

ARTÍCULO ORIGINAL

Utilidad del Cobas® Taqman® Ct Test, v2.0 para la detección de cepas de *Chlamydia Trachomatis* circulantes en México**Utility of the Cobas® Taqman® Ct Test, v2.0 for the detection of circulating strains of *Chlamydia Trachomatis* in Mexico****Marcela López-Hurtado¹, Verónica R. Flores-Salazar¹, Rodrigo Gutiérrez-Trujillo¹, Marcos R. Escobedo-Guerra¹, Fernando M. Guerra-Infante^{1,2}**¹Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Ciudad de México, México.²Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Col. Casco de Santo Tomás, Ciudad de México, México.**Resumen**

Objetivo: Evaluar la utilidad de la prueba de qPCR de COBAS® TaqMan® *Chlamydia trachomatis* (CT) para la detección de cepas circulantes en México. **Materiales y Métodos:** Estudio descriptivo y transversal. Se analizaron 413 muestras endocervicales por el sistema COBAS® de pacientes con infertilidad, con el diagnóstico de *C. trachomatis*. que acudieron a la Clínica ETS del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en la Ciudad de México. Las muestras positivas también analizaron por el sistema Abbot Real-time CT / NG, y por PCR de punto final para la detección de plásmido. Las variables de estudio fueron: Infertilidad, diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, infección por *Chlamydia* y otras variables. Para determinar la asociación entre la infección por CT y los datos clínicos se utilizó la prueba no paramétrica exacta de Fisher. Un valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo. **Resultados:** De las 413 muestras, 276 pacientes femeninas con infertilidad primaria y 137 de infertilidad secundaria, con edades de 20 a 42 años. La principal causa de infertilidad primaria fue factor endocrino-ovárico y de infertilidad secundaria fue el factor tuboperitoneal. De 22 muestras fueron positivas, una asociación significativa entre la infertilidad por factor tubárico y la infección por *C. trachomatis* (RR = 2,47 IC95% 1,1-5,5, $p < 0,05$) fue demostrada por la prueba COBAS® TaqMan® CT. De éstas solo 5 fueron identificadas por el sistema Abbott ($p < 0.011$). **Conclusión:** El sistema de COBAS® TaqMan® CT de Roche Molecular Diagnostic mostró mayor utilidad para identificar las cepas de CT que están circulando en México.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*; variantes génicas de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia* sin plásmido, infertilidad por factor tubárico (Fuente: DeCS BIREME)..

Abstract

Objective: This study aimed to evaluate the usefulness of the qPCR de COBAS® TaqMan® CT test to detect circulating strains in Mexico. **Materials and Methods:** Descriptive and transversal study. We analyzed 413 endocervical cases for the COBAS® system of patients with infertility, with the diagnosis of *C. trachomatis*. that acudieron has the Clínica ETS del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) in the Ciudad de México. Las muestras positivas también analizaron por el sistema Abbot Real-time CT / NG, y por PCR de punto final para la detección de plásmido. Las variables de estudio fueron: Infertilidad, diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*, infección por *Chlamydia* y otras variables. To determine the association between CT infection and clinical data, Fisher's no parametric exact test was used. A value $p < 0.05$ was considered significant. **Results:** Of the 413 deaths, 276 female patients with primary infertility and 137 with secondary infertility, they ranged from 20 to 42 years. The main cause of primary infertility is endocrine-ovarian factor and secondary infertility is tuboperitoneal factor. Of 22 positive cases, a significant association between infertility by tubárico factor and infection by *C. trachomatis* (RR = 2.47 95% CI 1.1-5.5, $p < 0.05$) was demonstrated by COBAS prueba ® TaqMan® CT. De éstas solo 5 fueron identificadas por el sistema Abbott ($p < 0.011$). Conclusion. El sistema de COBAS® TaqMan® CT de Roche Molecular Diagnostic mostró mayor utilidad para identificar las cepas de CT que están circulando en México. **Conclusion:** The COBAS® TaqMan® CT test from Roche Molecular Diagnostic showed more utility in identifying the CT strains that circulate in Mexico.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, Diagnosis of *Chlamydia trachomatis*, Mexican variant of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia* with cryptic plasmid deletion, plasmid-free *Chlamydia*, tubal factor infertility (Source: MeSH BIREME).

Citar como: López-Hurtado M, et al. Utilidad del Cobas® Taqman® Ct Test, v2.0 para la detección de cepas de *Chlamydia Trachomatis* circulantes en México. Rev. Peru. Investig. Salud. [Internet]; 2022; 6(2): 91-100. <https://doi.org/10.35839/repis.6.2.1303>

Correspondencia a: Fernando Guerra Infante; fguerra_96@yahoo.com

Orcid: López-Hurtado M.: <https://orcid.org/0000-0001-5742-7214>
Flores-Salazar V.R.: <https://orcid.org/0000-0002-6386-8320>
Gutiérrez-Trujillo R.: <https://orcid.org/0000-0002-5810-2080>
Escobedo-Guerra M.R.: <https://orcid.org/0000-0002-4353-2117>
Guerra-Infante F.M.: <https://orcid.org/0000-0001-8730-0484>

Conflicto de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

Financiamiento: Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Perinatología con número de registro 2019-1-33.

Editor: Bernardo Dámaso, UNHEVAL

Recibido: 19 de noviembre de 2021

Aprobado: 28 de abril de 2022

En línea: 30 de abril de 2022

Copyright: 2616-6097/©2022. Revista Peruana de Investigación en Salud. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Permite copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato. Usted debe dar crédito de manera adecuada, brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios.

Introducción

La infección genital por *Chlamydia trachomatis* (CT) es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) curable y la más frecuente en todo el mundo⁽¹⁾. El 80% de las infecciones son asintomáticas, y a menudo permanece sin ser detectada o no diagnosticada, lo que a su vez da como resultado una amplia propagación de la infección por este patógeno y un retraso en su tratamiento⁽²⁾. Cuando ésta infección no es tratada, puede provocar complicaciones graves, como la enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico e infertilidad por factor tuboperitoneal (FTP)⁽³⁾. En los hombres, puede causar uretritis no gonocócica e infección de las glándulas accesorias⁽⁴⁾. Además, la infección por CT se asocia con un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino en unión con el virus del papiloma humano y de adquirir la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana^(5,6).

Aunque las técnicas de amplificación de ácido nucleico (TAAN) para la detección de CT de tipo comercial aparecieron desde 1992⁽⁷⁾, el número de casos de infección por este patógeno han ido en aumento en todo el mundo, de 89 millones de casos nuevos en 1995 a 127 millones en 2016⁽⁸⁾. Diversas causas podrían ser las responsables tales como: tipo de prueba de diagnóstico empleada, características propias del microorganismo, tipo de tratamiento, capacidad de la respuesta inmunológica y comportamiento sexual del individuo (solo por mencionar algunas)⁽⁸⁾.

Con el avance de las TAAN, el diagnóstico se ha vuelto más fácil, ha demostrado la gran cantidad de personas infectadas y ha permitido identificar la aparición de subgenotipos y nuevas variantes de CT (nvCT) en todo el mundo⁽⁸⁻¹⁴⁾. Lo anterior es importante ya que los blancos genéticos más empleados son los genes de la proteína principal de membrana externa (*ompA*) y los genes del plásmido críptico^(9,10,12). Es importante señalar que por cada cuerpo elemental existen de 4 a 10 copias del plásmido, y que el plásmido tiene 8 marcos de lectura a abierta (ORF) o secuencias codificantes (CD)^(9,11). Gracias al aumento en el análisis de las secuencias nucleotídicas de estos genes en diversas cepas, se ha demostrado delecciones y mutaciones, lo que puede favorecer el reporte de pruebas falsas negativas como ocurrió con la variante plásmídica sueca reportada en 2006⁽⁹⁻¹²⁾.

En México han aparecido variantes y subgenotipos de este patógeno que no habían sido reportados anteriormente en otros países^(13,15). Además, un estudio serológico realizado por nuestro grupo de investigación en mujeres mexicanas embarazadas ha puesto en evidencia la presencia de anticuerpos contra diversas especies de *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*). Este estudio demostró que el 46% de los sueros tenían anticuerpos para las tres especies de *Chlamydia*. Lo que sugiere de una posible infección con estos tres patógenos, lo que da la posibilidad de una recombinación genética entre ellas si en un momento dado hubo una infección mixta⁽¹⁶⁾.

Todas las TAAN comerciales para el diagnóstico de infección por CT han sido estandarizadas y evaluadas con muestras vaginales, uretrales o de orina de personas infectadas con cepas prevalentes de Europa y de Estados Unidos, pero no para muestras que tienen cepas que transitan en Latino-América. Debido a lo anterior el objetivo de esta investigación fue establecer la utilidad de algunas pruebas comerciales para la detección de las cepas de *Chlamydia* que circulan más frecuentemente en México.

Material y métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio descriptivo y transversal.

Población de estudio

La población estuvo conformada por participantes femeninas de 20 a 42 años todas ellas con infertilidad, con el diagnóstico endocervical de infección por clamidia que acudieron a la Clínica ETS del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en la Ciudad de México, durante septiembre de 2016 a noviembre de 2017.

Muestra y muestreo

El tamaño de la muestra fue por conveniencia y no probabilístico. Se considero 413 pacientes. Los criterios de inclusión fueron: paciente femenina entre 20 y 42 años, con diagnóstico endocervical por clamidia. Las pacientes fueron excluidas del estudio si habían tomado antibióticos en los últimos 30 días, si mostraban una enfermedad inmunosupresora conocida o signos de una crisis de salud emocional o mental o algún tipo de tratamiento contra el cáncer.

Variables

Las variables de estudio fueron: Infertilidad (primaria y secundaria), diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* (COBAS, ABBOTT Y PCR-KL), infección por *Chlamydia* y otras variables: edad, años de infertilidad, factor endocrino-ovárico, factor masculino, factor tuboperitoneal (FTP) y factor uterino-endometrial.

Procedimientos

Posterior a la obtención del permiso del comité de ejecución del estudio. Se procedió a tomar las muestras endocervicales, mediante la introducción de un hisopo de alginato de calcio en la cavidad vaginal, para obtener células epiteliales del endocervix. Los hisopos fueron colocados en el medio de transporte UTM-RT (Copan Diagnostic Inc. Corona, CA, EUA).

Detección de Chlamydia trachomatis mediante PCR tiempo real

Para la detección de CT se utilizaron dos sistemas de PCR tiempo real, uno de ellos fue empleando el kit de COBAS® TaqMan® CT test, v2.0 de Roche (Roche Molecular Diagnostic, Oklahoma, OK, USA) y realizando la detección con el sistema COBAS® TaqMan® 48. El otro sistema fue el de Abbott Real-time CT/NG (Abbot Molecular Inc., Des Plaines, IL, EE. UU.) que utiliza en el sistema robotizado Abbott m2000. En ambas técnicas se siguieron las instrucciones del fabricante. El sistema COBAS® detecta un doble objetivo, amplifican genes de la región CD1 y 2 del plásmido críptico (fragmento de 206 pb) y del *ompA* (182 pb). El sistema Abbott amplifica y detecta dos sitios del plásmido críptico, uno de 102 pb en la región de delección de 377 pb (CD1) de la variante sueca, y un segundo fragmento de 140 pb que se encuentra fuera de la región CD1. Ambos sistemas garantizan la detección de la variante Sueca.

Detección de Chlamydia trachomatis por PCR punto final

Para las muestras que fueron positivas a CT, se les extrajo el DNA mediante la técnica fenol-cloroformo tal y como se describió previamente⁽¹⁵⁾. La detección del patógeno fue por PCR de punto final detectando la presencia de plásmido. Para ello, se amplificó un fragmento de 241 pb de la CD2 con los iniciadores reportados por Mahony y col.,⁽¹⁷⁾ KL1 5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3' y KL2 5'-AATCAATGCCCGG GATTGGT-3'. Para la amplificación de este fragmento se empleó un volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción fue: 3 µl de ADN (aproximadamente 100 ng/µl) y 47 µl de una mezcla de reactivos que contenía el tampón de amplificación 1X, MgCl₂ 1,75 mM, 30 pM/µl de cada cebador, 160 µM/µl de cada base y 1 U/µl de polimerasa Taq (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La mezcla de reacción se procesó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc TM, EE.UU.). La desnaturalización del ADN se hizo a 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación: 94 °C, 1 min; 56°C, 1 min y 72°C, 2 min y extensión final a 72°C 5min. Como control negativo se empleó DNA de células Mc Coy no infectadas y como control positivo DNA de la variante Mexica y de la cepa D (ATCC: DUWC3X) de CT.

La Identificación de los genotipos de Chlamydia trachomatis

La identificación de genotipos se realizó por secuenciación mediante secuenciador ABI PRISM (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.), las muestras fueron enviadas al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias del gen *ompA* fueron analizadas en el software de Chromas, identificado por BLASTn (NCBI) y alineadas con el software ClustalW, 10 y Multalin (versión 5.4.1, alineación de secuencia múltiple con agrupamiento jerárquico, Francia).

Análisis estadístico

Para determinar la asociación entre la infección por CT y los datos clínicos se utilizó la prueba no paramétrica exacta de Fisher. La magnitud de las asociaciones entre las variables fue expresada como riesgo relativo (RR) en un intervalo de confianza del 95%. Para datos cuantitativos se empleó la prueba de t student. Una P de dos colas con valor p<0.05 fue considerado como significativo. Los análisis se realizaron en el programa SPSS versión 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, Ny. IBM Corp),

Aspectos éticos

Este estudio fue llevado a cabo con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" en la Ciudad de México, México con el ID número 2019-1-33. Además, las pacientes diagnosticadas de este estudio otorgaron su consentimiento informado.

Resultados

Tipos de Infertilidad

De las 413 muestras estudiadas, 276 fueron de pacientes con infertilidad primaria y 137 de infertilidad secundaria; la edad promedio fue 31.8 y 32.9 años ($p < 0.5$), respectivamente. Los años promedio de infertilidad primaria fue de seis y de infertilidad secundaria de cinco años ($p < 0.05$). El 60.3% de las pacientes, su infertilidad fue a una combinación de diversas causas, sin embargo, las pacientes con infertilidad primaria la causa más frecuente fue el factor endocrino-ovárico (RR= 10.5; IC95% 5.9-18.04, $p < 0.001$) mientras que las pacientes con infertilidad secundaria fue el FTP (RR=1.4; IC95% 1.08-1.87, $p < 0.025$). El factor masculino y el factor uterino-endometrial estuvieron presentes tanto en pacientes con infertilidad primaria como secundaria por lo que no mostraron una estadística significativa (Tabla 1). Cabe señalar que hubo un 7% mayor del factor masculino en mujeres con infertilidad primaria. Los años de infertilidad entre uno y cinco mostró asociación significativa con la infertilidad secundaria (RR= 3.34 IC95% 1.15-9.7, $p < 0.01$) mientras que la infertilidad mayor o igual a 11 años con la infertilidad primaria (RR=1.27 IC95% 1.08-1.48, $p < 0.02$).

Tabla 1

Causas frecuentes de infertilidad primaria y secundaria de los pacientes que asisten al Instituto Nacional de Perinatología

Variables	Infertilidad		Riesgo Relativo IC 95%	Valor de P*
	Primaria n	Secundaria n		
Edad (años)				
20-29	76	36	1.02 (0.88-1.19)	NS
30-39	191	97	0.98 (0.83-1.13)	NS
≥40	9	4	1.04 (0.72-1.5)	NS
Años de infertilidad				
1 - 5 años	145	92	1.52 (1.13-2.05)	0.006
6 - 10 años	94	37	1.11 (0.97-1.28)	NS
≥11 años	37	8	1.27 (1.08-1.48)	0.019
Factor endocrino- Ovárico				
Si	265	23	10.5 (5.9-18.4)	0.001
No	11	114		
Factor Masculino				
Si	106	43	1.11 (0.96-1.27)	NS
No	170	94		
Factor tuboperitoneal (FTP)				
Si	69	50	1.4 (1.08-1.87)	0.021
No	207	87		
Factor Uterino-Endometrial				
Si	57	23	1.08 (0.92-1.27)	NS
No	219	114		
Infección por <i>Chlamydia</i>				
Si	13	9	0.88 (0.62-1.25)	NS
No	263	128		

Fuente: Elaboración Propia, n=muestra, *= $p < 0.05$, NS= no significativo

Prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis*

Veinte y dos muestras fueron positivas por el sistema COBAS®. Por lo que la prevalencia de infección fue de 5.33%. Trece de ellas mostraron infertilidad primaria y nueve infertilidades secundarias (Tabla 2). Los resultados en general mostraron que hubo una asociación significativa entre la presencia del FTP y la positividad al ADN de CT empleando el sistema de COBAS® (RR= 2.47 IC95% 1.1-5.5, $p < 0.05$), de manera similar, los años de infertilidad entre 1 y 5 años mostró una asociación significativa con la detección de ADN de CT (RR= 3.34 IC95% 1.15-9.7, $p < 0.03$).

Tabla 2
Asociación de *Chlamydia trachomatis* con diferentes padecimientos que causan infertilidad femenina

Variables	<i>Chlamydia trachomatis</i>		Riesgo Relativo IC 95%	Valor de P*
	Positiva	Negativa		
	n	n		
Edad (años)				
20-29	7	105	1.25 (0.53-3.0)	NS
30-39	15	273	0.983(0.39-2.23)	NS
≥40	0	13	1.06 (1.03-1.08)	NS
Años de infertilidad				
1 - 5 años	18	219	3.34 (1.15-9.7)	0.025
6 - 10 años	3	128	0.34 (0.10-1.13)	NS
≥11 años	1	44	0.39 (0.54-2.8)	NS
Factor endocrino- Ovárico				
Si	15	273	0.93 (0.39-2.22)	NS
No	7	118		
Factor Masculino				
Si	7	142	0.83 (0.35-2.0)	NS
No	15	249		
Factor tuboperitoneal (FTP)				
Si	11	108	2.47 (1.1-5.5)	0.03
No	11	283		
Factor Uterino-Endometrial				
Si	5	75	1.2 (0.47-3.2)	NS
No	17	316		

Fuente: Elaboración Propia, n=muestra, *=p<0.05, NS= no significativo

Comparación predictiva de las pruebas de detección de *Chlamydia trachomatis*

Para la comparación predictiva de la sensibilidad de las pruebas comerciales que detectan la infección CT, se seleccionaron las 22 muestras positivas y 78 muestras negativas (seleccionadas al azar) por el sistema COBAS® (Tabla 3). Estas 100 muestras se analizaron para los sistemas de Abbott y PCR de punto final (PCR-KL). Los resultados mostraron que no hubo una asociación significativa entre los diversos métodos de detección y las manifestaciones clínicas, a excepción del sistema de COBAS® que mostró asociación con el FTP como la única causa de su infertilidad (RR= 3.8, IC95% 1.9-7.6, p<0.05).

Al comparar las 22 muestras positivas por el sistema de COBAS® con los otros sistemas (Tabla 4) se observó una concordancia significativa con el sistema de Abbott ($X^2= 6.49$ p<0.02) pero no con la PCR-KL. A pesar de lo anterior, el sistema de Abbott mostró una concordancia significativa con la PCR-KL ($X^2= 5.92$; p<0.02).

Identificación del genotipo de *Chlamydia*

El análisis de secuenciación nucleotídica del gen *ompA* de 7/9 cepas identificados por los tres sistemas de PCR utilizadas en este estudio, identificó a 6 de ellas como genotipo F y una del genotipo D. En dos de ellas no se logró identificar el genotipo de *Chlamydia*, sugiriendo la presencia de cepas diferentes a CT.

Discusión

Chlamydia trachomatis es un patógeno que está asociado al desarrollo de infertilidad por oclusión tubárica⁽³⁾. Sin embargo, las causas de infertilidad pueden ser múltiples y hasta una misma paciente puede tener más de una causa de infertilidad⁽¹⁸⁾. En este estudio se evidenció que las pacientes infértiles que participaron el factor endocrino-ovárico fue 10 veces más frecuente en las mujeres con infertilidad primaria, sugiriendo que es la causa más común para no embarazarse y la urgencia para asistir a la clínica de infertilidad del INPer. Varios estudios han reportado que factor endocrino-ovárico se presenta entre el 5% al 20 % de las mujeres en edad reproductiva⁽¹⁹⁾. En el caso de mujeres que mostraron infertilidad por FTP, éste fue significativo en las mujeres que mostraron una infertilidad secundaria y que no habían logrado embarazarse nuevamente en los primeros 5

Tabla 3
Detección de Chlamydia trachomatis mediante diversos ensayos y su asociación con la infertilidad

Variables	COBAS		ABBOTT		KL		Riesgo Relativo IC 95%	Valor de P*
	+	-	+	-	+	-		
Edad (años)								
20-29	7	29	3	33	9	27	1.21 (0.54-2.7)	NS
30-39	15	49	6	58	14	50	1.13 (0.3-4.2)	NS
Años de infertilidad								
1 - 5 años	18*	44	7	55	12	50	2.8 (1.01-7.5)	0.045
6 - 10 años	3	27	2	28	9	21	1.5 (0.73-3.1)	NS
≥11 años	1	7	0	8	2	6	1.1 (0.31-3.85)	NS
Factor endocrino- Ovárico								
Si	15	64	8	71	16	63	0.57 (0.27-1.22)	NS
No	7	14	1	20	7	14	2.13 (0.28-16.1)	NS
Factor Masculino								
Si	7	45	5	47	15	37	0.43 (0.16-0.97)	NS
No	15	33	4	44	8	40	1.15 (0.33-4.0)	NS
Factor tuboperitoneal (FTP)								
Si	11	28	4	35	11	28	1.56 (0.75-3.26)	NS
No	11	50	5	56	12	49	1.25 (0.36-4.38)	NS
Factor Uterino-Endometrial								
Si	5	26	3	28	10	21	0.66 (0.27-1.6)	NS
No	17	52	6	63	13	56	1.11 (0.3-4.2)	NS
Solo factor tuboperitoneal								
si	3*	1	0	4	1	3	3.8* (1.9-7.6)	0.032
no	19	77	9	87	22	74	1.1 (1.04-1.18)	NS

Fuente: Fuente: Elaboración Propia, n=muestra, *=p<0.05, NS= no significativo

Tabla 4
Concordancia para la detección de Chlamydia trachomatis en sistemas de diagnóstico

	COBAS		ABBOTT		Valor X ²	Valor de P
	+	-	+	-		
ABBOTT						
Positivo	5	4	—	—	6.49	0.011
Negativo	17	74	—	—		
KL						
Positivo	4	19	5*	18	0.37	NS
Negativo	18	59	4	73	5.92	0.015*

Fuente: Elaboración Propia

años de no haber usado algún método de planificación familiar. Además, cabe señalar que la detección de CT en esta pacientes fue 2 veces más frecuente cuando el diagnóstico se realizó por el sistema de Cobas Amplicor de Roche Diagnostics, y cuando se compara con el sistema RealTime CT/NG de Abbott o con la PCR-KL, ésta es 3 veces mayor para detectar CT en pacientes con infertilidad por FTP.

En cuanto a la prevalencia de infección por CT en este estudio, ésta fue 1.8% mayor a la reportada previamente por López-Hurtado y Col., en mujeres con infertilidad que asistieron al INPer en el 2015⁽²⁰⁾, lo que sugiere que la infección por CT ha ido en aumento en la población Mexicana como ha ocurrido a nivel mundial⁽⁸⁾. Lo anterior se puede deber a una falla en la detección de CT o al bajo número de laboratorios del sector público como privado que no realizan esta prueba de diagnóstico.

Las fallas más comunes de detección de CT en los países industrializados han sido debido a la aparición de

nuevas cepas de CT por ejemplo: desde el 2006 en Suecia, se informó de una variante de CT que presentó una delección de 377 nucleótidos en su plásmido⁽⁹⁾. Este sitio fue el blanco genético por muchos años para el diagnóstico de infección por CT en los sistemas de diagnóstico comercialmente disponibles en esa época (Cobas Amplicor de Roche Diagnostics y test RealTime CT/NG de Abbott Laboratories). La falla en su detección provocó una alta proporción de infecciones (10-65%) por esta variante en la mayoría de los condados de Suecia^(9,21) y la posibilidad de que esta cepa se distribuyera en todo el mundo. En México también se ha identificado una variante con delección en la misma región del plásmido⁽¹³⁾.

Debido a lo anterior, es imperativo conocer si estos sistemas mantienen su capacidad de identificar este tipo de variantes. La variante de CT informada por nuestro grupo de investigación evidenció la misma de delección de 377 nucleótidos (pero de diferente genotipo D) que la cepa Sueca (genotipo E). Además, durante es estudio se identificó un alto porcentaje de cepas libres de plásmido⁽¹³⁾. Otro estudio de nuestro grupo de investigación identificó la presencia de cepas de LGV que no desarrollaban esta enfermedad⁽¹⁵⁾. Por tales motivos, se decidió evaluar los sistemas de COBAS® y Abbott y una versión de PCR de punto final (PCR-KL) que amplifica la región codificante CD2 del plásmido (región diferente a la zona de delección) de CT para identificar cuál prueba era mejor.

En este estudio al parecer el sistema de COBAS® fue más sensible al identificar un mayor número de muestras positivas y mostrar una asociación significativa con la presencia del FTP. Cabe señalar, que de las 22 muestras detectadas por el sistema COBAS®, solo cuatro fueron identificadas por el sistema Abbott. La diferencia que existe entre ambos sistemas es que COBAS® detecta tanto el plásmido como el gen *ompA*, mientras que Abbott solo el plásmido. Lo anterior sugiere que las 17 muestras no detectadas por el sistema Abbott carecen de plásmido, o que son otras especies de *Chlamydia* que muestran secuencias nucleotídicas similares en el gen *ompA*. Lo anterior no es extraño, en México circula un alto porcentaje de cepas de CT libres de plásmido (11.5%)⁽¹³⁾. De manera similar, Yeow y Col.,⁽²²⁾ informaron que las mujeres de Malasia son infectadas por un alto porcentaje de cepas de CT carentes de plásmido (6.5%), aún en E.E.U.U se ha informado de un alto porcentaje (22.5%) de estas cepas en pacientes que asistieron al Hospital de la Universidad de Massachusetts⁽²³⁾. A pesar de lo anterior, se han realizado pocos estudios para identificar el genotipo o las variantes de CT que carecen de este plásmido^(13,22-24). Aunque otra posibilidad, es la pérdida del plásmido durante la extracción del ADN, por lo que será necesario llevar a cabo la evaluación de técnicas para la purificación del plásmido para confirmar si realmente son cepas carentes de plásmido.

En cuanto a la PCR-KL, solo detectó cuatro muestras que fueron positivas por COBAS®, dos de ellas no detectadas por el sistema de Abbott, lo que sugiere que éstas presentan secuencias nucleotídicas diferentes a las que amplifica el sistema Abbott. Además, las 17 muestras detectadas por el sistema COBAS®, tampoco fueron amplificadas por la PCR-KL, confirmando que éstas no tenían plásmido.

Diversos estudios han evaluado los sistemas comerciales para la identificación de CT y han demostrado diferencias en el número de muestras identificadas. Hadad y Col., en 2009⁽²⁵⁾ analizaron 1059 muestras de las cuales 100 (9,4%) dieron positivas tanto en LightMix (Lightmix Kit 480 HT CT/NG, TIB Molbiol) como en COBAS® y 13 más solamente en COBAS®. Sin embargo, de éstas últimas, solo 8 de 10 analizadas se confirmaron como positivas en el sistema BD ProbeTec ET (BD ProbeTec ET CT/GC Amplified DNA) mientras que por el sistema Abbott las 10 analizadas fueron positivas. La explicación dada por Hadad y Col., de las dos muestras que no se confirmaron por el sistema ProbeTec fue debido a que este sistema muestra menor sensibilidad que el sistema COBAS®⁽²⁶⁾, o que el medio de transporte no fue el adecuado para el aislamiento del ADN, o el tipo de almacenamiento, o el transporte de las muestras, etc.,⁽²⁶⁾. Sin embargo, otra posibilidad no descrita por estos autores es que fueran cepas con mutaciones en los sitios blancos de amplificación. En 2019, en Rusia se detectó una variante sueca de CT del genovar E (ST13) que fue aislada e identificada en una clínica de Saratov, y que mostró doble delección, la de 377 nucleótidos y otra de 17 nucleótidos, ambas en la región CD1 de su plásmido, lo que podría dar falsas negativas en estos sistemas⁽²⁷⁾. Además recientemente, nuestro grupo de investigación informó de un caso clínico de una mujer infectada con una cepa de *C. pneumoniae* no humana⁽²⁸⁾. Lo que abre la posibilidad de recombinación genética entre diferentes cepas de *Chlamydia spp.*, y que puede provocar una falla en el diagnóstico de infección por este patógeno.

En este estudio, de las nueve cepas de CT que se llevaron a genotipificar, el genotipo F fue el más identificado, mismo que se ha reportado en otros estudios como el de mayor frecuencia⁽¹⁵⁾. Sin embargo, en dos muestras que mostraron plásmido no se lograron identificar sus genotipos. Esto insinúa que otras especies de *Chlamydia spp.* podrían estar infectando a estas pacientes, como ha sucedido con *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. suis*, *C. caviae* o *C. gallinacea* o *C. felis* que infectan al hombre⁽²⁹⁾.

Por otro lado, los resultados de la PCR-KL de este estudio, mostraron 23 muestras positivas, solo cuatro y cinco de ellas fueron identificadas por los sistemas COBAS® y Abbott, respectivamente. Lo anterior sugiere de cepas con diferentes secuencias nucleotídicas en el plásmido que no son detectadas por estos sistemas. Que el sistema COBAS® no haya detectado todas estas muestras positivas, podría deberse a que no detectó el gen

ompA. Lo anterior puede deberse a que este sistema reporta como limitaciones que depende del número de cuerpos elementales presentes en la muestra, y que requiere de al menos 4 unidades formadoras de inclusión (UFI)/ml para dar a la muestra como positiva. En el caso del sistema Abbott, reporta como limitación su incapacidad para detectar las cepas de CT carentes de plásmido y requiere de al menos 5 UFI/ml (es decir de 20 a 29 copias del plásmido) para que una muestra se considere como positiva.

Es importante señalar, que Jones y Col.⁽¹¹⁾ al estudiar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en cada una de las ocho regiones CD de 524 plásmidos crípticos de todos los serovares descritos⁽¹⁶⁾; identificaron aproximadamente 11,847 SNP lo que equivale a una tasa loci del 2,84% con SNP. Las regiones CD1, CD2 y CD3 mostraron un total de SNP's 2,012; 1,734 y 2,216 respectivamente, que son las regiones que más comúnmente se utilizan para la identificación del plásmido de CT, lo que podría explicar parcialmente la incapacidad de estos sistemas de diagnóstico para detectar a las diferentes muestras analizadas en este estudio.

Un estudio realizado por An y col., en 1992⁽²³⁾, sobre la detección de cepas libres de plásmido fue el hecho de que los ensayos de RNA-PCR y RNP (ensayo de RNA-PCR con ribonucleasa A) identificó nueve cepas libres de plásmido a diferencia del ensayo de plásmido-PCR. Además, el sistema de RNP no logró diferenciar con exactitud a las cepas CT ya que mostró cierta reactividad cruzada con *C. psittaci* (la diferencia en el gene ARNr 16S es menor al 5%). Lo anterior sugiere que podría haber infecciones por *C. psittaci*, o nvCT (por recombinación genética con *C. psittaci*) que no son detectadas tan fácilmente. Recientemente se ha informado de una nvCT en Finlandia la cual no fue detectada por el sistema Aptima Combo 2 (AC2) (Hologic Inc., San Diego, California, Estados Unidos (EE. UU.)), que detecta el ARNr 23S de CT. La mutación observada en esta cepa fue el cambio de una citosina por una tiamina en el gen 1515 (C1515T) del rRNA 23S de CT^(14,30). Lo que confirma el estudio de An y Col.⁽²²⁾ y sugiere de la aparición de nvCT.

Finalmente, desde 2009, los laboratorios de 17 países europeos que participan en el Servicio Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido (Reino Unido) (NEQAS), han informado que los nuevos sistemas de detección de CT son capaces de identificar la variante Sueca⁽³¹⁾. En este estudio se confirmó que ambos sistemas COBAS® y Abbott, son capaces de detectar la variante mexicana que al igual que la cepa que muestra la delección de 377 pb, cabe señalar que la variante Mexicana fue utilizada como control positivo para identificar este tipo de cepas. En conclusión, el sistema de COBAS® TaqMan® CT de Roche Molecular Diagnostic mostró mayor utilidad para identificar las cepas de CT que están circulando en México.

Una de las fortalezas del estudio fue determinar la capacidad que tiene la prueba de diagnóstico de COBAS® TaqMan® CT de Roche para identificar la presencia de la variante mexicana de CT y de las cepas carentes de plásmido a diferencia del sistema de Abbott y la PCR-KL que solo detectan plásmido. La debilidad del estudio fue la incapacidad para identificar el genotipo y la especie de las cepas de CT carentes de plásmido. El poder identificar el genotipo o la especie de *Chlamydia spp* permitiría conocer la prevalencia de estas cepas. Además, el estudio tiene la limitación que solo se realizó con muestras endocervicales de la población mexicana y no con otras poblaciones o razas humanas que entran al país como migrantes y podrían tener otro tipo de cepas de CT.

La utilidad del presente estudio radica en conocer los sistemas de detección para identificar las variantes de *Chlamydia trachomatis* que están apareciendo en población Mexicana, así como la de favorecer a la sospecha de que otras especies de *Chlamydia spp* que pueden causar infecciones endocervicales. Además sugiere qué prueba de diagnóstico debe utilizar para identificar a CT en otros países donde puede haber un porcentaje mayor de cepas de CT sin plásmido o con delección. En conclusión el sistema COBAS® TaqMan® CT de Roche es útil para identificar cepas de CT carentes de plásmido.

Contribución de los autores

Marcela López-Hurtado, Verónica Flores-Salazar, Rodrigo Gutiérrez-Trujillo, Marcos Escobedo-Guerra, Fernando Guerra-Infante (Todos los autores participaron en: concepción de la idea del manuscrito, análisis del estudio, redacción del primer borrador del artículo, metodología, recolección de datos, edición crítica del artículo, aceptación del contenido final del artículo y aprobación de la versión final para publicación).

Referencias bibliográficas

1. Woodhall SC, Gorwitz RJ, Migchelsen SJ, Gottlieb SL, Horner PJ, Geisler WM, et al. Advancing the public health applications of *Chlamydia trachomatis* serology. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(12):399-407. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30159-2.
2. Marccone V, Recine N, Gallinelli C, Nicosia R, Lichtner M, Degener A M, et al. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* endocervical infection in a previously unscreened population in Rome, Italy, 2000 to 2009. *Euro Surveill*. 2012;17(25):20203. PMID: 22748006.
3. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis*

- genital infection in women. *J Infect Dis*. 2010; 201(2):134-55. doi: 10.1086/652395.
4. Wagenlehner FM, Weidner W, Naber KG. Chlamydial infections in urology. *World J Urol*. 2006;24(1):4-12. doi: 10.1007/s00345-005-0047-x.
 5. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;289(4):715-23. doi: 10.1007/s00404-013-3122-3.
 6. Bhattar S, Bhalla P, Chadha S, Tripathi R, Kaur R, Sardana K. Chlamydia trachomatis infection in HIV-infected women: need for screening by a sensitive and specific test. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013;2013:960769. doi: 10.1155/2013/960769
 7. 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. doi: 10.1128/jcm.30.11.2847-2851.1992.
 8. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2019;97(8):548-562. doi: 10.2471/BLT.18.228486.
 9. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(1):62-9. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834204d5.
 10. Bowden KE, Joseph SJ, Cartee JC, Ziklo N, Danavall D, Raphael BH, et al. Whole-Genome Enrichment and Sequencing of Chlamydia trachomatis Directly from Patient Clinical Vaginal and Rectal Swabs. *mSphere*. 2021;6(2):1302-20. doi: 10.1128/mSphere.01302-20.
 11. Jones CA, Hadfield J, Thomson NR, Cleary DW, Marsh P, Clarke IN, et al. The Nature and Extent of Plasmid Variation in Chlamydia trachomatis. *Microorganisms*. 2020;8(3):373. doi: 10.3390/microorganisms8030373.
 12. Ripa T, Nilsson P. A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006;11(11):E061109. doi: 10.2807/esw.11.45.03076-en.
 13. Escobedo-Guerra MR, Katoku-Herrera M, Lopez-Hurtado M, Villagrana-Zesati JR, de Haro-Cruz MJ, Guerra-Infante FM. Identification of a new variant of Chlamydia trachomatis in Mexico. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019;37(2):93-99. doi: 10.1016/j.eimc.2018.02.008.
 14. Roberts DJ, Davis GS, Cole MJ, Naik D, Maru H, Woodford N, et al. Prevalence of new variants of Chlamydia trachomatis escaping detection by the Aptima Combo 2 assay, England, June to August 2019. *Euro Surveill*. 2019;24(38):1900557. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.38.1900557.
 15. De Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, Guerra-Infante FM. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(2):102-8. doi: 10.1016/j.eimc.2010.08.014.
 16. Hernández-Trejo M, Herrera-González N, Guerra-Infante FM. Evidencia serológica de infección por tres especies de Chlamydia en mujeres embarazadas. *Ginecol Obstet Mex*. [Internet]. 2014[citado el 35 de agosto de 2021];82(9):585-90. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=52467>
 17. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1993;31(7):1753-8. doi: 10.1128/jcm.31.7.1753-1758.1993.
 18. Jose-Miller AB, Boyden JW, Frey KA. Infertility. *Am Fam Physician*. 2007; 75(6), 849–856. PMID: 17390595.
 19. Azziz R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet Gynecol*. 2018;132(2):321-336. doi: 10.1097/AOG.0000000000002698.
 20. López-Hurtado M, García-Romero S, Escobedo-Guerra MR, et al. Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in women attending in the national institute of perinatology from Mexico city. *Rev Chilena Infectol* 2018; 35: 371–376. doi:10.4067/s0716-10182018000400371.
 21. Persson K, Hammas B, Janson H, Bjartling C, Dillner J, Dillner L. Decline of the new Swedish variant of Chlamydia trachomatis after introduction of appropriate testing. *Sex Transm Infect*. 2012;88(6):451-5. doi: 10.1136/sextrans-2011-050409.
 22. Yeow TC, Wong WF, Sabet NS, Sulaiman S, Shahhosseini F, Tan GM, et al. Prevalence of plasmid-bearing and plasmid-free Chlamydia trachomatis infection among women who visited obstetrics and gynecology clinics in Malaysia. *BMC Microbiol*. 2016;16:45 doi: 10.1186/s12866-016-0671-1.
 23. An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA. Infection with a plasmid-free variant chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2814–21. doi: 10.1128/jcm.30.11.2814-2821.1992.
 24. Fontana C, Favaro M, Cicchetti O, Minelli S, Pistoia ES, Favalli C. Performance of strand displacement amplification assay in the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(5):283-8. PMID: 16249622.
 25. Hadad R, Fredlund H, Unemo M. Evaluation of the new COBAS TaqMan CT test v2.0 and impact on the proportion of new variant Chlamydia trachomatis by the introduction of diagnostics detecting new variant C trachomatis in Orebro county, Sweden. *Sex Transm Infect*. 2009;85(3):190-3. doi: 10.1136/sti.2008.033142.
 26. Schuur TA, Verweij SP, Weel JFL, Ouburg S, Morré SA. Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in an STI population: performances of the Presto CT-NG assay, the Lightmix Kit 480 HT CT/NG and the COBAS Amplicor with urine specimens and urethral/cervicovaginal samples. *BMJ Open*. 2013;3(12):3607. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003607.

27. Feodorova VA, Zaitsev SS, Saltykov YV, Sultanakhmedov ES, Bakulev AL, Ulyanov SS, et al. An Asymptomatic Patient with Fatal Infertility Carried a Swedish Strain of *Chlamydia trachomatis* with Additional Deletion in The Plasmid orf1 that Belonged to A Different MLST Sequence Type. *Microorganisms*. 2019;7(7):187. doi: 10.3390/microorganisms7070187.
28. Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Villagrana-Zesati JR, Escárcega-Tame MA, de Haro-Cruz MJ, Guerra-Infante FM. Detección atípica de *Chlamydia pneumoniae* no humana en una muestra endocervical. Reporte de caso. *Ginecol Obstet Mex*. 2021; 89 (12): 978-984. doi:10.24245/gom.v89i12.5837.
29. Cheong HC, Lee CY, Cheok YY, Tan GMY, Looi CY, Wong WF. Chlamydiaceae: Diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms* 2019;7(5):146. doi: 10.3390/microorganisms7050146.
30. Unemo M, Hansen M, Hadad R, Lindroth Y, Fredlund H, Puolakkainen M, et al. Finnish new variant of *Chlamydia trachomatis* escaping detection in the Aptima Combo 2 assay also present in Örebro County, Sweden. *Euro Surveill*. 2019;24(26):1900370. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.26.1900370.
31. Unemo M, Rossouw A, James V, Jenkins C. Can UK NEQAS participants from seventeen European countries and five additional countries/regions detect the Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) in 2009? *Euro Surveill*. 2009;14(19):19206. doi: 10.2807/ese.14.19.19206-en.