

Validación técnica de una PCR: Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Technical validation of a polymerase chain reaction for *Chlamydia trachomatis* detection

Diana Jurado-Orejuela¹, Claudia Paredes-Amaya²,
Gerardo Libreros-Zúñiga³

Resumen

Objetivo: Estandarizar una técnica de PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Materiales y método: Estudio experimental en el que se optimizaron las condiciones de PCR para la detección *in vitro* de *C. trachomatis*. Se utilizó ADN de *C. trachomatis* VR885D y los cebadores CtP1 5'-TAGTAAGTCCACTTCATCA-3' y CtP2 5'-TTCCCCTGTAAATTCGTTGC-3, que amplificaron un segmento de 201 pb del plásmido clamidial. Se realizaron diluciones logarítmicas de ADN clamidial y fueron empleados para determinar la sensibilidad analítica expresada como copias de plásmidos y/o de cuerpos elementales. La especificidad analítica de la prueba se evaluó usando los cebadores CtP1 y CtP2 y ADN de microorganismos colonizadores y/o patógenos urogenitales. La variabilidad intraensayo fue evaluada sobre muestras por triplicado, mientras que la variabilidad interensayo se determinó mediante comparación de los resultados obtenidos por tres técnicos en diferentes días.

Resultados: Las condiciones de PCR para la amplificación del gen de interés fueron establecidas (94°C/4 min; 40 ciclos de 94°C/1 min, 56°C/1 min. y 72°C/1.5 min; 72°C/4 min); 1.5 mM MgCl₂ y 1 U/μL Taq polimerasa. La sensibilidad analítica de la PCR fue de 10⁻¹⁷ g de ADN, equivalentes a una copia del plásmido o menos de un cuerpo elemental de *C. trachomatis*. Los cebadores CtP1 y CtP2 amplificaron específicamente el ADN de *C. trachomatis* bajo las condiciones experimentales evaluadas. La repetitibilidad y reproducibilidad de la PCR se determinó con experimentos de variabilidad intra e interensayo respectivamente.

Conclusiones: La estandarización de esta PCR es el primer paso para su utilización en el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis*. Se requieren estudios adicionales de validación clínica de ésta prueba.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, diagnóstico molecular, PCR.

Fecha de recepción: 15 abril de 2016
Fecha de aceptación: 26 de mayo de 2016

¹ Profesora Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad del Valle, Cali (Colombia). dijurado@yahoo.com

² Bacterióloga Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. cparedes09@gmail.com

³ Profesor Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. gerardo.libreros@correounivalle.edu.co

Correspondencia: Gerardo Andrés Libreros Zúñiga. Av. 1N n° 3N-35, oficina 2301, Centenario, Cali (Valle del Cauca, Colombia). Teléfono 57-2-6670326, Fax 57-2-6670329. gerardo.libreros@correounivalle.edu.co

Abstract

Objective: To standardize a PCR for *Chlamydia trachomatis* detection.

Materials and methods: An experimental study was designed to standardize a *C. trachomatis* PCR test. Genomic DNA from *C. trachomatis* serovar D ATCC VR885D was used for the PCR standardization. An amplicon of 201 bp from clamidial plasmid was obtained using primers CtP1 5'-TAGTAAGTCCACTTCATCA-3' and CtP2 5'-TTCCCTTGTAATTCGTTGC-3'. Serial dilutions of clamidial DNA were used to determine the analytical sensitivity. Analytical specificity was tested using DNA from several urogenital microorganisms. Intra assay variability was assessed on triplicate DNA samples, while inter assay variability was assessed comparing the results by three technicians on different days.

Results: Established (94°C/4 min; 40 cycles at 94°C/1 min, 56°C/1 min and 72°C/1.5 min; 72°C/4 min; 1.5 mM of MgCl₂ and 1U/μL of Taq polymerase. The analytical sensitivity was 10⁻¹⁷ g of DNA equivalent to one plasmid or less than one elementary body from *C. trachomatis*. Primers CtP1 and CtP2 amplified specifically *C. trachomatis* in the experimental conditions evaluated. Intra and inter assay variability demonstrated the repeatability and reproducibility of the PCR respectively.

Conclusions: We standardized the experimental conditions for a *C. trachomatis* PCR that can be used for diagnostic purposes. Other studies are required for further clinical evaluation of this test.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, molecular diagnosis, PCR.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es la bacteria que causa el mayor número de infecciones de transmisión sexual en el mundo, con un estimado de 100 millones de casos por año, constituyéndose en un problema de salud para la población sexualmente activa (1, 2). *C. trachomatis* infecta principalmente células del epitelio mucoso y, simultáneamente, se asocian con un estado de inflamación local que favorece la co-infección de otros microorganismos, como por ejemplo, el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (3).

En Colombia, la transmisión de *C. trachomatis* se favorece por la carencia de un programa de vigilancia de infecciones de transmisión sexual específicamente enfocado hacia el control de este patógeno y a las dificultades para su diagnóstico de laboratorio. Adicionalmente, la naturaleza asintomática y crónica de la infección por *Chlamydia* facilita su diseminación entre las poblaciones de mayor

riesgo. Por lo anterior, la implementación de nuevas técnicas diagnósticas tendría gran impacto en el tratamiento oportuno de los pacientes y en el control de la infección antes del desarrollo de una vacuna. (4).

El cultivo en células MacCoy, a pesar de ser considerado como el método de referencia para el diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*, presenta baja sensibilidad y es de difícil implementación en laboratorios clínicos. (5).

Por otro lado, como alternativa al cultivo, se encuentran las pruebas de detección de antígenos bacterianos (LPS o MOMP), que a pesar de su bajo costo y fácil implementación presentan baja especificidad comparadas con el cultivo (6).

Actualmente, las recomendaciones mundiales para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *C. trachomatis* se inclinan por el uso de las pruebas de amplificación de áci-

dos nucleicos como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), debido a su elevado desempeño diagnóstico (sensibilidad y especificidad superiores a 90 % comparadas con el cultivo o la detección de antígenos) (7); adicionalmente la PCR también puede ser estandarizada para el análisis de diferentes tipos de muestras clínicas, facilitando así el diagnóstico de infecciones genitales y extragenitales (8, 9). Por lo anterior, este estudio pretende validar una PCR para la detección de *C. trachomatis* que pueda ser usada con fines diagnósticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y material genético: Todos los microorganismos o ADN usados en este trabajo se presentan en la tabla 1.

Extracción y cuantificación de ADN: A partir de un cultivo puro en agar trispticasa soya se suspendieron 2 a 5 colonias en 1.5 ml de agua Milli-Q. Se centrifugó a 12.000 g y el precipitado se utilizó para la extracción del ADN genómico empleando el estuche Wizard Genomic ADN Purification (Promega). Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas en el Qubit 2.0 (Invitrogen).

PCR para ARN ribosomal 16S: Como un control interno de las PCR bacterianas se amplificó un segmento de 602 pb del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S usando los cebadores Ub1 5'-GATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-3' y Ub2 5'-CCGGGAACGTATTCACCG-3'. La PCR se realizó de acuerdo con Ashimoto et al. (10).

PCR para *Chlamydia trachomatis*: Se realizaron experimentos de optimización de la PCR variando las concentraciones de MgCl₂ (1.0 a 3.0 mM con variaciones de 0.5 mM), *Taq* polimerasa (0.5 a 2 U/μL con variaciones de 0.5 U/μL) y temperaturas de alineamiento de cebadores (52 a 57°C con variaciones

de 1°C). Se emplearon los cebadores CtP1 5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3' y CtP2 5'-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3' (11). La composición y concentración final de los reactivos en la mezcla reacción se muestra en la tabla 2. Una vez estandarizada la prueba, todos los experimentos se realizaron en termociclador Applied Biosystems 2720 empleando el programa: 95°C/4 min, 40 ciclos (95°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/1.5 min) y 72°C/4 min. Todos los experimentos incluyeron un control positivo y blanco de reactivo.

Sensibilidad analítica: Se realizaron diluciones logarítmicas del ADN de *C. trachomatis* y se procesaron por PCR. Se estimó el número de plásmidos y de CE considerando un plásmido de 7500 pb y 10 copias por cada CE. La sensibilidad analítica de la prueba se definió como la mínima concentración de ADN clamidial o menor número de plásmidos o CE detectados por la PCR.

Especificidad analítica: Se realizaron PCR por triplicado con los cebadores CtP1 y CtP2 y ADN de cada uno de los microorganismos o mezclas de organismos mostrados en la tabla 1. La especificidad analítica se definió como la capacidad de los cebadores CtP1 CtP2 de amplificar exclusivamente el gen de interés, evidenciado como una banda de 201 pb en el gel de agarosa.

Análisis de los productos de PCR: Se adicionaron 10 μL de cada producto de PCR en los pozos del gel de agarosa 2 % con SYBR-Safe (Invitrogen). La electroforesis se realizó en tampón TBE 1X, pH 8.3 a 7 V/cm por 60 minutos. Los geles se documentaron con el transiluminador Safe-Imager 2.0 (Invitrogen). Se usó el marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Variabilidad intraensayo: Diferentes técnicos realizaron la PCR por triplicado usando diferentes muestras de origen urogenital que previamente habían sido procesadas y diagnosticadas como positivas o negativas para *C. trachomatis* con el estuche comercial de PCR en tiempo real (qPCR) múltiplex *C. trachomatis, Ureaplasma y Mycoplasma* (Sacace Biotechnologies). La variabilidad intraensayo se definió como la repetitibilidad de los triplicados realizados por cada operador bajo las mismas condiciones experimentales (tabla 4).

Variabilidad interensayo: Se procesaron por PCR muestras de origen urogenital variando las condiciones experimentales (por ejemplo, diferentes técnicos y días de ensayo). La variabilidad interensayo se definió como la reproducibilidad de los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales (tabla 5).

Consideraciones éticas: Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión Ética Humana de la Universidad del Valle. Acta 045-012.

RESULTADOS

Los cebadores CtP1 y CtP2 flanquean una secuencia de 201 pb comprendida entre la timina 3584 (T3584) y la Adenina 3784 (A3784) del plásmido críptico de *C. trachomatis*. Esta región génica no está incluida dentro de las ocho secuencias codificantes (CDS) conocidas para el plásmido de *C. trachomatis*, por lo que, el fragmento génico amplificado en esta PCR correspondería a una posible región intergénica con función desconocida hasta el momento (GenBank: AAB02587.1) (figura 1).

Para estandarizar las condiciones experimentales de la PCR se realizaron variaciones

en la temperatura de alineamiento de los cebadores CtP1 y CtP2 (entre 52 a 57°C) y en las concentraciones de MgCl₂ (1 a 3 mM). Se observó amplificación de una banda de 201 pb entre 55 y 56 °C y entre 1.5 a 2.5 mM de MgCl₂ (figura 2). A temperaturas de alineamiento inferiores a 55°C o superiores a 57°C no se observó la banda esperada (datos no mostrados). Adicionalmente se realizaron experimentos evaluando diferentes concentraciones de *Taq* polimerasa (0.5 a 2 U/μL). Considerando que la concentración de enzima recomendada por el fabricante era de 1 U/μL, esta PCR consiguió amplificar el fragmento génico de interés en todas las concentraciones de *Taq* polimerasa evaluadas, inclusive a 0.5 U/μL (datos no mostrados).

Con el fin de establecer el límite de detección de la prueba se realizaron PCR de 40 ciclos a 56 °C, usando diluciones logarítmicas del ADN de *C. trachomatis*, 1 U de *Taq* polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ y los cebadores CtP1 y CtP2.

Esta PCR detectó hasta 10⁻¹⁷ g de ADN, lo que equivale a un plásmido de 7500 pb o menos de un cuerpo elemental de *C. trachomatis* (figura 3), o menos de un cuerpo elemental de *C. trachomatis* (figura 3).

Con el propósito de examinar la especificidad de los cebadores CtP1 y CtP2 se realizaron PCR de 40 ciclos a 56°C, usando aproximadamente 1 ng de ADN proveniente de microorganismos patógenos o comensales del tracto genitourinario. Solo se observó amplificación del gen de interés en las muestras que contenían ADN de *C. trachomatis*, o en las mezclas (*C. trachomatis* + *U. urealyticum*) y (*C. trachomatis* + *M. hominis*).

Para determinar la variabilidad intra e interensayo se compararon los resultados de los

triplicados de las PCR realizadas por triplicado y variando las condiciones experimentales (operadores y días de ensayo) respectivamente. La PCR para *C. trachomatis* evaluada en este estudio demostró la repetitibilidad y reproducibilidad esperada (tablas 4 y 5).

DISCUSIÓN

Chlamydia trachomatis es el patógeno que causa el mayor número de infecciones urogenitales en el mundo cada año, produciendo enfermedades de tipo agudo como uretritis y cervicitis e infecciones persistentes que frecuentemente son asintomáticas y pueden llegar a producir complicaciones crónicas. La infección natural con *C. trachomatis* no protege contra la reinfección y actualmente no existe una vacuna contra esta bacteria, por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento oportuno de los individuos infectados es la principal herramienta para el control de la transmisión.

Este trabajo realizó la validación técnica de una PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* que podría servir como punto de partida para la implementación clínica de esta prueba en nuestro medio. Debido a las dificultades para el diagnóstico de *C. trachomatis* en Colombia, se espera que la aplicación de esta PCR pueda beneficiar a la población de mayor riesgo (individuos jóvenes sexualmente activos) y simultáneamente, impactar en el control de esta bacteria de transmisión sexual.

A pesar de que el cultivo celular es considerado como el método de referencia para el diagnóstico de laboratorio de *C. trachomatis*, este presenta grandes inconvenientes para su implementación en los laboratorios clínicos, dentro de los que se destacan el elevado costo y la complejidad operacional (5); así como las pruebas inmunoenzimáticas, que se basan

en la detección de antígenos bacteriano y tienen la ventaja de ser económicas y de fácil ejecución, pero presentan una baja especificidad comparadas con el cultivo (12). Por lo anterior, los métodos basados en amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR, son la alternativa de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis*, debido a su alta sensibilidad, especificidad y fácil estandarización dentro del laboratorio (7).

La gran versatilidad de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos ha permitido su aplicación en el diagnóstico de *C. trachomatis* por medio de diferentes estrategias, como LCR (Ligase Chain Reaction), PCR (Polymerase Chain Reaction) y PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR), entre otros. Actualmente, existen en el mercado estuches de qPCR fácilmente automatizables y con excelente desempeño diagnóstico (9); sin embargo, los altos costos de los equipos y estuches comerciales de qPCR pueden ser el principal inconveniente para su implementación en países en desarrollo. Por este motivo, este trabajo se estandarizó una PCR convencional *In house*, con una capacidad diagnóstica similar a una qPCR pero que podría resultar más económica.

La enzima *Taq* polimerasa cataliza la adición de mononucleótidos, derivados de desoxinucleósidos 5' trifosfatos, al grupo OH 3' de la cadena creciente de ADN. Esta reacción solo es posible bajo la presencia de iones Mg^{2+} que inducen ajustes conformacionales en la enzima necesarios para su actividad (13).

La estandarización de la concentración de Mg^{2+} es clave durante la PCR porque así como estos iones son esenciales para garantizar la actividad enzimática, el exceso de Mg^{2+} disminuye la especificidad y fidelidad de

la enzima, además de afectar la T_m de los híbridos cebador-ADN, ADN-ADN y cebador-cebador formados durante la PCR (14).

Nuestros datos mostraron amplificación del gen de interés a partir de 1.5 mM y hasta 3 mM de $MgCl_2$; sin embargo, para minimizar el efecto del exceso de Mg^{+2} *Taq* polimerasa y la T_m de los híbridos, todas las PCR se realizaron con la menor concentración de $MgCl_2$ que permitió amplificar el gen de interés (1.5 mM).

C. trachomatis es un patógeno intracelular con un cromosoma de 7 Mb y 10 copias de un plásmido de 7.5 kb (15). Este plásmido no conjugativo contiene cinco secuencias codificantes (CDS) que comparten identidad con genes de mantenimiento episomal y tres CDS que codifican por proteínas, posiblemente relacionadas con virulencia (16).

El plásmido es un blanco común de las pruebas de PCR usadas en el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia* (incluyendo la PCR de este estudio), que han sido fundamentales para el seguimiento y control de las infecciones causadas por esta bacteria en Europa y Estados Unidos.

En 2006 se describió por primera vez en Suecia una nueva variante de *C. trachomatis* que no era detectada por algunas pruebas de PCR disponibles en el mercado (17). Posteriormente se determinó que estas variantes tenían una delección de 377 pb, justo en la región usada para la amplificación génica en estas pruebas (18).

La secuencia del plásmido amplificada por nuestra PCR no está incluida en la delección reportada en la variante sueca, lo cual significa que la PCR estandarizada en este estudio podría potencialmente detectar tanto los

aislados clásicos como la variante sueca de *C. trachomatis*.

La emergencia de la variante sueca de *C. trachomatis* representa un ejemplo de la gran versatilidad del genoma bacteriano y muestra, simultáneamente, la importancia de la selección de regiones génicas conservadas como blancos para la detección de patógenos en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

Un estudio que comparó las ocho CDS del plásmido de once aislados de *C. trachomatis*, incluyendo la nueva variante sueca, determinó las regiones CDS2, CDS6, CDS7 y CDS8 como las más conservadas dentro de los plásmidos secuenciados (19). Por lo tanto, la utilización de cebadores que flanqueen simultáneamente estas secuencias conservadas del plásmido junto con genes cromosómicos, como *ompA*, pueden disminuir la probabilidad de falsos negativos en las pruebas de detección de *C. trachomatis*.

La sensibilidad analítica de la PCR estandarizada en este estudio, usando 40 ciclos, fue de 10^{-17} g de ADN; este valor corresponde a una copia del plásmido o menos de un cuerpo elemental de *C. trachomatis* (figura 3). Estos resultados fueron similares a los reportados por otros (20) y demuestran el potencial diagnóstico de esta PCR.

Un estudio que mostró la carga de C.E de *C. trachomatis* excretados por individuos infectados en diferentes muestras clínicas (21) determinó en promedio, 1200 C.E/100 μ L y 162 C.E/100 μ L en orina de hombres y mujeres respectivamente. De la misma manera, determinaron cargas de 2231 y 773 C.E/100 μ L en muestras endocervicales y vaginales, respectivamente. Basados en el número de

CE excretados por individuos sintomáticos y asumiendo que los individuos con infecciones asintomáticas tienen una menor carga de CE que los sintomáticos, se puede sugerir que esta PCR tendría el potencial de detectar ambos grupos considerando su sensibilidad analítica (1 plásmido $\approx \leq$ 1 CE) (Figura 4). La identificación de una bajo número de CE, e inclusive de ADN plasmidial (liberado después de la muerte bacteriana), es fundamental para el diagnóstico y tratamiento de individuos asintomáticos y por consiguiente para el control de la transmisión.

Para la estandarización de esta prueba se usó ADN de *Chlamydia trachomatis* serovar D (asociada con infecciones genitales no invasivas), para amplificar una región del plásmido críptico de gran estabilidad genética y amplia distribución dentro del género *Chlamydia* (16, 19, 22); por lo tanto, esta PCR podría emplearse para detectar otras serovares genitales no invasivas como E-K, así como los biovares tracoma y linfogranuloma venéreo.

Aunque este trabajo utilizó unas pocas muestras de exudados vaginales, para los ensayos de especificidad y reproducibilidad se requiere de un estudio adicional que incluya individuos sintomáticos y asintomáticos para realizar validación clínica de esta prueba.

CONCLUSIONES

A pesar de que la terapia con antibióticos es efectiva para el tratamiento de las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, la prevención de las secuelas post inflamatorias, las reinfecciones y co-infecciones por otros patógenos, constituyen en la actualidad los principales desafíos que debemos afrontar antes de la implementación de una vacuna contra este patógeno.

La naturaleza asintomática de las infecciones por *C. trachomatis* interfiere con el diagnóstico y tratamiento de los individuos infectados y a la vez facilita la inflamación crónica y el daño tisular irreversible (23, 24).

En Colombia, el acceso limitado a las pruebas de diagnóstico de *C. trachomatis*, sumado a la ausencia de un programa de vigilancia de infecciones por este microorganismo, ofrecen el escenario ideal para la transmisión de esta bacteria, así como de otros microorganismos de transmisión sexual, como VIH, que puede aprovechar el estado de inflamación crónica inducido por *C. trachomatis* para infectar células blanco reclutadas en las mucosas urogenitales (24, 25).

La implementación de pruebas diagnósticas, tal como la PCR estandarizada en este estudio, podría contribuir con el diagnóstico y tratamiento temprano de las infecciones por *C. trachomatis* de individuos sintomáticos y asintomáticos (26).

Agradecimientos

Los autores agradecen la donación de material genético de Mycoplasmataceae, Dra. Natalia Basto (Lab. Celagem); *Treponema pallidum*, Dra. Lady Ramírez (CIDEIM); PBMC-VIH-1 y Herpes simples-1, Dra. Beatriz Parra (Universidad del Valle). Ya los profesionales Leonor Oviedo y Javier Bustamante, del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, por su apoyo técnico.

Financiación: Universidad del Valle. Convocatoria interna 2011. CI 1671.

Conflicto de intereses: ninguno.

REFERENCIAS

1. ECDC. ECfDPaC. Sexually transmitted infections in Europe 2013 Stockholm 2015. Available from: <http://ecdc.europa.eu/>

- en/publications/Publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013.pdf.
2. CDC CfDCaP. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012 Atlanta 2013. [Available from: <http://www.cdc.gov/sTD/stats12/Surv2012.pdf>].
 3. Senior K. Chlamydia: a much underestimated STI. *Lancet Infect Dis* 2012;12(7):517-8.
 4. Gottlieb SL, Deal CD, Giersing B, Rees H, Bolan G, Johnston C et al. The global roadmap for advancing development of vaccines against sexually transmitted infections: Update and next steps. *Vaccine* 2016;34(26):2939-47.
 5. Gordon FB, Woolridge RL, Quan AL, Gillmore JD, Arm HG, Yang YF et al. Field studies on McCoy cell cultures for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1972;3(1):69-78.
 6. Lefebvre J, Laperrière H, Rousseau H, Massé R. Comparison of three techniques for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens from asymptomatic women. *J Clin Microbiol* 1988;26(4):726-31.
 7. Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2004;42(7):3089-93.
 8. Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(11):2847-51.
 9. Peuchant O, de Diego S, Le Roy C, Frantz-Blancpain S, Hocké C, Bébéar C et al. Comparison of three real-time PCR assays for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in young pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;83(4):335-7.
 10. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(4):266-73.
 11. Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, van Doornum GJ, MacLaren DM, Meijer CJ et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31(5):1060-5.
 12. Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A et al. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol* 2002;51(12):1021-31.
 13. Vinod K, Beard W, Shock D, Krahn J, Pendersen L, Wilson S. Magnesium induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex. *Structure* 2006;14(4):757-66.
 14. Eckert K, Kunkel T. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 1990(13):3739-44.
 15. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998;282(5389):754-9.
 16. Rockey DD. Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid. *J Exp Med* 2011;208(11):2159-62.
 17. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24(1):62-9.
 18. Ripa T, Nilsson PA. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis* 2007;34(5):255-6.
 19. Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, Marsh P, Barron A, Bignell A et al. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics* 2009;10:239.
 20. Ostergaard L, Birkelund S, Christiansen G. Use of polymerase chain reaction for detec-

- tion of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):3081.
21. Michel CE, Sonnex C, Carne CA, White JA, Magbanua JP, Nadala EC et al. Chlamydia trachomatis load at matched anatomic sites: implications for screening strategies. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1395-402.
 22. Thomas NS, Lusher M, Storey CC, Clarke IN. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology* 1997;143 (Pt 6):1847-54.
 23. Mascellino MT, Boccia P, Oliva A. Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* Infected Women. *ISRN Obstet Gynecol*. 2011;2011:436936.
 24. Molano M, Meijer CJ, Weiderpass E, Arslan A, Posso H, Franceschi S et al. The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. *J Infect Dis* 2005;191(6):907-16.
 25. Paredes MC, Gómez YM, Torres AM, Fernández M, Tovar MB. Prevalence of infections by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among high school students in the Sabana Central area of Cundinamarca, Colombia. *Biomedica* 2015;35(3):314-24.
 26. Fredlund H, Falk L, Jurstrand M, Unemo M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. *APMIS* 2004;112(11-12):771-84.

Tabla 1. Microorganismos usados en la estandarización de la PCR de *C. trachomatis* y su relación con el tracto genitourinario (TGU)

Grupo	Microorganismo	Relación con TGU	Origen
Bacterias	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar D	Patógeno	ATCC VR885D
	<i>Treponema pallidum</i>	Patógeno	Cepa Nichols
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Patógeno	Aislado clínico
	<i>Mycoplasma hominis</i>	Patógeno	Aislado clínico
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Comensal o patógeno	ATCC 12386
	<i>Escherichia coli</i>	Comensal o patógeno	ATCC 25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Comensal o patógeno	ATCC 25923
	<i>Micrococcus (Kocuria) kristinae</i>	Comensal	Aislado clínico
Hongos	<i>Candida albicans</i>	Comensal o patógeno	Aislado clínico
Virus	Herpes tipo 1	Patógeno	Aislado clínico
	VIH-1	Patógeno	Aislado clínico

Tabla 2. Mezcla de reacción de la PCR de *C. trachomatis*

Reactivos	Concentración final (50 µL)	Vol. / reacción (µL)
Agua DEPC	-	34,6
Green GoTaq® Flexi Buffer pH 8.5 (Promega)	1X	10
MgCl ₂	1,5 mM	3
dNTP mix	800 µM	1
Primer CtP1	0,5 µM	0,15
Primer CtP2	0,5 µM	0,15
T GoTaq® polimerasa (Promega)	1 U	0,1
ADN	> 10-17 g	1

Tabla 3. Especificidad analítica de la PCR para *C. trachomatis*

Microorganismo	PCR
<i>C. trachomatis</i>	+
<i>U. urealyticum</i>	-
<i>M. hominis</i>	-
<i>C. trachomatis</i> + <i>U. urealyticum</i>	+
<i>C. trachomatis</i> + <i>M. hominis</i>	+
<i>U. urealyticum</i> + <i>M. hominis</i>	-
<i>T. pallidum</i>	-
<i>S. agalactiae</i>	-
<i>E. coli</i>	-
<i>S. aureus</i>	-
<i>M. kristinae</i>	-
<i>C. albicans</i>	-
Herpes tipo 1	-
VIH-1	-

Tabla 4. Variabilidad intraensayo repetitibilidad de la PCR de *C. trachomatis*

Técnico	Muestra	Resultado PCR 1	Resultado PCR 2	Resultado PCR 3	Resultado final
1	1	+	+	+	Positivo
	2	-	-	-	Negativo
	3	-	-	-	Negativo
	Control	+	+	+	Positivo
2	4	-	-	-	Negativo
	5	-	-	-	Negativo
	6	+	+	+	Positivo
	Control	+	+	+	Positivo
3	7	+	+	+	Positivo
	8	+	+	+	Positivo
	9	-	-	-	Negativo
	Control	+	+	+	Positivo

Tabla 5. Variabilidad inter ensayo (reproductibilidad) de la PCR de *C. trachomatis*

Operador	Jornada	Muestra	Resultado PCR 1	Resultado PCR 2	Resultado PCR 3	Resultado final
1	Día 1, mañana	10	-	-	-	Negativo
		11	+	+	+	Positivo
		12	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo
	Día 2, tarde	10	-	-	-	Negativo
		11	+	+	+	Positivo
		12	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo
2	Día 1, mañana	13	+	+	+	Positivo
		14	-	-	-	Negativo
		15	+	+	+	Positivo
		Control	+	+	+	Positivo
	Día 2, tarde	13	+	+	+	Positivo
		14	-	-	-	Negativo
		15	+	+	+	Positivo
		Control	+	+	+	Positivo

3	Día 1, tarde	16	-	-	-	Negativo
		17	-	-	-	Negativo
		18	-	-	-	Negativo
	Control	+	+	+	Positivo	
	Día 2, mañana	16	-	-	-	Negativo
		17	-	-	-	Negativo
		18	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo

3541 aaaattagta aattctccgc tattaaaaa gtaggtaaa ttatagtaac tgccactca
 3601 tcaaagtcc tatccacctt gaaaatcaga agtttgaag aagacctggt caatctatta
 3661 agatatctcc caaattggct caaaatggga tggtagaagt tataggtctt gattttctt
 3721 catctatta ccatgcatta gcagctatcc aaagattact gaccgcaacg aattacaagg
 3781 ggaacacaaa

Figura 1. Regiones de reconocimiento de los cebadores CtP1 y CtP2 en el plásmido de *C. trachomatis* (GenBank: CP007132.1). En gris se muestran las secuencias flaqueadas por los cebadores CtP1: Timina 3584-Adenina 3604 (T3584-A3604) y CtP2: Guanina 3765-Adenina 3784 (G3765-A3784).

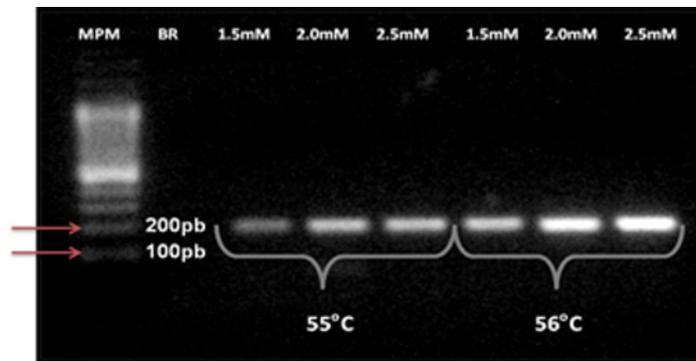


Figura 2. Estandarización de la temperatura de alineamiento de los cebadores CtP1 y CtP2 y de la concentración de MgCl₂. Volúmenes iguales (10 µL/ pozo) de los productos de amplificación se colocaron en cada pozo y se realizó la electroforesis en gel de agarosa a 7 V/cm durante 1 hora. Se observó la amplificación del gen de interés a 55 y 56 °C y a las concentraciones de 1.5 a 2.5 mM de MgCl₂. MPM: Marcador de peso molecular 100 pb, 1.5 mM, 2.0 mM, 2,5 mM: Con flechas rojas se muestran las bandas de 100 y 200 pares de bases, esta última, cercana al tamaño del amplicón esperado (201 pb). En la parte superior se muestra el gradiente de concentraciones de MgCl₂ evaluado. MPM: Marcador de peso molecular, BR: Blanco de reactivo.

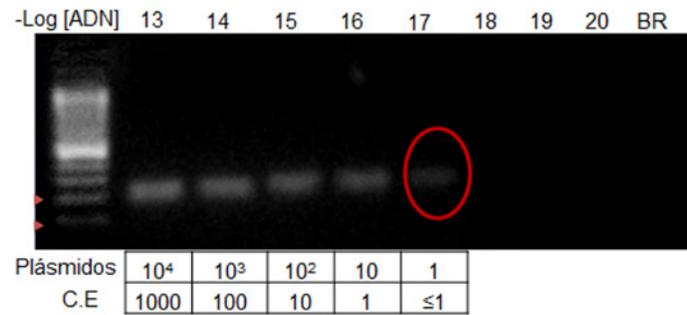


Figura 3. Límite de detección de la PCR de *Chlamydia trachomatis*. Diluciones logarítmicas del ADN ATCC VR885D fueron usadas para PCR. Los números en la parte superior corresponden al logaritmo negativo de la concentración del ADN. En la parte inferior se correlaciona la concentración de ADN con el número de plásmidos y de cuerpos elementales (C.E). El límite de detección de la prueba correspondió a 10⁻¹⁷ g de ADN, equivalentes a un plásmido y menos de un C.E de *C. trachomatis*. está indicado sobre la foto del gel con un círculo rojo.

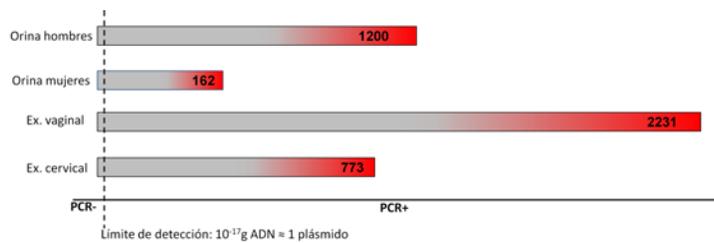


Figura 4. Potencial diagnóstico de la PCR en el diagnóstico de infecciones sintomáticas y asintomáticas por *Chlamydia trachomatis*. La carga bacteriana, definida como el número de cuerpos elementales (C.E./100 μL), fue determinada por Michel *et al.* en diferentes muestras de hombres y mujeres sintomáticos (21). Las cuatro barras horizontales representan la magnitud relativa de la carga bacteriana para cada muestra clínica. A la derecha de cada barra (en rojo), se encuentra la carga promedio determinada en (21). La zona central e izquierda de las barras (en gris), representarían la región de umbral en donde posiblemente se encuentran los individuos con infección asintomática. El límite de detección determinado para la PCR de nuestro estudio (10⁻¹⁷ g ADN ≈ 1 plásmido ≈ ≤ 1 C.E) está representado por la línea punteada vertical que corta el eje *x*, y definiría la PCR como positiva o negativa.