



ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de *Chlamydia trachomatis* en orina por LCR: aplicación del método de mezcla de muestras biológicas[†]

Miguel Ángel Sánchez-Alemán,* Juan Pablo Gutiérrez,** Stefano Michael Bertozzi,** Maydelín Frontela-Noda,*** Víctor Guerrero-Lemus,* Carlos Jesús Conde-González*

* Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas.

** Centro de Investigación en Sistemas de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública.

*** Instituto Nacional de Endocrinología, Cuba.

Ligase chain reaction testing of pooled urine specimens to diagnose *Chlamydia trachomatis* infection

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to assess the utility and validity of pooling urine samples for molecular diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. **Material and methods.** Of 1,220 urine samples collected from Mexican female and male adolescents, 305 pools were composed of fourth individual samples each, based on a calculation of optimal pool size. These were processed by ligase chain reaction (LCR) for the detection of *C. trachomatis*. Positive and gray-zone pools were reanalyzed individually. Cost savings were calculated comparing actual costs of testing to the cost that would have been incurred testing all 1,220 samples individually. **Results.** Pools results were: 56 positive, 19 gray-zones and 230 negative. Following individual retesting of positive and gray-zone pools, 59 cases of *C. trachomatis* infection were identified (4.8% prevalence). Thus, a total of 601 LCR tests were performed, for a 50.4% savings considering only the direct cost of the test. **Conclusions.** Our experience shows that sample pooling is both a reliable and convenient tool for CT surveillance in our setting. It should be considered in other similar settings where limited resources constraint surveillance of STIs.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la validez y conveniencia de la estrategia de la mezcla de muestras de orinas para el diagnóstico molecular de *Chlamydia trachomatis* (CT). **Material y métodos.** A partir de 1,220 muestras de orina recolectadas de jóvenes de uno y otro sexos, se conformaron 305 mezclas con cuatro aliquotas de muestras individuales, previo cálculo del tamaño óptimo de la mezcla. A continuación se determinó la presencia de ácidos nucleicos de clamidía en esas mezclas, mediante el método de reacción en cadena de la ligasa. Las mezclas positivas o en zona gris fueron reanalizadas de manera individual (cuatro pruebas adicionales).

El número final de pruebas realizadas se comparó con el total de pruebas que se habrían efectuado individualmente. **Resultados.** Del total de mezclas analizadas, 230 resultaron negativas, 56 fueron positivas y 19 más se ubicaron en zona gris. Una vez reanalizadas de manera individual las mezclas positivas y las de zona gris, se obtuvieron 59 muestras de orina positivas a clamidía (prevalencia de 4.8%). De esta manera, el número total de pruebas efectuadas fue de 605 en contraste con las 1,220 que tendrían que haberse hecho si se hubieran procedido las muestras individualmente, es decir, que se logró un ahorro de 50.5% del costo directo del reactivo de diagnóstico. **Conclusiones.** La metodología aplicada mostró ser tanto confiable como conveniente en el entorno mexicano para llevar a cabo vigilancia epidemiológica de la infección por CT. Dado lo anterior, esta metodología podría ser considerada en otros entornos en los que la falta de recursos limita la vigilancia de las infecciones de transmisión sexual.

Key words. Sample pooling. *C. trachomatis*. LCR.

Palabras clave. Mezcla de muestras. *C. trachomatis*, LCR.

[†] Trabajo realizado durante su estancia en el INSP.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular, que puede transmitirse por contacto sexual.¹ La clamidiasis, que representó 92 millones de casos nuevos alrededor del mundo en 1999,² puede originar uretritis en hombres y enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad y embarazos ectópicos en mujeres,¹ además de ser un factor que facilita la transmisión del VIH.³ Esta enfermedad generalmente es asintomática (80% en mujeres y 50% en hombres),^{4,5} por lo que se requieren programas de tamizaje para controlar la transmisión. Al menos para países desarrollados, se ha mostrado que el tamizaje es costo-ahorrador: estudios del CDC, por ejemplo, estimaron que por cada dólar invertido en prevención, se ahorran \$12 dls. en el tratamiento de secuelas.⁶

Para detectar la infección se cuenta actualmente con pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, nucleic acid amplification test); estos métodos poseen una gran sensibilidad y especificidad, además de permitir el empleo de muestras obtenidas por procedimientos no invasivos.⁷ Una de las pruebas NAAT, la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR, Ligase Chain Reaction) presenta sensibilidades de 94-96.5% y especificidades de 99-100% cuando utiliza muestras de orina.⁷⁻⁸ El empleo de muestras cervicales tiene una sensibilidad ligeramente mayor, alrededor de 5%, que al utilizar muestras de orina,⁹ sin embargo, las muestras cervicales tienen el inconveniente de ser invasivas, se necesitan aditamentos especiales para colectarla y son molestas; su equivalente en hombres, las muestras uretrales, son poco aceptadas en programas de tamizaje, por lo que las muestras de orina son la mejor opción al tener una sensibilidad similar que las muestras uretrales cuando se emplean NAAT.¹⁰

Por otra parte, el alto precio de las NAAT ha restringido su uso en los programas de tamizaje.^{8,11} Una opción para abatir costos es la realización de mezclas ("pool") de muestras biológicas, este método se ha empleado para la detección de anticuerpos contra el VIH, mostrando una alta concordancia entre los sueros individuales que resultaron positivos y las mezclas de 10 sueros donde se encontraban esas muestras.¹² En el mismo sentido, se ha propuesto la utilización de mezclas de orina para la detección de *C. trachomatis*.¹³ El presente trabajo pretende describir y valorar la aplicación de la estrategia de mezcla de orinas para el diagnóstico molecular de *C. trachomatis* en una muestra de jóvenes de población mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

En el año 2003, en el laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, se analizaron 1,220 muestras de orina, provenientes de una muestra de adolescentes mexicanos hombres y mujeres entre 15 y 21 años de edad, que habitaban en áreas de nivel socioeconómico bajo en 204 localidades de entre 2,500 y 50 mil habitantes en 28 entidades federativas, y que fue parte de una encuesta de evaluación del Programa de Desarrollo Humano Oportunidades.

Tamaño óptimo de la mezcla de muestras

Para que la realización de la prueba mediante las mezclas resulte más eficiente que las pruebas individuales, el número total de análisis mediante las mezclas debe ser menor a los que se hubieran necesitado con pruebas individuales. Para ello, es necesario estimar el tamaño óptimo de la mezcla en términos de eficiencia, y ajustarlo considerando también la dilución máxima a la que la prueba puede detectar resultados.

Para estimar el tamaño óptimo de la mezcla se utilizó la siguiente fórmula:¹²

$$CM = \frac{CP}{TP} + [1 - (1 - Prev)^{TP}] * CP$$

En donde CM es el costo por muestra analizada, CP es el costo del reactivo para cada determinación, TP es el tamaño de la mezcla y Prev es la prevalencia esperada. El tamaño óptimo de la mezcla es el que minimiza el costo por muestra. Esta fórmula no incluye el costo adicional de preparar las mezclas debido a que es mínimo.

En el caso del presente documento, se consideró una prevalencia esperada de entre 5 y 8% (datos no publicados de población femenina Hospital General de Cuernavaca, Mor.) y costo del reactivo* de \$10 dls. El tamaño óptimo estimado fue de cinco muestras para el límite inferior de prevalencia y cuatro para el límite superior (Figura 1), con base en ello se decidió el empleo de mezclas con cuatro muestras de orina.

* El precio comercial del reactivo LCx de Abbott cuando se realizó este estudio era de \$10 dls. Sin embargo, durante el segundo semestre del año 2003 el fabricante retiró su producto del mercado por decisión propia. En la actualidad la única prueba NAAT para clamidia disponible en el mercado nacional es AMPLICOR-CT de laboratorios ROCHE, con un costo aproximado por prueba de \$15 dls.

Prueba de laboratorio

Todas las muestras de orina se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento. Cada muestra se agitó durante 30 seg, enseguida se tomaron 250 µl. El volumen final de 1 mL para procesamiento por LCR según instrucciones del fabricante (LCx Probe system, Abbott Laboratories), se obtuvo de mezclar las alícuotas de cuatro muestras. La prueba de LCx amplifica una secuencia del plásmido críptico de *C. trachomatis* por medio de la LCR y detecta el amplímero utilizando un sistema fluorescente. Todas las corridas realizadas en el equipo automatizado de detección ($n = 20$ mezclas) fueron validadas por los controles internos de la prueba. Cuando esto no fue así, se repitieron la totalidad de las corridas correspondientes.

El ensayo origina un resultado (S/CO), que es el cociente de la lectura de la muestra (S) dividida por el valor del calibrador (CO), lo que permite determinar muestras positivas ($S/CO \geq 1.0$) y aquellas con valores menores se consideran negativas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la mezcla de muestras individuales de orina se ha propuesto una zona gris (ZG) que abarca de 0.2-1.0.¹³ por lo que para efectos del presente estudio, las mezclas se clasificaron en negativas, grises y positivas de acuerdo con ese crite-

rio. Las mezclas en ZG y positivas se reanalizaron de manera individual (de cada mezcla, cuatro muestras individuales) para determinar la muestra o muestras positivas, en este segundo análisis se consideraron los valores de corte establecidos por el fabricante.

RESULTADOS

De las 1,220 muestras individuales se obtuvieron 305 mezclas de orina, de las cuales 230 resultaron negativas, 56 mezclas positivas y 19 mezclas en ZG (los valores de S/CO de cada mezcla se encuentran en la figura 2). A partir de las mezclas positivas, 41 presen-

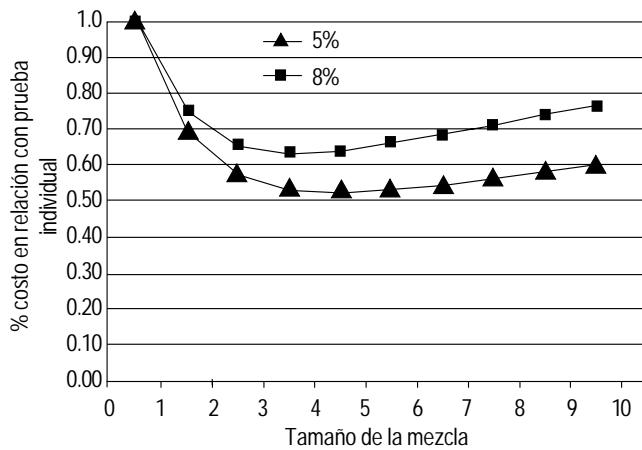


Figura 1. Tamaño óptimo de la mezcla de muestras.

Cuadro 1. Características demográficas de adolescentes entre 15 y 21 años.

Variable	Positivos (n = 58)	Negativos (n = 1,147)	Todos (n = 1,205)*
Mujeres (%)	78%	62%	65%
Edad ($x \pm DS$)**	17.6 ± 1.5	17.5 ± 1.5	17.5 ± 1.5
Sexualmente activos (%)**	84%	70%	73%
Edad 1a. relación sexual**	15.8 ± 1.2	15.8 ± 1.7	15.8 ± 1.6

* Quince adolescentes no respondieron a las preguntas, entre los cuales hay un caso positivo a *C. trachomatis*. ** Abarca uno u otro sexo de los participantes.

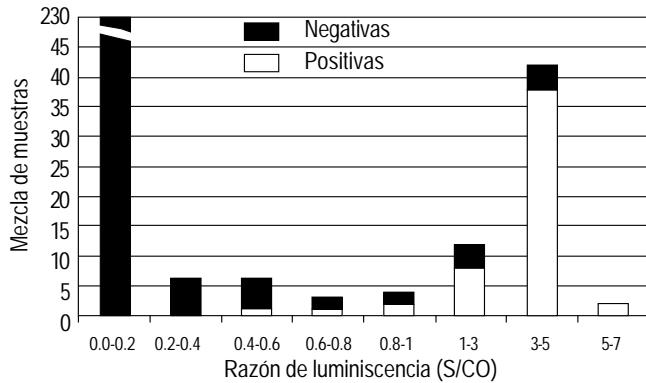


Figura 2. Análisis de 305 mezclas individuales de orina por LCR. A partir de cada muestra positiva o zona gris, se realizaron las muestras individuales, en caso de resultar al menos una muestra individual positiva, la mezcla se consideró como positiva.

taron una muestra individual positiva, siete tuvieron dos muestras individuales positivas y ocho con las cuatro muestras individuales negativas. De las mezclas en ZG, se identificaron cuatro con una muestra individual positiva y las restantes 15 presentaron muestras individuales negativas, en la figura 2 se esquematizan los resultados anteriores. El total de muestras individuales positivas fue de 59 y de negativas 1,161, cuatro muestras individuales positivas se detectaron a partir de mezclas en ZG y las restantes a partir de mezclas positivas.

Para las mezclas se emplearon 305 reacciones, para el análisis de muestras individuales se realizaron 300 ensayos ([56 pos + 19 ZG] X 4), por lo que al final se utilizaron 605 pruebas, en lugar de las 1,220 reacciones originales de haberse empleado ensayos individuales desde un inicio, lo que representó un ahorro de 50.4%.

En el cuadro 1 se presenta una descripción de los adolescentes que proporcionaron las muestras, de los cuales la mayoría fueron mujeres. Todos ellos se

Cuadro 2. Prevalencia de *C. trachomatis* en diferentes subgrupos de los adolescentes de 15 a 21 años.

Variable	% del total	% positivos
Casados	19	4
En unión libre	16	7
Separados o viudos	4	15
Solteros	60	4
Reportaron algún síntoma de ITS alguna vez	2	4.5
Fuman	10	6.3
Van a la escuela	24	3.6

Cuadro 3. Estudios que han evaluado la mezcla de muestras biológicas para detectar *C. trachomatis* por métodos de NAAT.

Estudio	Muestra	Método	n	nM	Sensibilidad	
Lisby ¹⁴	Cervical	PCR	268	5	18/18	100%
Kacena ¹³	Orina	LCR"	568	4	48/48	100%
Kacena ¹³	Orina	LCR"	520	10	61/62	98.4%
Krepel ¹¹	Orina	LCR"	1,220	4	107/111	96.4%
Krepel ¹¹	Orina	LCR"	576	8	48/49	97.9%
Morré ¹⁵	Orina	PCR	650	5	26/26	100%
Morré ¹⁵	Orina	PCR	650	10	25/26	96.1%
Kapala ¹⁶	Cervical	LCR	1,288	4	51/53	96.2%
Kapala ¹⁶	Cervical	LCR	1,288	8	50/53	94.2%
Peeling ¹⁷	Orina	PCR	370	5	17/18	94.4%
Clark ¹⁸	Cervical	LCR	3,170	5	187/188	99.5%
Clark ¹⁸	Cervical	LCR	3,170	10	186/188	98.9%

n = Número de muestras individuales analizadas. nM = Número de muestras individuales por mezcla. " Emplearon una ZG de 0.2-1, los demás estudios no emplearon ZG.

encontraban aparentemente sanos y en ninguno se registró sintomatología de infección genital. La edad promedio de los jóvenes fue de 18 años, y reportaron haber iniciado vida sexual en los dos años anteriores a la encuesta. La proporción de mujeres fue mayor (78 vs. 62%) en el caso del grupo con resultado positivo. Por otra parte, cerca de 6% de los que mencionaron ser sexualmente activos resultaron positivos para *C. trachomatis*, en tanto que los que dijeron no ser sexualmente activos, poco más de 2% resultaron positivos, la prevalencia general fue de 4.8%.

Por lo que se refiere a las variaciones en prevalencia, en el cuadro 2 se presenta el porcentaje de casos positivos encontrados para algunos subgrupos de adolescentes. Las frecuencias más bajas se dan entre los solteros y los casados, en tanto que entre aquellos que viven en unión libre o se han separado se registraron prevalencias superiores (7 y 15%, respectivamente). Asimismo, el porcentaje de positivos entre aquellos que reportaron algún síntoma de ITS fue similar a la prevalencia global, en tanto que para los que reportaron fumar, la frecuencia fue superior (6.3%), finalmente entre aquellos que mencionaron asistir a la escuela, la prevalencia fue menor (3.6%).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en México que aplica el método de mezcla de muestras biológicas para el diagnóstico de *C. trachomatis*, como una alternativa para ahorrar material y con ello para ampliar el número de sujetos estudiados. La mezcla de muestras biológicas para *C. trachomatis* por NAAT ha mostrado tener una alta sensibilidad al compararse con muestras individuales, tal como se observa en el cuadro 3, don-

de la sensibilidad varía desde 94.2% hasta 100%, dependiendo del número de muestras por mezcla (4, 5, 8, 10) y del tipo de muestra utilizada, cervical u orina. En el presente estudio se detectó una prevalencia de clamidiasis de 4.8% y se realizaron mezclas de cuatro muestras de orina para el diagnóstico, de acuerdo con el cálculo descrito en material y métodos y consistente con lo reportado en la literatura.¹³

La mezcla de muestras de orina puede encontrar muestras positivas que no son detectadas con ensayos individuales,^{11,16} lo que puede originar una sensibilidad ligeramente mayor.¹⁸ Este aumento en la detección se debe a que al diluir las muestras individuales en la mezcla, también se diluyen los inhibidores potenciales de LCR. Por otra parte, en una misma mezcla de muestras de orina, las muestras individuales negativas pueden tener inhibidores que enmascaren a muestras positivas, sin embargo, tanto la dilución como la baja temperatura a que se mantienen las muestras disminuye considerablemente la posibilidad de inhibición,¹⁹ además de que la frecuencia de inhibidores de LCR en muestras de orina es baja, sólo 3.9% en lo reportado por Mahony¹⁹ y 2.6% en el trabajo de Berg.²⁰ En el presente estudio se esperaría una baja frecuencia de inhibidores, similar a lo reportado anteriormente, pero para contrarrestar esta potencial fuente de falsos negativos todas las muestras se procesaron diluidas (1:4 en la mezcla de muestras) y se mantuvieron a -20 °C, por lo que se esperaría que al menos en 77% de las muestras que tuvieran inhibidores, se contrarrestara su efecto, como se ha reportado.¹⁹

Se detectaron ocho mezclas positivas, que al reanalizarlas de manera individual dieron resultados negativos, tres de estas mezclas presentaron valores entre 0.8-0.95. Desconocemos si estas muestras presentaban inhibidores aún después del tratamiento a bajas temperaturas, y en dado caso tendríamos la presencia de falsos negativos, para lo cual sobre todo en estudios clínicos, se recomienda utilizar otro método molecular

o NAAT, como la Reacción en Cadena de la Polimera- sa (PCR) para confirmar el resultado, o en un momento dado indicarle tratamiento al paciente, el cual no representa mayores complicaciones para eliminar la posible infección y detener la transmisión en la comu-nidad. Aunque es necesario aclarar que en la realización de pruebas individuales, sin el precedente de la mezcla, estas muestras definitivamente se clasificarián como negativas.

La creación de mezclas diluye las muestras, lo que podría impactar en la reactividad del espécimen, por eso se ha propuesto una Zona Gris para solventar la dilución de la muestra. La LCR ha demostrado que su alta sensibilidad y especificidad no se afectan con mezclas de hasta 10 muestras individuales cuando se considera una ZG de 0.2-1.0, en lugar de lo recomendado por el fabricante ($S/CO \geq 1.0$).¹³ Al analizar en nuestro estudio las mezclas de ZG, 78.9% (15/19) presentaron muestras individuales negativas, sin embargo, cuatro muestras positivas se detectaron a partir de reanalizar estas mezclas, por lo que nuestros resultados apoyan la utilidad de emplear una ZG al usar el método de mezcla de muestras de orina.

Para ilustrar el efecto de la variación del intervalo de la ZG con respecto a nuestros hallazgos, se podría considerar un primer escenario teórico con una ZG de 0.4-1, en lugar de la propuesta inicial de 0.2-1; en este ejercicio, 236 mezclas se clasificarían como negativas, 56 mezclas positivas y 13 mezclas en ZG, se emplearían 305 reacciones para mezclas y 276 reacciones para muestras individuales. En un segundo escenario teórico con una ZG de 0.6-1, se clasificarían 242 mezclas como negativas, 56 positivas y siete en ZG, utilizando 305 reacciones para mezclas y 252 reacciones para muestras individuales, pero en este segundo caso teórico se perdería una muestra positiva proveniente de una mezcla que pasó de ZG a negativa. En el cuadro 4 se presenta el ahorro de reactivos y un resumen de ambos escenarios teóricos y del escenario real.

Cuadro 4. Diferentes escenarios de zona gris para mezclas de orina.

Zona gris	.2-1	.4-1	.6-1
Mezclas negativas	230	236	242
Mezclas positivas	56	56	56
Mezclas ZG	19	13	7
Muestras positivas	59	59	58
Reacciones totales	605	581	557
Ahorro estimado*	50.4%	52.4%	54.3%
Sensibilidad	**	100%	98.3%
Especificidad	**	100%	100%

* Porcentaje de reacciones que dejaron de realizarse. ** Referencia.

La utilización de una ZG de 0.2-1.0 detectó muestras individuales positivas, pero al disminuir la ZG (0.4-1.0) se tendría la misma sensibilidad, con un ligero aumento en el ahorro de tiempo, material y reactivos. La utilización de un valor de ZG de 0.6-1.0 lleva a un mayor ahorro de reactivos, pero con una menor sensibilidad de la prueba de laboratorio.

En este estudio, la detección de *C. trachomatis* que empleó mezclas de cuatro muestras individuales de orina, demostró un ahorro de 50.4% de reactivos, además, la utilización de una ZG de 0.2-1 aumentó la detección de muestras positivas. La posibilidad de cambiar el límite inferior de la ZG a 0.4 e inclusive a 0.6 necesita de estudios posteriores, pero la decisión de reanalizar de manera separada las muestras individuales de dichas mezclas, puede estar en función del número de mezclas en zona gris, de la cantidad de reactivos que se disponga y también del tipo de estudio que se esté realizando, clínico vs. epidemiológico.

Con respecto al abordaje epidemiológico, es de señalarse que la frecuencia de infección por *C. trachomatis* en la población joven estudiada (4.8%), es menor a la reportada en mujeres que asisten a clínicas ginecológicas de la frontera norte de México (9.7%) y en trabajadoras sexuales de la frontera sur del país (14.4%), ambos estudios emplearon métodos de detección de DNA, pero sin amplificación del material genético.^{21,22} Algunos otros estudios en trabajadoras sexuales mexicanas, que emplearon otras técnicas diagnósticas como el cultivo celular y la prueba de ELISA directa, han encontrado prevalencias de 11.1 y 12.5%, respectivamente.^{23,24} Es interesante notar que entre algunos subgrupos de la población estudiada las prevalencias alcanzan valores cercanos a los reportados para poblaciones con mayor experiencia sexual. En particular llama la atención la diferencia en prevalencia entre quienes reportaron estar casado(a)s y los que viven en unión libre. *C. trachomatis* es un agente de ITS presente desde temprana edad en jóvenes mexicanos de uno u otro sexo, dato que no se había corroborado anteriormente en población mexicana considerada de bajo riesgo, sino hasta el presente reporte, donde también por primera vez se utilizó un método NAAT. Esta infección es generalmente asintomática, tanto en mujeres como en hombres,^{4,5} dato que se corroboró en el actual trabajo, debido a que ninguno de los participantes infectados reportaron síntomas. Las mujeres jóvenes, como las de nuestro estudio, de acuerdo con la literatura tienen un mayor riesgo de infección debido a que *C. trachomatis* tiene preferencia por infectar células del epitelio endocervical inmaduras, dichas células se encuentran presentes en adolescentes y adultos jóvenes.²⁵ Por otra parte, el ini-

cio temprano de actividad sexual, 15.8 años en promedio en los adolescentes de nuestra muestra, se ha asociado con comportamientos sexuales de riesgo, como relaciones con múltiples parejas sexuales, lo que indicaría una mayor exposición a adquirir alguna ITS, como *C. trachomatis*.²⁶ Asimismo, se observó una mayor prevalencia entre los que reportaron fumar y una menor entre los que asisten a la escuela, lo que estaría sugiriendo una concentración de comportamientos de riesgo en esos subgrupos, sin que los hechos de fumar o de contar con menor escolaridad por sí mismos coadyuvan a la transmisión de *C. trachomatis*. Un análisis más detallado y con un mayor tamaño de muestra en relación con la clamidiasis en esta población, será parte de otra comunicación en la que se definirán con precisión los factores asociados a esta infección.

Finalmente, los resultados que se presentan en este trabajo en relación con su objetivo central demuestran que es posible reducir de forma importante los costos de análisis de orina para el diagnóstico molecular de *C. trachomatis*, lo cual puede favorecer su detección y tratamiento oportuno, además de ofrecer la posibilidad de que esta prueba sea considerada dentro de un esquema de vigilancia de ITS que sea sostenible, el cual detecte casos que de manera rutinaria no se encontrarían para ayudar a detener la transmisión y diseminación de esta ITS.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al Programa de Desarrollo Humano Oportunidades, que financió tanto la recolección de las muestras como su análisis en el marco de las actividades de evaluación del Programa. Asimismo, queremos agradecer al Dr. Gustavo Olaíz y su equipo del Centro de Encuestas del INSP por el trabajo realizado para la recolección de las muestras de orina en los hogares.

Finalmente, nuestro agradecimiento a Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V., por los precios preferenciales que permitieron el uso de sus productos, para el análisis de las muestras.

REFERENCIAS

1. Schachter J. Biology of *Chlamydia trachomatis*. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN (Eds.). Sexually Transmitted Diseases. 3rd. edition. USA: Mc Graw Hill press; 1999, p. 391-406.
2. Research on Reproductive Health at WHO: biennial report 2000-2001. Chapter 3: Preventing reproductive tract infection, 31-36. World Health Organization 2002.
3. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M, Heyward WL, Ryder

- RW, Piot P. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7: 95-102.
4. Gaydos EA, Howell MR, Pare B, et al. *Chlamydia trachomatis* infections in female military recruits. *N Engl J Med* 1998; 339: 739-44.
 5. Zelin JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E, Williams P. Chlamydial urethritis in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change. *Int J STD AIDS* 1995; 6: 27-30.
 6. Institute of Medicine. The hidden epidemic – confronting sexually transmitted diseases. Washington DC: National Academy Press; 1992, p. 28-68.
 7. Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh P, Starý A, Stray Pederson B. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1021-31.
 8. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 160-84.
 9. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, et al. Head-to-Head Multi-center comparison of DNA probe and nucleic acid amplification test for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3757-63.
 10. Center for Disease Control and Prevention. Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002. *MMWR Recommendations and Reports* 2002; 51: 1-27.
 11. Krepel J, Patel J, Sproston A, Hopkins F, Jang D, Mahony J, Chernesky M. The impact on accuracy and cost of Ligase Chain Reaction Testing by Pooling Urine Specimens for the Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Sex Transm Dis* 1999; 26: 504-7.
 12. Behets F, Bertozzi S, Kasali M, Kashamuka M, Atikala L, Brown C, Ryder RW, Quinn TC. Successful use of pooled sera to determine HIV-1 seroprevalence in Zaire with development of cost-efficiency models. *AIDS* 1990; 4: 737-41.
 13. Kacena KA, Quinn SB, Howell MR, Madico GE, Quinn TC, Gaydos ChA. Pooling Urine Samples for Ligase Chain Reaction Screening for Genital *Chlamydia trachomatis* Infection in Asymptomatic Women. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 481-5.
 14. Lisby G, Scheibel J, Abrahamsson LO, Christensen ES, Palohelimo S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in individual and pooled endocervical and urethral scrapes by a commercial available polymerase chain reaction. *APMIS* 1994; 102: 797-800.
 15. Morré SA, Meijer CJJLM, Munk C, Krüger-Kjaer S, Winther JF, Jorgensens HO, Van Den Brule AJC. Pooling of urine specimens for detection for Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections by PCR in a Low-Prevalence Population: Cost-Saving Strategy for Epidemiological Studies and Screening Programs. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1679-80.
 16. Kapala J, Copes D, Sproston A, Patel J, Jang D, Petrich A, Mahony J, Biers K, Chernesky. Pooling Cervical Swabs and Testing by Ligase Chain Reaction are Accurate and Cost-Saving Strategies for Diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2480-3.
 17. Peeling RW, Toye B, Jessamine P, Gemmill I. Pooling of urine specimens for PCR testing: a cost saving strategy for *Chlamydia trachomatis* control programmes. *Sex Transm Infect* 2001; 77: 76-7.
 18. Clark AM, Steece R, Crouse K, Campbell J, Zanto S, Kartchner D, Mottice, Pettit D. Multisite Pooling Study Using Ligase Chain Reaction in Screening for Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 565-8.
 19. Mahony J, Chong S, Jang D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3122-6.
 20. Berg ES, Anestad G, Moi H, Storvold G, Skaug K. False-negative results of a ligase chain reaction assay to detect *Chlamydia trachomatis* due to inhibitor in urine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 727-31.
 21. Giuliano AR, Denman C, Guernsey de Zapien J, et al. Design and results of the USA-Mexico border human papillomavirus (HPV), cervical dysplasia, and *Chlamydia trachomatis* study. *Rev Panam Salud Pública* 2001; 9: 172-81.
 22. Uribe-Salas F, Conde-Glez CJ, Juárez-Figueroa L, et al. Sociodemographic dynamics and sexually transmitted infections in female sex workers at the Mexican-Guatemalan border. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 266-71.
 23. Uribe-Salas F, Hernández-Avila M, Conde-Glez CJ, et al. Low prevalence of HIV infection and Sexually Transmitted Diseases among female commercial sex workers in Mexico City. *Am J Pub Health* 1997; 87: 1012-15.
 24. Alvarado Esquivel C, Briones Ezcarzaga ML, Castruita Limones DE, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in registered female sex workers in northern Mexico. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 195-8.
 25. Stamm WE. *Chlamydia trachomatis* infection of the adult. Chapter 29. In Sexually Transmitted Diseases, Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, et al. Editors. Third edition. USA: McGraw Hill; 1999.
 26. Aral SO, Holmes KK. Social and behavioral determinants of the epidemiology of STDs: Industrialized and developing countries, Chapter 4. In Sexually Transmitted Diseases, Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, et al. (Ed.). Third edition. USA: McGraw Hill; 1999.

Reimpresos:

Dr. Carlos Jesús Conde-González
 Dirección de Microbiología Médica
 Instituto Nacional de Salud Pública
 Av. Universidad 655
 Col. Santa María Ahuacatitlán
 62100 Cuernavaca, Mor.
 Tel.: (777) 101-29-04
 Fax: (777) 317-54-85
 Correo electrónico: cconde@insp.mx

*Recibido el 11 de junio de 2004.
 Aceptado el 16 de mayo de 2005.*