

Análisis molecular y filogenético del genotipo F de *Chlamydia trachomatis* aislados en México en 2011

Marisol Basurto-Tranquilino¹, María J. de Haro-Cruz¹, Marcela López-Hurtado² y Fernando M. Guerra-Infante^{2*}

¹Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; ²Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Ciudad de México, México

Resumen

Antecedentes: *Chlamydia trachomatis* es la bacteria que se detecta con mayor frecuencia en las infecciones de transmisión sexual. Se han identificado 20 genotipos de *C. trachomatis* mediante el gen *ompA* y varias genovariantes mediante el análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). En México, el genotipo F es el más frecuente. **Objetivo:** Identificar la existencia de subtipos del genotipo F. **Método:** Se analizaron siete cepas del genotipo F de *C. trachomatis* aisladas en 2011, mediante secuenciación de nucleótidos y mapeo con enzimas de restricción. **Resultados:** El análisis de SNP mostró dos cepas con el mismo SNP en el nucleótido 288 (C288T), mientras que con enzimas de restricción se identificó una variante con diferente RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción) cuando se tratan con la mezcla de enzimas *HinfI* y *TaqI*. **Conclusión:** En México se encuentran dos subtipos del genotipo F y solo las enzimas de restricción *HinfI* y *TaqI* pueden identificar la existencia de uno de estos genotipos F.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*. Genotipo F. Enzimas de restricción. Infertilidad. Genotipos de *Chlamydia*.

Molecular and phylogenetic analysis of the F genotype of *Chlamydia trachomatis* isolated in Mexico in 2011

Abstract

Background: *Chlamydia trachomatis* is the most frequently identified bacterium in sexually transmitted infections. Twenty *C. trachomatis* genotypes have been determined using the *ompA* gene and several genovariants by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. In Mexico, the F genotype is the most frequent. **Objective:** To identify subtypes of the F genotype. **Method:** Seven *C. trachomatis* genotype F strains isolated in 2011 were analyzed by nucleotide sequencing and restriction enzyme mapping. **Results:** SNP analysis showed two strains with the same SNP at nucleotide 288 (C288T), while with restriction enzymes, a variant with different RFLP (restriction fragment length polymorphism) was identified when treated with the mixture of *HinfI* and *TaqI* enzymes. **Conclusion:** In Mexico, there are two subtypes of F, and only with restriction enzymes *HinfI* and *TaqI* can identify one of the genovariants of the F genotype.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*. F genotype. Restriction enzymes. Infertility. *Chlamydia* genotypes.

*Correspondencia:

Fernando M. Guerra-Infante

E-mail: fguerra_96@yahoo.com

Fecha de recepción: 26-09-2023

Fecha de aceptación: 02-11-2023

DOI: 10.24875/PER.23000021

Disponible en internet: 15-02-2024

Perinatol Reprod Hum. 2023;37(3):99-107

www.perinatologia.mx

0187-5337/© 2023. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Publicado por Permayer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Chlamydia trachomatis es la bacteria que se identifica con mayor frecuencia en las infecciones de transmisión sexual (ITS)¹. La incidencia mundial de ITS por *C. trachomatis* reportada es de 131 millones de nuevos casos por año¹. La infección crónica por este patógeno produce diversas patologías en el aparato genito-urinario de mujeres y varones². En la mujer se desarrolla enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad por factor tubario, embarazos ectópicos y dolor pélvico crónico¹. En el varón se desarrolla uretritis no gonocócica, epididimitis y orquitis².

Las cepas de *C. trachomatis* están clasificadas en dos biovariedades, el tracoma, que incluye las cepas A-C que producen una infección ocular y las cepas D-K que infecta células de la mucosa genitourinaria, respiratoria y conjuntival y el biovar LGV (linfogranuloma venéreo), que produce infecciones en los nódulos linfáticos inguinales³. Las cepas de ambos biovars se identificaron mediante serología al reconocer diferentes epítomos de la proteína principal de membrana externa (MOMP), que constituye el 60% de todas las proteínas de superficie³⁻⁵. El análisis serológico de la MOMP identificó 19 serotipos de *C. trachomatis*⁴. Sin embargo, la exploración de la secuencia nucleotídica del gen de la MOMP (*ompA*) que tiene un tamaño molecular aproximado de 1,194 pb, ha evidenciado la existencia de más de 20 genotipos⁵⁻⁷. Lo anterior es debido posiblemente a la recombinación de genética que ocurre entre las diferentes cepas de *Chlamydia*, como se demostró para la cepa L2c de *C. trachomatis*^{3,6}.

Actualmente, los serotipos más frecuentes en el mundo en individuos heterosexuales son D, E y F^{8,9}. Los análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *ompA* del serovar F han reportado que este serovar muestra muy pocas variaciones en las secuencias nucleotídicas (SNP por sus siglas en inglés) con respecto a su cepa prototipo, y a diferencia de lo que ocurre con serotipos G y L2, que muestran un mayor número de SNP^{9,10}. En México, la cepa F es el serovar de *C. trachomatis* que más frecuentemente se ha identificado en mujeres y hombres con infertilidad^{11,12}. Un estudio previo de cuatro cepas del genotipo F aislada e identificadas en 2011, mostraron que dos de ellas presentaban cambios en su secuencia de aminoácidos en las regiones constantes de la MOMP aumentando su avidez por la molécula HLAB27, molécula de histocompatibilidad asociada al desarrollo de enfermedades autoinmunes como la artritis reactiva, enfermedad que se ha asociado a la infección por este patógeno¹³.

El objetivo de este estudio fue hacer un análisis de la homología y analogía de las cepas F aisladas en México con respecto a otras cepas F identificadas a nivel mundial.

Material y métodos

Enzimas de restricción

Todas las enzimas de restricción empleadas en este estudio fueron de Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, EE.UU.): AluI (*Arthrobacter luteus*), PstI (*Providencia stuarti*), HinfI (*Haemophilus influenzae* Rf), HindIII (*Haemophilus influenzae* Rd) y TaqI (*Thermus aquaticus* YT-1).

Genotipo F de *Chlamydia trachomatis*

Se analizaron siete genotipos del serotipo F de *C. trachomatis* que fueron aisladas e identificadas en 2011 de muestras endocervicales de mujeres que asistieron a un hospital de tercer nivel por causas de infertilidad. La identificación del serotipo se realizó mediante la secuenciación nucleotídica de un fragmento de 879 pb. El análisis de secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para ello se empleó un analizador genético ABI-PRISM 310 (PE Biosystem). El producto de 879 pb se obtuvo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Todas las condiciones de reacción de la PCR fueron descritas previamente por de Jesús de Haro-Cruz et al. en 2011¹¹. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas en el programa Bioedit versión 7.2, y se compararon con secuencias reportadas previamente en el Genbank de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El árbol filogenético se diseñó mediante el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA Software versión 11.0), mediante el modelo de máxima parsimonia.

Clonación del gen *ompA* del genotipo F

Para realizar varios análisis y repeticiones con las diversas enzimas de restricción, el producto de amplificación de 879 pb del gen *ompA* de cada una de las cepas a analizar fue clonado al plásmido pGEM-T easy (Promega Corporation. Madison, WI, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del proveedor, de la siguiente manera: a un tubo Eppendorf se le adicionó

7.5 µl del *buffer* de ligación, 1 µl del vector (pGEM-T easy), 3 U/µl de ADN ligasa, 5.5 µl del fragmento de 879 pb y la cantidad necesaria de agua desionizada para alcanzar un volumen final de reacción de 15 µl. El tubo se incubó por 2 h a temperatura ambiente y después a 4 °C toda la noche. Posteriormente este vector fue insertado en células de *Escherichia coli* JM109 competentes, para ello, a un tubo Eppendorf con 100 µl de una suspensión de *E. coli* se le adicionó 0.5 ml de CaCl₂ y 15 µl del vector. Después, el tubo Eppendorf se incubó por 30 min en hielo, posteriormente, el tubo se incubó a 45 °C en baño maría por 45 s y se incubó nuevamente en hielo por 2 min más. Pasado el tiempo de incubación, al tubo Eppendorf se le agregó 400 µl del medio SOC, se mezcló y se incubó por 1 h a 37 °C. Finalmente, la *E. coli* transformada fue sembrada en placas de agar LB con ampicilina. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, las colonias resistentes a la ampicilina se consideraron como bacterias que presentaron el vector y la ligación del producto de 879 pb.

Selección de clonas transformadas y purificación del plásmido

La confirmación de la inserción del plásmido se realizó en aquellas colonias que fueron resistentes a la ampicilina. Para ello, se realizó la extracción del plásmido mediante la técnica de miniprep. La extracción e integridad del plásmido se corroboró mediante electroforesis en agarosa al 0.8%. La amplificación del fragmento de 879 pb del gen *ompA* de *C. trachomatis* mediante PCR corroboró la presencia del vector.

Amplificación del fragmento de 879 pb

La amplificación del fragmento de 879 pb del gen *ompA* de las cepas clonadas se realizó utilizando los iniciadores P3 (5'-TTTTGTTGACGACTT CCGTGTTT-3') y P4 (5'-TTTTCTAGATTTTACCTTGTTCAA T/CTG-3') descritos por Yang et al.¹⁴. En cada reacción se utilizó regulador (1X), 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 25 pM iniciadores, 2.5 U de Taq polimerasa y 5 µl del ADN plasmídico de la *E. coli* transformante. Las condiciones del ensayo de la PCR fueron las siguientes: 35 ciclos de amplificación (que consistió en un minuto a 95 °C, un minuto a 59 °C y un minuto a 70 °C), todo se realizó en un termociclador Techne TC-312 (Scientific Support, Inc., CA, EE.UU.). Los productos de la PCR se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2%. El ADN del

serovar L2 (434/Bu; ATCC VR-902B) y D (UW3/CX; ATCC VR-885D) de *C. trachomatis* se utilizó como controles positivos.

Análisis de RFLP

Los productos de 879 pb del gen *ompA* fueron sometidos a digestión con diferentes endonucleasas de restricción durante diez horas a 37 °C. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. Cada tubo Eppendorf contenía 2 U de la endonucleasa, 8 µl del producto de PCR y 2 µl del *buffer* de la endonucleasa de restricción (2X), posteriormente se incubó el tubo como se describió anteriormente. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%^{11,14}. Cuando se utilizaron dos enzimas se agregó 1 µl de cada enzima y 2 µl del *buffer* compatible para ambas enzimas o el *Multi-Core* (Promega) y se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Para observar el patrón de bandas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en TBE y revelado con bromuro de etidio al 1%.

Análisis *in silico* de sitios de restricción

Para el análisis *in silico* de la acción de las enzimas de restricción se utilizó el programa NEBcutter® V2.0 de New England Biolabs, que indica la frecuencia de corte y la sensibilidad del estado de metilación de la secuencia del ADN a analizar.

Resultados

Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *ompA*

En la [Figura 1](#) se muestra la secuencia nucleotídica del gen *ompA* de las siete cepas F aisladas en México, estas secuencias fueron alineadas con 16 cepas identificadas en diversos lugares y que fueron reportadas en el GenBank durante 2004 al 2019. En el análisis de alineamiento de 776 pb evidenció (el análisis de este tamaño fue debido a que algunas secuencias del gen *ompA* reportadas en GenBank son parciales) que el mayor polimorfismo se encuentra en las regiones variables (VS) de este gen. La cepa F-CDC9 (con número de identificación AY535120.1) aislada en 2004 en EE.UU. mostró la mayor variabilidad en las regiones variables 3 y 4 (VS3 y VS4). En cuanto a las cepas mexicanas, solo se observó SNP en la región VS1 en

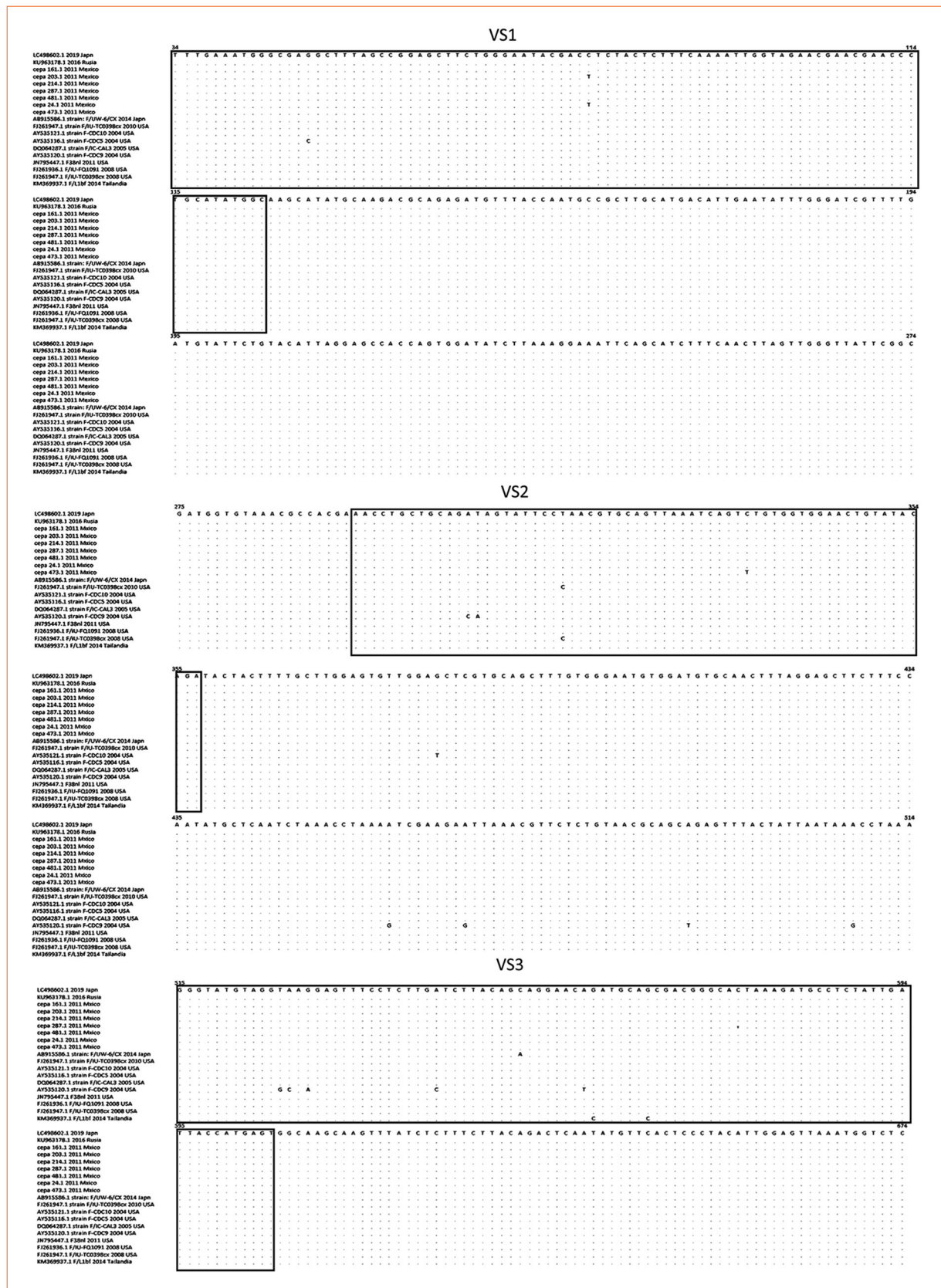


Figura 1. Secuencia nucleotídica del fragmento de 879 pb del gen *ompA* del genotipo F de *Chlamydia trachomatis* (continúa).

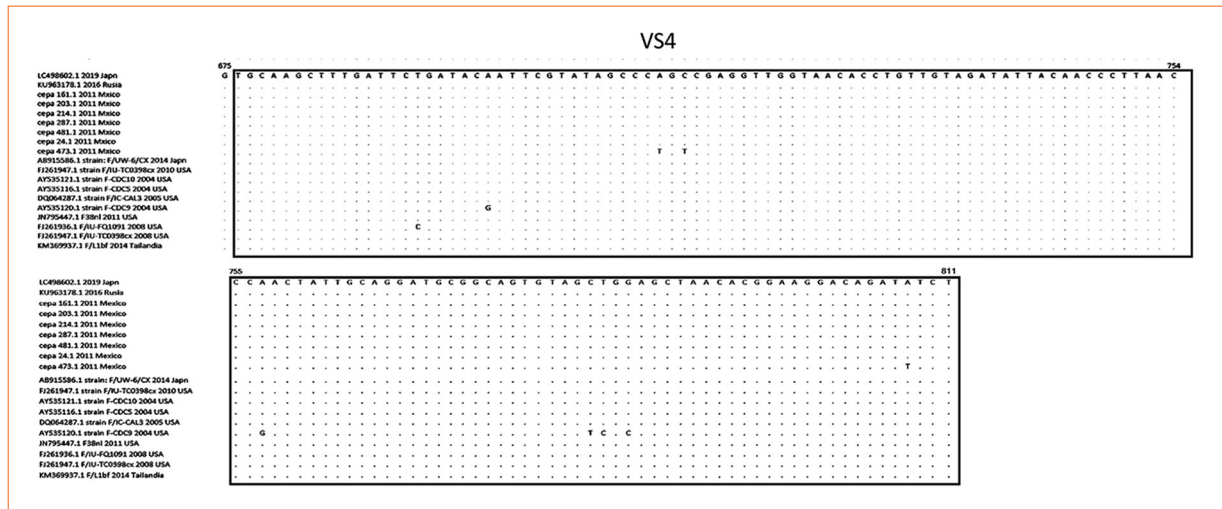


Figura 1. Secuencia nucleotídica del fragmento de 879 pb del gen *ompA* del genotipo F de *Chlamydia trachomatis* (continuación).

Tabla 1. Sitios de mutación en las regiones variables del gen *ompA* de genotipos F de *Chlamydia trachomatis* aislados en México

Cepa	Mutación			Cambio de aminoácido		Cambio en la estructura secundaria	
	Región	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio
24	VS1	78	C → T	26	Thr → Thr	-	-
161	Sin cambios	-	-	-	-	-	-
203	VS1	78	C → T	26	Thr → Thr	-	-
287	VS3	575	C → T	192	Thr → Ile	58	β-plegada → vuelta
473	VS2	335	C → T	112	Ser → Phe	234	β-plegada → vuelta
	VS4	710	A → T	237	Gln → Leu	58	β-plegada → vuelta
	VS4	712	C → T	238	Pro → Ser	306	Vuelta → β-plegada
481	Sin cambios	-	-	-	-	-	-

las cepas 24.1 y 203.1, mientras que la cepa 473.1 mostró el mayor número de SNP en la región VS4.

Otros cambios de nucleótidos fueron observados en la región VS1 (C78T) de la cepa 24; en la cepa 287 en la región VS3 (C575T); en la cepa 161 en la región VS4 (C830A) y en la cepa 473, en las regiones VS2 (C335T) y VS4 (A710T y C712T); cabe señalar que la cepa 473 mostró varios cambios de nucleótidos en la parte final de la región VS4 a partir del nucleótido 807 (Tabla 1).

La Figura 2 muestra el árbol filogenético de las cepas analizadas y la posición que muestran las cepas mexicanas, las cuales se agruparon en 2 clados. Las

cepas 161 y 214 con asociación con cepas de Asia (Tailandia, Rusia y Japón) reportadas entre 2014 y 2019. Las cepas 24, 203, 287, 473 y 481 con cepas de EE.UU. Sin embargo cabe señalar que la cepa 24 se encuentra más distanciada de la cepa 203.

Mapeo de los sitios de restricción

En la Figura 3A se muestran los patrones del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos del gen *ompA* de las cepas F tratadas con la enzima de restricción AluI, fueron identificados cuatro fragmentos con tamaño molecular

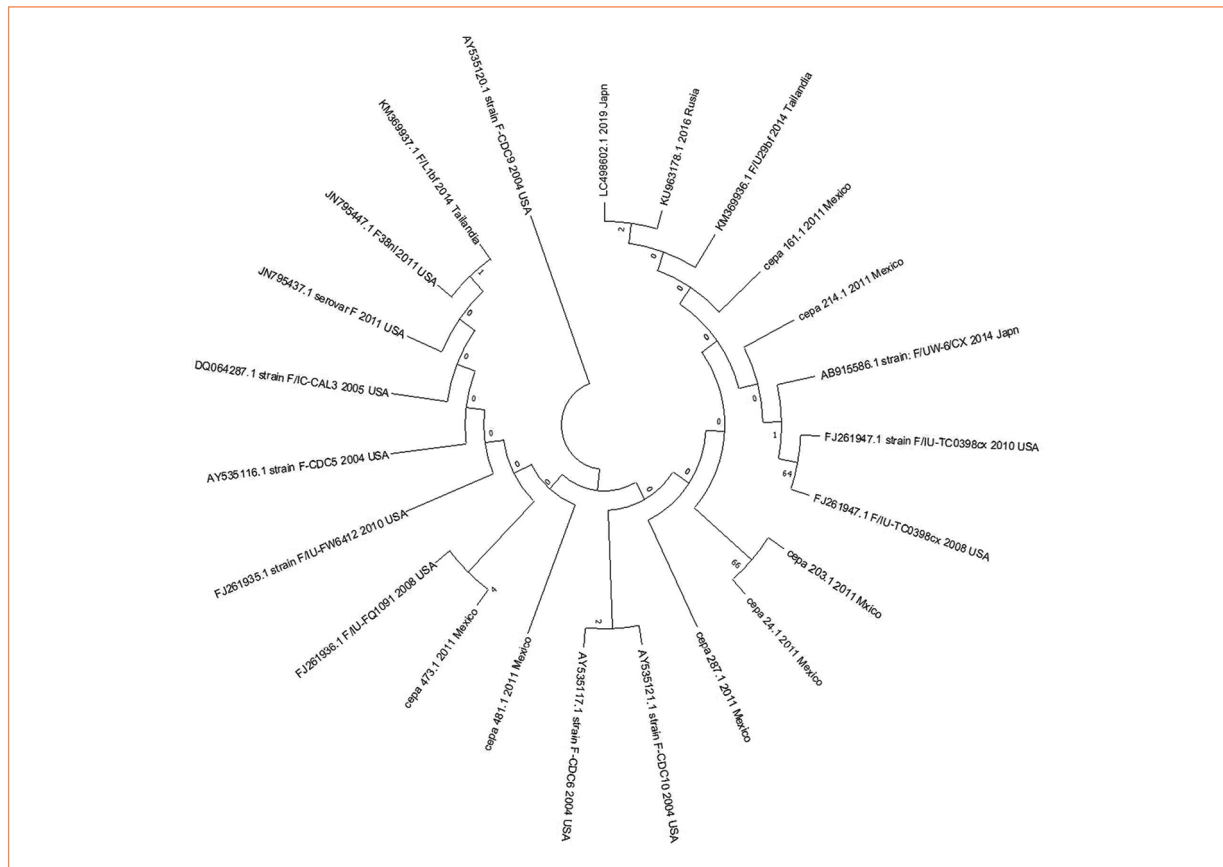


Figura 2. Análisis filogenético del genotipo F identificadas a nivel mundial.

aproximado de 350, 275, 100 y 75 pb. Con la enzima de restricción HindIII (Fig. 3B) se observaron dos fragmentos, uno de aproximadamente 700 pb y otro de 179 pb. Con HinfI (Fig. 3C) se evidenciaron tres bandas de aproximadamente 640, 179 y 60 pb, ninguna diferencia fue observada entre las cepas analizadas. En cuanto al uso de dos enzimas de restricción (Fig. 4), se observó que la combinación AluI y PstI (Fig. 4A) formó entre tres y cuatro fragmentos. La cepa 161 mostró cuatro fragmentos cercanos a 350, 250, 100 y 75 pb, mientras que las cepas 24, 214, 473 y 481 identificaron tres bandas de aproximadamente 250, 100 y 75 pb. En cuanto a la combinación de las enzimas HinfI y TaqI, el resultado obtenido fue que todas las cepas formaron dos fragmentos, uno de 450 pb y otros de 150 pb, excepto la cepa 473, que formó un fragmento de 150 pb y otro de 130 pb (Fig. 4B).

Por otro lado, mediante el análisis *in silico* utilizando el programa NEBcutter® V2.0 se analizó que las enzimas de restricción HinfI y TaqI identificaron que la cepa 473 y la cepa AY535116.1 de EE.UU. tienen patrones

diferentes de RFLP en la región VS4 con respecto a los demás genotipos analizados (Fig. 5).

Discusión

Conocer la distribución geográfica y la prevalencia de los genotipos y genovariantes de *C. trachomatis* en México es de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que se puede conocer la manera en que estos serovares circulan en la población heterosexual mexicana, así como la aparición de nuevas variantes que estén circulando por el mundo. Actualmente se investiga la importancia evolutiva, clínica y epidemiológica de la recombinación genética de las diferentes cepas de *C. trachomatis*. En 2017, Hadfield et al¹⁵, examinaron 563 genomas de esta bacteria, de los cuales detectaron 1,116 bloques de recombinación putativos, lo que abarcó en promedio 7,5 kb de recombinación genética (IC95%: 7.0-8.0 kb) y cubrieron en promedio 246 kb por aislado (23% del genoma) con una *r/m* media de 0.31. Uno de los puntos de mayor recombinación que se observaron inicialmente fue en el locus *ompA*¹⁵.

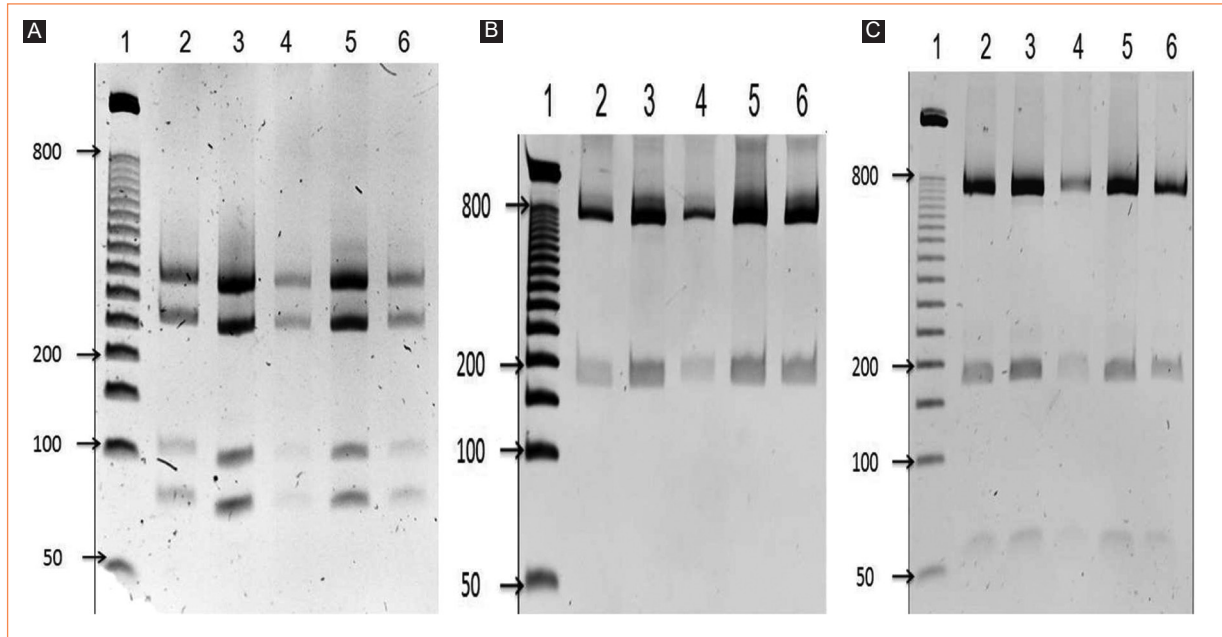


Figura 3. Análisis de RFLP del gen *ompA* de las cepas F tratadas con diferentes enzimas de restricción. **A:** enzima AluI. **B:** HindIII. **C:** HinfI. El análisis se realizó en gel de poliácridamida al 8%. Carril 1, marcador de tamaño molecular; carril 2, cepa 24; carril 3, cepa 161; carril 4, cepa 214; carril 5, cepa 473, y carril 6, cepa 481. AluI: *Arthrobacter luteus*; HinfI: *Haemophilus influenzae* Rf; HindIII: *Haemophilus influenzae* Rd; RFLP: polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*).

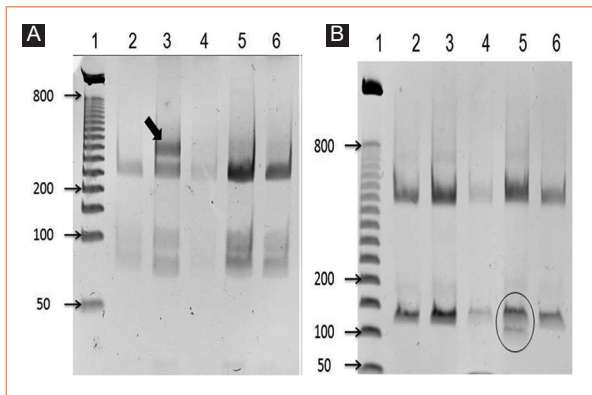


Figura 4. Análisis de RFLP del gen *ompA* de las cepas F tratadas con la combinación de endonucleasas. **A:** enzimas AluI y PstI. **B:** HinfI y TaqI. El análisis se realizó en gel de poliácridamida al 8%. Carril 1, marcador de tamaño molecular; carril 2, cepa 24; carril 3, cepa 161; carril 4, cepa 214; carril 5, cepa 473 y carril 6, cepa 481. AluI: *Arthrobacter luteus*; PstI: *Providencia stuarti*; HinfI: *Haemophilus influenzae* Rf; TaqI: *Thermus aquaticus* YT-1; RFLP: polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*).

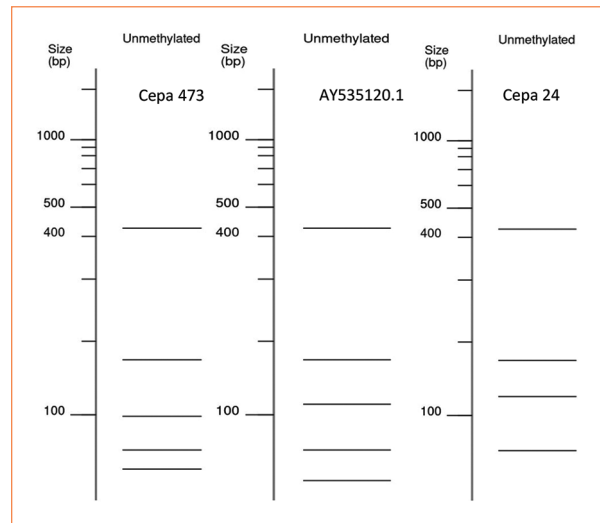


Figura 5. Análisis *in silico* del genotipo F de *Chlamydia trachomatis* tratadas con las endonucleasas HinfI y TaqI. Para este análisis se utilizó el programa NEBcutter® V2.0 de New England Biolabs. HinfI: *Haemophilus influenzae* Rf; TaqI: *Thermus aquaticus* YT-1.

El gen *ompA* ha sido útil para identificar los diferentes genotipos de *C. trachomatis*. Del 60-70% de los casos de infección urogenital por este patógeno son los

genotipos E y F los que han experimentado una recombinación genética reciente y una expansión del linaje con pocas variaciones en el gen *ompA*¹⁶. En la zona

conurbada de Ciudad de México (CDMX), el genotipo identificado más frecuentemente es el F seguido del E y D, mientras que en la Ciudad de Guadalajara es el E seguido del F y D^{11,12,17}. En recientes estudios realizados en la CDMX en 2022¹², el genotipo F sigue siendo el más dominante y no ha variado en su prevalencia (50% son del genotipo F), y como se ha informado, el genotipo F es uno de los que muestran menor variabilidad genética a nivel mundial, tal y como se observa en el árbol filogenético analizado de 777 pb de este estudio, a excepción de la cepa F-CDC9 (AY535120.1), que fue aislada e identificada en 2004 en EE.UU.¹⁸, y que al parecer no se ha expandido a otras partes del mundo. Sin embargo, es importante señalar que solo se analizaron las regiones VS1-VS4 debido a que varias de las secuencia nucleotídicas del gen *ompA* reportadas en el Gen Bank son secuencias parciales.

Como se describió anteriormente, solo el 6.3% de las cepas F inscritas en el Gen Bank muestran SNP, y como en México hay un alto porcentaje de individuos infectados por el genotipo F es necesario demostrar si estas cepas muestran variación genética que indique si son clados específicos de México. El análisis de las secuencias nucleotídicas de las cepas 473 y 481 fueron muy similares a las cepas de EE.UU., mientras que las cepas 161 y 214 a cepas de Japón, Rusia, Tailandia y EE.UU. Por último, las cepas 24, 203 y 287 fueron cercanas a las cepas de EE.UU. Aunque, posiblemente, las cepas 24 y 203 son cepas específicas de México al mostrar un SNP en la posición 288 que muestra un cambio de una citosina (C) por una timina (T) (C288T), sin haber modificación en el aminoácido ni con las enzimas de restricción utilizadas en este estudio. Es importante indicar que la cepa 473 mostró mayor polimorfismo en la región VS4 y diferencias en el patrón de RFLP con la mezcla de enzimas HinfI y TaqI, que no se observaron con otras cepas mexicanas, lo que sugiere que posiblemente es una cepa regional.

Se ha informado que la ubicación geográfica de donde se aíslan las cepas está asociada significativamente con la distancia filogenética entre los linajes urogenitales de *Chlamydia*^{4,10}. Debido a lo anterior hay cierta similitud entre las cepas americanas con las mexicanas, sin embargo también existe relación con cepas japonesas y tailandesas, lo que significa que la globalización social participa de manera sustancial en la importación de cepas de *C. trachomatis* a diversas regiones de México y del mundo.

Finalmente, se observó que mediante el mapeo con las enzimas de restricción HinfI y TaqI se puede identificar la existencia de genovariantes del genotipo F

como se observa con la cepa 473 y la cepa AY535116.1 de EE.UU. que muestran patrones diferentes de RFLP en la región VS4 con respecto a los demás genotipos analizados (Fig. 5). Un estudio realizado en 2019 por Feodorova et al¹⁰, demostró la presencia de genovariantes dentro de los genotipos de *C. trachomatis*. El análisis de SNP del gen *ompA* (fragmento de 1,156 pb) en muestras de individuos eslavos (E>G>D) y no eslavos (E>G>K) encontró 13 variantes o subtipos del gen *ompA*, como E (E1, E2, E6), G (G1, G2, G3, G5), F1, K, D (D1, Da2), J1 y H2. A diferencia de este, Feodorova et al¹⁰, no encontraron una alta frecuencia del genotipo F como sucede en México, por lo que posiblemente también existen subtipos o genovariantes del genotipo F o se están desarrollando estas. Debido a lo anterior es necesario seguir realizando estudios al respecto.

Conclusiones

En México existen dos subtipos del genotipo F y solo las enzimas de restricción HinfI y TaqI pueden identificar la existencia de uno de estos genotipos F.

Financiamiento

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o con ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo y no han utilizados datos o información de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Para este estudio los autores no requirieron el consentimiento informado ya que estas cepas fueron obtenidas del biobanco del departamento.

Bibliografía

1. Phillips JA. Chlamydia infections. Workplace Health Saf. 2019;67:375-6.

2. Land JA, van Bergen JEAM, Morré SA, Postma MJ. Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update*. 2009;16:189-204.
3. Abdelsamed H, Peters J, Byrne G. Genetic variation in Chlamydia trachomatis and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol*. 2013;8:1129-46.
4. Rodrigues R, Sousa C, Vale N. Chlamydia trachomatis as a current health problem: Challenges and opportunities. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12:1795.
5. Brunelle BW, Sensabaugh GF. The ompA gene in Chlamydia trachomatis differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect Immun*. 2006;74:578-85.
6. Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, et al. Hypervirulent Chlamydia trachomatis clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L(2)) and D lineages. *mBio*. 2011;2:e00045-11.
7. Gomes JP, Nunes A, Florindo C, Ferreira AM, Santo I, Azevedo J, et al. Lymphogranuloma venereum in Portugal. Unusual events and new variants during 2007. *Sex Transm Dis*. 2009;36:88-91.
8. Kapil R, Press CG, Hwang ML, Brown L, Geisler WM. Investigating the epidemiology of repeat Chlamydia trachomatis detection after treatment by using C. trachomatis OmpA genotyping. *J Clin Microbiol*. 2015;53:546-9.
9. Chen Y, Chen J, Yang L, Jiang Y, Li L, Yi W, et al. Distribution of Chlamydia trachomatis genotypes in infective diseases of the female lower genital tract. *Med Sci Monit*. 2017;23:4477-81.
10. Feodorova VA, Konnova SS, Saltykov YV, Zaitsev SS, Subbotina IA, Polyagina TI, et al. Chlamydia trachomatis multilocus sequence types and genovar distribution in chlamydia infected patients in a multi-ethnic region of Saratov, Russia. *PLoS One*. 2018;13:e0195386.
11. de Jesús de Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, et al. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:102-8.
12. López-Hurtado M, Escarcega-Tame MA, Escobedo-Guerra MR, de Haro-Cruz MJ, Guerra-Infante FM. Identification of Chlamydia trachomatis genotypes in Mexican men with infertile women as sexual partners. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2022;40:353-8.
13. Guerra-Infante FM, Basurto-Tranquilino M, de Haro-Cruz MJ, López-Hurtado M. Genomic analysis and amino acid gene ompA of Chlamydia trachomatis serotype F isolated in Mexico. *Rev Invest Clin*. 201;63:544-6.
14. Yang C, Maclean I, Brunham R. DNA sequence polymorphism of the Chlamydia trachomatis omp1 gene. *J Infect Dis*. 1993;168:1225-30.
15. Hadfield J, Harris SR, Seth-Smith HMB, Parmar S, Andersson P, Giffard PM, et al. Comprehensive global genome dynamics of Chlamydia trachomatis show ancient diversification followed by contemporary mixing. *Genome Res*. 2017;27:1220-9.
16. Thapa J, Watanabe T, Isoba M, Okubo T, Abe K, Minami K, et al. Chlamydia trachomatis isolated from cervicovaginal samples in Sapporo, Japan, reveals the circulation of genetically diverse strains. *BMC Infect Dis*. 2020;20:53.
17. Casillas-Vega N, Morfín-Otero R, García S, Llaca-Díaz J, Rodríguez-Noriega E, Camacho-Ortiz A, et al. Frequency and genotypes of Chlamydia trachomatis in patients attending the obstetrics and gynecology clinics in Jalisco, Mexico, and correlation with sociodemographic, behavioral, and biological factors. *BMC Womens Health*. 2017;17:83.
18. Millman K, Black CM, Johnson RE, Stamm WE, Jones RB, Hook EW, et al. Population-based genetic and evolutionary analysis of Chlamydia trachomatis urogenital strain variation in the United States. *J Bacteriol*. 2004;186:2457-65.