

## ARTÍCULOS ORIGINALES

# Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y su asociación con el virus del papiloma humano: un estudio de seguimiento

Mónica Molano (1,2), Chris Meijer (2), Héctor Posso (1), Annie Arslan (3), Nubia Muñoz (3)

- 1 Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia. Grupo de Investigación en la Biología del Cáncer.
- 2 Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam. The Netherlands Department of Pathology.
- 3 International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia. Unit of Field and Intervention Studies.

### Resumen

**Objetivo:** estudiar el curso natural de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) y su asociación con el virus del papiloma humano (VPH) en mujeres bogotanas con citología normal, durante un periodo de cinco años.

**Metodología:** se analizaron 82 mujeres positivas para *C. trachomatis* a intervalos de seis meses. En cada visita se realizó un cepillado cervical para hacer la detección del plásmido endógeno de *C. trachomatis* con el uso de los iniciadores específicos Bio PL6.1/PL6.2 y, para la detección de VPH, con los iniciadores Bio GP5+/GP6+, mediante el desarrollo de un PCR-EIA. De estas mujeres, 18 (21,9%) fueron positivas para VPH genérico, 13 (15,8%) de las cuales tuvieron VPH de alto riesgo y 5 (6,1%) VPH de bajo riesgo.

**Resultados:** durante el seguimiento, el VPH genérico no se asoció con la eliminación o persistencia de la infección por *C. trachomatis* (RR 0,96 IC 0,6-1,4). Así mismo, los tipos virales de VPH de alto riesgo (RR 0,92 IC 0,5-1,5) y de bajo riesgo (RR 0,95 IC 0,5-1,7) tampoco se asociaron con la eliminación de la infección por *C. trachomatis*. Después de cuatro años de seguimiento, 6% de las mujeres infectadas por *C. trachomatis* aún no habían superado la infección.

**Conclusión:** en este estudio se observó un bajo porcentaje de infecciones persistentes por *C. trachomatis* después de cuatro años de seguimiento, y el VPH no fue un factor de riesgo para la persistencia o eliminación de las infecciones por este germen.

**Palabras clave:** *C. trachomatis*, VPH, Colombia, estudios de seguimiento.

---

#### Correspondencia:

Mónica Molano, Grupo de Investigación en la Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E.,  
Av. 1ª No. 9-85, Bogotá, D.C., Colombia  
Tel: 3340959; Fax: 3341360  
mmolano@incancerologia.gov.co

Recibido: 29/04/04; aceptado: 09/11/04

## ***Chlamydia trachomatis* infections and their association with the human papilloma virus (HPV) in a cohort study**

### **Abstract**

**Objective:** To study the natural course of *C. trachomatis* infections and their association with the human papilloma virus (HPV) in women with normal cytology, from Bogotá, during a 5-year period.

**Methodology:** Eighty-two women who were positive for *C. trachomatis* at the start of the study were studied at 6-month intervals. At each visit, a cervical scrape was collected for *C. trachomatis* endogenous plasmid and HPV detection by PCR-EIA by using the specific primers Bio PL6.1/ PL6.2 y Bio GP5+/ GP6+, respectively.

**Results:** Among 82 positive women for *C. trachomatis*, 18 (21.9%) were positive for generic HPV, 13 (15.8%) of them infected with high-risk types, and 5 (6.1%) with low-risk types. The infection with generic HPV was not associated with an increased rate of *C. trachomatis* clearance (RR 0.96 CI 0.6-1.4). Likewise, high-risk (RR 0.92 CI 0.5-1.5) and low-risk types (RR 0.95 CI 0.5-1.7) were not associated with *C. trachomatis* clearance. After 4 years of follow-up, 6% of the women had not cleared the *C. trachomatis* infection.

**Conclusions:** In this follow-up study, a low percent of *C. trachomatis* infections persists after 4 years of follow-up, and a clear association between HPV infections and *C. trachomatis* clearance was not observed.

**Key words:** HPV, *C. trachomatis*, cohort studies, Colombia.

### **Introducción**

La *Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada, no móvil y patógena, que se caracteriza por ser uno de los agentes más comunes de transmisión sexual en el mundo (1,2).

Cerca del 70% de las infecciones por *C. trachomatis* son asintomáticas y pueden causar complicaciones severas, como enfermedad inflamatoria pélvica (10%-16%), infertilidad (6%-21%), dolor pélvico (18%-24%) y embarazo ectópico (7%-9%) (1,2). Se sugiere que *C. trachomatis* podría ser un cofactor del desarrollo de cáncer de cuello uterino, y algunos estudios muestran una asociación epidemiológica entre la presencia de anticuerpos contra *C. trachomatis* y las lesiones cervicales (3-6); sin embargo, su papel en el desarrollo de este tipo de lesiones aún no es claro.

El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo asociado con el desarrollo de lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cuello uterino, y algunos estudios de corte transversal muestran una débil asociación entre *C. trachomatis* y VPH (7-8). En la

actualidad hay pocos estudios de seguimiento sobre el curso natural de las infecciones por *C. trachomatis* (9-12) y no hay reportes de seguimiento en los cuales se analice su asociación con el VPH, razón por la cual se necesita realizar un mayor número de investigaciones para avanzar en el conocimiento de las infecciones por *C. trachomatis* en términos de transmisión, eliminación, complicaciones y factores de riesgo asociados (6).

La infección por *C. trachomatis* es uno de los factores de riesgo que estamos revisando en un estudio de cohorte realizado en mujeres de bajos recursos económicos, en el cual se estudia la historia natural de la infección por VPH y el papel de otros factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Los resultados sobre la infección por *C. trachomatis* en la línea de base del estudio mostraron una prevalencia del 5,3%, y los principales factores de riesgo asociados con la infección fueron el número de compañeros sexuales y la infección por múltiples tipos de VPH (13).

En este reporte se presentan los resultados de mujeres positivas para *C. trachomatis* en la línea de base del estudio a quienes se les hizo un seguimiento por un periodo de cinco años y se analiza el papel del VPH como factor de riesgo para la persistencia o eliminación de las infecciones por *C. trachomatis*.

## Materiales y métodos

### Pacientes y diseño del estudio

El diseño del estudio fue descrito en más detalle por Molano et al. en el año 2000 (14). Entre noviembre de 1993 y noviembre de 1995, el Instituto Nacional de Cancerología realizó un censo en cuatro diferentes centros de salud de Bogotá (Colombia). Dos mil mujeres en edades entre 18 y 85 años fueron identificadas al azar e invitadas a participar. Además, 200 mujeres en edades entre los 13 y 17 años que asistían a Profamilia para recibir orientación sexual fueron incluidas en el estudio. Al comienzo del estudio, todas las mujeres respondieron un cuestionario detallado y asistieron a una consulta ginecológica en la cual se les realizó un cepillado cervical para hacer un análisis citológico y para detectar la infección por VPH y *C. trachomatis*.

Se obtuvo consentimiento escrito de todas las participantes; los comités ético y de investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología y la International Agency for Research on Cancer (IARC) aprobaron el protocolo del estudio. Un total de 1.995 (90,7%) mujeres se incluyeron finalmente en el estudio. El seguimiento consistió de una visita cada 6-9 meses, hasta diciembre de 2000; en cada visita se realizó un cuestionario corto y se obtuvieron muestras clínicas de manera similar a la forma como se había hecho en la primera visita. Los resultados sobre *C. trachomatis* y VPH no se conocieron durante el seguimiento y no influyeron en el manejo clínico.

El análisis descrito aquí es un estudio anidado de la cohorte inicial, en el que se seleccionaron 82 mujeres con citología normal mediante un muestreo no probabilístico, quienes fueron positivas para *C. trachomatis* en la línea de base, y tuvieron al menos una visita de seguimiento, y a quienes se les hizo un seguimiento por un periodo de cinco años con el fin de analizar el curso natural de la infección por *C. trachomatis*. Así mismo, para realizar el análisis de la infección por VPH como un factor de riesgo involucrado en la persistencia o eliminación de la infección por *C. trachomatis*, se tomaron las

mujeres que en la línea de base fueron positivas para la infección por VPH que también fueron positivas para *C. trachomatis* y se siguieron durante el mismo periodo.

Se excluyeron mujeres del análisis cuando usaron antibióticos a los cuales *C. trachomatis* es sensible o cuando se les realizó un diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical.

### Recolección de las muestras y procesamiento

Las muestras se procesaron según el método descrito por Jacobs y cols. (15). Se realizó un cepillado cervical que se colocó en un tubo que contenía 5 ml de solución salina fosfato (PBS 1x) + 0,05% tiomerosal. Las células fueron desprendidas mediante vórtex y centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 1 ml de tampón 10 mM Tris-HCl pH 8,3 y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Para el análisis se usó una alícuota de 100 µl, la cual se hirvió durante 10 minutos a 100 °C, se colocó en hielo por 2 minutos y se centrifugó por 1 minuto a 3000 g. Se tomaron 10 µl de esta alícuota para efectuar análisis por PCR (16).

### Detección del plásmido endógeno de *C. trachomatis* por PCR

La detección de *C. trachomatis* se realizó como se describió previamente (17). Para la amplificación por PCR se usaron los iniciadores específicos Bio PL6.1 y PL6.2, dirigidos hacia un plásmido endógeno de *C. trachomatis*. La PCR consistió en un paso de desnaturalización del ADN a 95 °C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación usando un termociclador PE 9600 (Perkin-Elmer, EU).

Los productos de PCR biotinilados se detectaron mediante el uso de un enzimo-inmunoensayo (EIA) (18,19). Para definir el punto de corte, en este ensayo se usó tres veces la media de la densidad óptica (DO) de los controles negativos. Como controles positivos se usaron diluciones de *C. trachomatis* L2 ADN (20), con un nivel de sensibilidad de 0,01-0,1 unidades formadoras de inclusiones (IFU).

### Detección de VPH por PCR

La detección del VPH se realizó mediante el uso de los iniciadores GP5+/GP6+, que amplifican para un fragmento de 140 pb, y por medio del EIA para la tipificación de 37 diferentes tipos de VPH (16,18). A las muestras positivas para VPH genérico se les realizó un

análisis específico de grupo usando una mezcla de sondas para VPH de alto y bajo riesgo. La mezcla de sondas de alto riesgo consistió en oligosondas específicas para VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. La mezcla de sondas de bajo riesgo se realizó con oligosondas específicas para VPH6, 11, 40, 42, 43, 44, VPH82 (MM4), VPH83 (MM7), VPH84 (MM8), ISO39, VPH71 (CP8061), CP6108, VPH81 (CP8304), Y VPH26, 34, 53, 54, 55, 57, 61, 70, 72 y 73. Las muestras positivas para estos grupos se analizaron en otro EIA usando oligosondas específicas para cada uno de los 37 tipos de VPH (15).

### Métodos estadísticos

La fecha de eliminación de la infección se definió como la duración media del intervalo entre un examen positivo para *C. trachomatis* y uno negativo. La función de supervivencia, que describe la probabilidad de que una infección por *C. trachomatis* se haya eliminado en función del tiempo, se estimó mediante el método de análisis de Kaplan-Meier. El VPH se analizó como un factor potencial asociado con la persistencia o la eliminación de la infección por *C. trachomatis*. Además se realizó un análisis de regresión de Cox para estimar los riesgos relativos (RR) ajustados por edad y los intervalos de confianza del 95% en la eliminación de la infección por *C. trachomatis* de acuerdo con la infección por VPH. Se utilizó el paquete STATA para llevar a cabo los análisis estadísticos.

## Resultados

### Características de la cohorte

En el análisis se incluyeron 82 mujeres con citología normal y con una o más visitas de seguimiento. El tiempo medio del seguimiento fue de 5,7 años y el intervalo medio entre visitas fue de 8 meses. En total se analizaron 544 muestras durante todo el seguimiento.

La tabla 1 muestra algunas de las características de la población del estudio. El 57,3% de las mujeres tenían más de 30 años de edad al inicio del estudio, 39% tenían un nivel de educación intermedio, 82,9% reportaron haber tenido un compañero sexual durante toda su vida y 47,6% reportaron haber usado alguna vez anticonceptivos orales. De las 82 mujeres positivas para *C. trachomatis* al inicio del estudio, 21,9% lo fueron para VPH genérico, de las cuales 15,8% fueron infec-

tadas con VPH de alto riesgo y 6,1% con VPH de bajo riesgo (tabla 1).

**Tabla 1. Características principales de la población del estudio.**

Variables	N	%
<i>Edad</i>		
< 30 años	35	42,7
> 30 años	47	57,3
<i>Educación</i>		
Baja	27	32,9
Media	32	39,0
Alta	23	28,1
<i>Número de compañeros sexuales estables</i>		
1	63	82,9
2	13	17,1
<i>Uso de anticonceptivos orales</i>		
Alguna vez	39	47,6
Nunca	43	52,4
<i>VPH genérico*</i>		
Neg.	64	78,1
Pos.	18	21,9
<i>vph</i>		
Neg.	64	78,1
Bajo riesgo	5	6,1
Alto riesgo	13	15,8

\* VPH genérico: 37 diferentes tipos de VPH.

### Análisis de seguimiento de las mujeres infectadas por *C. trachomatis*

El 46,2% de las infecciones fueron persistentes a un año de seguimiento y un 6% lo fueron a 4 años (gráfico 1). Aunque el tiempo medio de seguimiento fue mayor a 5 años, el número de mujeres en riesgo de resolver la infección por *C. trachomatis* no permitió estimar con precisión la probabilidad de persistencia después de 4 años.

El análisis de VPH como un factor de riesgo para la eliminación de *C. trachomatis* no mostró asociaciones significativas: no se observaron diferencias en la eliminación de la infección por *C. trachomatis* entre mujeres positivas para VPH genérico y mujeres negativas para el virus (gráfico 2). Así mismo, cuando se realizó el análisis de acuerdo con los tipos virales de alto y

bajo riesgo, tampoco se observaron diferencias significativas (gráfico 3). Finalmente, al comparar a las mujeres que tenían infecciones múltiples por VPH con las que tenían infecciones simples, tampoco se encontraron diferencias significativas en la eliminación de la infección por *C. trachomatis*.

La tabla 2 muestra los riesgos relativos ajustados por edad y el intervalo de confianza de 95% en la eliminación de *C. trachomatis* de acuerdo con la infección genérica por VPH y de acuerdo con los tipos virales. Ninguno de estos factores fue asociado en forma significativa con la probabilidad de eliminar la infección por *C. trachomatis*.

Gráfico 1. Infecciones persistentes por *C. trachomatis* durante el estudio de seguimiento. La línea media muestra la persistencia general de *C. trachomatis* a lo largo del seguimiento.

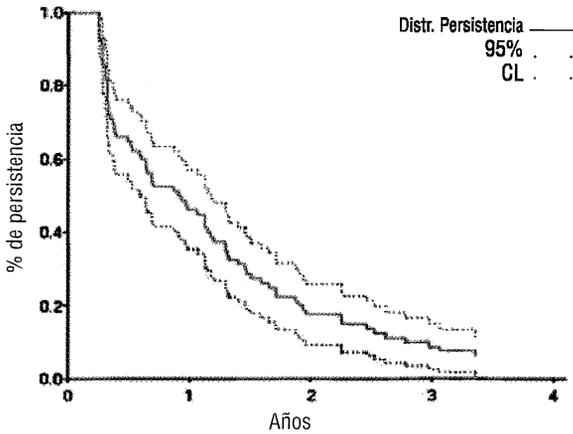


Gráfico 2. Persistencia de *C. trachomatis* según infección genérica por VPH. Log-rank:  $p = 0,8559$

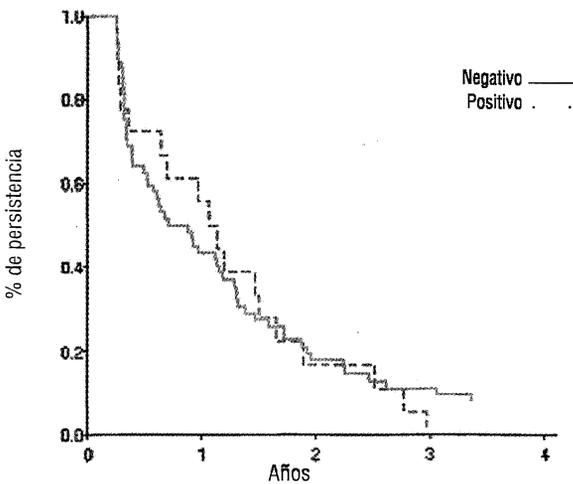


Gráfico 3. Persistencia de *C. trachomatis* según tipos virales de VPH de alto y bajo riesgo. Log-rank:  $p = 0,9782$

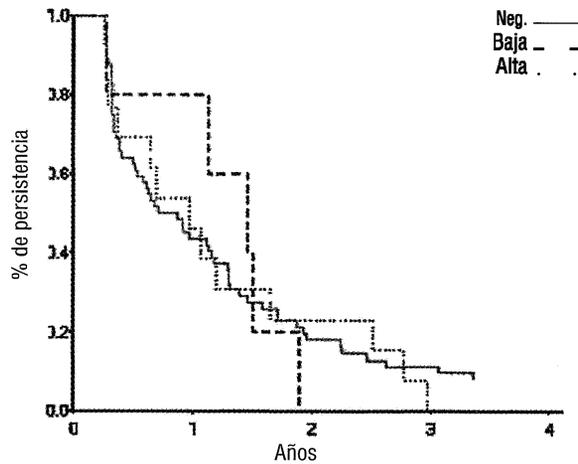


Tabla 2. Riesgos relativos e intervalos de confianza del 95% en la eliminación de infecciones por *C. trachomatis* en mujeres con citología normal, de acuerdo con la infección por VPH.

Detección de VPH	RR ajustado por edad	
	RR	95% IC
VPH genérico*		
Neg.	1	
Pos.	0,93	0,6-1,4
VPH		
Neg.	1	
Bajo riesgo	0,95	0,5-1,7
Alto riesgo	0,92	0,5-1,5

RR: riesgo relativo

IC: intervalo de confianza

\*VPH genérico: 37 diferentes tipos de VPH.

## Discusión

Este estudio mostró que el 94% de las mujeres con citología normal habían eliminado la infección por *C. trachomatis* después de 4 años de seguimiento.

Hay algunos estudios en humanos, modelos animales y sistemas *in vitro* en los que se observa persistencia de las infecciones por *C. trachomatis* (11,19,21-25). Sin embargo, el mecanismo usado por *C. trachomatis* para persistir aún es desconocido.

En este estudio, el 53,8% de las infecciones por *C. trachomatis* se habían eliminado a un año de seguimiento; estos resultados están de acuerdo con otros reportes en los que se han mostrado porcentajes similares de eliminación de *C. trachomatis* después de un año de seguimiento (9,12,19,25). Sin embargo, en nuestro estudio se observa que aún después de 4 años de seguimiento hay un porcentaje de mujeres con infección persistente por *C. trachomatis*, información que no se había reportado antes debido a que los estudios realizados hasta el momento tenían periodos de seguimiento menores de 2 años (9,12,19,25). Estas mujeres podrían tener un mayor riesgo de sufrir complicaciones severas debido al largo tiempo de infección. Hillis y cols., en un estudio retrospectivo realizado en 1997, mostraron que mujeres con infecciones recurrentes por *C. trachomatis* presentaban un mayor riesgo de tener un embarazo ectópico, infertilidad o enfermedad inflamatoria pélvica, cuando se compararon con mujeres que tuvieron un corto episodio de infección (10). Es importante anotar que los compañeros sexuales pudieron ser un factor importante para la persistencia o reinfección por *C. trachomatis*; infortunadamente, de ellos no se tiene ningún tipo de información.

*C. trachomatis* es sensible a tratamientos con tetraciclina, macrólidos y fluoroquinolonas, los cuales pueden contribuir a su eliminación. En este estudio, 9 mujeres usaron antibióticos durante el seguimiento, aunque todas los emplearon cuando la infección por *C. trachomatis* ya había sido eliminada. Los resultados fueron similares cuando se excluyeron estas 9 mujeres del estudio.

En un estudio de prevalencia de *C. trachomatis* en la línea de base de esta población se había observado una asociación entre *C. trachomatis* y VPH en mujeres que tenían infecciones múltiples por este último (13). Sin embargo, en este estudio de seguimiento el VPH no parece ser un factor de riesgo involucrado en la persistencia o la eliminación de la infección por *C. trachomatis*, lo que podría indicar que la asociación observada al inicio del estudio se debe, más que a otros factores, a la presencia de estos agentes como marcadores de actividad sexual. No obstante, es necesario aclarar que el número de mujeres seguidas y que tuvieron infecciones múltiples por VPH fue bajo, lo que impide sacar conclusiones definitivas. Además, es importante tener en cuenta que en el presente estudio no se incluyeron las infecciones incidentes por *C. trachomatis* o por VPH que pudieron presentarse durante el seguimiento, datos que podrían ser interesantes para la interpretación de la asociación entre estos agentes.

En conclusión, en este estudio de seguimiento se muestra que hay un porcentaje bajo de infecciones por *C. trachomatis* que persisten por un largo periodo, sin observarse una asociación clara entre la infección por VPH y la eliminación de las infecciones por *C. trachomatis*.

## Agradecimientos

Se agradece a todas las mujeres que participaron en el estudio y a los ginecólogos, enfermeras y trabajadores sociales que realizaron el trabajo de campo (Grupo VPH\*). A S. Morré por colaborar en las discusiones, a Martyn Plummer por sus comentarios al manuscrito, a M. Lettink por el apoyo técnico y al Dr. Álvaro Quintero por la corrección del texto.

## REFERENCIAS

1. Westrom L, Joessoff R, Reynolds G. Pelvic inflammatory disease and fertility: A cohort study of 1844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sex Transm Dis* 1992;19:185-191.
2. Lan J, Van den Brule AJC, Hemrika DJ, Risse EK, Walboomers JM, Schipper ME, Meijer CJ. *Chlamydia trachomatis* and ectopic pregnancy: Retrospective analysis of salpingectomy specimens, endometrial biopsies and cervical smears. *J Clin Pathol* 1995;48:815-819.

\* Grupo VPH: Mauricio González, Joaquín Luna, Gilberto Martínez, Edmundo Mora, Gonzalo Pérez, José María Fuentes, Constanza Gómez, Eva Klaus, Constanza Camargo, Cecilia Tobón, Teodolinda Palacio, Carolina Suárez, Claudia Molina y Alexander Torres.

3. Dillner J, Lehtinen M, Bjorge T. Prospective seroepidemiologic study of human papilloma virus infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1293-1299.
4. Koskele P, Anttila T, Bjorge T. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000;85(1):35-39.
5. Smith JS, Muñoz N, Franceschi S, Eluf-Neto J, Herrero R, Peeling RW. Chlamydia trachomatis and cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001;285(13):1704.
6. Anttila T, Saikku P, Koskela P. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001;285:47-51.
7. Lehmann M, Groh A, Rodel J, Nindl I, Straube E. Detection of Chlamydia trachomatis DNA in cervical samples with regard to infection by human papilloma virus. *J Infect* 1999;38:12-17.
8. Kjaer SK, Van den Brule AJC, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME et al. Determinants for genital human papilloma virus (HPV) infection in 1.000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: Are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:799-805.
9. Mc Cormack, Alpert S, McComb DE, Nichols RL, Semine DZ, Zinner SH. Fifteen-month follow-up study of women infected with Chlamydia trachomatis. *New Engl J Med* 1979;300:123-125.
10. Hillis SD, Owens LM, Marchbanks PA, Amsterdam LE, Mac Kenzie WR. Recurrent chlamydial infections increase the risk of hospitalization for ectopic pregnancy and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol* 1997;1:103-106.
11. Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence of long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping. *J Infect Dis* 2000; 182:909-916.
12. Morré SA, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, De Blok S, Meijer CJLM. The natural course of asymptomatic Chlamydia trachomatis infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-year follow-up. *Int J Std Aids* 2002;13(12)Suppl 2:12-18.
13. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morre S, Ronderos M, Franceschi S, Arslan A, Meijer CJ, Munoz N, Van den Brule AJC (HPV Study Group). Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogotá, Colombia. *Sex Transm Infect* 2003;79(6):474-478.
14. Molano M, Posso H, Weiderpass E. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002; 87(3):324-333.
15. Jacobs MV, Walboomers JMM, Snijders PJF, Voorhorst FJ, Daalmeijer NF, Meijer CJLM. Age-related distribution patterns of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: Decreased high-risk/low-risk ratio at older age. *Int J Cancer* 2000;87(2):221-227.
16. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van den Brule AJC, Meijer CJ, Snijders PJ. The use general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papilloma virus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-1062.
17. Morré SA, Sillekens PT, Jacobs MV. Monitoring of Chlamydia trachomatis infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence based amplification. *Mol Pathol* 1998; 51(3):149-154.
18. Jacobs MV, Snijders PJ, Van den Brule AJC, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/6+-mediated PCR enzyme-immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papilloma virus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997;35:791-795.
19. Munk C, Morré SA, Kjaer S, Poll PA, Bock JE, Meijer CJ, Van den Brule AJC. PCR-detected Chlamydia trachomatis infections from the uterine cervix of young women from the general population. *Sex Transm Dis* 1999;26:352-358.
20. Morré SA, Sillekens P, Jacobs MV. RNA amplification by nucleic acid sequence-based amplification with internal standard enables reliable detection of Chlamydia trachomatis in cervical scrapings and urine samples. *J Clin Microbiol* 1996;34:3108-3114.

21. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent Chlamydiae: From cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microb Rev* 1994;58:686-699.
22. Koehler L, Nettelbreker E, Hudson AP. Ultrastructural and molecular analysis of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathogen* 1997;22:133-142.
23. Patton DL, Sweeney YC, Bohannon NJ et al. Effects of doxycycline and anti-inflammatory agents on experimentally induced chlamydial upper genital tract infection in female macaques. *J Infect Dis* 1997;175:648-654.
24. Phillips DM, Burillo CA. Ultrastructure of the murine cervix following infection with *Chlamydia trachomatis*. *Tissue Cell* 1998;30:446-452.
25. Joyner JL, Douglas JM, Foster M, Judson FN. Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis* 2002;29(4):196-200.