en las muestras o existen sustancias inhibitoras que interactúan directamente con el material genético (25, 26).

Al evaluar los dos ensayos de RCP de plásmido críptico de *C. trachomatis* en las muestras clínicas, se obtuvieron resultados similares a los alcanzados con la prueba de referencia (RCP de MOMP en tiempo real). Estas cifras además coinciden con las frecuencias de infección referidas en estudios previos realizados en Cuba, a pesar de que el tamaño de la muestra empleada en la presente investigación es limitada y no se puede arribar a conclusiones sobre la frecuencia de infección por este agente. Kourí y colaboradores, en el año 2002, al estudiar (mediante RCP de MOMP) 60 mujeres seropositivas al VIH y 60 seronegativas, obtienen una frecuencia de 10 y 6,6%, respectivamente (8). Frontela y colaboradores, al evaluar 59 mujeres que tenían antecedentes de infertilidad mediante una técnica de RCP de plásmido críptico, describen una frecuencia de 15,3% (27). Posteriormente, estos mismos autores estudian 224 mujeres en edad reproductiva y reportan una frecuencia de 6,9% (28). En contraste, un estudio más reciente de Ortiz y colaboradores en el año 2010, analiza pacientes infértiles y abortadoras habituales, detectando un 45,2% de positividad (9); llama la atención que en esta investigación se utiliza una prueba rápida y no se hace la confirmación del diagnóstico mediante una NAAT, como se recomienda en la literatura (10).

Por otro lado, en la India, varios autores notifican una frecuencia similar a la informada en los estudios anteriores de Cuba y en la presente evaluación. Sood y colaboradores (2012) y Sánchez y colaboradores (2009), utilizando una RCP de plásmido críptico (9,3 y 20,4%), así como Dwibedi y colaboradores (2009) y Pramanik y colaboradores (2006), empleando una RCP de MOMP (7 y 12,3%), respectivamente (4, 29-31). Estos resultados aunque con un porcentaje ligeramente superior al obtenido en las pacientes investigadas, coinciden con la frecuencia estimada para esta infección a nivel internacional (2 a 25%) (1).

La utilización de un sistema de RCP en tiempo real para la detección de *C. trachomatis* supone un gran avance en el diagnóstico de esta infección. La ventaja de utilizar esta

técnica, además de su elevada sensibilidad y especificidad, consiste en la cuantificación y la detección simultánea de *C. trachomatis* y de otros microorganismos causantes de ITS. Un trabajo publicado por Corbeto y colaboradores, pone de manifiesto estos criterios, en el que se obtiene, incluso, un porcentaje de infección conforme se describe en la literatura (4%) (3).

No cabe duda que las NAAT han revolucionado el diagnóstico de la infección por *C. trachomatis*. La elevada sensibilidad de estas técnicas proporciona una herramienta útil para el diagnóstico de casos tanto sintomáticos como asintomáticos. Es importante contar con un método que proporcione resultados confiables para el diagnóstico de *C. trachomatis*, si se tiene en cuenta que esta infección se asocia a complicaciones que repercuten en la salud reproductiva de la mujer causando, fundamentalmente, infertilidad y embarazo ectópico.

Se debe señalar que aunque las muestras evaluadas fueron suficientes para cumplimentar los objetivos del presente estudio, no es posible extrapolar los resultados obtenidos a la población de mujeres cubanas, así como tampoco hacer interpretaciones sobre prevalencia de la infección.

CONCLUSIONES

Se normalizaron dos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *C. trachomatis*, con elevada sensibilidad y especificidad, lo que permite fortalecer el diagnóstico microbiológico de la infección genital por este microorganismo. Se recomienda continuar realizando investigaciones sobre esta temática, empleando un mayor número de muestras para identificar la prevalencia actual de esta infección en la población cubana.

BIBLIOGRAFÍA

- Gallo L, Entrocassi C, Corominas AI, Rodríguez M. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis. *BMC Research Notes*. 2010;3:34.
- Arráiz N, Ginestre M, Castellano M, Perozo A, Urdaneta B. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de hisopado endocervical por inmunofluorescencia directa y reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2006;26(1):14-8.
- Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, AVECILLA A, et al. Prevalencia de la infección por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* y determinantes para su adquisición en jóvenes y adultos-jóvenes en Cataluña. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(2):96-101.
- Sood S, Mukherjee A, Bala M, Satpathy G, Mahajan N, Sharma A, et al. A pilot study for diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections by polymerase chain reaction among symptomatic Indian women. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2012;78:443-7.
- Vázquez F, Lepe JA, Otero L, Blanco MA, Aznar J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(1):32-7.
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(5):299-305.
- Montenegro AG. Diagnóstico de infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis*: utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y el aislamiento en cultivos celulares [Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. Ciudad de la Habana: IPK; 1993.
- Kourí V, Cartaya J, Rodríguez MF, Mune M, Soto Y, Resik S, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in Human immunodeficiency Virus-infected women in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;13(2):52-5.
- Ortiz CE, Hechavarría CE, Ley M, Álvarez G, Hernández Y. Estudio de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en pacientes infértiles y abortadoras habituales. *Rev Cubana de Obstet Ginecol*. 2010;36(4):573-84.
- Van Dommelen L, Van Tiel FH, Ouburg S, Brouwers EEHG, Terporten PHW, Savelkoul PHM, et al. Alarmingly poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. *Sex Transm Infect*. 2010;86:355-9.
- Banda C, Koumans EH, Sawyer MK, Dover J, O'Connor A, Papp JR, et al. Evaluation of the Rapid BioStar Optical Immunoassay for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Adolescent Women. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):215-6.
- Yin YP, Peeling RW, Chen XS, Gong KL, Zhou H, Gu WM, et al. Clinic-based evaluation of Clearview *Chlamydia* MF for detection of *Chlamydia trachomatis* in vaginal and cervical specimens from women at high risk in China. *Sex Transm Infect*. 2006;82 Suppl 5:33-7.
- Schachter J. *Chlamydia*. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editors. *Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections*. 7th ed. Washington: APHA 1995. p. 231-43.
- Shank D, Jensen N, Wolfe D. A Method to Enumerate *Chlamydia trachomatis* by Counting DFA Stained Elementary Bodies on a Printed Microscope Slide. As presented at the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology; 1999.
- Claas HCJ, Wagenvoort JHT, Niesters HGM, Tio TT, Van Rijsoort-Vos JH, Quint WGV. Diagnostic Value of the Polymerase Chain Reaction for *Chlamydia* Detection as Determined in a Follow-Up Study. *J Clin Microbiol*. 1991;29(1):42-5.
- Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of Plasmid- and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. *J Clin Microbiol*. 1993;31(7):1753-8.
- Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajdab M, Runnebauma IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*. 2009;44:302-7.
- Chernesky MA. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(1):39-44.
- Black CM. Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(1):160-84.

20. Centers for Disease Control and Prevention. Screening Tests to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. MMWR. 2002;51(RR-15):1-40.
21. Zapata M, Chernesky M, Mahony J. Indirect Immunofluorescence Staining of *Chlamydia trachomatis* Inclusions in Microculture Plates with Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol*. 1984;19(6):937-9.
22. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev*. 1989;2:119-36.
23. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Jang D, Chernesky MA. Confirmatory Polymerase Chain Reaction Testing for *Chlamydia trachomatis* in First-Void Urine from Asymptomatic and Symptomatic Men. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2241-5.
24. Mahony JB, Luinstra KE, Tyndall M, Sellors JW. Multiplex PCR for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary Specimens. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11):3049-53.
25. Bessetti J. An Introduction to PCR Inhibitors 2007. Disponible en: www.promega.com.
26. Orta N, Guna MR, Cardona CG, Pérez JL. Control de calidad en microbiología molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 9:2-7.
27. Frontela M, Amores I, Yepe S, Kourí V, Ferreira R, Mallea L. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de exudado endocervical por la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Endocrinol*. 2002;13(2):135-43.
28. Frontela M, Rodríguez Y, Verdejas OL, Valdés FJ. Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres cubanas en edad reproductiva. *Rev Cubana Endocrinol*. [Internet]. 2006 [citado el 22 de mayo de 2009];17(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532006000200001&lng=es&nrm=iso.
29. Sánchez V, Torres AE, Villalba JD. Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Ginecol Obstet Mex*. 2009;77(1):13-8.
30. Dwibedi B, Pramanik JM, Sahu P, Kar SK, Moharana T. Prevalence of genital *Chlamydia* infection in females attending an Obstetrics and Gynecology out patient department in Orissa. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009;75(6):614-6.
31. Pramanik JM, Potdar S, Kerkar S. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infection. *J Clin Lab Anal*. 2006;20:8-14.

The normalization of two polymerase chain reaction tests for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*

SUMMARY

Objective: To normalize two types of polymerase chain reaction (PCR) tests corresponding to the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* and evaluate its performance in endocervical exudate samples from women with lower abdominal pain.

Methods: Two simple PCR tests were normalized from the cryptic plasmid *C. trachomatis* (tests K and T) and their sensibilities were determined for strain L2 of *C. trachomatis*. Afterwards its performance was evaluated in 50 endocervical exudates samples in women with lower abdominal pain, from the municipality of "10 de Octubre". Additionally, sensibility, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated for both tests, utilizing a major outer membrane protein (MOMP) PCR as a commercial real time reference.

Results: Both PCR tests showed good sensibility. With the K test 10 UFI/mL of the L2 strain of *C. trachomatis* were detected, while the T test showed a greater sensibility detecting less than 1 UFI/mL. Positive results were seen in 8% (4/50) of the samples tested by PCR in real time, as well as 6% (3/50) of the trials done using tests K and T. A sensibility of 75%, a specificity of 100%, a PPV of 100%, and a NPV of 97.9% were obtained with the cryptic plasmid PCR.

Conclusions: This study demonstrated that normalized PCR tests in our laboratory conditions provide trustworthy results for the diagnosis of *C. trachomatis*.

Key words: *Chlamydia trachomatis*/isolation&purification; Polymerase Chain Reaction; *Chlamydia* Infection/diagnostic.

Dirección para la correspondencia: Dra. Vivian Kourí, DrC. Laboratorio de ITS, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Lisa. La Habana, Cuba. Código Postal 10400..

E-mail: vkouri@ipk.sld.cu