



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

Virginia Sánchez Monroy,^{1*} Adolfo Evaristo Torres Mata,^{**} José D'Artagnan Villalba Magdaleno^{***}

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Introducción: la infección por *Chlamydia trachomatis* es la enfermedad de transmisión sexual bacteriana más común en el mundo.

Objetivo: determinar la prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* en los pacientes que asisten a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional en la Ciudad de México.

Material y método: 98 muestras cervicales; estudio transversal y analítico. Con técnica de PCR se determinó la existencia de *C. trachomatis* amplificando un fragmento de ADN del plásmido críptico. Se investigaron las variables médicas de interés y prácticas anticonceptivas en la población de estudio. Se compararon las variables entre las pacientes positivas y negativas a la infección por *C. trachomatis*. Se utilizaron las pruebas de U de Mann-Whitney y ji al cuadrado con el programa de SigmaStat versión 2.0. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.001$.

Resultados: se detectaron 20 muestras positivas a la infección por *C. trachomatis* de las 98 estudiadas, que implican una prevalencia de 20.4% del grupo total. Las variables analizadas mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cantidad de abortos, que fueron mayores para las pacientes positivas a la infección.

Conclusión: la prevalencia encontrada en este estudio indica que la infección por *C. trachomatis* constituye un problema de salud pública que amerita contar con técnicas de diagnóstico que favorezcan el incremento en la detección y tratamiento temprano.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, PCR, plásmido críptico, prevalencia.

ABSTRACT

Introduction: Infection with *Chlamydia trachomatis* is a sexually transmitted bacterial disease most common in the world.

Material and Methods: Determination through the PCR technique the presence of *C. trachomatis* in 98 cervical samples by amplifying a fragment of DNA plasmid cryptic. We investigated medical variables of interest and contraceptive methods in the population. Variables were compared between the positive and negative patients to infection with *C. trachomatis* using the test of Mann-Whitney U test and Chi square with the program SigmaStat version 2.0. We considered statistically significant as those values of $p < 0.001$.

Results: 20 samples were found positive for infection with *C. trachomatis* of the 98 patients studied, indicating a prevalence of 20.4% of the total group. The variables analyzed showed a statistically significant difference in the number of abortions, which were higher for patients positive for the infection.

Conclusions: The prevalence found in this study suggests that infection with *C. trachomatis* is an issue of concern in public health, it requires the count on diagnostic techniques, such as PCR favoring an increase in the detection and early treatment in reducing the spread of the infection and long-term sequelae, so that justifies his provide detection in a broader way.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, PCR, cryptic plasmid, prevalence.

RÉSUMÉ

Antécédents: l'infection à *Chlamydia trachomatis* est la maladie bactérienne sexuellement transmissibles les plus courantes dans le monde.

Objectif: déterminer la prévalence de l'infection à *Chlamydia trachomatis* chez les patients participant à la clinique spécialisée pour les femmes de Forces armées dans la ville de Mexico.

Matériel et méthodes: 98 échantillons col de l'utérus, les coupes d'étude et d'analyse. Avec la technique PCR est en *C. trachomatis* amplifier un fragment d'ADN du plasmide cryptique. Nous avons étudié des variables d'intérêt et de la pratique médicale de contraception dans la population étudiée. Les variables ont été comparées entre les patients positifs et négatifs à l'infection par le *C. trachomatis*. Les tests ont été utilisés U de Mann-Whitney et de chi-deux avec le programme SigmaStat version 2.0. Ont été considérés statistiquement significative des valeurs- $p < 0,001$.

Résultats: 20 échantillons positifs ont été trouvés d'être infectés par le *C. trachomatis* des 98 études, portant une prévalence de 20,4% du total du groupe. Les variables analysées ont montré une différence statistiquement significative par rapport au montant de l'avortement, qui ont été plus élevés pour les patients avec des infections.

Conclusions: La prévalence dans cette étude suggère que l'infection à *C. trachomatis* est un problème de santé publique qui mérite d'avoir des techniques de diagnostic qui favorisent l'augmentation de la détection et le traitement précoce.

Mots-clés: *Chlamydia trachomatis*, PCR, plasmide cryptique, la prévalence.

RESUMO

Antecedentes: a infecção por *Chlamydia trachomatis* é a doença bacteriana sexualmente transmissível mais comum no mundo.

Objetivo: determinar a prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes freqüentando o Ambulatório de Especialidades da Mulher Forças Armadas na Cidade do México.

Materiais e métodos: 98 amostras cervicais, estudo transversal e analítico. Com a técnica PCR é encontrado em *C. trachomatis* DNA amplificando um fragmento da cópica plasmidial. Foram investigadas as variáveis de interesse e de prática médica contracepção na população do estudo. As variáveis foram comparadas entre pacientes positivos e negativos para a infecção com *C. trachomatis*. Foram usados os testes de Mann-Whitney U e teste qui-quadrado com o programa SigmaStat versão 2.0. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,001$.

Resultados: 20 amostras positivas foram encontrados para ser infectado por *C. trachomatis* dos 98 estudos, envolvendo uma prevalência de 20,4% do total do grupo. As variáveis analisadas mostraram uma diferença estatisticamente significativa em comparação com a quantidade de abortos, que foram maiores para os pacientes com infecção positiva.

Conclusão: A prevalência encontrada neste estudo sugere que a infecção com *C. trachomatis* constitui um problema de saúde pública que merece ter diagnóstico técnicas que promovam o aumento da detecção e tratamento precoce.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, PCR, cópica plasmídico, prevalência.

Chlamydia trachomatis es un parásito intracelular obligado, que origina la mayor cantidad de infecciones bacterianas de transmisión sexual. En las mujeres, la infección por esta bacteria produce secuelas y complicaciones graves, como: enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, embarazo ectópico, artritis reactiva y endocarditis.^{1,2} También puede ser causa de abortos repetidos, rotura prematura de membranas y, debido a la infección genital materna en el recién nacido, bajo peso y aumento de la mortalidad perinatal; es responsable de conjuntivitis, ceguera y neumonía.³ Los estudios recientes han demostrado que esta bacteria facilita la transmisión del VIH y del virus del papiloma humano.^{4,5} Debido a que los individuos infectados pueden portar el microorganismo

durante meses o años y transmitir la enfermedad a sus parejas sexuales, su diagnóstico sigue siendo un reto. Quienes contraen esta infección experimentan síntomas muy leves o son portadores asintomáticos, circunstancias que pueden retrasar el diagnóstico y aumentar el riesgo de secuelas a largo plazo.

En la actualidad, en todo el mundo, *C. trachomatis* es la bacteria más frecuente en infecciones del aparato genital. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta una prevalencia global de 4.4 a 6.6 %.⁶ En México no se conoce con exactitud la prevalencia de la infección genital; algunos reportes sugieren una frecuencia de 4% en población abierta de mujeres en edad reproductiva, aparentemente sanas, de colonias suburbanas; de 3 a 18% en pacientes asintomáticas que asisten a la clínica de Gineco-Obstetricia, de 3 a 40% de las pacientes que asisten a la clínica de Gineco-Obstetricia y cursan con leucorrea y síntomas, del 10 a 13.5% en pacientes embarazadas, 8% en pacientes con daño tubárico y 12 a 25% en trabajadoras sexuales.⁷⁻¹⁶

La variación tan amplia en la prevalencia se debe, principalmente, a la metodología empleada para hacer el diagnóstico y al tipo de población analizada. En la actualidad, las técnicas moleculares, como la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son ensayos relativamente simples que han demostrado mayor sensibilidad que otros métodos.

El primer reporte de uso de PCR para detectar *C. trachomatis* en muestras clínicas apareció en 1989.¹⁷ Los estudios se basaron en la amplificación del plásmido cópico (PC), que son moléculas de ADN circulares autorreplicativas encontradas en todos los serotipos de *C. trachomatis*. Estudios recientes de PCR han utilizado para

* Estudiante del doctorado en Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

** Pasante de QFB de la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

*** Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec.

¹ Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos.

Correspondencia: M en C Virginia Sánchez Monroy. Laboratorio de Biología Molecular. Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos. Cerrada de Palomas S/N, colonia Lomas de San Isidro, México 11320 DF. E-mail vickysm17@hotmail.com
Recibido: septiembre, 2008. Aceptado: diciembre, 2008.

Este artículo debe citarse como: Sánchez MV, Torres MAE, Villalba MJDA. 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):13-18
La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

amplificación el plásmido críptico, la proteína principal de membrana externa (MOMP) y subunidades ribosomales (rRNA), lo que indica que la PCR tiene una excelente sensibilidad, incluso algunos han confirmado que es más sensible que el cultivo y los métodos inmunológicos. Mahony y colaboradores, en 1993, realizaron un estudio en el que compararon cinco ensayos de PCR, incluidos dos dirigidos al plásmido, dos al MOMP y uno al rRNA. Los resultados obtenidos indicaron que la amplificación basada en el plásmido fue la más sensible.¹⁸

En el estudio que aquí se reporta se utilizó la técnica de PCR para determinar la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en un grupo de mujeres que acuden a la consulta de ginecología en la Clínica de Especialidades de la Mujer (CEM) de la Secretaría de la Defensa Nacional (SEDENA).

MATERIAL Y MÉTODO

Población y selección de la muestra

A una población abierta de 98 mujeres que acudieron a la consulta externa de Ginecología de la SEDENA en la Ciudad de México, entre julio del 2005 y marzo del 2006 se investigó si tenían *C. trachomatis*. A cada paciente se tomó una muestra cervical y se le entregó un cuestionario para responderlo. Las variables estudiadas fueron: edad, inicio de vida sexual, antecedentes de abortos, dispositivo intrauterino u otro método anticonceptivo, antecedentes de vaginitis estudiado por el análisis de exudado en fresco y cantidad de hijos. Se excluyeron las mujeres que recibieron antibióticos durante las dos semanas previas al ingreso al estudio.

Detección de *C. trachomatis* mediante PCR

Las muestras para el estudio se tomaron de un exudado del cuello uterino con un *citobrush*, que se depositó en un tubo de plástico de 2 mL con solución de extracción para ADN. La extracción de éste se realizó con la técnica descrita por Sambrook y colaboradores.¹⁹ La cuantificación del material genético se determinó en un espectrofotómetro (GeneQuant pro Amersham Pharmacia).

Para la amplificación por PCR se utilizó un par de oligonucleótidos específicos para la secuencia genética del PC, descritos por Mahony y colaboradores;¹⁷ como control de integridad del ADN, en todas las muestras se amplificó un fragmento del gen para la beta globina de humano. Las

secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de *C. trachomatis* y de beta-globina.

Oligonucleótidos	Secuencia
Plásmido críptico (PC)	KL1 5'-TCCGGAGCGAGTTAC-GAAGA-3'
	KL2 5'-AATCAATGCCCGG-GATTGGT-3'
	GH20 5'-GAAGAGCCAAGGA-CAGGTAC-3'
Beta-globina	PC04 5'-CAACTTCATCCACG-TTCACC-3'

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L que contenía una mezcla de reacción con: 0.5 U *Taq* polimerasa (Invitrogen), 1 μ M de cada uno de los oligonucleótidos, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, buffer para la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen), y 100 ng de ADN proveniente de la muestra a analizar. La mezcla quedó contenida en un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600). La desnaturalización del ADN ocurrió a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación: 94°C, 30 seg, 56°C 30 seg y 72°C 30 seg. Al término de los ciclos se hizo una extensión final de 72°C durante cinco minutos.

Como control negativo de la PCR se utilizó la misma mezcla de reacción sometida a las mismas condiciones, pero sin ADN blanco y como control positivo se utilizó ADN purificado de la bacteria *C. trachomatis* (L2), donada por el Departamento de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Los tamaños de los productos amplificados correspondieron a 241 pb para el PC de *C. trachomatis* y 268 pb para el gen de beta globina, que se observaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Con el propósito de conocer la mínima cantidad de bacterias detectadas mediante PCR, se realizó una curva de sensibilidad de ADN. Para esto se cuantificó espectrofotométricamente el ADN bacteriano, se realizaron diluciones seriadas del mismo y se ensayaron las PCR.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para la comparación de las variables se efectuó con las pruebas de U de Mann-Whitney y ji al

cuadrado y con el programa de SigmaStat versión 2.0. Se consideraron estadísticamente significativos los valores con $p < 0.001$

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación de la CEM de la SEDENA. Se solicitó consentimiento informado escrito para la participación en el estudio. Las pacientes con resultado positivo de la prueba recibieron asesoramiento médico individual y a la pareja se le indicó el tratamiento correspondiente.

RESULTADOS

De las 98 muestras estudiadas, 20 (20.4%) resultaron positivas a la infección por *C. trachomatis*, cuando se realizó el diagnóstico molecular por PCR. En la figura 1 se ejemplifican sólo ocho muestras diferentes de las 98 analizadas. Los fragmentos generados de la PCR identifican molecularmente a *C. trachomatis*. Se obtuvo el amplificado esperado de un tamaño igual a 241 pb, que detectó hasta 1 pg/μL de ADN bacteriano equivalente a una bacteria, como puede comprobarse con el ensayo de sensibilidad al ADN bacteriano que se muestra en la figura 2.

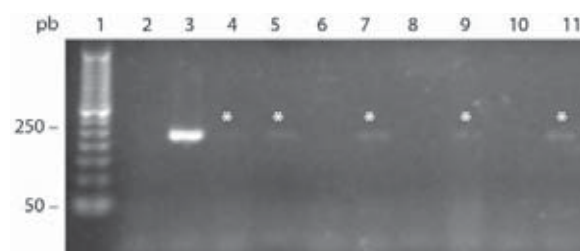


Figura 1. Fragmentos generados de la amplificación por PCR de *Chlamydia trachomatis*. Gel de agarosa al 3% que muestra en el carril 1, marcador de tamaño molecular 50 pb ADN Ladder; carril 2, blanco de la PCR que contiene todos los reactivos utilizados sin ADN; carril 3 control positivo, que contiene reactivos con ADN de *Chlamydia trachomatis* y los carriles del 4 al 11, amplificados con ADN proveniente de ocho muestras cervicales de las 98 pacientes estudiadas. Los asteriscos señalan las muestras positivas.

Se compararon las características entre las pacientes positivas y negativas a la infección por *C. trachomatis* y, de acuerdo con el cuadro 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad, inicio de vida sexual, cantidad de hijos, vaginitis y algún método anticonceptivo empleado. Sin embargo, sólo se observó

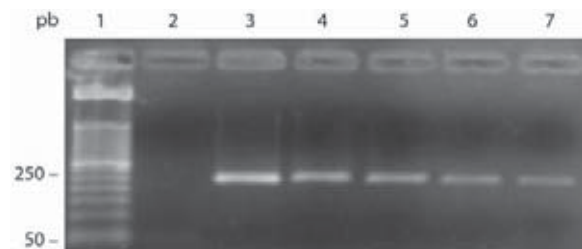


Figura 2. Curva de sensibilidad al ADN bacteriano de *Chlamydia trachomatis*. Gel de agarosa al 3% que muestra en el carril 1, el marcador de tamaño molecular 50 pb ADN Ladder; el carril 2, el blanco de la PCR que contiene todos los reactivos utilizados sin ADN; los carriles del 3 al 7 con ADN de *C. trachomatis* a 100, 10, 1, 0.1 y .001 ng, respectivamente.

Cuadro 2. Relación entre los resultados de la detección molecular de *Chlamydia trachomatis* y las características de la población estudiada.

Características	Negativo (n= 78-79.6%)	Positivo (n= 20-20.4%)	p
Edad	33.64	34.65	NS
Inicio de vida sexual	19.11	19.8	NS
Número de hijos	2.07	2.25	NS
Vaginitis	34 - 43.59%	11 - 55%	NS
Abortos	15 - 19.23%	16 - 80%	P = <0.001
Método anticonceptivo			
Ninguno	34 - 43.59%	9 - 45.0%	NS
DIU	15 - 19.23%	6 - 30.0%	NS
Salpingoclasia	14 - 17.95%	2 - 10.0%	NS
Hormonal	10 - 12.82%	2 - 10.0%	NS
Barrera	5 - 6.41%	1 - 5.0 %	NS

NS= no significativo

diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la cantidad de abortos, que fue mayor para las pacientes positivas a la infección. De las 20 muestras con resultado positivo para *C. trachomatis* correspondieron a una media de edad de 34.64 años. El inicio de la actividad sexual correspondió a la edad de 19.8 años, con 2.25 hijos. Once pacientes con prueba positiva para *C. trachomatis* tenían antecedentes de enfermedad del aparato genital inferior y mediante el examen realizado en fresco se observaron 11 vaginitis debidas a bacterias y dos a *Candida*, nueve no tenían este antecedente. El antecedente de aborto coexistió en 16 mujeres y correspondió al parámetro con mayor

significado estadístico en nuestro estudio, con la infección por *C. trachomatis*.

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la prevalencia de *C. trachomatis* en las pacientes atendidas en la CEM de la SEDENA correspondió a 20.4%. En comparación con los otros siete estudios de prevalencia en poblaciones atendidas en otros hospitales se reporta que en México la prevalencia va de 3 a 18.1%.^{7,8,10,11,14} Sólo dos estudios, el de Rosas y colaboradores en 1993¹⁵ y el de Iglesias y su grupo, en 2007,⁹ reportaron prevalencias superiores al nuestro de 28.4 y 40%, respectivamente. La explicación a este hallazgo puede deberse a la diferencia con el tipo de población, nivel socioeconómico y lugar de estudio, aunque consideramos que el mayor peso se debe a que en los otros reportes se utilizaron técnicas para detección con menor sensibilidad y especificidad, lo que directamente reduce la demostración de datos reales de prevalencia. La principal fortaleza de este estudio es el método de detección utilizado, que está debidamente fundamentado y que es muy sensible, específico y supera al cultivo considerado como patrón de referencia.^{13,18,20}

No se encontró relación entre la edad, el inicio de la actividad sexual, la cantidad de hijos o enfermedades de la vía genital y la infección por *C. trachomatis*, pero sí con el número de abortos. Este dato ya ha sido reportado en otro estudio similar al nuestro, con 1,100 mujeres que acudieron a dos clínicas de planificación familiar en Mérida, Yucatán, México, por Canto y colaboradores.¹⁰ Sin embargo, en el mismo año Cravioto¹² y su grupo analizaron 586 mujeres en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, de la Ciudad de México, y no reportaron diferencias significativas entre la infección y los abortos. Por lo que se refiere a nuestro estudio, una limitación es que el tamaño de las muestras analizadas es bajo y pudiera afectar el poder para la detección de diferencias significativas respecto de los factores de riesgo conocidos. Consideramos la importancia de estudiar otros factores asociados con *C. trachomatis*, como responsables del aborto espontáneo, como: *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*.

En nuestro país, la promiscuidad, el no usar preservativo y la falta de higiene adecuada representan un serio problema que repercute en que las infecciones de transmi-

sión sexual sean mucho más frecuentes, y que no todos los episodios se diagnostiquen y traten adecuadamente.

Este estudio pone de manifiesto la importancia de hacer el diagnóstico de *C. trachomatis* con métodos de detección sensibles (PCR) para iniciar el tratamiento en forma temprana y disminuir la diseminación de la infección, evitando secuelas a largo plazo en la salud.

REFERENCIAS

1. Cates W, Wasserheit JN. Genital chlamydial infection: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1771-81.
2. Sieper J, Kingsley G. Recent advances in the pathogenesis of reactive arthritis. *Immunol Today* 1996;17:160-2.
3. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness a global perspective. *Bulletin of the World Health Organization* 2001;79:214-21.
4. Jalal H, Stehen H, Bibby DF, Sonnex C, Carne CA. Molecular epidemiology of genital human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* among patients attending a genitourinary medicine clinic- will vaccines protect? *Int J STD AIDS* 2007;18:617-21.
5. Giuliano A, Denman C, Guernsey de Zapien J, Navarro HJ, et al. Design and results of the USA-Mexico border human papillomavirus (HPV), cervical dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* study. *Rev Panam Salud* 2001;9:172-81.
6. Rowe PJ. Reproductive tract infections: Annual Technical Report. Human Reproduction Programme, WHO; 1998;pp:186-90.
7. Reyes ME, Díaz FLA, Gonzalez BCV, Esquer MM, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* by immunofluorescence, Papanicolaou and immunoperoxidase in woman with leucorrhea. *Rev Latinoam Microbiol* 1996;38:65-73.
8. Acosta CB, Ruiz ML, Escobedo PJ. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in low-income rural and suburban populations of Mexico. *Sex Transm Dis* 1996;23:283-88.
9. Iglesias BJ, Saldivar RD, Tijerina MR, González GG, y col. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*: prevalencia y relación con los datos clínicos de vaginitis. *Medicina Universitaria* 2007;9:53-7.
10. Canto DT, Polanco RL, Fernández GV, Ruiz GS. Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. *Salud Pública Méx* 2003;45 supl 5:S657-61.
11. Jiménez PT, Trujillo OL, Roblero OS. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres usuarias de un hospital general en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Enf Infec y Micro* 2001;21:123-5.
12. Cravioto MC, Matamoros O, Villalobos ZY, Peña O, y col. Prevalencia de anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* y anti-*Neisseria gonorrhoeae* en grupos de individuos de la población mexicana. *Salud Pública Méx* 2003; 45 Supp 5:S681-9.
13. Bañuelos PC, Deleon RI, Hernandez MJ, Martinez GL, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 2000;44:114-23.

14. Díaz BG, Díaz LE, Servin RF. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* en el cervix de mujeres embarazadas en control prenatal. Ginecol Obstet Mex 1997;65:48-52.
15. Rosas AJ, Toca PL, Díaz EC, Nava FJ. Infección por *Chlamydia trachomatis* en cérvix uterino. Ginecol Obstet Mex 1993;61:326-8.
16. Esquivel CA, Briones EML, Castruita LD, Lazalde RB, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in registered female sex workers in northern Mexico. Sex Transm Dis 2003;30:195-8.
17. Mahony JB, Luinstra KE, Chernesky MA. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in culture positive and culture negative specimens by polymerase chain reaction (PCR). Eighth ISSTD-DR Meeting Copenhagen, Denmark 1989, Abstract # 20.
18. 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; 31:1753-8.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1994.
20. Marrazzo JM, Cellum CL, Hillis SD, Fine D, et al. Performance and cost-effectiveness of selective screen criteria for *Chlamydia trachomatis* infection in women. Sex Transm Dis 1997;24:131-41.