

Persistencia de *Chlamydia trachomatis* en el endometrio y líquido peritoneal de pacientes con infertilidad pero cultivo cervical negativo⁺

Jesús Roberto Villagrana Zesati,¹ Marcela López Hurtado,² Verónica R Flores Salazar,³ María J de Haro Cruz,⁴ Marcos R Escobedo Guerra,⁴ Fernando M Guerra Infante⁵

RESUMEN

Antecedentes: las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son un problema de salud pública debido a su alta prevalencia; son asintomáticas en 70% de las mujeres y tienen secuelas reproductivas porque no se detectan ni tratan oportunamente.

Objetivo: buscar *C. trachomatis* en el endometrio y el líquido peritoneal de mujeres infériles en quienes no se detectó este agente patógeno en el endocervix.

Pacientes y método: estudio retrospectivo y transversal realizado en pacientes con infertilidad de origen desconocido que en la histerosalpingografía no mostraron datos de obstrucción tubaria. En todas se buscó *C. trachomatis* en el endometrio y líquido peritoneal.

Resultados: de las 38 pacientes a las que se les efectuó estudio laparoscópico, sólo 18 tuvieron infección en el endometrio, el líquido peritoneal, o ambos; ocho de ellas fueron negativas a la amplificación de un producto de 129 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis* en muestras endocervicais. Los datos laparoscópicos indicaron que cinco de ellas tenían enfermedad pélvica inflamatoria.

Conclusión: la ausencia de *C. trachomatis* en el endocervix no refleja lo que sucede en los genitales superiores; en mujeres en quienes se sospeche infertilidad es necesaria una búsqueda intencionada de infección por este agente patógeno en el endometrio.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, infección endocervical, infección endometrial, infección del líquido peritoneal.

ABSTRACT

Background: *Chlamydia trachomatis* infection is considered a public health problem due to its high prevalence, and because it is asymptomatic in 70% of women and provokes reproductive sequelae when it is not detected and treated timely.

Objective: To search for *C. trachomatis* in endometrium and peritoneal fluid of infertile women without detection of this pathogen in cervical secretions.

Patients and method: A retrospective and cross-sectional study was done in 38 patients with infertility only 18 showed peritoneal fluid infection and/or endometrial infection, eight of them were negative for the amplified product of 129-bp from CT *ompA* gene in cervical secretions. Laparoscopic data showed that five of them had pelvic inflammatory disease.

Conclusion: The non-detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervix does not reflect what happens in the upper genital tract, that's why we need to do a deliberate search of infection by this pathogen in endometrium of suspected women with infertility.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, endocervical infection, endometrial infection, peritoneal fluid infection.

RÉSUMÉ

Infections à *Chlamydia trachomatis* sont considérés comme un problème de santé publique en raison de sa prévalence élevée, asymptomatique dans 70% des femmes en matière de reproduction et les séquelles qui produisent ne sont pas détectés et traités rapidement. L'objectif de cette recherche était la recherche de *C. trachomatis* (CT) dans le liquide péritonéal de l'endomètre et des femmes infertiles présentant pas de détection de cet agent pathogène dans l'endocol. Sur les 38 patients atteints de la seule étude a montré une infection par laparoscopie dans 18 l'endomètre et / ou le liquide péritonéal, dont huit se sont révélés négatifs pour l'amplification de de 129 pb du gène *ompA* produit de la TDM dans les échantillons endocervicaux, les données laparoscopiques ont montré que cinq d'entre eux eu une maladie inflammatoire pelvienne (PID). En conclusion, la non-détection de CT dans endocol ne reflète pas ce qui se passe dans les organes génitaux supérieurs, nécessite une recherche délibérée de l'infection par cet agent pathogène dans l'endomètre chez les femmes atteintes d'infertilité suspectée.

Mots-clés: infection à *Chlamydia trachomatis* endocervical, endométrial infection et l'infection du liquide péritonéal.

RESUMO

Infecções por *Chlamydia trachomatis* são considerados um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, assintomática em 70% das mulheres e seqüelas reprodutiva que não produzem a ser detectados e tratados precocemente. O objetivo desta pesquisa foi a busca por *C. trachomatis* (CT) no líquido peritoneal e endometrial de mulheres inférteis com nenhuma detecção desse patógeno em endocérvice. Dos 38 pacientes com apenas um estudo mostrou laparoscópica infecção em 18 endometrial e / ou fluido peritoneal, oito das quais foram negativas para a amplificação de um produto de 129 pb do gene *ompA* de CT em amostras endocervicais, laparoscópicas dados mostraram que cinco deles teve doença inflamatória pélvica (DIP). Em conclusão, a não detecção de CT em endocérvice não reflete o que acontece nos órgãos genitais superiores, requer uma busca deliberada de infecção por essa bactéria no endometrio em mulheres com infertilidade suspeita.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis* infecção endocervical, endometrial infecção e infecção do fluido peritoneal.

Las infecciones de transmisión sexual producidas por *Chlamydia trachomatis* representan un problema de salud pública debido a su alta prevalencia y a las consecuencias devastadoras que ocasionan en la reproducción femenina, porque generan enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad por obstrucción tubaria y embarazos ectópicos.^{1,2} Los métodos de mayor precisión para el diagnóstico de infecciones endocervicales por *C. trachomatis* son el cultivo celular y la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR);^{3,4} sin embargo, es difícil detectar este agente patógeno en los órganos genitales superiores, ya que las muestras endocervicales no necesariamente reflejan lo que sucede en ellos. Al principio la infección suele ser asintomática o sólo causar molestias leves que no generan preocupación en la paciente.

La persistencia de la infección por *C. trachomatis* durante meses o años en el área endocervical, las infecciones repetidas o un tratamiento antimicrobiano tardío son factores que favorecen que esta bacteria invada los órganos genitales superiores, como los ovarios o las trompas de Falopio.^{1,2,5,6} No detectar *C. trachomatis* en el endocérvix no implica que no exista una infección tubaria.

* Trabajo ganador del tercer lugar del Premio Dr. Luis Castelazo Ayala, otorgado a los trabajos científicos de investigación clínica, presentados por escrito, en el 63º Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, celebrado del 5 al 9 de agosto de 2012 en Guadalajara, Jal.

¹ Ginecoobstetra, infectólogo, maestro en ciencias e investigación clínica, investigador en ciencias médicas y jefe del Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal.

² Bióloga, maestra en ciencias e investigadora en ciencias médicas.

³ QBP. Departamento de Infectología, Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Perinatología, México, DF.

⁴ QBP, Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, México, DF.

⁵ Doctor en ciencias e investigador en ciencias. Departamento de Infectología, Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Perinatología. Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, México, DF.

Correspondencia: Dr. Jesús Roberto Villagrana Zesati. Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales 800, colonia Lomas Virreyes, CP 11000, México, DF. Correo electrónico: dr_robertovillagrana@hotmail.com
Recibido: 5 de agosto 2012. Aceptado: diciembre 2012.

Este artículo debe citarse como: Villagrana-Zesati JR, López-Hurtado M, Flores-Salazar VR, De Haro-Cruz MJ y col. Persistencia de *Chlamydia trachomatis* en el endometrio y líquido peritoneal de pacientes con infertilidad pero cultivo cervical negativo. Ginecol Obstet Mex 2013;81:23-28.

Aunque la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia* o la detección de ADN de *C. trachomatis* por hibridación en biopsias de tejido endometrial son los métodos utilizados para diagnosticar infección en los órganos genitales superiores,⁷⁻¹⁰ en varias clínicas de infertilidad no se usan de manera habitual debido a que las pruebas serológicas se consideran de poca validez, porque los títulos elevados de anticuerpos pueden persistir durante años, lo que hace difícil identificar a las mujeres con infección activa en estos tejidos.^{11,12} La búsqueda de ADN de *C. trachomatis* en el endometrio resulta irrelevante porque se desconoce la velocidad real de crecimiento de esta bacteria y no se entiende hasta qué punto este microorganismo puede existir en forma latente (infección persistente) en estos tejidos.

Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio fue examinar la hipótesis de que *C. trachomatis* puede persistir como una infección crónica en los tejidos de los órganos genitales superiores, aun cuando no se demuestre una infección en el endocérvix. Para ello, se amplificó un fragmento del gen *ompA* de *C. trachomatis* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final en biopsias de endometrio y líquido peritoneal de las mujeres que fueron negativas, también por PCR, a la infección por este microorganismo en el endocérvix.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

Estudio retrospectivo y transversal realizado de enero a diciembre de 2010. Se seleccionaron todas las pacientes infériles por causa desconocida que no tenían obstrucción tubaria, corroborada por histerosalpingografía.

Muestras endocervicales

Las muestras de endocérvix se colectaron con un espejo vaginal estéril sin lubricante y la introducción de un hisopo de dacron en el cuello del útero, con el que se hizo un raspado riguroso para obtener células endocervicales. Posteriormente, el hisopo se colocó en un tubo cónico que contenía el medio de transporte 2SP, y se mantuvo a -70°C hasta el momento de usarlo.

Muestras de endometrio

Las muestras se obtuvieron mediante aspiración con una cánula de biopsia desechable estéril. Las biopsias de endometrio se colocaron en tubos cónicos que contenían el

medio de transporte 2SP y se conservaron a -70°C hasta el momento de efectuar el diagnóstico de infección por *C. trachomatis*.

Muestras de líquido peritoneal

Las muestras de líquido peritoneal se obtuvieron durante la laparoscopia. El método utilizado fue la aspiración del líquido libre acumulado en el fondo de saco. El líquido peritoneal se depositó en tubos de propileno y se centrifugó a 9,000 x g durante 10 minutos. Al botón celular se le adicionaron 2 mL del medio de transporte 2SP y se mantuvo a -70°C hasta el momento de hacer el diagnóstico de infección.

Purificación de ADN

Se realizó una digestión proteica de 200 µL de cada una de las muestras mediante proteinasa K; posteriormente, se llevó a cabo la purificación del ADN por el método de fenol-cloroformo, tal como se describió.¹³

Detección de *Chlamydia trachomatis*

El diagnóstico de infección por *Chlamydia* se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 129 pb del gen *omp A* de *C. trachomatis*, con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los iniciadores usados fueron los reportados por Duthil y col.¹⁴ en 1993 (MOMP1 5'-GCGCTTGAGTTCTGCTTCCTC-3' y MOMP2 3'-CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA-5'). La PCR se efectuó en un volumen final de 50 µL, que consistió en: 3 µL de ADN y 47 µL de la mezcla que contenía regulador de amplificación 1 X, 1.75 mM de MgCl₂, 30 pM/µL de cada uno de los iniciadores, 160 µM/µL de cada una de las bases y 1 U/µL de Taq polimerasa (Promega, Madison WI, EUA). La mezcla de reacción se sometió a desnaturización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 34 ciclos de amplificación en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., EUA) y una extensión final prolongada de 70°C durante 10 minutos. Cada ciclo consistió en un paso de desnaturización a 95°C durante 60 segundos, de una alineación a 61°C por 120 segundos y de una extensión a 70°C durante 60 segundos. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa a 2% revelado con bromuro de etidio al 0.1%. En cada ensayo se incluyó ADN genómico de *C. trachomatis* (ATCC L2 434/Bu) como control positivo y ADN de células HeLa como control negativo. La existencia

de un producto de amplificación de 129 pb se consideró positiva a la infección por *Chlamydia trachomatis*.

RESULTADOS

Se analizaron 38 pacientes con datos de infertilidad por causa desconocida. En la Figura 1 se muestra la amplificación del fragmento de 129 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis*. La edad promedio de las mujeres fue de 30 ± 5 años; la mayoría de ellas refirió haber tenido sólo un compañero sexual. Veinte fueron negativas a la infección por *C. trachomatis* en el endocérvid, el endometrio y el líquido peritoneal. El análisis por laparoscopia indicó que 14 mujeres no tenían lesiones; dos tenían obstrucción tubaria bilateral; tres, adherencias laxas, y una, obstrucción tubaria bilateral y adherencias laxas (Cuadro 1).

En las 18 pacientes restantes se logró demostrar una infección por *C. trachomatis*. El promedio de edad de estas mujeres fue de 31 ± 5 años, y la mayoría sólo tuvo un compañero sexual. En 10 de ellas se observó infección endocervical, y de éstas, a siete se les detectó ADN de *C. trachomatis* en el endometrio y el líquido peritoneal y a una sólo en el endometrio. Los hallazgos laparoscópicos de este grupo de pacientes fueron: dos mujeres con obstrucción tubaria bilateral, dos con adherencias pélvicas y dos con ambos padecimientos (Cuadro 1).

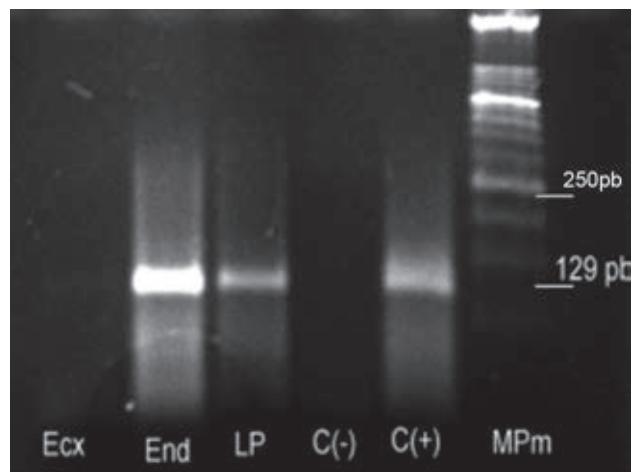


Figura 1. Amplificación del gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis*. Se analizaron muestras de endocérvid (Ecx), endometrio (End) y líquido peritoneal (LP) de mujeres sin infección endocervical por *Chlamydia trachomatis*; C (-) control negativo; ADN de células HeLa; C (+) control positivo; ADN de *Chlamydia trachomatis* (ATCC L2 434/Bu).

Cuadro 1. Datos clínicos y laparoscópicos de pacientes infértiles con infección por *Chlamydia trachomatis*

	<i>Sin infección por C. trachomatis n = 20</i>	<i>Con infección por C. trachomatis Negativo en el endocérvix n = 8</i>	<i>Positivo en el endocérvix n = 10</i>
Edad (años)	19-37	21-38	25-39
Inicio de vida sexual activa (años)	18-25	14-37	19-20
Número de compañeros sexuales	1-2	1	1-2
Enfermedad pélvica inflamatoria	0	5	0
Obstrucción tubaria bilateral	2	0	2
Adherencias pélvicas	3	0	2
Obstrucción tubaria bilateral + adherencias pélvicas	1	0	2
Sin lesiones	14	3	4
Embarazos ectópicos	0	0	2
Infección por Chlamydia en:			
Endocérvix	0	0	10
Endometrio	0	0	1
Líquido peritoneal	0	3	0
Endometrio y líquido peritoneal	0	5	7
Tipo de infertilidad			
Primaria	15	5	6
Secundaria	5	3	4
Temperatura corporal (°C)	36.2-37.2	36.5-37.5	36.5-37.5
Leucocitos X 10 ³	5.2-8.6	5.1-13.0	4.7-11.8
VSG (mm/h)	5-38	6-20	6-35

VSG: velocidad de sedimentación globular.

De las ocho pacientes sin infección endocervical, la edad promedio fue de 31 ± 4 años; la mayoría había tenido sólo una pareja sexual; cinco fueron positivas a *C. trachomatis* en el endometrio y el líquido peritoneal y tres solamente en el líquido peritoneal. En el estudio de laparoscopia se apreció que tres pacientes no tenían lesiones y cinco padecían enfermedad pélvica inflamatoria (Cuadro 1). En cuanto a la prevalencia de infección por *C. trachomatis*, se demostró que cuando sólo se analizaron las muestras endocervicales ésta fue de 26.32%, mientras que si se evaluaron el endometrio y el líquido peritoneal se incrementó a 47.36%.

DISCUSIÓN

La infección por *Chlamydia trachomatis* se ha detectado en diversos tejidos del aparato genital, como: el endocérvix, el endometrio, el ovario y las trompas de Falopio, así como en el líquido peritoneal del fondo de saco.^{7,8,15} En este estudio

se comprobó la infección simultánea por *C. trachomatis* en el endometrio y el líquido peritoneal sin infección en el endocérvix. Este hallazgo confirma el carácter ascendente de *C. trachomatis*, como ya se había descrito en un modelo animal.^{16,17} Se han sugerido tres diferentes mecanismos para que *C. trachomatis* pueda ascender a los órganos genitales superiores. En primer lugar, se ha propuesto que los espermatozoides actúan como transportadores de la bacteria; estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de *C. trachomatis* de adherirse a las células espermáticas.^{18,19} En segundo lugar, la cantidad y calidad del tapón mucoso y su efecto protector, que puede ser modificado por las fluctuaciones hormonales durante el ciclo menstrual, permite el ascenso de los microorganismos de la vagina, incluido *C. trachomatis*.²⁰ Asimismo, las contracciones subendometriales, que se amplifican antes de la ovulación, también pueden influir en el ascenso de microorganismos.²¹ Por último, pueden contribuir algunos procedimientos invasivos, como la colocación del dispositivo intrauterino,

la biopsia de endometrio, la sonohisterosalpingografía o la histerosalpingografía, entre otros.

El desconocimiento por parte de la paciente y del médico de una infección por *C. trachomatis* en el endometrio puede tener un efecto devastador en futuros embarazos. La concepción que se produce en una cavidad uterina infectada puede estar predestinada a un aborto espontáneo. En esta investigación, ocho pacientes no tenían infección por *C. trachomatis* en el endocérvidx, pero sí en el endometrio y en el líquido peritoneal; cinco de ellas tenían salpinges hiperémicas que sugerían enfermedad pélvica inflamatoria leve. Esta observación indujo al médico a prescribir tratamiento antimicrobiano de amplio espectro. A pesar de lo anterior, tres pacientes del mismo grupo no mostraron datos laparoscópicos de lesión, por lo que corrían el riesgo de padecer enfermedad pélvica inflamatoria, obstrucción tubaria bilateral, embarazos ectópicos o dolor pélvico crónico si no se les indicaba tratamiento antimicrobiano específico y oportuno.

Si bien la enfermedad pélvica inflamatoria se considera una infección polimicrobiana de los órganos genitales superiores,²² la tercera parte de los casos son producidos por *C. trachomatis*.^{1,23} Las tasas de progresión y recurrencia varían ampliamente entre las pacientes;^{1,24} algunos estudios han informado que entre 2.0 y 4.5% de las mujeres con infección por *C. trachomatis* en el endocérvidx pueden padecer la enfermedad en aproximadamente 14 días.^{1,21,24} En otros estudios con seguimiento más prolongado, se han reportado tasas más bajas del padecimiento, que van de 0 a 9.5%.^{21,24} En este estudio, de las 18 pacientes con infección por *C. trachomatis*, sólo cinco tenían enfermedad pélvica inflamatoria leve o moderada; todas ellas fueron tratadas de manera ambulatoria. A pesar de lo anterior, se ha puesto en evidencia que aún después del tratamiento antimicrobiano, un bajo porcentaje de estas mujeres puede padecer la enfermedad. Un estudio prospectivo, realizado por Ness y col. con 1,170 mujeres de cinco clínicas de Estados Unidos, demostró que de 122 pacientes que fueron positivas a *C. trachomatis*, 23 sufrieron enfermedad pélvica inflamatoria aún después del tratamiento.²⁵

Aunque existen pocos estudios prospectivos de las secuelas que se producen en los órganos genitales después de la enfermedad pélvica inflamatoria no diagnosticada o mal tratada, se ha informado que cerca de 19% de las mujeres sufrirán infertilidad, 15% enfermedad pélvica inflamatoria recurrente y 20.7% dolor pélvico crónico.^{1,26} En este estudio, de las 10 pacientes con infección en el endocérvidx, el

endometrio y el líquido peritoneal, seis tenían obstrucción tubaria, adherencias pélvicas, o ambas, lo que sugiere que no padecían enfermedad pélvica inflamatoria o no fueron diagnosticadas y, en consecuencia, tampoco fueron tratadas; dicha situación seguramente generó infección crónica por *C. trachomatis*. Se ha propuesto que las adherencias y la obstrucción tubaria son resultado de una respuesta autoinmunitaria órgano específica, debido a la producción de anticuerpos contra la proteína de choque térmico de 60 kDa (hsp60) de *C. trachomatis*. Esta proteína tiene una homología de 60% en su secuencia de aminoácidos con la proteína de hsp60 de células humanas. Las pacientes con oclusión tubaria, con adherencias, o con ambas, muestran concentraciones elevadas de anticuerpos anti-HSP60 de *C. trachomatis*.^{27,28}

Durante una infección crónica, *C. trachomatis* produce altas cantidades de HSP60. Los efectos de la reactividad cruzada con las HSP60 humanas posiblemente perpetúan y aumentan la infección y, por tanto, inducen un proceso inflamatorio de evolución crónica que dañará al tejido y provocará la reparación del mismo con una alta posibilidad de cicatrización y fibrosis; esto producirá una obstrucción parcial o total de las salpinges y la formación de adherencias.²⁷⁻³⁰

Debido a que las tasas de avance de la infección varían ampliamente entre las pacientes, es imperativo pensar primero en las que tienen factores de riesgo e infertilidad y posteriormente realizar los estudios adecuados para un buen diagnóstico y, según corresponda, un tratamiento específico. Continuar con esta línea de investigación permitirá entender mejor la historia natural y la patogénesis de *C. trachomatis*. No se descarta la posibilidad de que en un futuro próximo se desarrolle una vacuna.

REFERENCIAS

1. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, et al. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. J Infect Dis 2010;201(Suppl 2):S134-155.
2. Bakken IJ. *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy: recent epidemiological findings. Curr Opin Infect Dis 2008;21(1):77-82.
3. Ostergaard L, Birkeland S, Christiansen G. Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1990;28(6):1254-1260.
4. 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(10):2648-2653.
5. Wølner-Hanssen P. Silent pelvic inflammatory disease: is it overstated? Obstet Gynecol 1995;86(3):321-325.
 6. Oakeshott P, Hay P. General practice update: *Chlamydia* infection in women. Br J Gen Pract 1995;45(400):615-620.
 7. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, et al. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. J Infect Dis 2010;201(Suppl 2):S134-S155.
 8. Toth M, Patton DL, Campbell LA, Garretta EI, et al. Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. Am J Reprod Immunol 2000;43(4):218-222.
 9. Patton DL, Askienazy-Elbar M, Henry-Suchet J, Campbell LA, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. Am J Obstet Gynecol 1994;171(1):95-101.
 10. Broeze KA, Opmeer BC, Coppers SF, Van Geloven N, et al. *Chlamydia* antibody testing and diagnosing tubal pathology in subfertile women: an individual patient data meta-analysis. Hum Reprod Update 2011;17(3):301-310.
 11. Hernández-Trejo M, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Guerra-Infante FM. Evaluación de los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*Chlamydia trachomatis* para el diagnóstico de infertilidad por factor tubario. Rev Invest Clin 2009;61(1):87-89.
 12. Sharara FI, Queenan JT Jr, Springer RS, Marut EL, et al. Elevated serum *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies. What do they mean for IVF pregnancy rates and loss? J Reprod Med 1997;42(5):281-286.
 13. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997;10(1):160-184.
 14. Jiménez-Estrada JM, Escobedo-Guerra MR, Arteaga-Troncoso G, López-Hurtado M, et al. Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. Amer J Anim Vet Scien 2008;3(4):91-95.
 15. Dutilh B, Bébáar C, Rodriguez P, Vekris A, et al. Specific amplification of a DNA sequence common to all *Chlamydia trachomatis* serovars using the polymerase chain reaction. Res Microbiol 1989;140(1):7-16.
 16. Guerra-Infante FM, Flores-Medina S, López-Hurtado M, Zamora-Ruiz A, et al. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid from asymptomatic infertile women. Arch Med Res 1999;30(2):138-143.
 17. Bell JD, Bergin IL, Schmidt K, Zochowski MK, et al. Nonhuman primate models used to study pelvic inflammatory disease caused by *Chlamydia trachomatis*. Infect Dis Obstet Gynecol 2011; doi:10.1155/2011/675360.
 18. Bell JD, Bergin IL, Harris LH, Chai D, et al. The effects of a single cervical inoculation of *Chlamydia trachomatis* on the female reproductive tract of the baboon (*Papio anubis*). J Infect Dis 2011;204(9):1305-1312.
 19. Wolner-Hanssen WH, Mardh PA. *In vitro* tests of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. Fertil Steril 1984;42:102-107.
 20. Friberg J, Confino E, Suarez M, Gleicher N. *Chlamydia trachomatis* attached to spermatozoa recovered from the peritoneal cavity of patients with salpingitis. J Reprod Med 1987;32(2):120-122.
 21. Zervomanolakis I, Ott H, Hadzimerovic D, Mattle V, et al. Physiology of upward transport in the human female genital tract. Ann N Y Acad Sci 2007;1101:1-20.
 22. Taylor BD, Haggerty CL. Management of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection: screening and treatment challenges. Infect Drug Resist 2011;4:19-29.
 23. Narcio RML, Arredondo GJL, Zaldívar NA, Quesnel GBC y col. Etiología microbiana de la enfermedad inflamatoria pélvica leve y moderada (EIP). Ginecol Obstet Mex 1998;66:309-315.
 24. Sweet RL. Treatment of acute pelvic inflammatory disease. Infect Dis Obstet Gynecol 2011; Article ID 561909, 13 pages, doi:10.1155/2011/561909.
 25. Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, et al. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. BMJ 2010;340:c1642. doi:10.1136/bmj.c1642.
 26. Ness RB, Smith KJ, Chang CC, Schisterman EF, Bass DC. Gynecologic infection follow-through, GIFT, investigators. Prediction of pelvic inflammatory disease among young, single, sexually active women. Sex Transm Dis 2006;33(3):137-142.
 27. Haggerty CL, Ness RB, Amortegui A, Hendrix SL, et al. Endometritis does not predict reproductive morbidity after pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol 2003;188(1):141-148.
 28. Dieterle S, Wollenhaupt J. Humoral immune response to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 in *Chlamydia*-associated chronic salpingitis with tubal occlusion. Hum Reprod 1996;11(6):1352-1356.
 29. Toye B, Laferrière C, Claman P, Jessamine P, Peeling R. Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. J Infect Dis 1993;168(5):1236-1240.
 30. Mascellino MT, Boccia P, Oliva A. Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* infected women. Obstet Gynecol 2011;2011:436936. (En prensa.)