

Optimización de la técnica Reacción de Polimerasa en Cadena para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en Managua, Nicaragua

Ernesto Flores*

Resumen.-Reportamos la implementación de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple para detectar simultáneamente *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, en muestras de exudados vaginales de mujeres trabajadoras del sexo de la ciudad de Managua. Evaluamos la PCR simultánea con la PCR por separado para estos patógenos y comparamos diferentes métodos de diagnóstico con la PCR y evaluamos su validez.

Introducción

Las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* son causas comunes de enfermedades transmitidas sexualmente, en países industrializados en países subdesarrollados. Estas enfermedades constituyen una de las mayores causas de morbilidad en mujeres sexualmente activas (Schacht, J. 1990:545).

Las Clamidias son un grupo de parásitos intracelulares obligatorios que se dividen en cuatro especies: *psittacci*, *trachomatis*, *pneumoniae* y *pecorum*. La *Chlamydia trachomatis* es un causante frecuente de uretritis no gonocócica y epididimitis en los varones de los cuales, del 20 al 50% permanecen sintomáticos. En las mujeres causa cervicitis, salpingitis, endometritis y enfermedad inflamatoria pélvica, que puede progresar a

infertilidad, embarazo ectópico, dolor abdominal crónico y linfogranuloma venéreo. Más del 70% de las mujeres son asintomáticas. Los recién nacidos pueden adquirir la infección durante el parto y pueden sufrir síntomas oculares y trastornos respiratorios.

La *Neisseria gonorrhoeae* es un diplococo Gram-negativo, no móvil, no forma esporas y es anaerobio estricto. Ataca la mucosa de las vías genitales, los ojos, el recto y la garganta produciendo supuración aguda con invasión tisular, culminando con inflamación crónica y fibrosis. En las mujeres produce endocervicitis con la posterior obliteración de las Trompas de Falopio. La esterilidad ocurre en el 20% de las mujeres que han sufrido de salpingitis gonocócica. La oftalmía neonatal gonocócica, es un trastorno frecuente en recién nacidos infectados, que puede progresar con rapidez a ceguera.

* Investigador del Centro de Biología Molecular-UCA

La detección de *Chlamydia trachomatis* se basa en el uso de técnicas tradicionales como: cultivo celular (Black, C. M. 1997:160), ensayo inmuno-enzimático (Barnes, 1989:119; Black, C. M. 1997:160), tinción por anticuerpo fluorescente (Wang, S. P. 1970:367; Stamm, W. E. 1988:92). Para la detección de *Neisseria gonorrhoea* se realizan cultivos en agar Thayer-Martin (Bonin, P. 1984:218), detección de anticuerpos y antígenos por ensayo inmuno-enzimático.

En la última década la tecnología de ADN ha crecido grandemente. Se han implementado técnicas para hibridación de ADN y amplificación de ácidos nucleicos, que han sido comercializadas (Bawnens, J. E. 1993:3031; Loeffelholz, M. J. 1992:2847; Ho, B.S. 1992:439).

Recientemente, se ha aplicado la reacción en cadena de la ligasa para detectar *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoea* (Chernesky, M. A. 1994:2682;

Birkenmeyer, L. 1992:3089). También se ha desarrollado la reacción de polimerasa en cadena (PCR) múltiple para la detección simultánea de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (Mahony, J. B. 1995:3049; Wong, K. C. 1995:101).

En este estudio se reporta la implementación de una reacción de la polimerasa en cadena múltiple para detectar simultáneamente *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Material y métodos

Muestras. Se tomaron exudados vaginales a 1,811 mujeres trabajadoras sexuales. A cada paciente se le tomaron cuatro muestras de frotis de hisopos: la primera fue destinada para una tinción de papanicolaou; la segunda para cultivo en agar Thayer-Martin; la tercera para ensayo inmuno-enzimático (EIA); y la cuarta para PCR. Las 1,811 muestras fueron procesadas primeramente por cultivo en agar Thayer-Martin y EIA. Luego todas las muestras positivas y el 10% de las negativas fueron procesadas por PCR. Se evaluó el medio de transporte óptimo para las muestras a procesarse por PCR estudiando 124 muestras recolectadas en 2-sucrosa fosfato (2-SP) y Chelex 100. Se determinó la dilución óptima del extracto a ser procesado por PCR estudiando 134 muestras sin dilución y diluidas 1:5 en agua destilada.

Se comparó la detección simultánea y por separado de ambos microorganismos por PCR procesando 164 muestras, a las que se realizó PCR separado y múltiple. Finalmente, para evaluar la sensibilidad y especificidad del PCR y establecer una comparación con las técnicas tradicionales, se analizó un total de 413 muestras.

Cultivo en agar Thayer-Martin. Se desarrolló el cultivo de agar Thayer-Martin por inoculación del exudado al plato e incubado en una atmósfera de 5% de CO₂ de 24 a 48 horas.

Las colonias características de *Neisseria gonorrhoeae* fueron confirmadas por detección de oxidasa y la prueba de utilización de carbohidratos.

Ensayo Inmuno-enzimático (EIA). Se estudiaron las muestras para detección de antígeno por EIA *Chlamydia* MicroTrack (Behring Diagnostic Inc, Cupernico, CA 95014) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Durante la experimentación, se utilizaron controles positivos y negativos.

Extracción de ADN. Tanto el ADN de *Chlamydia trachomatis* como el ADN de *Neisseria gonorrhoeae* fueron extraídos hirviendo durante 10 minutos las muestras de exudado en Chelex 100.

Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR). Se desarrolló el PCR para uno u otro ADN extraído como se describió anteriormente. Cinco microlitros de muestra se adicionaron a 20 l de la mezcla de reacción del PCR. Para la detección de *Chlamydia trachomatis* fueron usados los cebadores KL1 y KL2 (Perkin-Elmer, Roche), que amplifican un fragmento de ADN de 241 pares de bases (pb) de un plásmido críptico conservado (Mahony, J. B. 1992:2241). Todas las muestras positivas fueron confirmadas por digestión con la enzima de restricción *Hind III* (New England Biolabs, Inc). Para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* se usaron los cebadores HO1 y HO3 (Perkin-Elmer, Roche), que amplifican un fragmento de ADN de 390 pb del gen *cppB* en el plásmido críptico de 4.2 Kb (Ho, B. S. 1992:439).

Todas las muestras positivas fueron confirmadas por digestión con enzima de restricción *Msp I* (New England Biolabs, Inc). La mezcla de amplificación contenía lo siguiente: ddH₂O (Sigma), Buffer de PCR 10X (Perkin-Elmer, Roche), cebadores KL1-KL2 y HO1-HO3 a 10M cada uno (Perkin-Elmer, Roche), dNTP 5mM (Promega Corp.) y Polimerasa Taq a 5U/l (Perkin-Elmer, Roche). La mezcla de amplificación junto con el ADN patrón se sometió a 35 ciclos en un termociclador Hybide modelo OmniGene, donde cada ciclo consistió en 1 minuto a 94 C, un minuto a 55 C y dos minutos a 72C. Los productos de la amplificación se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.6% (Merck) previamente teñido con bromuro de etidio 10mg/dl (Fisher Biotech) y visualizados a través de rayos ultravioleta. Los tamaños de las bandas de ADN fueron medidos con un marcador escalera que va de 100 en 100 pares de bases (Gibco BRL, Gaithersburg, Md). Se tomaron todas las precauciones debidas en las amplificaciones para prevenir contaminación.

Resultados

Selección del medio de transporte de ADN

De las 124 muestras procesadas por PCR y recolectadas en 2-SP y Chelex 100, se obtuvieron ocho muestras positivas para *Chlamydia trachomatis* y una muestra positiva para *Neisseria gonorrhoeae*. Estos resultados fueron Observados en las mismas muestras recolectadas en ambos medios de trans-

porte, lo que da una concordancia del 100%. Se observó que en las muestras recolectadas en 2-SP proliferaron hongos y bacterias. Por falta de transporte, las muestras permanecían a temperatura ambiente por una semana antes de ser procesadas (cuadro 1).

Dilución óptima del extracto

De 134 muestras, 43 resultaron positivas sin diluir y 45 diluidas 1:5, respecto a *Chlamydia trachomatis*. Al correr las muestras pareadas se obtiene

un total de 46 muestras positivas. Respecto a *Neisseria gonorrhoeae*, resultaron positivas 25 muestras sin diluir y 28 diluidas 1:5. Al correr las muestras pareadas se obtiene un total de 29 muestras positivas (cuadro 2 e ilustraciones 1 y 2).

En el gel de agarosa el control positivo corresponde a una banda de 241 pares de bases para *Chlamydia trachomatis* y de 390 pares de bases para *Neisseria gonorrhoeae*.

Cuadro 1
MEDIO DE TRANSPORTE ÓPTIMO PARA MUESTRAS A PROCESARSE POR PCR (2SP VS CHELEX 100)

N= 124 muestras	<i>Chlamydia Trachomtis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Positivos	8	1
Negativos	116	123

Cuadro 2
DILUCIÓN ÓPTIMA DEL EXTRACTO ANALIZADO POR PCR

N=134 muestras	POSITIVAS	NEGATIVAS
<i>Chlamydia</i> 1:1	43	91
<i>Chlamydia</i> 1:5	45	89
<i>Chlamydia</i> (pareado)	46	88
<i>Chlamydia</i> (Bioanálisis)	39	95
<i>Gonorrea</i> 1:1	25	109
<i>Gonorrea</i> 1:5	28	106
<i>Gonorrea</i> (pareado)	29	105
<i>Gonorrea</i> (Bioanálisis)	39	95

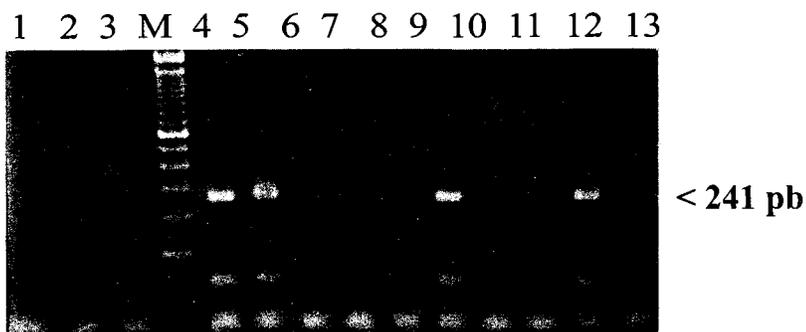


Ilustración 1. Detección de *Chlamydia trachomatis*, comparación de diluciones 1:1 y 1:5. Amplificación de muestras diluidas 1:1 y 1:5 para detectar *Chlamydia trachomatis*. Controles negativos (líneas 1-3), M: Marcador de ADN de 100 pb (Gibco

BRL, Gaithersburg, Md), muestra positiva fuerte (líneas 4 y 5, dilución 1:1 y 1:5), muestra con inhibidor (líneas 8 y 9, dilución 1:1 y 1:5), muestras negativas (líneas 10 y 11, dilución 1:1 y 1:5), control positivo (línea 12), control negativo (línea 13).

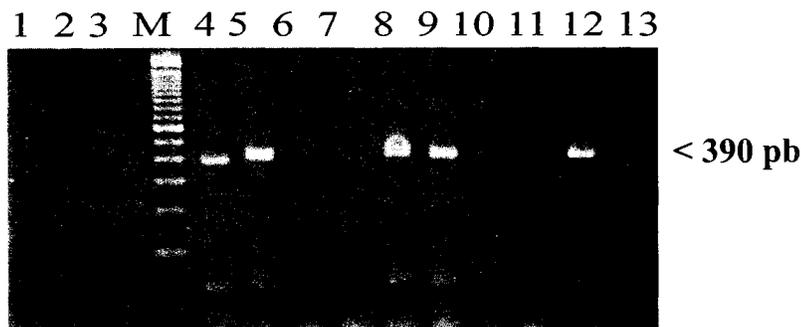


Ilustración 2. Detección de *Neisseria gonorrhoeae*, comparación de diluciones 1:1 y 1:5. Amplificación de muestras diluidas 1:1 y 1:5 para detectar *Neisseria gonorrhoeae*. Controles negativos (líneas 1-3), M: Marcador de ADN de 100 pb (Gibco

BRL, Gaithersburg, Md), muestra con inhibidor (líneas 4 y 5, dilución 1:1 y 1:5), muestra negativa (líneas 6 y 7, dilución 1:1 y 1:5), muestra positiva fuerte (líneas 8 y 9, dilución 1:1 y 1:5), muestra negativa (líneas 10 y 11, dilución 1:1 y 1:5), control positivo (línea 12), control negativo (línea 13).

PCR simultáneo vs PCR separado

Se obtuvo que en la PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* por separado se detectaron 23 muestras positivas y en cambio, al realizar el PCR simultáneo, se detectaron 22 muestras positivas. Con respecto a la detección de *Neisseria gonorrhoeae*

por la PCR separado se detectaron 23 muestras positivas y por PCR simultáneo, 19 muestras positivas. Todas las muestras positivas por PCR simultáneo fueron captadas por PCR separado (cuadro 3 e ilustración 3).

Cuadro 3
PCR SIMULTÁNEO VS PCR SEPARADO

N-134 muestras	POSITIVAS	NEGATIVAS
Chlamydia 1:1	45	95
Chlamydia 1:5	45	89

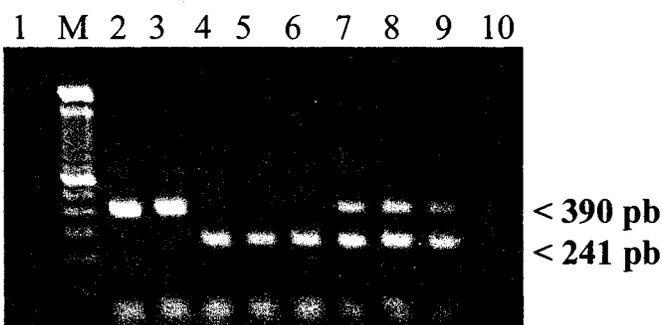


Ilustración 3. PCR para detección separada y simultánea de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Control negativo (línea 1), muestras positivas para *N. gonorrhoeae* (líneas 2,3), muestras

positivas para *C. trachomatis* (líneas 4-6), muestras positivas para ambos microorganismos (líneas 7-9), control negativo (línea 10). M: marcados de ADN de 100 pb (GIBCO, Gaithersburg, Md.)

PCR vs técnicas de referencias

Para comparar la sensibilidad y especificidad del PCR con técnicas de referencia (EIA para *Chlamydia trachomatis* y cultivo en agar Thayer-Martin para *Neisseria gonorrhoeae*) se analizaron 413 muestras endocervicales para la detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

PCR vs ELISA para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Se procesaron 413 muestras por ELISA para la detección de antígeno Lipopolisacárido de *Chlamydia trachomatis* y por PCR en el que se utilizaron cebadores KL1 y KL2, que amplifican una secuencia de 241 pb. Como resultado, se detectaron 91 muestras positivas y 322 negativas para ELISA. De estas muestras 67 fueron positivas y 296 negativas por ambas

técnicas: 24 fueron ELISA positivas y PCR negativas y 26 fueron ELISA negativas y PCR positivas, para una concordancia del 87.8%. Tomando ELISA como estándar, la sensibilidad y especificidad del PCR es del 73.6% y 91.9%, respectivamente. El valor predictivo positivo para una prevalencia del 4.3% fue del 28%; para una prevalencia del 14.3% fue del 63%. El valor predictivo negativo para una prevalencia del 4.3 % fue del 99% y para una prevalencia del 14.3% fue del 95%. Los datos de prevalencia fueron basados en un estudio previo realizado por Björn Hermann y colaboradores (Hermann, B. 1996:20) en las ciudades de León, Matagalpa, Corinto y Bluefields en 1995, donde el 4.3% corresponde a mujeres control que se atendieron de rutina en clínicas ginecológicas y el 14% corresponde a mujeres trabajadoras de sexo (cuadro 4).

Cuadro 4
PCR VS ENSAYO INMUNO-ENZIMÁTICO PARA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

N=413	EIA positivo	EIA negativo	TOTAL
PCR Positivo	67	26	93
PCR Negativo	24	296	320
TOTAL	91	322	413

Concordancia: 88%
Sensibilidad: 74%
Especificidad: 92%

P: 4%
VPP: 28%
VPN: 99%

P: 14%
VPP: 63%
VPN: 95%

Simbología: P- prevalencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

Para confirmar los resultados del grupo de 26 muestras ELISA negativo y PCR positivo, se realizó digestión con enzimas de restricción *Hind III* a todos los productos de amplificación obteniendo que: 21 de las 26 muestras eran realmente positivas para *C. trachomatis* por PCR. Además, a las 24 muestras ELISA positivo y PCR negativo les amplificamos nuevamente por PCR con enzima Taq polimerasa de ADN nueva y se realizó control de inhibición captando así, cuatro muestras positivas confirmadas por digestión con enzimas de restricción. Las 20 muestras restantes fueron negativas. Una vez confirmados los resultados e incluidos como verdaderos

positivos, se hizo un recálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de una prueba positiva, valor predictivo de una prueba negativa y concordancia del PCR. De esta manera se obtuvo una sensibilidad de 82.1%, especificidad de 98.3%, valor predictivo de una prueba positiva cambia a 78% para una prevalencia del 4.3% y de 94% para una prevalencia del 14.3%. El valor predictivo de una prueba negativa cambia a 99% para una prevalencia del 4.3% y de 97% para una prevalencia del 14.3%. La concordancia entre los resultados del PCR y el ELISA es de 93.4 % (ilustración 4 y cuadro 5).

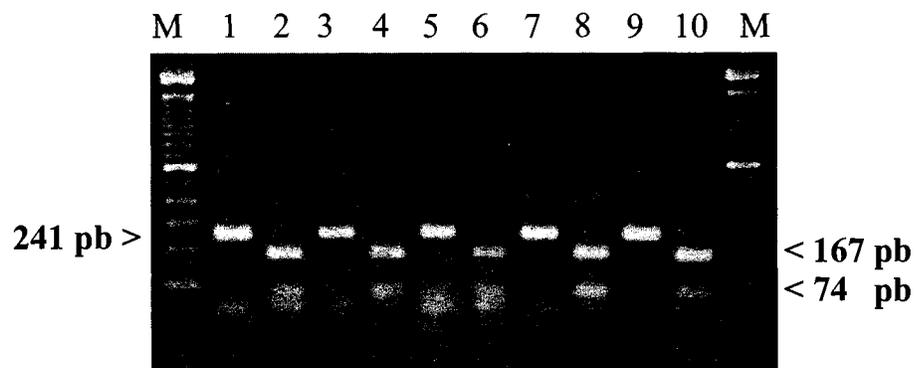


Ilustración 4. Digestión de productos de amplificación de *Chlamydia trachomatis* con *Hind III*. Digestión de productos de 241 pb de muestras positivas para *Chlamydia trachomatis* producto 241 pb (líneas

1,3,5,7,9), digerido con *Hind III* para dar dos bandas de 167 y 74 pb (líneas 2,4,6,8,10). En los extremos está el marcador de ADN de 100 pb (Gibco BRL gaithersburg, Md)

Cuadro 5
PCR VS ENSAYO INMUNO-ENZIMÁTICO DESPUÉS DE LA
CONFIRMACIÓN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN *HIND III* Y
CONTROLES DE INHIBICIÓN

N=413	EIA positivo	EIA negativo	TOTAL
PCR positivo	92	5	97
PCR negativo	20	296	316
TOTAL	112	301	413

Concordancia: 94.9%
 Sensibilidad: 82.1%
 Especificidad: 98.3%

P: 4%
 VPP: 78%
 VPN: 99%

P: 14%
 VPP: 94%
 VPN: 97%

Simbología: P: prevalencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

PCR vs cultivo para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*

Se procesaron 413 muestras por cultivo en agar Thayer Martin y PCR en el que se utilizaron cebadores HO1 y HO3, que delimitan una secuencia de 390 pb. Como resultado, se detectaron 93 muestras positivas y 320 negativas por cultivo. Por PCR se detectaron 81 muestras positivas y 332 negativas, de las cuales 66 fueron positivas para ambas técnicas y 305 negativas; 27 muestras fueron positivas por cultivo y negativas por PCR; y 15 muestras negativas por cultivo y positivo por PCR, para una concordancia del 89.8%. Tomando la prueba de cultivo como estándar, la sensibilidad y especificidad del PCR es del 70.9% y del 95.3%,

respectivamente. El valor predictivo positivo para una prevalencia del 4% fue del 37 %; para una prevalencia del 14% fue del 71%; y el valor predictivo negativo para una prevalencia del 4 % fue del 99%; y para una prevalencia del 14 % fue del 95% (cuadro 6).

Para confirmar los resultados del grupo de 15 muestras negativas por cultivo y PCR positivas, se realizó digestión con enzimas de restricción *Msp I* a todos los productos de amplificación, obteniendo que ocho de las 15 muestras eran realmente positivas para *N. gonorrhoeae* por PCR. Además, las 27 muestras positivas por cultivo y negativas por PCR fueron amplificadas nuevamente por PCR con enzima Taq polimerasa nueva y se les realizaron controles de inhibición captando de esta

Cuadro 6
PCR VS CULTIVO PARA *NEISSERIA GONORRHOEAE*

N=413	CULTIVO positivo	CULTIVO negativo	TOTAL
PCR positivo	66	15	81
PCR negativo	27	305	332
TOTAL	93	320	413

Concordancia: 90%
Sensibilidad: 71%
Especificidad: 95%

P: 4%
VPP: 37%
VPN: 99%

P: 14%
VPP: 71%
VPN: 95%

Simbología: P: prevalencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

manera siete muestras positivas confirmadas por digestión con enzimas de restricción. Las 20 muestras restantes fueron negativas. Una vez confirmados los resultados e incluidos como verdaderos positivos, la sensibilidad y especificidad del PCR para *N. gonorrhoeae* es de 80.1% y 97.7%, respectivamente. El valor

predictivo de una prueba positiva para una prevalencia del 4.3% es de 53%, y para una prevalencia del 14.3% es de 82%. El valor predictivo de una prueba negativa para una prevalencia del 4.3% es de 99%, y para una prevalencia del 14.3% es de 96%. La concordancia entre los resultados del PCR y el cultivo es del 93.4% (ilustración 5 y cuadro 7).

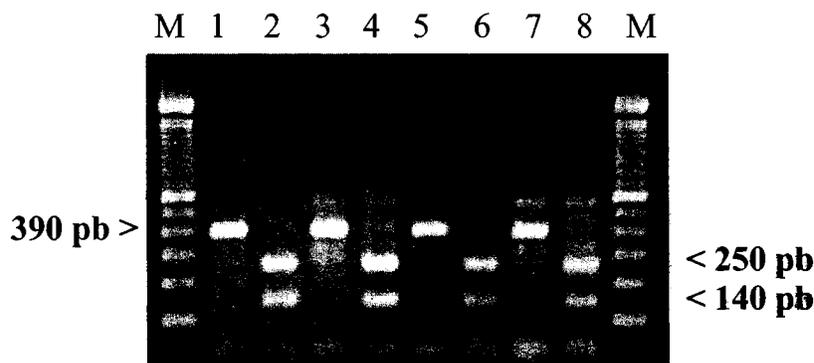


Ilustración 5. Digestión de productos de amplificación de *Neisseria gonorrhoeae* con *Msp I*. Digestión de muestras positivas para *Neisseria gonorrhoeae* productos de 390 pb (líneas 1,3,5,7,9, digeridas con *Msp I*

en dos productos de amplificación de 140 y 250 pb (líneas 2,4,6,8). En los extremos está el marcador de ADN de 100 pb (Gibco BRL, Gaithersburg, Md)

Cuadro 7
PCR VS CULTIVO PARA *NEISSERIA GONORRHOEAE* POST
CONFIRMACIONES CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN *MSP I* Y
CONTROLES DE INHIBICIÓN

N=413	CULTIVO positivo	CULTIVO negativo	TOTAL
PCR positivo	81	7	88
PCR negativo	20	305	325
TOTAL	101	312	413

Concordancia: 93.4%

Sensibilidad: 80.1%

Especificidad: 97.7%

P: 4%

VPP: 53%

VPN: 99%

P: 14%

VPP: 82%

VPN: 96%

Simbología: P: prevalencia; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

Discusión

Los resultados indican que ambos medios de transporte tienen la misma sensibilidad, pero Chelex es más apropiado para situaciones que implican transporte de muestras desde un lugar lejano hasta el laboratorio central. El Chelex no permite la proliferación de microorganismos ni la acción de nucleasas, facilitando una mejor manipulación de la muestra. Por otro lado, 2-SP es un medio rico en glucosa, lo que puede favorecer la proliferación de bacterias del tracto genital femenino y algunos hongos del medio ambiente, lo que proporciona una muestra de baja calidad y difícil de manejar. Además, Chelex 100 aumenta las señales del PCR (Walsh, P. S. 1991:506).

Se determinó que amplificar muestras con diluciones pareadas 1:1 y 1:5 mejora la sensibilidad del PCR. Los resultados de muestras positivas 1:1-negativas 1:5 y negativas 1:1-positivas 1:5 se explican a continuación:

Las muestras positivas 1:1 y negativas 1:5, probablemente tenían poca cantidad de DNA en la dilución 1:1. Por lo tanto, al diluir las muestras 1:5 el DNA se redujo a cantidades de copias indetectables por los cebadores.

Las muestras negativas 1:1 y positivas 1:5, probablemente contenían inhibidores de la Polimerasa del ADN que pudieron ser diluidos al diluir la muestra 1:5 obteniendo de esta manera resultados positivos.

Bajo las condiciones de este estudio, se determinó que la PCR separado para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* es más adecuada para la detección de los microorganismos. Durante el proceso de experimentación se observó que hubo dificultad por parte del PCR-simultáneo para captar a una muestra positiva para *Chlamydia trachomatis* y cuatro muestras positivas para *Neisseria gonorrhoea*, que fueron previamente positivas por PCR-separados. Esto puede deberse a una competencia entre cebadores (Wong, K. C. 1995:101) lo que brinda resultados falsos negativos al realizar PCR-simultáneo.

Al evaluar la sensibilidad y especificidad del PCR vs ELISA como técnica de referencia, se determinó que la sensibilidad y especificidad del PCR fue para *Chlamydia trachomatis* del 73.6% y 91.9%, respectivamente. El valor predictivo de una prueba positiva para una prevalencia del 4% y 14% fue del 28% y 63%, respectivamente. El valor predictivo de una prueba negativa fue 99% y 95% para ambas prevalencias.

Se obtuvieron 24 muestras positivas para ELISA y negativas para PCR, lo que puede deberse a la presencia de inhibidores de la polimerasa del ADN en la muestra. Esto que se corroboró realizando controles de inhibición, obteniendo que 20 de las 24 muestras eran capaces de amplificar el ADN control que se puso en cada una de ellas, lo que deja ver que no existían inhibidores que pudieran afectar la amplificación de los ácidos nucleicos. Las cuatro muestras restantes resultaron positivas al realizar el PCR

con enzima Taq polimerasa nueva. Probablemente la enzima que se usó estaba comenzando a perder actividad, fallando en la amplificación de ácidos nucleicos de ciertas muestras. Por otro lado, las muestras destinadas al análisis por PCR fueron el cuarto frotis con hisopo que se hizo en el momento de la toma de muestra, lo que significa que la mayoría de los microorganismos pudieron ser removidos en los primeros tres hisopados y, al momento de tomar las muestras para PCR, ya quedaban muy pocos o casi ninguno. Los EIA basados en el uso de anticuerpos dirigidos a LPS pueden cruzar reacción con los LPS de otros microorganismos Gram-negativos, lo que produce resultados falsos-positivos (Barnes, R. C. 1989:119; Stamm, W.E. 1988:92).

De las muestras procesadas, 26 fueron negativas por ELISA y positivas por PCR. En todas las corridas de PCR se utilizaron controles negativos y positivos, lo que descarta la posibilidad de contaminación de la muestra con productos de amplificaciones previas o por aerosolización y por lo tanto, se descartan resultados falsos positivos. Luego de digerir los 26 productos de amplificación con enzimas de restricción y obtener que 21 de las 26 son verdaderas positivas, no cabe duda de que son muestras positivas para *C. trachomatis*. Por otro lado, si la toma de muestra destinada al análisis por ELISA fue inadecuada, existe la posibilidad de obtener resultados falsos negativos. Cuando se toman como verdaderos positivos los resultados de las confirmaciones por digestión con enzimas de restricción, la sensibilidad aumenta a 82.1% y la especificidad a 98.3%.

Al evaluar la sensibilidad y especificidad del PCR para *Neisseria gonorrhoeae* vs cultivo como técnica de referencia, determinamos que la sensibilidad y especificidad del PCR fue del 70.9% y 95.3%, respectivamente. El valor predictivo de una prueba positiva para una prevalencia del 4% y 14% fue de 37% y 71%, respectivamente. El valor predictivo para una prueba negativa fue de 99% y 95% para ambas prevalencias.

Se obtuvieron 27 muestras positivas por cultivo y negativas por PCR. Esto puede deberse a la alta sensibilidad del cultivo que permite la observación del crecimiento del microorganismo, la visualización de la bacteria en un frotis teñido por el método de Gram, y la realización de pruebas bioquímicas que evidencian que el microorganismo aislado es *Neisseria gonorrhoeae*. Por otro lado, un PCR puede ser negativo en muestras obtenidas de pacientes infectados por este microorganismo debido a la presencia de abundante moco y sangre, característico en estos casos, lo que inhibe la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos esperada.

Además, se obtuvieron 15 muestras negativas por cultivo y positivas por PCR. Esto puede deberse a la manera como se manipularon y procesaron las muestras después de ser tomadas, pues el manejo de muestras destinadas al estudio por cultivo es crítico porque la bacteria muere fácilmente al salir del tracto genital. Al tomar como verdaderos positivos los resultados de las confirmaciones con enzimas de digestión, la sensibilidad aumenta a 80.1% y la especificidad a 97.7%.

El Chelex 100 es el medio más conveniente para transportar muestras para analizar por PCR. Se determinó que trabajar las muestras pareadas 1:1 y 1:5 mejora la sensibilidad del PCR. Cuando se compara entre la detección simultánea y por separado por PCR, se determina que es más adecuada la detección por separado. Al evaluar PCR contra EIA para detectar *Chlamydia trachomatis* se determina una sensibilidad del 73.6% y una especificidad del 91.9%. Al incluir como verdaderos positivos los resultados de las confirmaciones, la sensibilidad mejoró a 82.1% y la especificidad a 98.3%. Al evaluar PCR contra cultivo en Thayer-Martin para detectar a *Neisseria gonorrhoeae*, se determinó una sensibilidad del 70.9% y una especificidad del 95.3%. Al incluir como verdaderos positivos los resultados de las confirmaciones, la sensibilidad mejoró a 80.1% y la especificidad 97.7%.

Por lo tanto se recomienda, utilizar Chelex 100 para transportar muestras a procesarse por PCR; trabajar las muestras pareadas 1:1 y 1:5; se considera conveniente utilizar PCR separados para detectar *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*; se sugiere seguir evaluando cuidadosamente al PCR simultáneo para determinar el protocolo idóneo en nuestras condiciones.

La reacción de la polimerasa en cadena múltiple tiene gran importancia diagnóstica, debido a que detecta simultáneamente *C. trachomatis* y *N.gonorrhoeae* en un corto período de tiempo. Además, es sensible, barata y rápida en comparación con los métodos

ensayo Inmuno-enzimático para *C. trachomatis* y cultivo en Thayer-Martin para detectar *N. gonorrhoeae*. En Nicaragua, donde la detección de *C. trachomatis* es muy limitada y costosa, el método de PCR podría resolver el problema del análisis.

Agradecimiento

Al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua por haber permitido la realización de este estudio en sus

instalaciones. A Alejandro Belli por su apoyo incondicional durante todo el trabajo de investigación y a Betzabé Rodríguez por su apoyo técnico. Ernesto Flores recibe apoyo de la Fundación *New England Biolabs*. El Centro de Biología Molecular de la UCA dirigido por el Dr. Jorge Huete cuenta con financiamiento de la Fundación *Pew Charitable Trusts* (PO114SC) y de la Organización Mundial de la Salud (T16/181/404, ID-971032).

Bibliografía

- BARNES, R.C. (1989). "Laboratory diagnosis of human chlamydial infections". *Clin Microbiol. Rev.* 2: 119-136.
- BAWNESES, J.E., CLARK, A.M., LOEFFELHOLZ, M.J., HERNAN, S.A., y STAMM, W.A. (1993). "Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* urethritis in men by polymerase chain reaction assay of first-catch urine". *J. Clin. Microbiol.* 31: 3031-3016.
- BIRKENMEYER, L., y ARMSTRONG, A.S. (1992). Preliminary evaluation of the Ligase Chain Reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3089-3094.
- BLACK, C. M. (1997). "Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection". *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 160-184.
- BONIN, P.; TANINO, T.T. y HANDSFIELD, H.H. (1984). "Isolation of *Neisseria gonorrhoea* on selective and nonselective media in a sexually transmitted disease clinic". *J. Clin. Microbiol.* 19 (2): 218-220.
- CHERNESKY, M.A.; JANG, D.; LEE, H.; BURCZAK, J.D.; HU, H.; SELLORS, J.; TOMAZIC ALLEN, S.J. y MAHONY, J.B. (1994). "Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men and woman by testing first-void urine by ligase chain reaction". *J. Clin. Microbiol.* 32: 2682-2685.
- HERMANN, B.; ESPINOZA, F.; RIVERA, R.; SMITH, G.D.; RAMOS, A. y EGGER, M. (1996). "Genital Chlamydial infection among woman in Nicaragua: Validity of direct fluorescent antibody testing prevalence, risk factors and clinical manifestations". *Genitourin. Med.* 72: 20-26.
- HO, B.S.W.; FENG, W.G.; WONG, B.K.C. y EGGLESTONE, S.I. (1992). "Polimerase chain reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens". *J. Clin. Pathol.* 45: 439-442.
- LOEFFELHOLZ, M.J.; LENINSKI, C.A.; SILVER, S.R.; PUROHIT, A.P.; HERMAN, S.A.; BUONAGURIO, D.A. y DRAGON, A. (1992). "Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction". *J. Clin. Microbiol.* 30: 2847-2851.
- MAHONY, J.B.; LUINSTRAS, K.E.; SELLORS, J.W.; JANG, D. y CHERNESKY, M.A. (1992). "Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men". *J. Clin. Microbiol.* 30: 2241-2245.
- MAHONY, J.B.; LUINSTRAS, K.E.; TYNDALL, M.; SELLORS, J.W.; KREPEL, J.; CHERNESKY, M. (1995). "Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria Gonorrhoeae* in genitourinary specimens". *J. Clin. Microbiol.* 33: 3049-3053.

- SCHACHTER, J. (1990). "Epidemiology of Chlamydia trachomatis". In Bowie W.R, Caldwell H.D, Jones R.P *et al*, eds. Chlamydia infections. Cambridge University Press, pp: 545-54.
- STAMM, W.E. (1988). "Diagnosis of Chlamydia trachomatis by cell cultures and serology". *Lab. Med.* 13: 92-100.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A. y HIGUSHI, R. (1991). "Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material". *Biotechniques*, vol.10,No.4, 506-13
- WANG, S.P.y GRAYSTON, J.T. (1970). "Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organism in new microtiter indirect immunofluorescence test". *Am. J. Ophthalmol.* 70: 367-374.
- WONG, K.C.; HO, B.S.W.; EGGLESTONE, S.I. y LEWIS, W.H.D. (1995). "Duplex PCR system for simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens". *J. Clin. Microbiol.* 48: 101-104.