



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

ADN de *Chlamydia trachomatis* en leucocitos de sangre periférica de neonatos



Marcela López-Hurtado^{a,b}, Karla N. Cuevas-Recillas^{a,b},
Verónica R. Flores-Salazar^{a,b} y Fernando M. Guerra-Infante^{a,b,*}

^a Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Perinatología, México D.F., México

^b Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México D.F., México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de abril de 2014

Aceptado el 11 de septiembre de 2014

On-line el 20 de diciembre de 2014

Palabras clave:

Chlamydia trachomatis

Neonatos

Neumonía

Sangre

Reacción en cadena de la polimerasa

Gen *ompA*

R E S U M E N

Introducción: El diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* es difícil en recién nacidos; sin embargo, este se realiza mediante el cultivo celular o por la detección de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis* (anti-CT). La detección de ADN de *C. trachomatis* en leucocitos de sangre mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser una mejor herramienta para el diagnóstico de infección por este patógeno.

Material y métodos: Se analizaron 44 recién nacidos, todos ellos prematuros y con peso menor de 2.500 g. De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre y de lavado nasofaríngeo. El ADN de los leucocitos fue obtenido mediante la técnica de fenol-cloroformo. La detección de *C. trachomatis* fue llevada a cabo mediante la amplificación del gen *ompA* utilizando el PCR de punto final. Además, se realizaron las pruebas de cultivo celular y la detección de anticuerpos IgM anti-CT mediante la técnica de microinmunofluorescencia.

Resultados: Veinte pacientes fueron PCR-positivo (45,5%), y la prueba se asoció significativamente con la presencia de neumonía (RR = 2,28; IC 95%: 1,01-5,17; p = 0,035). El cultivo celular de lavado nasofaríngeo solo fue positivo en 7 muestras y no hubo asociación significativa con algún dato clínico o de laboratorio. El título de anticuerpos anti-CT asociado al PCR-positivo fue 1:32 (RR = 2,74; IC 95%: 1,21-6,23; p = 0,008); sin embargo, este título no se asoció a la presencia de neumonía.

Conclusión: La detección de ADN en leucocitos de sangre periférica podría ser útil para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis*.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Chlamydia trachomatis DNA in leukocytes of peripheral blood from neonates

A B S T R A C T

Introduction: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in newborns is difficult; however, this diagnosis is performed by cell culture or by detection of IgM antibodies against *C. trachomatis*. Detection of *C. trachomatis* DNA in peripheral blood leukocytes using polymer chain reaction (PCR) may be a better tool for the diagnosis of infection by this pathogen.

Material and methods: A total of 44 premature newborns, all weighing less than 2500 g, were included in the study. A blood sample and nasopharyngeal lavages were obtained from each newborn. Leukocyte DNA was obtained by phenol-chloroform extraction technique. Detection of *C. trachomatis* was performed by amplifying the *ompA* gene using the PCR endpoint. Cell culture tests and the detection of IgM antibodies against *C. trachomatis* by microimmunofluorescence assay were also performed.

Results: Twenty newborns were PCR-positive (45.5%), with this test being significantly associated with the presence of pneumonia (RR = 2.28; 95% CI: 1.01 to 5.17; P = .035). The cell culture of nasopharyngeal lavage

Keywords:

Chlamydia trachomatis

Neonates

Pneumonia

Blood

Polymer chain reaction

ompA gene

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fguerra.96@yahoo.com (F.M. Guerra-Infante).

was positive in only 7 samples and no significant association was observed with any clinical or laboratory data. The titer of IgM antibodies against *C. trachomatis* associated with PCR-positive was 1:32 (RR = 2.74; 95% CI: 1.21 to 6.23; $P = .008$), however this titer was not associated with the presence of pneumonia.

Conclusion: DNA detection in peripheral blood leukocytes could be useful for diagnosis of *C. trachomatis* infection.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Chlamydia trachomatis es considerada la bacteria que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones de transmisión sexual¹. En la mujer embarazada puede provocar embarazos ectópicos, partos pretérmino, rotura prematura de membranas, corioamnionitis, aborto espontáneo y mortalidad perinatal². El recién nacido puede adquirir la infección cuando pasa a través del canal de parto o durante la rotura prematura de membranas, y posiblemente también *in utero*³⁻⁵. Las manifestaciones clínicas más comunes en el recién nacido son la conjuntivitis o la neumonía, las cuales aparecen entre las 4 y las 11 semanas después del nacimiento^{3,5-7}. El diagnóstico de infección por *C. trachomatis* en el recién nacido es difícil y en algunas ocasiones tardío, y los métodos empleados con mayor frecuencia son la detección de anticuerpos IgM anti *C. trachomatis* mediante la prueba de microinmunofluorescencia (MIF)⁷⁻⁹ y la detección de antígeno mediante el cultivo celular e inmunofluorescencia directa^{10,11}. Se ha informado que uno o más órganos de los recién nacidos pueden ser colonizados por esta bacteria; esta infección generalizada posiblemente es mediante vía hematógena^{12,13}. Los monocitos son considerados como los susceptibles a la infección por esta bacteria, los cuales en el tejido se transformarán en macrófagos^{14,15}. Desde el año 2001 se ha detectado *Chlamydia trachomatis* y/o *Chlamydia pneumoniae* en leucocitos de sangre periférica de personas adultas y niños en edad preescolar y escolar^{15,16}. El objetivo de esta investigación fue determinar la utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN de *C. trachomatis* en sangre de recién nacidos con dificultad respiratoria.

Material y métodos

Pacientes y muestras

Cincuenta recién nacidos con datos clínicos de neumonía atípica o sepsis fueron evaluados para la detección de ADN de *C. trachomatis* en leucocitos de sangre periférica. Se extrajeron 500 μ l de sangre en tubos microtainer con EDTA mediante la punción de la vena basilica del dorso de la mano. De igual forma se obtuvieron muestras de lavado nasofaríngeo, las cuales fueron depositadas en medio de transporte 2 SP. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.000 $g \times 10$ min a 10 °C, posteriormente se recuperaron tanto la capa de células blancas (*Buffy coat*) como el plasma. Los leucocitos fueron utilizados para la extracción de ácidos nucleicos y la identificación de ADN de *Chlamydia* mediante PCR de punto final. El plasma fue guardado en tubos Eppendorf a -70 °C para determinar la presencia de anticuerpos IgM anti *C. trachomatis* mediante MIF. Las muestras de lavado nasofaríngeo fueron utilizadas para el diagnóstico de *C. trachomatis* mediante cultivo celular e inmunofluorescencia directa.

Obtención de ADN

Antes de la obtención del ADN de los leucocitos, se eliminaron los eritrocitos mediante 2 lavados con 1 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM, MgCl 5 mM y NaCl 10 mM) por

centrifugación a 1.500 $g \times 7$ min a temperatura ambiente. Ya eliminados los eritrocitos, los leucocitos fueron incubados con 200 μ l de la solución de lisis para glóbulos blancos (Tris base 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0,2%, pH 7,6 con 10 μ l de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml) en baño maría a 55 °C por 1 h. Posteriormente el ADN fue obtenido mediante la técnica de fenol-cloroformo.

Detección de *Chlamydia*

Se emplearon 2 técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para confirmar la presencia del ADN de *C. trachomatis*. La primera de ellas fue para amplificar un producto del gen *ompA* de 129 pb y la segunda, para obtener un producto del mismo gen de 1.142 pb. Los iniciadores empleados para la primer PCR fueron los reportados por Dutilh et al.¹⁷: Momp1 (5'-GCCGCTTGAGTTCTGCTTCCTC-3'); Momp2 (5'-CCAAGTGGTGCAAGGATCGCA-3'), y en la segunda PCR se utilizaron los iniciadores reportados por Yang et al.¹⁸: OMP1 (5'-GCCGCTTGAGTTCTGCTTCCTC-3') y OMP2 (5'-ATTTACGTGAGCAGCTCTCTCAT-3'). En la mezcla de reacción se utilizaron las siguientes concentraciones: 1,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 25 pM de cada uno de los iniciadores, 2,5 U de Taq polimerasa (GoTaq® Flexi ADN polimerasa de Promega®, Madison, WI, EE. UU.) y 5 μ l del ADN de la muestra para un volumen final de 25 μ l. En la primera PCR, la mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95 °C para la desnaturalización, seguido de 2 min a 61 °C para la alineación y 1 min a 70 °C para la extensión. La elongación final fue de 5 min a 70 °C. La segunda PCR se realizó bajo las mismas condiciones, solo cambió el tiempo y la temperatura de alineación, las cuales fueron: 1 min a 59 °C (termociclador: MJ Research, Inc. Mod. PTC-100. Watertown, Mass, EE. UU.).

Detección de *Mycoplasma* spp.

Para la detección de *Mycoplasma* se utilizó la técnica de PCR descrita por Van Kuppeveld et al.¹⁹, y los iniciadores utilizados fueron: MGSO (5'-GCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3' y GPO-1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'). La mezcla y las condiciones de reacción fueron utilizadas tal como se describió previamente¹³.

Microinmunofluorescencia

La técnica de microinmunofluorescencia (MIF) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el instructivo de los proveedores (*Chlamydia pneumoniae* IgG/IgM Micro-IF Test kit, Ani Labsystems Ltd. Oy, Vantaa, Finlandia). La presencia de fluorescencia y la intensidad de esta se evaluaron mediante un microscopio de epifluorescencia Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Alemania).

Cultivo celular para *Chlamydia trachomatis*

Para el cultivo celular se emplearon células McCoy, y la detección de *Chlamydia trachomatis* se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa empleando el kit comercial Chlamydial Direct IF (BioMérieux SA, F-69280 Marcy l'Etoile, Francia); posteriormente se siguió el procedimiento tal y como se describió previamente²⁰.

Tabla 1
Características clínicas y microbiológicas de neonatos positivos y negativos a PCR para la detección de ADN de *Chlamydia trachomatis*

		PCR-positivo (n=20)	PCR-negativo (n=24)	RR IC 95%
Sexo	Masculino	11 (25%)	15 (34,1%)	1,01 (0,51-1,99)
	Femenino	8 (18,2%)	10 (22,7%)	NS
Semanas de gestación		29,6 ± 1,9 ^a	29,37 ± 2,7	NS
Peso (g)		1 136,5 ± 263,38	1 099,24 ± 376,45	NS
Talla (cm)		37,12 ± 2,7	37,12 ± 4,31	NS
Perímetro cefálico (cm)		27,18 ± 2,55	26,66 ± 2,92	NS
Tipo de parto	Cesárea	20 (44,4%)	24 (53,3%)	0,54 (0,41-0,71)
	Vaginal	0	1 (2,2%)	NS
EMH ^b	Positivo	1 (2,27%)	1 (2,27%)	1,105 (0,26-4,6)
	Negativo	19 (43,2%)	23 (52,3%)	NS
Neumonía	Positivo	15 (34,1%)	10 (22,7%)	2,28 (1,01-5,17)
	Negativo	5 (11,4%)	14 (31,8%)	0,035
Conjuntivitis	Positivo	2 (4,4%)	3 (6,6%)	0,87 (0,28-2,67)
	Negativo	18 (40%)	22 (48,9%)	NS
Sepsis	Positivo	15 (34,1%)	17 (38,6%)	1,13 (0,52-2,42)
	Negativo	5 (11,4%)	7 (15,9%)	NS
Leucocitos	× 10 ³ /mm ³	10,45 ± 4,8	13,39 ± 6,57	NS
Eosinófilos	mm ³	429,6 ± 482,5	678,3 ± 473,7	NS
<i>Mycoplasma</i> ^c	Positivo	8 (18,2%)	2 (4,5%)	2,27 (1,31-3,93)
	Negativo	12 (27,3%)	22 (50%)	0,027
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^d	Positivo	5 (11,4%)	2 (4,5%)	1,76 (0,96-3,24)
	Negativo	15 (34,1%)	22 (50%)	NS

^a Media y desviación estándar.

^b Enfermedad de membrana hialina.

^c Evaluado por reacción en cadena de la polimerasa.

^d Evaluado por inmunofluorescencia directa en células Mc Coy.

Cultivo celular para virus sincitial respiratorio

Las muestras de lavado nasofaríngeo fueron depositadas en el medio de transporte, el cual fue utilizado para infectar células Hep-2 y Vero. La identificación del virus se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-virus sincitial respiratorio (RSV3-FITC Novocastra, Leica Biosystem, Balliol Business Park West, Reino Unido). El procesamiento de las muestra se realizó tal y como se describió previamente¹⁰.

Cultivo microbiológico

Se realizaron cultivos microbiológicos de aspirado bronquial. Se utilizaron medios artificiales selectivos y diferenciales para el aislamiento de las bacterias y levaduras; la identificación de estos se realizó mediante pruebas bioquímicas en un equipo automatizado Vitek 2 compact (BioMérieux)

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a análisis estadístico mediante la prueba t de Student (a un nivel de significación de $p=0,05$) para pruebas paramétricas. Para pruebas no paramétricas se utilizó el ji-cuadrado. La magnitud de las asociaciones entre las variables fue expresada como riesgo relativo (RR) en un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor de 0,05. La información obtenida fue analizada con el programa SPSS para Windows (versión 17.0.1, 2008; IBM Corporation, New Orchard Road, Armonk, NY, EE. UU.). También se determinaron la sensibilidad y la especificidad de cada una de las pruebas para la detección de *C. trachomatis*. Para ello se consideraron pacientes positivos a la infección por esta bacteria cuando 2 o más de las pruebas de diagnóstico fueron positivas (amplificación positiva del gen *ompA*, cultivo celular positivo o título de anticuerpos IgM mayor o igual a 1:32).

Resultados

En la **tabla 1** se muestra la información referida a los datos clínicos y microbiológicos de la población estudiada. Se analizaron solo 44 recién nacidos de un total de 50, todos ellos con dificultad

respiratoria. Seis pacientes fueron excluidos debido a la falta de datos clínicos.

Todos los pacientes analizados fueron menores de 36 semanas de gestación (rango de 24,7–35 ± 2,34) y con peso al nacimiento menor de 2.500 g (rango de 600–2.065 ± 326,7). En un solo paciente se aisló *C. albicans* del aspirado bronquial, y en ningún caso se evidenció infección por virus sincitial respiratorio. A 20 de los recién nacidos (45,5%) se les detectó ADN de *C. trachomatis* (PCR-positivos) en sus leucocitos de sangre periférica (**tabla 1**). La neumonía y la sepsis fueron los 2 padecimientos que se reportaron con mayor frecuencia al momento de la toma de las muestras; sin embargo, solo la neumonía se asoció significativamente con los pacientes que fueron PCR-positivo (RR = 2,28; IC 95%: 1,01-5,17; $p=0,035$). En cuanto a los pacientes que mostraron sepsis, 13/15 fueron PCR-positivo con neumonía (RR = 2,17; IC 95%: 0,73–6,46; $p=NS$, datos no mostrados) y solo 2 de estos tuvieron hemocultivo positivo, uno a *S. aureus* y otro a *Enterobacter cloacae* (datos no mostrados). El peso, la talla y la circunferencia cefálica se asociaron directamente con la edad gestacional (coeficiente de correlación Spearman ρ 0,44; 0,57; 0,50; $p=0,003$, respectivamente; datos no mostrados) y no con la detección del ADN de *C. trachomatis*.

Otro de los patógenos identificados en 10 muestras de ADN en sangre fue *Mycoplasma* spp. Ocho de estos se asociaron con la presencia de ADN de *C. trachomatis* (RR = 2,27; IC 95%: 1,31–3,93; $p=0,027$). En cuanto a los niveles de leucocitos totales y de eosinófilos, no estuvieron asociados con la PCR-positiva.

Otro aspecto estudiado fue la serología, mediante la cual se llevó a cabo la detección de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis*; los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 2**. En 23 pacientes se identificaron títulos mayores o iguales a 1:32; de ellos, 15 fueron PCR-positivo (RR = 2,74; IC 95%: 1,21–6,23; $p=0,008$). Al identificar la sensibilidad y la especificidad de la prueba serológica se encontró que estas eran del 88,89 y del 73,07%, respectivamente. El análisis de la curva ROC indica que la prueba es menos sensible para identificar a neonatos con infección por *C. trachomatis* (**fig. 1**). En cuanto al cultivo celular, se identificaron 7 muestras positivas, de las cuales solo 5 fueron PCR-positivo, mostrando una sensibilidad y una especificidad del 27,78 y del 92,31%, respectivamente (**tabla 3**).

Tabla 2

Distribución del título de anticuerpos IgM por microinmunofluorescencia (MIF) contra pacientes positivos o negativos a PCR para *Chlamydia trachomatis*

Título de MIF	No. PCR-positivos (n=20)	No. PCR-negativos (n=24)	Total
Negativos	1	2	3
1:8	1	6	7
1:16	3	8	11
1:32	12	8	20
1:64	3	0	3
Total	20	24	44

Tabla 3

Sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Prueba empleada	Sensibilidad	Especificidad
PCR en leucocitos ^a	94,44%	88,46%
Serología ^b	88,89%	73,07%
Cultivo celular ^c	27,78%	92,31%

La sensibilidad y la especificidad se calcularon en función a que 2 pruebas o más fueran positivas.

^a Producto de amplificación del gen *ompA* de 129 pb.

^b Detección de anticuerpos IgM por microinmunofluorescencia; se consideró positivo cuando mostró un título 1:32.

^c Detección de cuerpos elementales mediante anticuerpos monoclonales anti-proteína principal de membrana externa fluoresceinados.

Discusión

Las afecciones que se producen durante una infección por *C. trachomatis* en el recién nacido son la neumonía y la conjuntivitis, las cuales aparecen entre la cuarta y la undécima semana de vida²¹. El diagnóstico de infección por este patógeno es difícil; sin embargo, se realiza mediante el cultivo celular o por la detección de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis*.

El cultivo celular es considerado como el estándar de oro debido a que se pueden observar los cuerpos elementales y reticulares cuando se utiliza para la detección una técnica de inmunofluorescencia directa^{10,22}. Sin embargo, diversos estudios han informado que esta técnica tiene una sensibilidad del 50 al 85%^{22,23}. En este estudio solo 7 pacientes fueron positivos a la infección por este patógeno, y el análisis estadístico no mostró ninguna asociación

con los datos clínicos y microbiológicos que mostraron los pacientes. Solo por mencionar, 5 de estos pacientes mostraron neumonía y fueron PCR-positivos. Aunque la especificidad que mostró el cultivo celular en este estudio fue aceptable, la sensibilidad fue baja; posiblemente esto se debió a que la muestra fue mal tomada o por la presencia de sustancias que inhiben el crecimiento de la bacteria, o que dañen las células del cultivo celular.

Actualmente la detección de anticuerpos no es considerada como una prueba eficiente para identificar infecciones activas por *C. trachomatis* en pacientes adultos. Sin embargo, la identificación de anticuerpos IgM anti-*C. trachomatis* es apreciada como una prueba de diagnóstico en aquellos niños que muestran neumonía^{3,7}. La MIF, que fue desarrollada en los años setenta y consiste en la reacción de los anticuerpos del paciente con los cuerpos elementales de *Chlamydia*, es considerada como el mejor método para el diagnóstico de infección por *C. pneumoniae*, reportándose una sensibilidad hasta del 92%^{9,22,24}. En esta investigación se encontró que solamente el título de anticuerpos 1:32 se asoció significativamente con la detección de ADN de *C. trachomatis* obtenido de los leucocitos de estos pacientes y con una asociación negativa con aquellos que mostraron conjuntivitis (RR = -2,43; IC95%: 1,67-3,55; p = 0,019), es decir, que la infección en la conjuntiva posiblemente no induce la producción de anticuerpos. Además se demostró que esta prueba tiene una sensibilidad buena pero una especificidad baja, lo cual corrobora la reactividad cruzada observada entre *C. pneumoniae* y *C. psittaci*; esta reactividad probablemente está dirigida hacia el antígeno de género que es el lipopolisacárido²².

En cuanto a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, se reporta que tienen una sensibilidad del 90 al 95% y que en teoría pueden detectar hasta un cuerpo elemental^{22,23}. Además, la adición experimental de cuerpos elementales en muestras de esputo ha demostrado que estas técnicas son capaces de detectar hasta 5 cuerpos elementales²⁵. También se ha informado que la detección ADN de *C. pneumoniae* y *C. trachomatis* en sangre es posible^{15,25}. En este estudio se demostró que efectivamente se puede identificar el ADN de *C. trachomatis* en muestras de sangre, ya que se logró amplificar el gen *ompA* de este patógeno mediante 2 técnicas diferentes de PCR.

El análisis estadístico mostró que la técnica de PCR-positiva estuvo asociada significativamente con la presencia de neumonía, con la dilución del suero y con la presencia de ADN de *Mycoplasma*.

Se ha informado que *C. trachomatis* está involucrado en el desarrollo de parto pretérmino, rotura prematura de membranas, corioamnionitis y bajo peso al nacimiento². En esta investigación no se logró demostrar asociación con parto pretérmino, ya que todos los recién nacidos estudiados fueron menores de 35 semanas de gestación. En cuanto a la rotura prematura de membranas, estuvo presente en 12 pacientes; sin embargo, no hubo asociación con la PCR-positiva, la corioamnionitis solo estuvo presente en un paciente y el bajo peso estuvo más asociado a las semanas de gestación que a la PCR-positiva.

Otros hallazgos de laboratorio importantes que se han descrito en los recién nacidos infectados con *C. trachomatis* es la presencia de una eosinofilia. Numazaki et al.²¹ han reportado eosinofilia de 400 células/mm³ o más. Sin embargo, en este estudio 11/20 PCR-positivo mostraron eosinofilia menor a este valor. Otros microorganismos que pueden desarrollar signos clínicos de neumonía semejantes a los de *C. trachomatis* son las infecciones por virus sincitial respiratorio, citomegalovirus y *Ureaplasma urealyticum*^{13,21,26}. En este estudio se observó que en ningún paciente hubo infección por virus sincitial respiratorio. Para citomegalovirus no se realizó el cultivo celular; no obstante, sus anticuerpos IgM anti-citomegalovirus fueron negativos. A pesar de lo anterior, una de las limitaciones del estudio es que no se identificaron otros virus, tales como virus de la parainfluenza, coronavirus

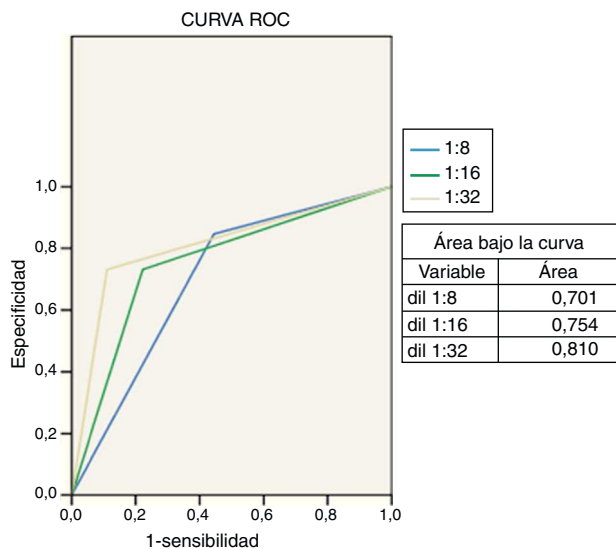


Figura 1. Sensibilidad y especificidad de los anticuerpos IgM anti-*Chlamydia trachomatis* en sueros de recién nacidos pretérmino. El método empleado fue microinmunofluorescencia.

y rinovirus²⁷. Aunque cabe señalar que el virus más frecuente en niños menores de 2 meses de edad es el virus sincitial respiratorio, siendo hasta del 3% en recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación²⁸. Otra limitante del estudio es que no se evaluó mediante PCR la presencia de *C. trachomatis* en las muestras de lavados nasofaríngeos. Actualmente existen pocos estudios que indican que hay buena significación estadística al emplear estas muestras²⁹; sin embargo, no existe una evaluación sobre la sensibilidad y la especificidad con respecto a otras técnicas que se utilizan para el diagnóstico de infección por esta bacteria, además de que hasta el 13% de las muestras respiratorias pueden contener sustancias que inhiben la PCR, como la sangre o el moco^{30,31}. Debido a lo anterior se decidió utilizar la serología como la prueba de diagnóstico estándar de infección por *C. trachomatis* en los recién nacidos y compararla con la detección del ADN de *C. trachomatis* de los leucocitos de los recién nacidos por la técnica de PCR.

Por otro lado, la identificación del ADN de *Mycoplasma* en muestras PCR-positivas a *C. trachomatis* sugiere una co-infección con ambas bacterias. Cabe señalar que *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son consideradas como parte de la flora normal de las mujeres con vida sexual activa, y en la actualidad existen evidencias clínicas y experimentales de que estos organismos contribuyen al desarrollo de corioamnionitis, de una respuesta inflamatoria fetal, de nacimientos pretérmino, de displasia broncopulmonar, de hemorragias intraventriculares y de enterocolitis necrosante³².

Además, la co-infección entre *C. trachomatis* y especies de *Mycoplasma* o *Ureaplasma* ha sido reportada en pacientes con VIH³³ y en mujeres de 15 a 64 años de edad, que muestran infecciones genitales hasta en el 9% de los casos³⁴. De manera similar, se ha reportado la co-infección entre *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* en infecciones de vías respiratorias en niños menores de 15 años³⁵. Debido a lo anterior, no es extraño que ambos patógenos hayan sido detectados en estas muestras y la presencia de ambos pudiese haber exacerbado la enfermedad respiratoria en estos pacientes. Sin embargo, estos pacientes no mostraron datos clínicos y de laboratorio diferentes a los infectados solamente con *C. trachomatis*.

Las infecciones respiratorias pueden ser producidas por otras bacterias o levaduras diferentes a *Chlamydia* o *Mycoplasma*; en esta investigación todos los cultivos microbiológicos de los aspirados bronquiales fueron negativos, excepto en un paciente, que mostró *Candida albicans*; esta levadura pudo haberse adquirido de manera congénita, aunque este neonato no presentó manifestaciones clínicas en la piel, por lo que esta infección se consideró de adquisición nosocomial^{36,37}.

Finalmente, se concluye que el uso de PCR de punto final en leucocitos de sangre periférica es útil para la detección de ADN de *C. trachomatis* y muestra mayor sensibilidad para la detección de recién nacidos que han sido infectados por este patógeno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: Impact on human reproduction. Hum Reprod Update. 1999;5:433–47.
- Silva MJ, Florêncio GL, Gabiatti JR, Amaral RL, Eleutério Júnior J, Gonçalves AK. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: A meta-analysis study. Braz J Infect Dis. 2011;15:533–9.
- Numazaki K, Asanuma H, Niida Y. Chlamydia trachomatis infection in early neonatal period. BMC Infect Dis. 2003;3:3–5.
- Mårdh PA, Johansson PJ, Svenningsen N. Intrauterine lung infection with Chlamydia trachomatis in a premature infant. Acta Paediatr Scand. 1984;73:569–72.
- Numazaki K. Current problems of perinatal Chlamydia trachomatis infections. J Immune Based Ther Vaccines. 2004;2:1–7.
- Yescas-Buendía G, Udaeta-Mora E, Arredondo-García JL, Guerra F, Chávez-González C, Joachim-Roy H. Neonatal conjunctivitis caused by Chlamydia trachomatis. Bol Med Hosp Infant Mex. 1993;50:570–6.
- Souza EL, Girão RS, Simões JM, Reis CF, Galvão NA, Andrade SC, et al. Chlamydia trachomatis: a major agent of respiratory infections in infants from low-income families. J Pediatr (Rio J). 2012;88:423–9.
- Numazaki K, Chiba S, Kogawa K, Umetsu M, Motoya H, Nakao T. Chronic respiratory disease in premature infants caused by Chlamydia trachomatis. J Clin Pathol. 1986;39:84–9.
- Wang Sp. The microimmunofluorescence test for Chlamydia pneumoniae infection: Technique and interpretation. J Infect Dis. 2000;181 Suppl 3: S421–5.
- López-Hurtado M, Zamora-Ruiz A, Flores-Medina S, Guerra-Infante FM. Prevalence of Chlamydia trachomatis in newborn infants with respiratory problems. Rev Latinoam Microbiol. 1999;41:267–72.
- Rafiei Tabatabaei S, Afjeiee SA, Fallah F, Tahami Zanjani N, Shiva F, Tavakkoly Fard A, et al. The use of polymerase chain reaction assay versus cell culture in detecting neonatal chlamydial conjunctivitis. Arch Iran Med. 2012;15: 171–5.
- Hernández-Trejo M, López-Hurtado M, Flores-Medina S, de Haro-Cruz Mde J, Guerra-Infante FM. Uncommon cause of late neonatal death with refractory respiratory distress syndrome. Acta Paediatr. 2007;96:139–40.
- Hernández-Trejo M, Herrera-González NE, Escobedo-Guerra MR, de Haro-Cruz MJ, Moreno-Verduzco ER, Lopez-Hurtado M, et al. Reporting detection of Chlamydia trachomatis DNA in tissues of neonatal death cases. J Pediatr (Rio J). 2014;90:182–9.
- Guerra-Infante F, García-Zaragoza FJ, Arredondo-García JL. Sensitivity and specificity of mouse peritoneal macrophages in the diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Rev Latinoam Microbiol. 1992;34:7–10.
- Cirino F, Webley WC, West C, Croteau NL, Andrzejewski C Jr, Stuart ES. Detection of Chlamydia in the peripheral blood cells of normal donors using in vitro culture, immunofluorescence microscopy and flow cytometry techniques. BMC Infect Dis. 2006;6:23.
- Webley WC, Salva PS, Andrzejewski C, Cirino F, West CA, Tilahun Y, et al. The bronchial lavage of pediatric patients with asthma contains infectious Chlamydia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1083–8.
- Dutilh B, Bébéar C, Rodriguez P, Vekris A, Bonnet J, Garret M. Specific amplification of a DNA sequence common to all Chlamydia trachomatis serovars using the polymerase chain reaction. Res Microbiol. 1989;140:7–16.
- Yang CL, Maclean I, Brunham RC. DNA sequence polymorphism of the Chlamydia trachomatis omp1 gene. J Infect Dis. 1993;168:1225–30.
- Van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol. 1992;58:2606–15.
- Guerra Infante FM, Flores Medina S, López Hurtado M, Sosa Gonzalez IE, Arredondo Garcia JL. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de Chlamydia trachomatis. Ginecol Obstet Mex. 1994;62:368–73.
- Numazaki K, Wainberg MA, McDonald J. Chlamydia trachomatis infections in infants. CMAJ. 1989;140:615–22.
- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Rev. 1997;10:160–84.
- Land JA, van Bergen JE, Morrè SA, Postma MJ. Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. Hum Reprod Update. 2010;16:189–204.
- Phoon MC, Yee GW, Koh WP, Chow VT. Comparative seroepidemiologic analysis of Chlamydia pneumoniae infection using microimmunofluorescence, enzyme immunoassay and neutralization test: Implications for serodiagnosis. Indian J Microbiol. 2011;51:223–9.
- Apfalter P, Boman J, Nehr M, Hienerth H, Makristathis A, Pauer J, et al. Application of blood-based polymerase chain reaction for detection of Chlamydia pneumoniae in acute respiratory tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20:584–6.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18:757–89.
- Huang G, Yu D, Mao N, Zhu Z, Zhang H, Jiang Z, et al. Viral etiology of acute respiratory infection in Gansu Province, China, 2011. PLoS One. 2013;8: e64254.
- Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Schultz AF, et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. Pediatrics. 2013;132:e341–8.
- Malathi J, Madhavan HN, Therese KL, Shyamala G. Polymerase chain reaction to detect Chlamydia trachomatis and adenovirus in the nasopharyngeal aspirates from paediatric patients with lower respiratory infections. Indian J Pathol Microbiol. 2004;47:302–5.
- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci. 1994;2:362–72.
- Forbes BA, Hicks KE. Substances interfering with direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by PCR: Effects of bovine serum albumin. J Clin Microbiol. 1996;34:2125–8.
- Viscardi RM. Perinatal inflammation and lung injury. Semin Fetal Neonatal Med. 2012;17:30–5.

33. Ghosh A, Rawre J, Khanna N, Dhawan B. Co-infections with *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* in a human immunodeficiency virus positive woman with vaginal discharge. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31:190–2.
34. Svenstrup HF, Dave SS, Carder C, Grant P, Morris-Jones S, Kidd M, et al. A cross-sectional study of *Mycoplasma genitalium* infection and correlates in women undergoing population-based screening or clinic-based testing for *Chlamydia* infection in London. *BMJ Open.* 2014;4:e003947.
35. Megías Montijano A, Gómez Campderá JA, Navarro Gómez ML, Urán Moreno M, González Sánchez MI, Rodríguez Fernández R. Coinfection with *Chlamydia* and *Mycoplasma*. Incidence in our environment. *An Esp Pediatr.* 2002;57:110–5.
36. Wang SM, Hsu CH, Chang JH. Congenital candidiasis. *Pediatr Neonatol.* 2008;49:94–6.
37. Badr MA, Ali YF, Albanna EA, Beshir MR, Amr GE. Ventilator associated pneumonia in critically-ill neonates admitted to neonatal intensive care unit, Zagazig University hospitals. *Iran J Pediatr.* 2011;21:418–24.