



Detección atípica de *Chlamydia pneumoniae* no humana en una muestra endocervical. Reporte de caso

Atypical detection of non-human *Chlamydia pneumoniae* in an endocervical sample. Case Report.

Marcos R Escobedo-Guerra,¹ Marcela López-Hurtado,¹ J Roberto Villagrana-Zesati,¹ Marco A Escárcega-Tame,¹ María J de Haro-Cruz,² Fernando Martín Guerra-Infante^{1,2}

Resumen

ANTECEDENTES: *Chlamydia trachomatis* es uno de los principales microorganismos de transmisión sexual asociado de manera importante con infertilidad femenina. La detección de genotipos y nuevas variantes de *Chlamydia trachomatis* permite conocer su prevalencia, distribución geográfica, identificar la aparición de resistencia antimicrobiana y las asociaciones clínicas o comportamientos sexuales y desarrollar vacunas. Este caso clínico es el primer informe de infección endocervical por una cepa diferente a *C trachomatis*.

CASO CLÍNICO: Paciente de 25 años, con diagnóstico de infertilidad primaria de 2 años de evolución por factor endocrino-ovárico (sobrepeso e hipotiroidismo subclínico) y por factor masculino de hipospermia y teratozoospermia. El cultivo microbiológico endocervical detectó la infección por *Ureaplasma* spp y *Chlamydia* spp. La identificación de la cepa de *Chlamydia* mediante secuenciación del gen 16S del ARNr informó que era *Chlamydia pneumoniae*. La existencia de un plásmido en esta cepa de *C pneumoniae* confirmó que la infección endocervical fue por una cepa de *Chlamydia pneumoniae* no humana.

CONCLUSIÓN: Este caso clínico sugiere la posibilidad de que una cepa de *C pneumoniae* no humana sea capaz de trasmitirse sexualmente a los humanos, estar circulando en la población mexicana y causar infertilidad, aunque aún se desconocen el origen y la dirección de la trasmisión.

PALABRAS CLAVE: *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Ureaplasma urealyticum*; infertilidad femenina; genotipos; resistencia antimicrobiana; vacunas; hipotiroidismo subclínico; teratozoospermia; diagnóstico de infertilidad por *Chlamydia pneumoniae* no humana.

Abstract

BACKGROUND: *Chlamydia trachomatis* is one of the leading sexually transmitted microorganisms that is significantly associated with the development of female infertility. The detection of genotypes and new variants of *Chlamydia trachomatis* allows us to know their prevalence and geographic distribution, identify the appearance of antimicrobial resistance, clinical associations, or sexual behaviors, and develop vaccines. This clinical case reports for the first time endocervical infection by a strain other than *C. trachomatis*.

CLINICAL CASE: A 25-year-old woman with primary infertility of 2 years of evolution due to endocrine-ovarian factor (overweight and subclinical hypothyroidism) and male factor characterized by hypospermia and teratozoospermia. Endocervical microbiological culture detected infection by *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia* spp. Identification of the *Chlamydia* strain by sequencing the 16S rRNA gene reported that it was *Chlamydia pneumoniae*. The presence of plasmid in this strain of *C. pneumoniae* no humana.

¹ Laboratorio de Virología, Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.

² Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

Recibido: febrero 2021

Aceptado: junio 2021

Correspondencia

Fernando Martín Guerra Infante
fguerra_96@yahoo.com

Este artículo debe citarse como:

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.



pneumoniae confirmed that the endocervical infection was by a non-human *Chlamydia pneumoniae* strain.

CONCLUSION: This clinical case suggests that a non-human strain of *C. pneumoniae* can be sexually transmitted to humans, circulating in the Mexican population, and causing infertility, although the origin and direction of transmission are still unknown.

KEYWORDS: *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Ureaplasma urealyticum*; Female infertility; Genotypes; Antimicrobial resistance; Vaccines; Subclinical Hypothyroidism; Teratozoospermia; Infertility Diagnosis of non-human *Chlamydia pneumoniae*.

ANTECEDENTES

Tanto *Chlamydia trachomatis* como *Chlamydia pneumoniae* causan una importante cantidad de infecciones en el hombre. *C trachomatis* es la que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones de transmisión sexual.^{1,2} *C trachomatis* favorece la aparición de diversas complicaciones; en las mujeres provoca: enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico e infertilidad por factor tubárico.³ En los hombres produce: uretritis no gonocócica, epididimitis y orquitis.^{1,2}

Las infecciones por *Chlamydia pneumoniae*, al igual que las de *C trachomatis*, en su mayoría son asintomáticas y se manifiestan como neumonía adquirida en la comunidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o faringitis.² Si bien los humanos son los principales reservorios de infección por *Chlamydia pneumoniae* este patógeno se ha detectado en diferentes animales: koalas, caballos, bandicoots, anfibios y reptiles.²

Aunque se carece de una confirmación de infección activa en el endocervix por otras especies de *Chlamydia* existen reportes de la búsqueda de *Chlamydia pneumoniae* en mujeres. Li y su grupo⁴ informaron que no detectaron anti-

cuerpos contra este patógeno en el suero de mujeres con embarazos ectópicos y concluyeron que no había evidencia suficiente para pensar que *Chlamydia pneumoniae* puede trasmisitirse sexualmente. Nueve años después, Whyte y colaboradores⁵ informaron un caso clínico en el que observaron partículas de *Chlamydia pneumoniae* en un lavado pélvico de una mujer de 21 años con sospecha de enfermedad pélvica inflamatoria. La detección se hizo mediante anticuerpos monoclonales anti *Chlamydia pneumoniae*. A pesar de lo anterior no lograron confirmar la existencia de este patógeno en 200 muestras endocervicales analizadas.

Con el avance de las técnicas moleculares se han logrado identificar diferentes genovariantes de *C trachomatis* y nuevas especies de la familia *Chlamydiaceae*.^{2,6} Debido a lo anterior, la caracterización molecular de las cepas de *C trachomatis* es importante para comprender los mecanismos fisiopatológicos de la infección por *Chlamydia* y su dinámica de transmisión con la actividad sexual. La tipificación de las cepas de *C trachomatis* se basa en el análisis de secuencia del gen *ompA*, que codifica para la proteína principal de membrana externa (MOMP).⁶ Durante esta etapa de caracterización molecular nuestro

grupo de investigación detectó la infección endocervical por una especie de *Chlamydia* distinta a *C trachomatis*.

CASO CLÍNICO

Paciente de 25 años que acudió al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes con datos de infertilidad primaria de 2 años, debida a factor endocrino-ovárico (obesidad e hipotiroidismo subclínico) y a factor masculino (hipospermia y teratozoospermia). Estado civil: unión libre, dedicada a las labores del hogar, escolaridad de 12 años. Inicio de la vida sexual activa a los 21 años, 2 parejas sexuales y consumo habitual de alcohol. Su pareja sexual actual es un de 30 años, con diagnóstico y tratamiento de infección por *Chlamydia* en abril de 2019. El análisis seminal reportó: teratozoospermia, con defectos en la cabeza, pieza intermedia y cola en el 99, 93 y 58%, respectivamente. Además, se informó la coexistencia de leucocitos (3 por campo) y eritrocitos (1 por campo), exceso de citoplasma residual y cabezas vacuoladas en el 15% de las células espermáticas.

La muestra endocervical se colocó en un medio de transporte UTM-RT (sistema de medio de transporte universal, Copan Diagnostic Inc. Murrieta CA, EUA). El cultivo microbiológico reportó *Ureaplasma urealyticum*. La detección inicial de *Chlamydia* se hizo mediante PCR en tiempo real con los sistemas automatizados m2000sp y m2000rt de Abbott (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) que informaron un resultado positivo para *C trachomatis*. Para identificar el biovar de esta cepa (ocular, urogenital o linfogranuloma venéreo) se hizo la amplificación del gen de la proteína polimórfica de membrana H (pmpH), tal como lo describieron Escobedo-Guerra y su grupo.⁶ Sin embargo, no hubo amplificación de este gen, lo que sugirió que el ADN identificado no era *C trachomatis*. Debido a esto, la muestra endocervical se cultivó en células McCoy, como

lo describió Chernesky.⁷ Las células infectadas se trataron con sonicación con un sonicador Branson (Branson Ultrasonics Corp. Brookfield, *C trachomatis*, USA). Las partículas de *Chlamydia* liberadas se recuperaron por centrifugación a 10,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Estos cuerpos elementales (EB) se utilizaron para confirmar la existencia de plásmido críptico. Para ello se amplificó un fragmento de la región ORF 2 del plásmido. El ADN de los cuerpos EB se purificó mediante la técnica de fenol-cloroformo, y la amplificación del gen se realizó con una PCR de punto final, descrita por Escobedo-Guerra y colaboradores.⁶ El ensayo de PCR generó un fragmento de 241 pb, lo que confirmó la presencia del plásmido. (Figura 1)

Para identificar la especie de *Chlamydia* causante de la infección cervical se hizo una amplificación del gen rRNA 16S mediante PCR de punto final utilizando los cebadores descritos por Madico y su grupo:⁸ para *C trachomatis* (*C trachomatis* R 70, 5'-GGCGTATTGGG-CATCCGAGTAACG-3' y *C trachomatis* R 71, 5'-TCAAATCCAGCGGGTATTAA CCGC *C trachomatis* -3'); para *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae* 90, 5'-GGT *C trachomatis* CAACCCATCCGTGTCGG-3' y *Chlamydia pneumoniae* 91, 5'-TGC GGAAAG *C trachomatis* GTATT *C trachomatis* ACAGTT-3') y para *C psittaci* (CPS100, 5'-CCCAAGGTG AG G *C trachomatis* GATGAC-3' y CPS101, 5'-CAA-ACCGTC *C trachomatis* AAGACAGTTA-3'); las condiciones de reacción fueron las descritas por Madico y su grupo.⁷ El resultado de la amplificación fue un fragmento de 195 pb, que correspondió a *Chlamydia pneumoniae* (Figura 1B). Este fragmento fue objeto de un análisis de secuencias de nucleótidos y se creó un árbol filogenético. Figura 2

Un mes después de recibir tratamiento con azitromicina la paciente y su pareja se logró el embarazo. El ultrasonido de las 11 semanas

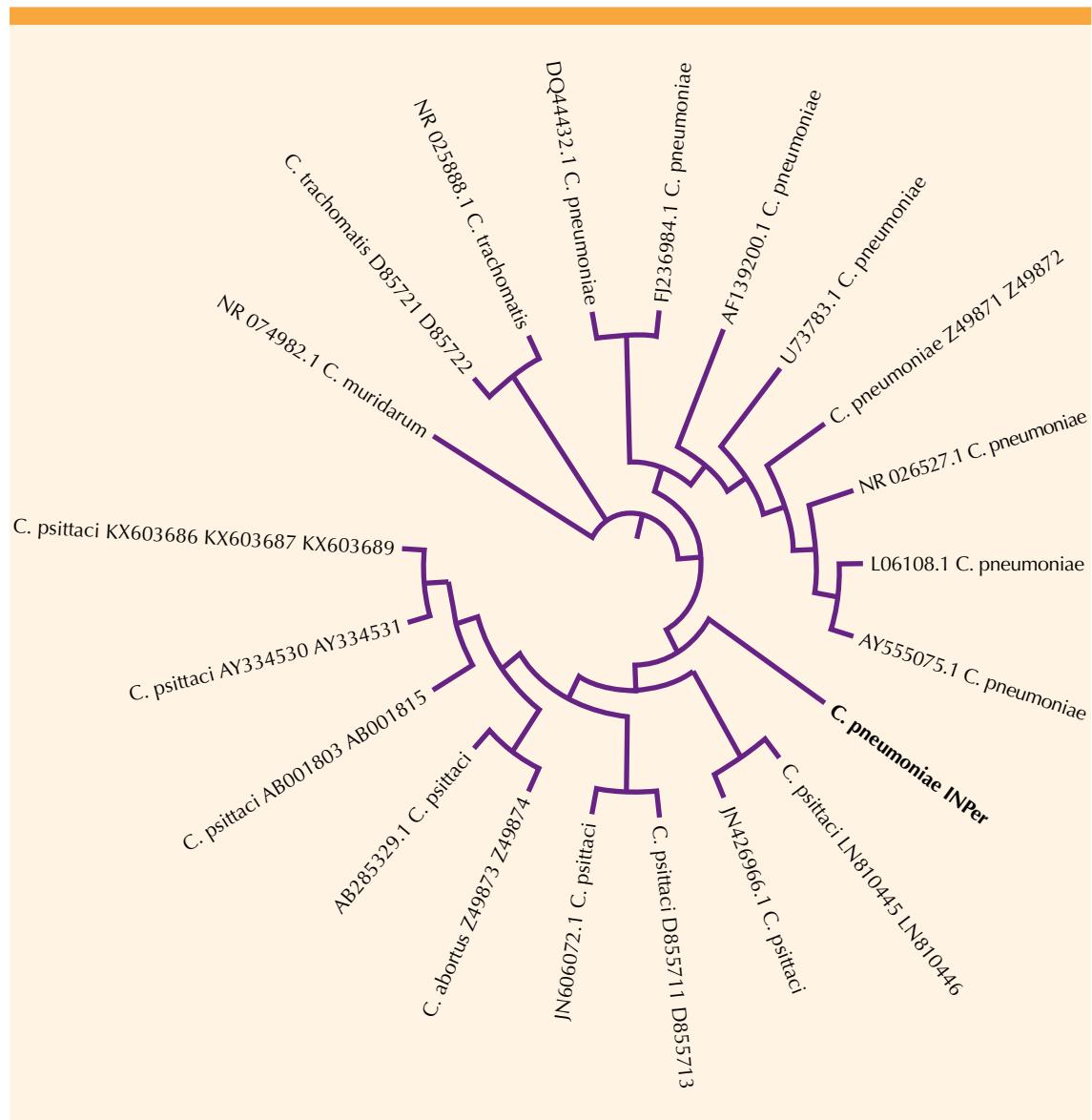
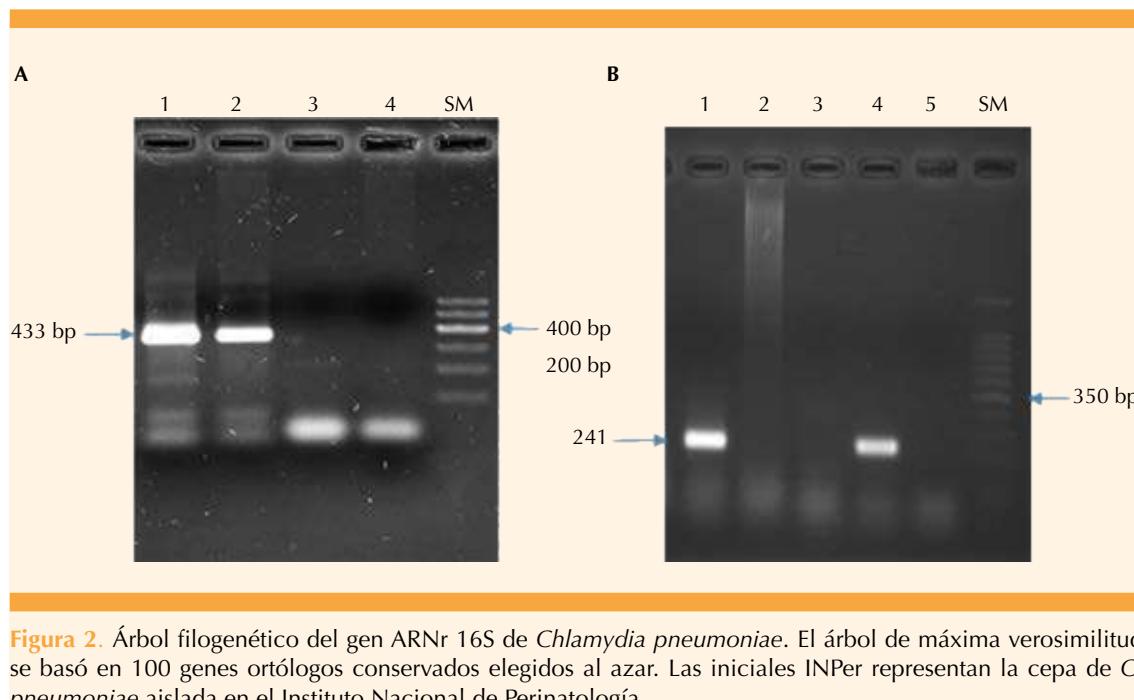


Figura 1. Identificación de ADN de *Chlamydia pneumoniae*.

Carriles 1 y 2) amplificación de 433 pb del gen de ARNr 16s de *Chlamydia* spp a diferentes concentraciones; Carriles 3 y 4) amplificación de 195 pb de *C. pneumoniae* a diferentes concentraciones. SM, marcador de talla molecular de 100 pb.

Carril 1) plásmido de *Chlamydia trachomatis* como control positivo; Carril 2) ADN de células McCoy no infectadas; Carriles 3 y 4) ADN de las cepa de *C pneumoniae* a diferentes concentraciones; Carril 5) control negativo. SM, marcador de talla molecular de 50 pb.



confirmó la gestación. Durante el control prenatal tuvo diabetes gestacional y preeclampsia. El embarazo finalizó a las 37 semanas mediante parto eutóxico y el nacimiento de una niña sana de 3059 g de peso y estatura de 49 cm, Apgar al minuto y 5 minutos de 8 y 9, respectivamente, sin requerimiento de maniobras adicionales.

DISCUSIÓN

Hasta ahora no se ha informado que otras especies diferentes a *C trachomatis* causen infección endocervical. En este estudio se reportó la infección endocervical por *Chlamydia pneumoniae*, afirmación sustentada con la existencia del amplicón de 195 pb del gene ARNr 16S obtenido en el ensayo de PCR con los cebadores de Madico y colaboradores.⁸ La sensibilidad y especificidad informadas de estos cebadores son del 96 y 90%, respectivamente.⁷ La secuencia de este amplicón de 195 pb y el análisis del árbol filogenético describen que esta cepa de *Chlamydia pneumoniae*

se encuentra en el clado de cepas de *C psittaci* y no dentro del clado de las cepas de *Chlamydia pneumoniae*. **Figura 2**

Lo anterior, quizá, se debe a que esta cepa de *Chlamydia pneumoniae* mostró un plásmido (amplicón de 241 pb). Se ha informado que las cepas de *Chlamydia pneumoniae* que infectan a humanos no tienen plásmido.^{2,9} Las únicas cepas de *Chlamydia pneumoniae* con plásmido son las que infectan a animales como: koalas, caballos y bandicots.^{2,10} El plásmido de *Chlamydia pneumoniae* reportado en la bibliografía mide 7.4 kb, muy similar al de *C trachomatis* y *C. muridarum*.^{2,8} Esto apoya lo reportado por Storey y su grupo,⁹ quienes describen que el biovar equino de *Chlamydia pneumoniae* (N16) está directamente relacionado con la cepa TWAR humana (primera cepa de *Chlamydia pneumoniae* identificada que infecta a humanos) con una homología de ADN del 94.5% entre las dos especies de *Chlamydia*. Esto sugirió que las



cepas humanas de *Chlamydia pneumoniae* se adquirieron del contacto con animales.^{2,8,11}

En 2010, Mitchell y su equipo¹¹ investigaron la diversidad genética de 30 aislamientos de diversas ubicaciones geográficas de *Chlamydia pneumoniae* de origen humano y animal. Lo que encontraron sugiere que el genotipo humano se originó a partir de un linaje de anfibios o reptiles. En 2005, Cochrane y su grupo¹² reportaron una infección por *Chlamydia pneumoniae* no humana (rana-koala) en un paciente con aterosclerosis.

La forma en que los pacientes de ese estudio adquirieron la *Chlamydia pneumoniae* no humana se desconoce. Las posibles hipótesis incluyen: zoofilia, infección local del sistema genitourinario a través del sexo oral y contacto directo con animales infectados, solo por mencionar algunos.

En referencia a la zoofilia, Khorvash y colaboradores¹³ al igual que Pinzon y su grupo¹⁴ informaron casos clínicos de pacientes con linfogranuloma venéreo al tener contacto sexual con equinos. Sin embargo, Khorvash y colaboradores¹³ no detectaron ADN de *C trachomatis* o ADN de linfogranuloma venéreo mediante RT-PCR de tejidos fijados en parafina, mientras que Pinzón y su equipo¹⁴ no identificaron el agente etiológico. De forma experimental, Coles y sus coautores¹⁰ informaron que *Chlamydia pneumoniae* de koala es capaz de infectar monocitos humanos y células Hep-2.

En cuanto al hecho extraordinario de que la paciente quedara embarazada quizás se debió a que mejoró la fertilidad en ambos después del tratamiento con azitromicina y que la mujer no tuvo una enfermedad pélvica inflamatoria. El exceso de citoplasma residual y las cabezas

vacuoladas de los espermatozoides pueden deberse a infecciones por *C trachomatis* porque los EB de *C trachomatis* se adhieren y se introducen a las cabezas de los espermatozoides dando un aspecto de células vacuoladas.^{14,15} Quizá la *Chlamydia pneumoniae* no humana puede producir esta infección. El tratamiento antimicrobiano, al parecer, fue efectivo contra esta cepa, lo que mejoró igualmente los parámetros seminales. Los estudios de Pajovic y colaboradores¹⁶ evidenciaron que el tratamiento con antibióticos mejora todos los parámetros seminales: aumento del volumen de eyaculado, un porcentaje más significativo de espermatozoides progresivamente móviles y menos formas anormales.

CONCLUSIÓN

El hallazgo de *Chlamydia pneumoniae* no humana pone en alerta el surgimiento de nuevas genovariantes o de cepas ya conocidas, pero ahora con un gran potencial patógeno. Esto obliga a incluir una mayor variedad de genes en las pruebas de PCR de tiempo real para identificar su origen humano o de especies animales y que permita establecer el diagnóstico e indicar el tratamiento correspondiente para prevenir infecciones de gran impacto en el ámbito ginecológico y obstétrico.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, con número de registro 2019-1-33.

Declaración ética

Esta investigación no implicó ninguna intervención directa en sujetos humanos. La paciente del caso otorgó su consentimiento informado para la publicación del caso clínico.

REFERENCIAS

1. Buder S, Schöfer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, Brockmeyer N. Bacterial sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17 (3): 287-315. doi: 10.1111/ddg.13804
2. Cheong HC, Lee CYQ, Cheok YY, Tan GMY, Looi CY, Wong WF. *Chlamydiaceae*: Diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms* 2019; 7: pii: E146. doi: 10.3390/microorganisms7050146
3. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 2008; 79 (2): 180-9. doi: 10.1095/biolreprod.108.067835
4. Li DK, Daling JR, Wang SP, Grayston JT. Evidence that *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, is not sexually transmitted. *J Infect Dis* 1989; 160: 328-31. doi: 10.1093/infdis/160.2.328
5. Whyte A, Garnett P, Thompson C, McMullen P. *Chlamydia pneumoniae* in the female genital tract. *J Infect* 1998; 36: 245.
6. Escobedo-Guerra MR, Katoku-Herrera M, López-Hurtado M, Villagrana-Zesati JR, de Haro-Cruz MJ, Guerra-Infante FM. Identification of a new variant of Chlamydia trachomatis in Mexico. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2019; 37 (2): 93-99. doi: 10.1016/j.eimc.2018.02.008
7. Chernesky MA. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 39-44. <https://doi.org/10.1155/2005/359046>
8. Madico G, Quinn TC, Boman J, Gaydos CA. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1085-93. doi: 10.1128/JCM.38.3.1085-1093.2000
9. Storey C, Lusher M, Yates P, Richmond S. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol* 1993; 39 (11): 2621-6. doi: 10.1099/00221287-139-11-2621
10. Coles KA, Timms P, Smith DW. Koala biovar of *Chlamydia pneumoniae* infects human and koala monocytes and induces increased uptake of lipids in vitro. *Infect Immun* 2001; 69 (12): 7894-97. doi: 10.1128/IAI.69.12.7894-7897.2001
11. Mitchell CM, Hutton S, Myers GS, Brunham R, Timms P. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. *PLoS Pathog* 2010; 6 (5): e1000903. doi: 10.1371/journal.ppat.1000903
12. Cochrane M, Walker P, Gibbs H, Timms P. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiology* 2005; 151: 2285-90. doi:10.1099/mic.0.27781-0
13. Khorvash F, Keshteli AH, Salehi H, Szeredi L, Morré SA. Unusual transmission route of Lymphogranuloma venereum; following sexual contact with a female donkey. *Int J STD AIDS* 2008; 19 (8): 563-4. doi: 10.1258/ijsa.2008.008073
14. Pinzón RHS, Causil GC, Bayter GCY, Redondo BC, Alvis GN. Venereal lymphogranuloma after sexual contact with a donkey: report of a case in pediatrics. *Cartagena Colombia. Rev Enferm Infect Pediatr* 2012; 27 (102): 234-6.
15. Wølner-Hanssen P, Mårdh PA. In vitro tests of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984; 42 (1): 102-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)47966-5.
16. Pajovic B, Radojevic N, Vukovic M, Stjepcevic A. Semen analysis before and after antibiotic treatment of asymptomatic *Chlamydia* and *Ureaplasma* related pyospermia. *Andrologia* 2013; 45 (4): 266-71. doi: 10.1111/and.12004