

Monografía

Infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis*

Estrella Cervantes G¹

¹Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Introducción

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* son patógenos que infectan un amplio rango de organismos, así como una variedad de protistas como la amiba de vida libre causante de infecciones cerebrales *Acanthamoeba*.¹

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligada, considerada uno de los patógenos de transmisión sexual prevalentes en el mundo. Las infecciones urogenitales causadas por *C. trachomatis* cursan con múltiples manifestaciones clínicas incluyendo cervicitis, uretritis y enfermedad inflamatoria pélvica que puede conducir a abortos e infertilidad; no obstante, la infección puede ser asintomática hasta en 80% de los casos.^{1,2}

Debido a la gravedad de estas complicaciones, diversos países han tomado acciones para reducir la prevalencia de esta infección, sin embargo, el diseño de programas de control epidemiológico se ve obstaculizado porque no se dispone de técnicas que reúnan criterios de sensibilidad satisfactorios. La técnica de referencia para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia* sigue siendo el cultivo, la que teniendo una especificidad de 100%, carece de una buena sensibilidad.^{2,3}

Chlamydia requiere cultivos en líneas celulares, siendo éstos de alto costo y de difícil mantenimiento en un laboratorio de rutina, por lo cual muchos laboratorios han abandonado la práctica de investigación de *Chlamydia* en muestras clínicas.⁴

El diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis* en nuestro medio se basa fundamentalmente en las manifestaciones clínicas, estrategia que presenta muchas limitaciones en casos de una alta tasa de infecciones asintomáticas. Por tal motivo, desconocemos la estimación de la verdadera prevalencia en nuestra población.⁵

Microbiología

En 1999 se realizó una nueva revisión de la familia *Chlamydiaceae* tomando como base los estudios genéticos de estos microorganismos. Anteriormente la familia contaba con un solo género *Chlamydia* y cuatro especies, en la actualidad la familia se divide en dos géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*. En el grupo *Chlamydia* se dejó a *Chla-*

mydia trachomatis, *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pneumoniae* se reubicaron en un nuevo género: *Chlamydophila*.⁶

Las clamidias son microorganismos no móviles, patógenos del humano, en décadas pasadas se les consideraba como virus por su tamaño pequeño, pueden atravesar filtros de 0.45 μm, además de ser bacterias intracelulares obligadas. Como las bacterias Gram negativas, poseen una membrana externa y una interna, además de presentar ambos, ácidos nucleicos.^{5,6}

Las clamidias detectadas en el tracto genital humano poseen en esta región un gen homólogo a los reportados en *Escherichia coli* enterohemorrágica O157 y *Clostridium*.^{7,8}

Las clamidias son bacterias aerobias, utilizan el glutamato como fuente primaria de carbono complementada por la glucosa-2-oxoglutarato. Las clamidias necesitan ATP de la célula huésped, sin embargo en el análisis de la secuencia del genoma se observó que presentan genes que codifican ADP/ATP translocasas, ATPasa vacuolar y ATPasas flagelares, que probablemente están involucradas en la síntesis ATP.^{8,9}

Una característica distintiva de las clamidias es la de presentar un ciclo biológico diferente a todas las bacterias, el cual está compuesto por la parte infecciosa denominado cuerpo elemental y un cuerpo reticular. El cuerpo elemental es resistente a factores ambientales adversos de forma semejante a una espora, con un diámetro de 0.2 a 0.4 μm, en el cuerpo elemental se encuentran los ácidos nucleicos ADN y ARN.^{8,10}

Presenta antígenos especie-específicos que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica y no pueden replicarse fuera de las células del huésped. Su pared celular carece de peptidoglucano como el presente en las bacterias Gram negativas, sin embargo contiene D-alanina y carbohidratos además de péptidos enlazados a grupos sulfhidrilo.

El lipopolisacárido (LPS) contiene el antígeno O, su estructura es similar al del LPS rugoso que se encuentra en algunas bacterias entéricas. Los cuerpos elementales se liberan de las células del huésped al final del ciclo de infección e invaden nuevas células blanco. Una vez dentro de estas células, las clamidias se transforman en cuerpos reticulares, cuyo diámetro es de 0.6 a 1.0 μm.¹¹

Estos cuerpos reticulares tienen actividad metabólica y se multiplican dentro de las vacuolas formadas por endocitosis en las células del huésped. Los cuerpos reticulares ca-

recent de ciclo de Krebs, por lo que deben tomar su trifosfato de adenosina (ATP) en forma directa de la célula huésped. Las clamidias son las únicas bacterias que tienen translocasa de ATP.^{9,12}

El cuerpo elemental para su observación se tiñe con Giemsa de color azul y por la tinción de Machiavello color rojo. Los cuerpos elementales de las clamidias en su membrana externa secretan proteínas extracelulares ricas en cisteína, unidas de forma cruzada a puentes disulfuro, proporcionándoles al cuerpo elemental protección y forma.¹³

Las proteínas ricas en cisteína incluyen la proteína MOP presente en la membrana externa, se expresa en la envoltura del cuerpo elemental, tiene un peso molecular de 40 kDa, constituye el 60% del total de las proteínas de la membrana externa, está codificada por el gene *omp1*, tiene función de porina, se glicosila postraducción, al parecer juega un papel en la adherencia electrostática, esta proteína contiene antígenos de superficie.¹⁴

Otra proteína que se encuentra en el espacio periplásmico con un peso molecular de 69 kDa, codificada por el gene *omp2*, proporciona a las clamidias integridad semejante a la del peptidoglucano, el cuerpo reticular no contiene esta proteína.^{15,16}

La proteína codificada por el gene *omp3* con un peso molecular entre 12-15 kDa es una proteína hidrofílica que ayuda en la adhesión a las células del huésped. Recientemente se han encontrado dos proteínas de choque térmico en la envoltura de las clamidias, la proteína 70HSP en mujeres con enfermedad pélvica asociada a *C. trachomatis*, y la proteína 69HSP.^{16,17}

En estudios realizados sobre infertilidad y embarazos ectópicos se han detectado títulos altos de anticuerpos anti-HSP60, en contraste con la proteína anti-HSP70 los cuales se han reportado con inmunidad protectora.

Por microscopía electrónica, se ha observado en la membrana externa de las clamidias unas proyecciones hemisféricas, semejantes a cilios especializados de superficie, al parecer al cuerpo elemental le sirven para adherirse a las células del huésped.¹⁸

Las clamidias poseen antígenos específicos, se pueden detectar anticuerpos contra estos antígenos con la técnica de fijación de complemento o por inmunofluorescencia. Los antígenos específicos de especie son proteínas de membrana externa.^{19,20}

El genoma de las clamidias es muy pequeño, contiene aproximadamente 600 kb, 58.7% de A-T corresponde a la cuarta parte del tamaño del cromosoma de *Escherichia coli*, además se conoce que *C. trachomatis* posee un plásmido críptico en su cromosoma.^{7,12}

Los análisis de los genomas de las clamidias, muestran que codifica para 875 proteínas aproximadamente, el 70 de éstas son exclusivas de *C. trachomatis*.

También con el análisis se observó que la región cercana al origen de la replicación del cromosoma de las clamidias es donde existe la mayor diversidad, esta región incluye genes que controlan la síntesis del triptófano y su utiliza-

ción se ha relacionado con la mediación del interferón gamma (IFN γ) en el desarrollo de la infección persistente.

Epidemiología

Chlamydia trachomatis, tiene una distribución mundial, produce tracoma (queratoconjuntivitis crónica), enfermedad oculogenital, neumonía y linfogranuloma venéreo (LGV). La infección causada por esta bacteria es una enfermedad de transmisión sexual con mayor incidencia.^{2,21}

La OMS estimó que en 1995 ocurrieron 89 millones de casos en el mundo. En EU de Norteamérica, las infecciones por *C. trachomatis* son las que más comúnmente son reportadas con 4.5 millones de casos anualmente. Las infecciones por *C. trachomatis* se dan en todas las sociedades, en países en desarrollo la enfermedad es más común entre grupos de niveles socioeconómicos bajos, las mujeres tienen mayor riesgo de pasar de forma asintomática que los hombres.^{20,21}

En países industrializados la principal transmisión de la infección es sexual, estimándose que en EUA se reportan aproximadamente 4 millones de casos al año, de infecciones por esta bacteria, la incidencia es de un 5% en mujeres adolescentes y un 10% en mujeres adultas con vida sexual activa.³

Otro problema causado por *C. trachomatis* en personas infectadas, especialmente el serotipo G, es el riesgo a desarrollar cáncer cervical, en Asia y África es la principal causa de ceguera.

El LGV es una infección severa causada por *C. trachomatis*, es transmitido vía sexual, su frecuencia en Norteamérica y Europa es baja, sin embargo en África, Asia y América Latina es común.^{22,23}

La detección de *C. trachomatis* en mujeres es importante, ya que éstas pueden transmitir la enfermedad a su pareja; si la mujer está embarazada, ésta lo transmite al recién nacido, además si no recibe tratamiento puede sufrir complicaciones como un embarazo ectópico e infertilidad.

Importancia clínica

Las clamidias pueden producir diversos cuadros clínicos, algunos como uretritis, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria, epididimitis y proctitis. En la mujer produce cervicitis que es la infección más frecuente que se presenta. Sin embargo, el 70% de las mujeres infectadas cursan como asintomáticas, el tercio restante presenta evidencias clínicas como flujo vaginal, dolor pélvico o abdominal, sangrado o disuria.^{4,5}

La presencia de la disuria puede incluir una uretritis, lo que sucede en un 35% de los casos, en otros sólo está comprometida la uretra y la infección uretral se manifiesta como piuria o disuria con cultivo negativo. Otras manifestaciones clínicas son la endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria o abscesos en las glándulas de Bartholin, que pueden dar

lugar a oclusiones tubáricas y esterilidad. Aunque el sitio inicial de la infección es el cérvix, la uretra y el recto también pueden verse afectados.^{5,6}

Las complicaciones debido a infecciones por *C. trachomatis* son: infección vaginal, endometritis. La infección en el hombre por esta bacteria es la uretritis no gonocócica, aunque la uretritis generalmente resulta con descarga mucoide, se reconoce un espectro que va desde la ausencia de la descarga a una descarga purulenta.

Las infecciones por *C. trachomatis* en hombres heterosexuales generalmente son uretrales y en más del 50% son asintomáticos. En el hombre también pueden presentarse complicaciones como epididimitis o infección en los ductos espermáticos de los testículos.

El linfogranuloma venéreo LGV es una enfermedad sistémica producida por *C. trachomatis* por los serotipos Li, L2, L3 la infección se inicia como una pápula o vesícula en genitales, después se transforma en úlcera indolora que puede curar sola. La infección puede diseminarse por vía linfática de tal forma que desde el inicio se produce una adenitis inguinal que se reblandece y forma un absceso que posteriormente se vuelve una fistula y se abre hacia el exterior como una llaga, a este proceso le sigue una fase de esclerosis con formación de estenosis en el recto, uretra o vagina.^{4,5,26}

La infección en niños por *C. trachomatis*, es la conjuntivitis neonatal y una de las causas más comunes de neumonía, entre los 5 y 14 días de nacido se puede presentar una conjuntivitis purulenta. En algunos casos esta conjuntivitis puede volverse crónica y producir daño irreversible en la córnea, también se puede presentar después de la conjuntivitis una neumonía que se caracteriza por los persistentes polipneas que a veces es paroxística. Además *C. trachomatis* puede producir en el recién nacido otros síndromes como rinitis, rinofaringitis, otitis y vulvitis.^{4,5}

El tracoma es una infección importante causada por los serotipos: A, B, C, de *C. trachomatis*, es una conjuntivitis crónica con una marcada reacción folicular y una hipertrofia papilar de la conjuntiva, puede desarrollar cicatrices. Estas lesiones llamadas trichiasis y entropión son las responsables de la ceguera por tracoma. La córnea se daña por el abrir y cerrar de los ojos, y por una infección secundaria, dando como resultado una ceguera.

El periodo de incubación para la mayoría de las infecciones oculares con *C. trachomatis* es de 1 a 2 semanas aproximadamente, la presencia de inclusiones citoplasmáticas características en las células de la conjuntiva es relevante a la distorsión de las estructuras externas del ojo, interfiere también con el flujo lacrimal normal con el crecimiento de las pestañas hacia dentro y con el funcionamiento glandular, en consecuencia de esto las infecciones bacterianas de los globos oculares por efecto del tracoma son frecuentes. Todos estos efectos conducen a la pérdida de la visión.

Se estima que alrededor de 500 millones de la población humana está infectada con el serotipo del tracoma a nivel mundial y que como consecuencia de ello entre 7 y 9 millones de personas sufren ceguera.

Diagnóstico

Existen varios métodos para diagnosticar infecciones por *Chlamydia trachomatis*, los más utilizados son:

Detección directa de las muestras, los cuerpos de inclusión de *C. trachomatis* contienen glucógeno, que se tiñen con yodo y Giemsa, después de incubar 48 a 72 h, los cubreobjetos se extraen y se tiñen. Si existe un gran número de clamidias el diagnóstico se establece con facilidad por las técnicas de tinción de Giemsa o Gimenez, que permiten distinguir las inclusiones por su color de reacción, morfología y localización.^{17,27}

Las inclusiones se localizan dentro del citoplasma de las células epiteliales, a menudo su ubicación es perinuclear, sin embargo se requiere de microscopia especializada en las células epiteliales del raspado conjuntival teñido con anticuerpos fluorescentes o Giemsa, se observan inclusiones citoplasmáticas típicas, esta técnica es más sensible para el diagnóstico de infecciones oculares en recién nacidos y en uretritis.²⁷

Inmunofluorescencia directa. Se realiza con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno específico o el LPS de membrana y sobre la proteína principal de la membrana externa de *C. trachomatis*.²⁸

Los antígenos son detectados en las células obtenidas del sitio infectado con el empleo de anticuerpos monoclonales conjugado con fluorocromo (isocianato de fluoresceína). Los cuerpos elementales son las formas infecciosas que se observan en muestras clínicas, son pequeños, de forma redonda. La presencia de células epitelio columnar aumenta la sensibilidad en un 80-90% de la prueba y una especificidad del 98-99%. Es un método sensible para detectar conjuntivitis de inclusión.^{29,30}

El cultivo es el método más sensible considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de infecciones causadas por *C. trachomatis*, del tracto genital tanto en hombres como en mujeres, tiene una sensibilidad de 70-85%, las muestras indicadas son las uretrales de hombres y mujeres asintomáticas, las nasofaríngeas, rectales, vaginales de niñas prepúberes y en casos de abuso sexual.³¹

C. trachomatis es una bacteria intracelular obligada, requiere de una célula hospedera para su desarrollo y multiplicación. Las líneas celulares más utilizadas son las células McCoy (fibroblastos de ratón), HeLa 299 (carcinoma humano), las BHK-21 (células de ovario de hámster) y recientemente las células BGMK.^{32,33}

El aislamiento también puede realizarse por inoculación en el saco vitelino de huevos de pollos embrionados de 6-8 días de edad. Las líneas celulares se tratan con irradiación,

dextrán, ciclohexamida para aumentar la sensibilidad del aislamiento. Antes de inocular la muestra, ésta se puede sonicar para romper las células del huésped y permitir que los cuerpos elementales se separen.³²

La línea celular que con mayor frecuencia se utiliza es la McCoy tratada con ciclohexamida, el cultivo se propaga en una monocapa sobre un cubreobjetos inoculado con las muestras, si hay suficiente número de cuerpos elementales de clamidias ellos infectarán las células y crecerán en forma de inclusiones citoplásmicas, luego de ser infectadas, las inclusiones pueden observarse después de 48-72 h de incubación y teñidas con anticuerpos marcados con fluoresceína que se ligan al LPS de la clamidia, otros reconocen específicamente la proteína de membrana externa, la observación directa de las inclusiones que posee una morfología distintiva contribuye al 100% de especificidad.³¹

Determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA: esta técnica se basa en la detección inmunohistoquímica de antígenos de LPS de géneros específicos. En la actualidad se comercializa un gran número de estas pruebas. La técnica inmunoensayo enzimático para la determinación de anticuerpos de *C. trachomatis* permite el análisis de diferentes muestras, los resultados se obtienen en 4 h. Se detectan antígenos del LPS específicos de género extraídos de los cuerpos elementales de las muestras, los cuales son más abundantes y más solubles que la proteína principal de membrana externa.³⁴

Técnicas moleculares: Con los recientes desarrollos de métodos moleculares para detectar patógenos específicos, éstos han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual basados en pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, pueden usar muestras de orina, hisopados vaginales disminuyendo la necesidad de los exámenes físicos y aumentando la especificidad y sensibilidad.^{36,37}

La primera técnica molecular implementada utilizó una sonda de DNA quimioluminiscente, la cual se hibridaba con una secuencia de rRNA 16S específica de especie de clamidias. Las clamidias poseen 10 a 4 copias de estos RNA.³⁰

Una vez formados los híbridos éstos se absorben sobre esferas y la cantidad de quimioluminiscencia se detecta en un luminímetro, esta técnica tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 98-99%. Debido a la dificultad en el diagnóstico y a los avances científicos y tecnológicos se han venido implementando técnicas alternas de valoración de las clamidias a escala molecular basados en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y LCL (reacción en cadena de la ligasa).^{38,39}

Estas pruebas son muy sensibles, proporcionan un alto grado de especificidad, lo que contribuye a la obtención de resultados de óptima calidad. La PCR es una técnica que permite detectar un bajo número de copias de DNA de clamidias, lo que la hace más sensible que otras pruebas.

El método comercial disponible es el AMPLICOR CT PCR (Roche Molecular System), en ensayo disponible comercialmente y automatizado que proporciona un control interno y una mezcla maestra para PCR. El control interno contiene regiones de unión al primer específico. Se amplifican ambos, la *C. trachomatis* y el blanco de DNA, seguida por una detección selectiva de cada amplificación.^{36,37,40}

En el ensayo de la reacción en cadena de la ligasa se emplean cuatro oligonucleótidos sintéticos (2 por cadena de DNA), que hibrida sitios específicos en el plásmido críptico, una vez hibridados los oligos, aquel intervalo complementado por el DNA polimerasa es sellado por la enzima ligasa, este proceso de dos pasos de llenado y cerrado del intervalo hace que la LCR sea muy específica en teoría.^{39,41}

El producto de la LCR es detectado en un aparato automatizado que usa un sistema de captura inmunocolorimétrico. Las técnicas de amplificación son muy útiles para el diagnóstico de uretritis en hombres o uretritis en cervicitis en mujeres.⁴¹

Genotipificación. El análisis por la técnica de RFLP del gen Omp-1 amplificado que codifica para la proteína de membrana externa MOMP, es simple y rápido, es una herramienta poderosa para estudios epidemiológicos.⁴²

Este método permite la diferenciación de serotipos, serovariantes y genovariantes. La técnica se realiza amplificando el gen Omp-1, luego se procede a digerir el producto obtenido mediante enzimas de restricción, el resultado es el patrón de bandas por electroforesis para cada clamidia.^{43,44}

Otra técnica es el método de secuenciación directa. La técnica reconocida como prueba de oro para la genotipificación de cepas, permite identificar variantes de genes que caracterizan los serotipos de *C. trachomatis*.⁴³

Conclusiones

Chlamydia trachomatis es uno de los patógenos de transmisión sexual predominantes en el mundo. Las limitaciones técnicas para su diagnóstico dificultan la estimación de su verdadera prevalencia en países en desarrollo, por lo que hay que implementar técnicas más sencillas y menos costosas para la realización de un buen diagnóstico y evitar con esto complicaciones graves en el humano.

Referencias

1. Moulder JW. Orden chlamydiales and family Chlamydiaceae, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V:1, Williams & Wilkins, Co.
2. Center for Disease Control and Prevention. Guidelines for treatment of sexually transmitted disease. Morbidity and Mortality Weekly reports 1998; 42 (No.RR14): 1-102.

3. Everett K. IV Encuentro de la Sociedad Europea de Investigaciones en Chlamydias. Helsinki, Finlandia 2002.
4. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th edition. Churchill Livingstone, 2004.
5. Murray PR. Manual of clinical microbiology. Ed 8th. Washington 2003 ASM.
6. Bush RM, Everett KD. Molecular evolution of the *Chlamydiaeae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51: 203-220.
7. Schachter J. Biology of *Chlamydia trachomatis*. In: Holmes KK et al. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York: McGraw-Hill.1999.
8. Gerard HC, Freise J, Wang Z. *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs persistent infection. Microbes Infection 2002; 4; 13-22.
9. McCarty F. Chlamydial metabolism as inferred from the complete genome sequence: In: Chlamydia: Intracellular biology, pathogenesis and immunity. Wilwy, New York. 1999.
10. Naaheimo H, Kosma P, Brade L, Brade H, Peters I. Mapping the binding of synthetic disaccharides representing epitopes of Chlamydial lipopolysaccharide to antibodies with NMR. Biochem 1999; 89; 3240-3248.
11. Raulton J. Chlamydial envelope components and pathogen host cell interaction. Mol Microb 1995; 15: 607-616.
12. Nicholson SE. New view of the surface projections of *Chlamydia trachomatis*. J Bacteriol 1998; 5: 343-349.
13. Raulton J. Localization of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line *in vitro*. Infect Immun 1998; 66: 2323-2329.
14. Wyrick PB. Cell biology of chlamydial infections: Proceedings of 9th. International Chlamydia Symposium. San Francisco, 1998: 69-78.
15. Stephens R, Kalman S, Lamel C, Fan J, Marathe R. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 1998; 282: 754-759.
16. Washington W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins.
17. Watson MW, Lambden PR, Clarke N. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the Chlamydial 60 kilodalton cysteine rich outer membrane protein gene. J Clin Microbiol 1991; 29: 1188-1193.
18. Frost E, Delandes S, Veileux S, Boirgau-Ranvisy D. Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. J Infect Dis 1991; 172: 1013-1022.
19. Stothard DR, Boguslawski G, Jones RB. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. Infect Immun 1998; 66: 361803625.
20. Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *trachomatis*. Nature Genetics 1999; 21: 385-389.
21. Raulton J. Localization of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 and 70 during infection of human endometrial epithelial cell line *in vitro*. Infect Immun 1998; 66: 2323-2329.
22. Stephen RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. J Bacteriol 1987; 169: 3879-3885.
23. Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. Trends Bioch Sci 2000; 25: 50-52.
24. Andrew D, Pumarola S, Sanz C. Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis* determinada mediante métodos de biología molecular. Enfermedades infecciosas. Microbiología Clínica 2002; 20: 205-207.
25. Stamm W. *Chlamydia trachomatis* infections: Progress and problems. J Infect Dis 1999; 179: 5380-5383.
26. Black C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 160-184.
27. Tanaka M, Nakayama H, Saguyama K, Haraoka M. Evolution of a new amplified enzyme immunoassay (EIA) for detection of *Chlamydia trachomatis* in male urine female endocervical swab, and patients obtained vaginal swab specimens. J Clin Pathol 2000; 53: 350-354.
28. Jaug D, Sellers W, Mahoney JB, Pickard L. Effects of broadening the gold standard on the performance of a chemiluminescent immunoassay (Magic Lite) to detect *Chlamydia trachomatis* antigens in centrifuged first void urine and urethral swabs for men. Sex Transm Dis J 1992; 19: 315-319.
29. McComb DE, Puzimak CI. Microcell culture method for isolation of *Chlamydia trachomatis*. Appl Microbiol 1974; 28: 727-729.
30. Rota RT, Nichols RL. *Chlamydia trachomatis* in cell culture: I comparison of efficiencies of infection in several chemically defined media at various pH and temperature values and after exposure to diethylaminoethyl-Dextran. Appl Microbiol 1973; 26: 560-565.
31. Rota RT, Nichols RL. Comparison of HeLa 229 and McCoy cell cultures for detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens. J Clin Microbiol 1989; 27: 1399-1400.
32. Hartley JC. PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. J Clin Microbiol 2001; 39: 3072-2079.
33. Altweig M. Comparison of Gene Probe PACE 2, Amplicor Roche. And conventional PCR for the detection of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens. Med Microbiol Lett 1999; 3: 181-187.
34. van der P. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 1105-1112.
35. Joyner J, Douglas J, Foster M. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction untreated patients. Sex Transm Dis 2002; 25: 196-200.
36. Chernesky M, Jang D, Lee H. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men and women by testing first void urine by ligase reaction. J Clin Microbiol 2002; 32: 682-685.
37. Zhang JP, Stephens S. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* attachment to eukaryotic cells. Cell 1992; 69: 861-869.
38. Peterson E, Darrow V, Blanching J, Aarnaes S. Reproducibility problems with the AMPLICOR PCR *Chlamydia trachomatis* test. J Clin Microbiol 1997; 35: 957-959.
39. Hock E, Smith K, Mullin C. Diagnosis of genitourinary *Chlamydia trachomatis* infections by using the ligase chain reaction on patient obtained vaginal swabs. J Clin Microbiol 1997; 35: 277-284.
40. Chernesky M, Jang D, Lee H. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men and women by testing first void urine by ligase reaction. J Clin Microbiol 2002; 32: 682-685.
41. Verhoen V, Avonts D, Mehesus A. Chlamydial infections: an accurate model for opportunistic screening in general practice. Sex Transm Infect 2003; 79: 313-317.
42. Yang C, Maclean I, Brunhan R. DNA sequence polymorphism of *Chlamydia trachomatis* ompI gene. J Infect Dis 1993; 168: 1225-1230.
43. Bandea CI, Kubota K, Brown TM, Kilmarx PH. Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (ompI). Sex Transm Infect 2001; 77: 419-422.