

Detección de *Mycoplasma genitalium* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras urogenitales de individuos cubanos sexualmente activos

Brian Arturo Mondeja-Rodríguez,^{1*} Jørgen Skov Jensen,² Nadia María Rodríguez-Preval,¹ Milena Capote-Tabares,¹ Islay Rodríguez-Gonzalez,³ Carmen Fernández-Molina¹

¹ Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; Avenida Novia del Mediodía Km 6 ½. P.O. Box: 601. Marianao 13. La Lisa, La Habana. Cuba.

² Mycoplasma Laboratory, Statens Serum Institut; Copenhagen, Dinamarca.

³ Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Espiroquetas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.

email: bmondeja@ipk.sld.cu

El diagnóstico de las infecciones por *Mycoplasma genitalium* mediante métodos bacteriológicos tradicionales resulta laborioso y poco práctico. Es por ello que los métodos moleculares basados en la amplificación del ADN se utilizan con fines diagnósticos de las infecciones causadas por este microorganismo. En Cuba se han realizado pocos estudios sobre la presencia de *M. genitalium* en el tracto urogenital. El objetivo de la presente investigación fue detectar *M. genitalium* en individuos cubanos sexualmente activos mediante la implementación de métodos de PCR simple. Se implementaron dos PCR simples para la detección de fragmentos de 427 pb del gen ARN ribosomal 16S y 281 pb del gen de la adhesina celular MgPa de *M. genitalium*, que se evaluaron en muestras de exudado endocervical provenientes de 300 mujeres con sintomatología urogenital y muestras de orina de 49 hombres asintomáticos sexualmente activos. Se logró un límite de detección de la PCR del ARNr 16S de aproximadamente 5 copias de genoma por reacción, mientras que para la PCR MgPa se logró la amplificación de solo 50 copias de genoma por reacción. El 3% (10/300) de los exudados endocervicales y el 24,5% (12/49) de las muestras de orina de hombres asintomáticos resultaron positivas mediante ambas PCR. El mayor porcentaje de muestras positivas correspondió a las muestras de orina provenientes de hombres asintomáticos, que resultó superior a lo esperado. El presente trabajo permitirá realizar estudios futuros de caracterización genética y antigénica de las cepas de *Mycoplasma genitalium* circulantes en Cuba, útiles para conformar un inmunógeno vacunal.

Palabras clave: *Mycoplasma genitalium*, PCR, MgPa, ARNr 16S.

Introducción

Mycoplasma genitalium (*M. genitalium*) es una de las especies de micoplasmas de origen humano y se reconoce como el organismo de vida libre más pequeño capaz de autorreplicarse. Su genoma de 580 kb está compuesto por 500 genes, el número mínimo de estos genes se encuentran involucrados en la síntesis de elementos estructurales, vías metabólicas y componentes de la maquinaria de síntesis proteica, lo que coloca a esta especie como modelo del concepto de "células mínimas o básicas" (1).

En un principio *M. genitalium* se asoció únicamente con la uretritis no gonocócica en el hombre; sin embargo, en la actualidad se reconocen otras enfermedades tanto en hombres como en mujeres que también se asocian a este patógeno (2-4).

En las mujeres, *M. genitalium* es uno de los agentes etiológicos fundamentales de cervicitis mucopurulenta,

uretritis, enfermedad pélvica aguda y leucorrea, mientras que la asociación de dicho microorganismo a la vaginosis bacteriana e infertilidad aún no está definida (1, 2).

El diagnóstico de las infecciones por *M. genitalium* mediante métodos bacteriológicos convencionales resulta laborioso y poco práctico, pues demora hasta 90 días en crecer en medios de cultivo específicos para micoplasmas, debido a su limitado metabolismo. Por otra parte, dada la homología antigénica y la consecuente reactividad cruzada entre *M. genitalium* y *Mycoplasma pneumoniae*, las herramientas serológicas carecen de especificidad en la práctica diaria. Es por ello que los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen herramientas sensibles, específicas y rápidas para la detección de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas (2, 4-8).

* Licenciado en Microbiología; MSc Bacteriología-Micología; Aspirante a Investigador.

En Cuba existen pocos estudios sobre la presencia de *M. genitalium* en el tracto urogenital de hombres con uretritis (9) y hasta el momento no hay evidencia de la detección de este patógeno en muestras urogenitales de mujeres, ni en muestras de orina de individuos de ambos sexos (9). Esta investigación tiene como objetivo determinar la presencia de *M. genitalium* en individuos cubanos con y sin sintomatología urogenital mediante la implementación de dos ensayos de PCR en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNRIM-IPK).

El presente trabajo contribuye a la implementación de métodos diagnósticos rápidos y confiables para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas, lo que permitirá realizar estudios de caracterización genética y antigénica de las cepas de *M. genitalium* circulantes en Cuba, útiles para conformar un inmunógeno vacunal.

Materiales y Métodos

Diseño y periodo del estudio

Se realizó un estudio analítico de corte transversal, a partir de la implementación de métodos de PCR para la detección de *M. genitalium* y su evaluación en muestras clínicas de individuos cubanos sexualmente activos, entre los meses de enero de 2011 a septiembre de 2012. A cada individuo se le informó verbalmente sobre las características de la investigación y luego se obtuvo el consentimiento informado para participar en la misma. El protocolo de la presente investigación se aprobó por la comisión científica especializada de microbiología y por la comisión de ética del IPK.

Muestras (individuos y toma de muestras)

Se realizó un estudio a partir de muestras urogenitales que incluyó 300 muestras de exudado endocervical provenientes de pacientes femeninas con diagnóstico clínico de afecciones genitourinarias (27 casos con cervicitis mucopurulenta, 10 casos con vaginosis bacteriana, 30 casos con enfermedad pélvica inflamatoria, 40 casos con leucorrea y 15 casos con uretritis) o atendidas en la consulta de fertilidad (178 mujeres) que acudieron al Laboratorio Clínico del Hospital del IPK para estudios de infecciones urogenitales durante los meses de abril de 2011 a julio de 2012.

Las edades de dichas pacientes oscilaron entre los 16 a 49 años. Las muestras se recolectaron mediante la metodología descrita para este tipo de examen microbiológico (3, 8, 12); brevemente, se tomó un hisopado, se inoculó en un tubo con 2,5 mL de medio Friis (10) e inmediatamente se trasladó al LNRIM-IPK, en un contenedor de bioseguridad refrigerado.

Además, se colectaron 49 muestras de orina (7) a partir de individuos masculinos voluntarios sin sintomatología urogenital y sexualmente activos, cuyas edades se encontraban comprendidas entre los 20 a 23 años. Para ello, se solicitó a cada individuo su disposición a participar en el estudio, así como si presentaban algún síntoma uretral (ardor o secreción). Aquellos individuos que mostraron los síntomas anteriormente mencionados se excluyeron del grupo de estudio. Las muestras se recolectaron entre julio-octubre de 2012; para ello se le solicitó a cada participante una muestra de 30 mL de orina de la primera micción de la mañana, cuyas muestras se trasladaron inmediatamente al LNRIM-IPK en un contenedor de bioseguridad refrigerado. Una vez en el laboratorio, las mismas se centrifugaron a 17000 rpm durante 30 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2,5 mL de medio Friis homogeneizado en vórtex. Las muestras urogenitales en medio Friis se dividieron en alícuotas de 0,25 mL y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

Extracción de ADN a partir de las muestras clínicas

A partir de las muestras de exudado endocervical se realizó la extracción del ADN por el método de choque osmótico y térmico modificado. Se centrifugó 1 μ L de muestra (medio Friis inoculado con muestra clínica) durante 30 min a 13000 rpm en un vial estéril; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS 1X estéril homogeneizado en vórtex. Seguidamente, se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm. Luego se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0,1 mL de agua ultrapura estéril homogeneizando en vórtex.

El vial se calentó a 100 °C durante 10 min e inmediatamente se colocó en un recipiente con hielo; posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se tomó el sobrenadante. El extracto se conservó a -80 °C hasta su utilización.

Para la extracción del ADN a partir de las muestras de orina se utilizó el método de extracción con Chelex 100 al 5% en tampón Tris-EDTA (TE) (13). Se descongeló una alícuota de 0,25 mL del sedimento de la orina resuspendido en medio Friis y se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm en un vial estéril. Se desechó el sobrenadante por inversión del vial y se resuspendió el sedimento en el remanente del sobrenadante (aproximadamente 0,05 mL) homogeneizado en vórtex. Seguidamente se adicionó el sedimento a un vial con 0,1 mL de Chelex 100 al 5% en tampón TE.

Luego se homogenizó en vórtex y el vial se calentó a 100 °C durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente; posteriormente se homogenizó en vórtex y se centrifugó a

13000 rpm durante 5 min, se tomó el sobrenadante y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

Como control positivo de extracción se utilizó 1 mL de cultivo de *M. genitalium* G37^T (10⁴ equivalentes de genomas por μ L) en medio Friis y como control negativo 1 mL de agua ultrapura estéril. Ambos controles se sometieron al mismo procedimiento de extracción que las muestras clínicas.

Estandarización y evaluación de las PCR simples para *M. genitalium*

Preparación de los patrones de ADN de *M. genitalium*

La cepa tipo de *M. genitalium* G37^T (ATCC 33530) se cultivó en un frasco de cultivo celular con 50 mL de medio de cultivo Friis durante 7 días a 37 °C en una incubadora de forma estática. El cultivo se centrifugó a 17000 rpm durante 30 min a 4 °C y a partir del sedimento celular obtenido se procedió a la extracción de ADN mediante el estuche comercial *High Pure DNA Template Preparation Kit* (Roche, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto de ADN se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico (6), se realizaron diluciones decimales seriadas desde 10⁷ copias de equivalentes de genomas por μ L (geq/ μ L) hasta obtener una última dilución 10⁻¹ geq/ μ L.

Normalización de las PCR simple

Se evaluó el PCR simple para la amplificación de un fragmento de 427 pb del gen del ARN ribosomal 16S de *M. genitalium*, se utilizó el juego de cebadores MG16-45F: 5'-TAC ATG CAA GTC GAT CGG AAG TAG C-3' y MG16-447R: 5'-AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG-3' descritos por Jensen y cols. 2003 (11) y otro juego de cebadores para la amplificación de un fragmento de 281 pb del gen de la proteína MgPa de *M. genitalium*: MgPa-1: 5'-AGT TGA TGA AAC CTT AAC CCC TTG G-3' y MgPa-3: 5'-CCG TTG AGG GGT TTT CCA TTT TTG C-3', descritos por Jensen y cols. 1991 (5). Se prepararon tres mezclas de reacción con variaciones en las concentraciones de los cebadores de 0,1; 0,2; 0,4 μ M respectivamente, para un volumen final de 25 μ L. Cada mezcla de reacción contenía: 1X de tampón de PCR 10X (25 mM de MgCl₂ x 6 H₂O; 2 mM de desoxirribonucleótidos; 0,2% de BSA; 0,1 mM de Tris HCl pH 8 y 0,5 M de KCl), los cebadores antes mencionados y 1 U de Taq-polimerasa (Qiagen, Alemania).

Para la determinación del límite de detección en cada una de las mezclas se utilizó como muestra 5 μ L de cada uno de los patrones de ADN de *M. genitalium*, anteriormente preparados. Cada ensayo de PCR se realizó por triplicado en días alternos para garantizar la reproducibilidad de los resultados y en el caso de los ensayos con los patrones de ADN con baja concentración (100-0,1 geq/ μ L) se utilizaron 10 réplicas por dilución. Se seleccionó aquella mezcla con menor número

de copias por reacción que mostró amplificación en el 95% de las réplicas. Como control negativo se utilizaron 5 μ L de agua ultrapura estéril en cada uno de los ensayos.

Programa de amplificación

La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf, Alemania), se utilizó un programa de amplificación común para ambos ensayos de PCR, previamente reportado por Jensen y cols. 2003 (11). La programación comenzó por un ciclo a 95 °C durante 4 min, 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, seguidos de un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Análisis de los productos amplificados

Los productos de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% que contenían 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, se empleó un voltaje de 100 V durante 30 min. La visualización de los resultados se realizó mediante un sistema digital de captura y análisis de imágenes con luz ultravioleta Uvitec (Cambridge, United Kingdom).

Identificación de *M. genitalium* en muestras clínicas mediante PCR simple

Se realizó una PCR simple para el gen del ARNr de *M. genitalium* y se utilizó la mezcla con mejor límite de detección a partir de 5 μ L de cada extracción de ADN que se obtuvo de las muestras clínicas. Como controles positivos se utilizaron 5 μ L de ADN de *M. genitalium* para una concentración final de 50 y 500 geq por reacción y agua ultrapura estéril como control negativo. Todos los resultados positivos para el gen del ARNr de *M. genitalium* se confirmaron mediante la PCR para el gen de la MgPa, utilizando la mezcla de reacción que mostró mejor límite de detección. Las condiciones de amplificación y visualización de los resultados fueron las mismas que para el caso de los ensayos de sensibilidad de las PCR.

Resultados

En la Figura 1A se muestra el resultado del ensayo para la determinación del límite de detección de la PCR simple para un fragmento de 427 pb del ARNr 16S de *M. genitalium*, al utilizar diferentes concentraciones de los cebadores.

Todas las variantes de mezclas mostraron un mismo límite de detección de 5 geq de *M. genitalium* por reacción. Sin embargo, se seleccionó la mezcla 3 (0,4 μ M de cebadores); se tuvo en cuenta que en estas condiciones es posible obtener la amplificación de pequeñas cantidades de ADN de *M. genitalium* y una clara visualización de los amplicones durante la electroforesis, lo cual permitió la utilización de dichas

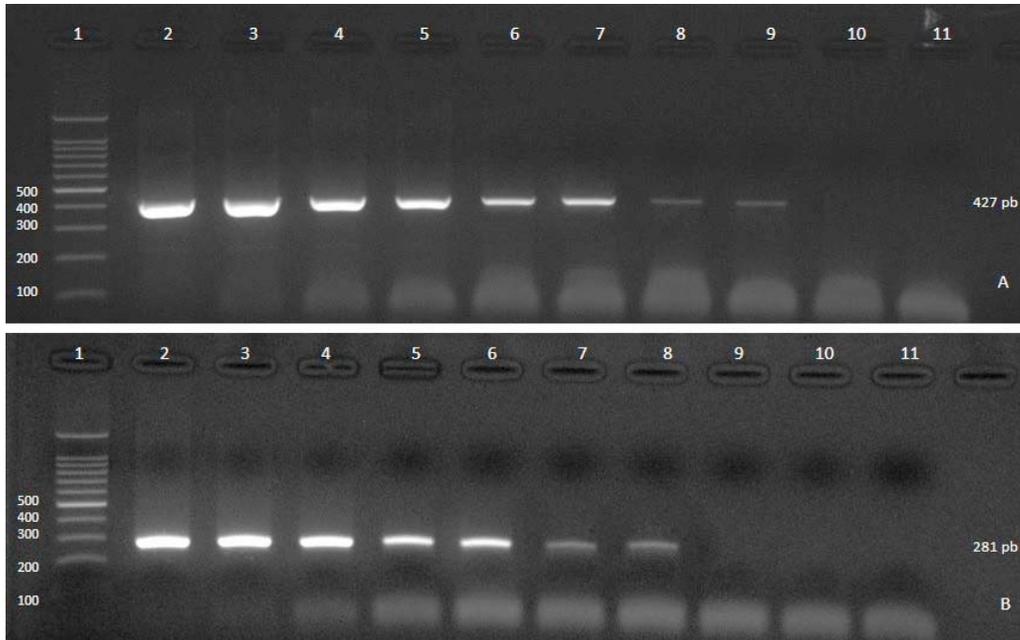


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos obtenidos mediante las PCR del ARNr 16S (A) y MgPa (B) de *M. genitalium* utilizando la mezcla 3. 1- PPM- Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega, EEUU); 2- 5×10^7 geq; 3- 5×10^6 geq; 4- 5×10^5 geq; 5- 5×10^4 geq; 6- 5×10^3 geq; 7- 5×10^2 geq; 8- 50 geq; 9- 5 geq; 10- 5×10^{-1} geq; 11- Control negativo.

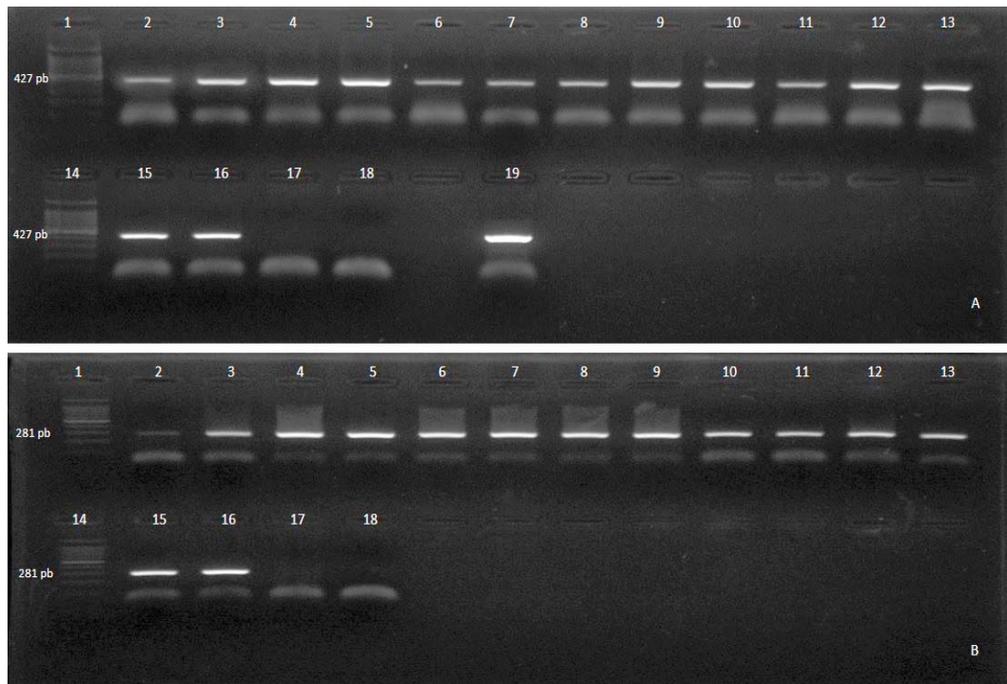


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos obtenidos mediante la PCR c del ARNr 16S (A) y la PCR de MgPa (B) de *M. genitalium* de 12 muestras clínicas positivas (FVU: muestras de orina; EE: exudados endocervicales). 2A: 1- Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega, EEUU); 2- 50 geq de ADN de *M. genitalium* (control positivo); 3- 5×10^2 geq de ADN de *M. genitalium* (control positivo); 4- 1M-FVU; 5- 2M-FVU; 6- 6M-FVU; 7- 9M-FVU; 8- 12M-EE; 9- 31M-EE; 10- 36M-EE; 11- 38M-EE; 12-50M-FVU; 13- 51M-FVU; 14- Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega, EEUU) 15- 297-U; 16- 347-U; 17-Control negativo de extracción; 18-Control negativo de mezcla de reacción; 19- Control positivo de extracción (10^4 geq de *M. genitalium*) 2B: 1- Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega, EEUU); 2- 50 geq de ADN de *M. genitalium* (control positivo); 3- 5×10^2 geq de ADN de *M. genitalium* (control positivo); 4- 1M-FVU; 5- 2M-FVU; 6- 6M-FVU; 7- 9M-FVU; 8- 12M-FVU; 9- 31M-FVU; 10- 36M-FVU; 11- 38M-FVU; 12-50M-FVU; 13- 51M-FVU; 14- Patrón de Peso Molecular de 100 pb (Promega, EEUU) 15- 297-U; 16- 347-U; 17-Control negativo de extracción; 18-Control negativo de mezcla de reacción.

condiciones para la detección eficiente en las muestras clínicas de este patógeno.

En la Figura 1B se muestra el resultado del ensayo para la determinación del límite de detección del PCR simple para un fragmento de 281 pb la MgPa de *M. genitalium* al utilizar diferentes concentraciones de los cebadores. Al contrario de la PCR para el ARNr 16S, en este ensayo se obtuvo el menor límite de detección de 50 geq con una concentración de cebadores de 0,4 μ M (mezcla 3), por lo que estas condiciones se seleccionaron para la PCR confirmatoria de las muestras que se detectaron como positivas mediante la PCR del ARNr de 16S.

Al evaluar la PCR simple para el ARNr 16S en las muestras clínicas se obtuvo la amplificación eficiente de los controles positivos y no se detectó contaminación de las reacciones de PCR durante la extracción del ADN, pues no se observó la presencia de amplicones en los controles negativos de extracción y de mezcla de reacción (Fig. 2A). Mediante este ensayo se obtuvo un 3% (10/300) de positividad en las muestras de exudado endocervical, mientras que en las muestras de orina se obtuvo un 24,5% (12/49) de positividad. Todas las muestras positivas se confirmaron mediante la PCR para la MgPa, al utilizar las condiciones anteriormente seleccionadas. No se obtuvo resultados discordantes entre ambos ensayos, todas las muestras positivas al PCR simple para el ARNr 16S se confirmaron como positivas para la MgPa (Fig. 2B).

Discusión

M. genitalium es un patógeno urogenital reemergente en el mundo. Para el diagnóstico de las infecciones causadas por este patógeno se requiere de ensayos con una alta sensibilidad (bajo límite de detección), dado que se encuentra en baja concentración en las muestras clínicas obtenidas (exudados endocervicales y orina) (14). Las muestras clínicas que se utilizan para el diagnóstico de infecciones por dicho patógeno en mujeres incluye: exudado vaginal, exudado uretral y exudado endocervical (1, 2, 4); mientras que en hombres se utiliza el exudado uretral (1, 3, 6). El uso de la orina como muestra clínica para el diagnóstico de *M. genitalium* es más ventajoso porque no es invasiva ni dolorosa a diferencia de las otras muestras clínicas (exudado uretral y endocervical, principalmente) (7, 8).

La fisiopatología de la infección por *M. genitalium* en el humano se caracteriza por una etapa de colonización del epitelio urogenital, que sigue a una etapa aguda de multiplicación activa del micoplasma, la inflamación del tejido y la consecuente aparición de signos y síntomas urogenitales. Si durante esta fase no se aplica la terapia antimicrobiana correspondiente, la infección se convierte en crónica, en la mayoría de los casos, ocurre la desaparición total o parcial

de las manifestaciones clínicas con la falsa suposición de "cura" por los pacientes, mientras que continúa la multiplicación de *M. genitalium* en el epitelio urogenital (1,14).

El cultivo bacteriológico de *M. genitalium* no resulta práctico, ya que este microorganismo demora varios meses en crecer en cultivos celulares y hasta seis meses para su adaptación a medios libres de células (3). En este sentido, el diagnóstico rápido de laboratorio solo es posible mediante métodos moleculares. Sin embargo, es necesario que estos métodos, basados principalmente en la PCR, tengan un bajo límite de detección (alta sensibilidad) y sean específicos (1, 3). En la presente investigación se evaluaron dos PCR simples para la detección de *M. genitalium*, se utilizaron como secuencias dianas los genes del ARNr 16S y de la adhesina celular (MgPa). Estos genes se reportan en la literatura como los de mayor sensibilidad y especificidad (3). Aunque las condiciones de amplificación originales en su mayoría se mantienen en la presente investigación, se modificaron algunos parámetros como el tipo de enzima, composición y volumen final de la mezcla de reacción.

Estas modificaciones pueden causar disminución de la sensibilidad de los ensayos de la PC, como se plantea en la publicación original de la PCR simple del ARNr del 16S, por Jensen y cols. 2003 (5, 11). En dicho reporte se encontraron diferencias en el límite de detección del ensayo al utilizar diferentes enzimas y condiciones de amplificación. Además, la utilización de una super-*Taq* polimerasa en vez de una *Taq* común aumentó el rendimiento de amplicones considerablemente, lo que facilita la visualización durante la electroforesis de los productos de la amplificación de muestras clínicas con baja concentración de *M. genitalium* (5, 11). Estas observaciones enfatizan la importancia de una evaluación cuidadosa de los ensayos de la PCR, siempre que se varíe o amplifique cuales quiera de los parámetros de la reacción (11).

En la presente investigación se utilizó una enzima *Taq*-polimerasa, no *hot-star* común, así como un tampón de PCR con componentes distintos a los que se reportan en el artículo original, por lo que hace necesario evaluar y normalizar estas nuevas condiciones antes de que se utilicen para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas. Aun cuando se introdujeron modificaciones, el límite de detección que se obtuvo en ambos ensayos de PCR resulta similar al que se reporta en los artículos originales de la PCR simple para la MgPa y el ARNr 16S, respectivamente (5, 11).

El porcentaje de positividad en las muestras endocervicales provenientes de mujeres con sintomatología urogenital concuerda con los reportes internacionales (4,15). En las mujeres sexualmente activas, *M. genitalium* se asocia con cervicitis e inflamación pélvica aguda. Por tanto, la detección de este micoplasma en muestras urogenitales femeninas es común en pacientes con dichas patologías (16, 17). La

presencia de este microorganismo en el tracto urogenital femenino se asocia con la aparición de síntomas urogenitales como dolor abdominal bajo, inflamación de la pelvis y endometritis, así como existen evidencias de una relación entre *M. genitalium* y la infertilidad femenina (18). Los datos clínico-epidemiológicos de las mujeres estudiadas en el presente trabajo serán motivos de una futura publicación. Sin embargo, la alta concentración de *M. genitalium* ($67\text{-}3,7 \times 10^6$ geq/ μL) que se determinó mediante PCR en tiempo real, descrita por Jensen y cols. 2004 (7), y por la intensidad de los amplicones que se observaron durante la electroforesis en las muestras clínicas estudiadas, sugieren que el mismo causa una infección activa y es responsable de los signos y síntomas que se observan en dichas pacientes (20).

Los resultados que se observaron en la presente investigación coinciden con Hitti y cols. 2010 (18), quienes encontraron en Perú una frecuencia de 3% de positividad de *M. genitalium* en exudados endocervicales de gestantes. Todas estas investigaciones parecen mostrar que *M. genitalium* se encuentra en baja proporción en diferentes partes del continente americano. Sin embargo, Gubelin y cols. 2006 (19) encontraron un 13% de positividad en secreción vaginal de mujeres embarazadas en Chile.

De manera similar Arráiz y cols. 2008 (20) en Venezuela detectan un 12,5% de positividad al estudiar muestras endocervicales de mujeres con cervicitis mucopurulenta. Como plantean Lillis y cols. 2011 (8), el porcentaje de detección de *M. genitalium* en mujeres es mayor al emplear muestras vaginales que cuando se utilizan muestras de exudado endocervical, motivo por el cual es posible explicar la alta frecuencia que se detectó en el estudio que se realizó en Chile; mientras que la baja frecuencia de *M. genitalium* detectada en la presente investigación puede deberse al grupo heterogéneo de mujeres estudiadas con diferentes sintomatologías urogenitales, así como la posible inhibición de las PCR por presencia de inhibidores en las muestras clínicas. Estudios futuros deben contemplar la incorporación de un control interno de amplificación que permita descartar la ocurrencia de falsos negativos debidos a la inhibición de la Taq-polimerasa.

La positividad que se encontr en las muestras de orina de hombres asintomáticos resultó elevada en comparación con lo esperado, teniendo en cuenta estudios publicados previamente (2-4, 11, 13, 14). Una posible explicación a este hecho es que estos individuos se encuentren cursando por una fase crónica de la infección por *M. genitalium* y por consiguiente los síntomas urogenitales desaparecieron parcial o totalmente. En este caso será necesario incluir en estudios posteriores la detección de leucocituria en dichas muestras, pues en ocasiones las uretritis no-gonocócicas transcurren sin la aparición de secreción uretral anormal ni pus y solamente se observa la aparición de una leucocituria moderada.

Es probable que la infección asintomática por *M. genitalium* resulte solo la punta del "iceberg", señalando la circulación en nuestro medio de este patógeno, siendo mucho mayor la frecuencia en pacientes con uretritis. Por tanto estos resultados abogan por la necesidad de la pesquisa de *M. genitalium* en todos aquellos pacientes masculinos con manifestaciones urogenitales, como secreción uretral anormal y ardor al orinar, o con resultados de exámenes de orina que muestren leucocituria, y en sus contactos o parejas sexuales, aun cuando estos últimos no muestren síntomas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron implementar un conjunto de tecnologías y procederes que se encuentran disponibles para el diagnóstico oportuno de este patógeno en el Sistema Nacional de Salud como parte de la pesquisa activa de las infecciones de transmisión sexual causadas por micoplasmas.

Agradecimientos

Al Lic. Ernesto X. Monrroy Vaca, por la lectura crítica de este manuscrito. A todos los colegas de los Laboratorios Nacionales de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas y Espiroquetas, por la ayuda brindada en la realización de estas investigaciones.

Referencias

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to Multicolored Butterfly. Clin Microbiol Rev 2011;24(3):498-514.
2. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis. Dan Med Bull 2006;53:1-27.
3. Shipitsyna E, Savicheva A, Sokolovskiy E, Ballard RC, Domeika M, Unemo M, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in east European countries. Acta Derm Venereol 2010;90:461-7.
4. McGowin CL, Anderson-Smiths C. *Mycoplasma genitalium*: An emerging cause of sexually transmitted disease in women. PLoS Pathog 2011;7(5):e1001324. doi:10.1371/journal.ppat.1001324.
5. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. J Clin Microbiol 1991;29(1):46-50.
6. Eastick K, Leeming JP, Caul EO, Horner PJ, Millar MR. A novel polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma genitalium*. J Clin Pathol 2003;56:25-8.

7. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis* 2004;31:499-507.
8. Lillis RA, Nsuami MJ, Myers L, Martin DH. Utility of urine, vaginal, cervical, and rectal specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* in Women. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1990-2.
9. Rodríguez N, Fernández C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera-Tapia J. PCR múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2007;24(2):152-6.
10. Jensen JS, Hansen HT, Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J Clin Microbiol* 1996;34(2):286-91.
11. Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):261-6.
12. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Sexually transmitted diseases. In: Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Geneva: WHO; 2003.p.75-85.
13. Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Molling P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. *J Med Microbiol* 2005;54:23-9.
14. Manhart LE, Broad JM, Golden MR. *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? *Clin Infect Dis* 2011;53(S3):129-42.
15. Anagnrius C, Lore B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* 2005;81:458-62.
16. Moi H, Reinton N, Moghaddam A. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. *Sex Transm Infect* 2009;85:10-4.
17. Bjartling C, Osser S, Persson K. *Mycoplasma genitalium* in cervicitis and pelvic inflammatory disease among women at a gynecologic outpatient service. *Amer J Obst Gynecol* 2012;206(6):476. Disponible en: [http://www.ajog.org/article/S0002-9378\(12\)00268-2/pdf](http://www.ajog.org/article/S0002-9378(12)00268-2/pdf)
18. Hitti J, Garcia P, Totten P, Paul K, Astete S, Holmes KK. Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among peruvian women. *Sex Trans Dis* 2010;37(2):81-5.
19. Gübelin W, Martínez MA, Céspedes P, Fich F, Fuenzalida C, De la Parra R, et al. Aplicación de método molecular en la detección de *Mycoplasma genitalium* en hombres y en mujeres embarazadas. *Rev Chil Infect* 2006;23(1):15-9.
20. Arráiz N, Colina S, Marcucci R, Rondón N, Reyes F, Bermúdez V, et al. Detección de *Mycoplasma genitalium* y correlación con manifestaciones clínicas en una población del estado Zulia, Venezuela. *Rev Chil Infect* 2008;25(4):256-61.

Detection of *Mycoplasma genitalium* by Polymerase Chain Reaction in urogenital samples from sexually-active Cuban individuals

Abstract

The diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections by bacteriological culture is not feasible due to slow growth and that is time-consuming. Consequently, molecular tools using DNA amplification are widely used in the infection diagnosis. There are few reports in Cuba on infections caused by this pathogen. The aim of this study was to detect *M. genitalium* in clinical samples from sexually active individuals, by two PCR assays. PCR-methods were implemented and evaluated on clinical samples for the detection of *M. genitalium* using fragments of the 16S rRNA (427 pb) and *mgpB* adhesion genes (281 pb) as targets. The PCR assays were used on 300 endocervical swabs from female patients with urogenital symptoms and on 49 first-void-urine samples from asymptomatic males. The limit of detection of 16S PCR and MgPa PCR-assays were of 5 and 50 $\text{geq}/\mu\text{L}$, respectively. For the analyzed clinical samples, 3% (10/300) of female swabs and 24.5% (12/49) of urine samples from asymptomatic men were positive for *M. genitalium* by the two PCR assays. In contrast to the anticipated results, male urine samples had the highest positive rate. Two PCR assays for the detection of *M. genitalium* were implemented and successfully used on clinical samples, with the unexpected finding of a high positive rate in specimens from asymptomatic men. The current work will allow performing future studies of genetic and antigenic characterization of the circulating *Mycoplasma genitalium*-strains in Cuba, useful as vaccine immunogen.

Key words: *Mycoplasma genitalium*, PCR, MgPa, 16S rRNA.
