



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA



Infecciones por *Mycoplasma genitalium*. Evidencias de un problema de salud poco conocido en Cuba



TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

BRIAN ARTURO MONDEJA RODRÍGUEZ

LA HABANA, 2017



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

**Infecciones por *Mycoplasma genitalium*. Evidencias de
un problema de salud poco conocido en Cuba**

*TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD*

Autor: Lic. Brian Arturo Mondeja Rodríguez, MSc.

Tutores: Prof. Consultante; Dr. Jørgen Skov Jensen, Dr Cs.

Prof. Titular; Dra. Sonia Resik, Dr C.

Asesores: Prof. Auxiliar; Dra. Carmen Fernández, Dr C.

Prof. Asistente; Lic. Islay Rodríguez, Dr C.

LA HABANA, 2017

AGRADECIMIENTOS

Uno de las secciones más difíciles de escribir siempre resulta ser la de los agradecimientos, pues por mucho que nos esforcemos siempre se nos queda alguien que con su modesto esfuerzo, puso un granito de arena para lograr la culminación de este trabajo. Es por ello, y sin ánimos de incurrir en tal olvido involuntario, quisiera agradecer a todas aquellas personas -que fueron muchas-, que con su apoyo, su colaboración paciente y desinteresada permitieron realizar el conjunto de investigaciones, expuestas de forma abreviada en este manuscrito. Quisiera expresar mis más especiales agradecimientos a mis tutores y asesores por participar activamente en mi formación profesional y personal. En especial al DrCs Jørgen Skov Jensen por aceptar la tutoría de este trabajo, por sus sabios y certeros consejos, por aprender a comprender el español y por su amistad. De igual manera quisiera agradecer a la Dra C. Nereyda Cantelar, Dra C. Alina Llop, Dra C. Isabel Martínez, Dra C. Yudira Soto y al Dr C. Ariel Martínez, por la lectura crítica y sus experimentados comentarios sobre este manuscrito, siempre útiles para el enriquecimiento del mismo. Así mismo, a los oponentes en los cuales recaiga el siempre enorme peso de evaluar este trabajo, mis más sinceros agradecimientos, en primer lugar, por dedicar parte de su valioso tiempo a esta faena, y por sus críticas y señalamientos - desde ya - bien recibidos por este autor. No podría terminar, sin agradecer a mi familia, resultado de la cual soy en todos los aspectos de mi vida, a mi madre, a mi abuela, a mis amigos...

En fin, a todos... infinitas gracias

Brian Arturo Mondeja Rodríguez

DEDICATORIA

A mi familia

SÍNTESIS

Mycoplasma genitalium es un patógeno emergente de transmisión sexual. La aparición de cepas multidrogorresistentes constituye un problema de salud mundial. Estudios preliminares realizados en Cuba mostraron la presencia de esta bacteria en algunos pacientes con uretritis y cervicitis. El objetivo del presente trabajo fue aportar evidencias sobre la ocurrencia e importancia de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba, así como caracterizar las cepas circulantes en el país. Se realizaron estudios descriptivos desde enero de 2009 a junio 2015, para conocer la frecuencia de infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos. Se implementó el aislamiento de *M. genitalium* y se caracterizaron los nuevos aislados para conocer su genotipo y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Se demuestra un 2 y 16 % de positividad a *M. genitalium* en pacientes femeninas y masculinos, respectivamente. Se obtuvieron tres aislados y se notificaron dos nuevos genotipos a nivel internacional. El aislado B19 fue resistente a macrólidos y tetraciclinas. Los resultados obtenidos en la presente investigación ofrecen evidencias claves para el perfeccionamiento de la vigilancia, el manejo y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en el escenario epidemiológico cubano.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problema científico	5
1.2 Objetivos	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Generalidades	10
2.2 Estructura celular de <i>Mycoplasma genitalium</i>	10
2.3 Biología molecular de <i>M. genitalium</i>	12
2.4 Patogénesis	14
2.5 Localización intracelular de <i>M. genitalium</i>	17
2.6 Principales enfermedades causadas por <i>M. genitalium</i>	18
2.6.1 Enfermedades en los hombres	18
2.6.1.1 Síndrome uretral	18
2.6.1.2 Uretritis no-gonocócica	19
2.6.1.3 Uretritis persistente o recurrente	19
2.6.1.4 Prostatitis	20
2.6.1.5 Proctitis	20
2.6.2 Enfermedades en las mujeres	21
2.6.2.1 Síndrome de flujo vaginal	21
2.6.2.2 Cervicitis	21
2.6.2.3 Vaginosis bacteriana	22
2.6.2.4 Síndrome de dolor abdominal bajo	22
2.6.2.5 Nacimiento pretérmino	23
2.6.2.6 Trastornos de la fertilidad	23
2.6.2.7 Aborto espontáneo	24

2.7 Diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por <i>M. genitalium</i>	24
2.7.1 Muestras clínicas	24
2.7.1.1 Muestras provenientes de mujeres	24
2.7.1.1.1 Exudado endocervical	24
2.7.1.1.2 Exudado vaginal	25
2.7.1.2 Muestras provenientes de hombres	25
2.7.1.2.1 Orina	25
2.7.1.2.2 Exudado uretral	26
2.7.1.2.3 Exudado rectal	26
2.7.1.3 Medios de transporte para exudados urogenitales y rectales	27
2.7.2 Cultivo in vitro y obtención de aislados de <i>M. genitalium</i>	27
2.6.2.1 Medios de cultivo para <i>M. genitalium</i>	28
2.6.2.1 Co-cultivo de <i>M. genitalium</i> en cultivos celulares	30
2.7.3 Diagnóstico molecular de las infecciones por <i>M. genitalium</i>	32
2.7.3.1 Extracción de ADN a partir de muestras clínicas	32
2.7.3.2 Ensayos de PCR punto final	33
2.7.3.3 Ensayos de PCR en tiempo real cuantitativos	34
2.8 Clasificación genotípica de <i>M. genitalium</i>	36
2.9 Resistencia antimicrobiana y tratamiento de las infecciones por <i>M. genitalium</i>	37
2.9.1 Resistencia intrínseca	37
2.9.2 Resistencia adquirida	37
2.9.2.1 Tetraciclinas	38
2.9.2.2 Macrólidos	38
2.9.2.3 Quinolonas	40
2.9.3 Tratamiento de las infecciones por <i>M. genitalium</i>	41

2.9.4 Manejo sindrómico de las ITS	43
2.10 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana para <i>M. genitalium</i>	44
2.11 Infecciones por <i>M. genitalium</i> en Cuba. Antecedentes	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 Diseño general	48
3.2 Material biológico de referencia	48
3.3. Preparación de los patrones de ADN de <i>M. genitalium</i>	49
3.4 Frecuencia de infección por <i>M. genitalium</i> en pacientes cubanos	49
3.4.1 Serie de casos I: estudio de mujeres cubanas con diagnóstico clínico de síndrome de flujo vagina/síndrome de dolor abdominal bajo, aborto espontáneo o trastornos de la fertilidad	49
3.4.2 Serie de casos II: estudio de hombres cubanos con diagnóstico clínico de síndrome uretral	50
3.4.3 Colecta , transporte y conservación de la muestra biológica	50
3.4.3.1 Exudado endocervical	50
3.4.3.2 Exudado uretral	51
3.4.4 Diagnóstico molecular de <i>M. genitalium</i> en las muestras clínicas	52
3.4.4.1 Extracción de ADN	52
3.4.4.2 PCR ARNr 16S de <i>M. genitalium</i>	53
3.4.4.2.1 Mezcla de reacción	53
3.4.4.2.2 Programa de amplificación	53
3.4.4.2.3 Visualización de los resultados	54
3.4.4.3 PCR cuantitativo <i>mgbB</i> para <i>M. genitalium</i>	54
3.4.4.3.1 Mezcla de reacción	55
3.4.4.3.2 Amplificación y visualización de los resultados	55
3.4.5 Análisis estadístico	56

3.4.6 Comparación de la frecuencia de positividad y concentración de <i>M. genitalium</i> entre ambas series de casos	56
3.5 Caracterización microbiológica de aislados de <i>M. genitalium</i> obtenidos a partir de muestras urogenitales	58
3.5.1 Evaluación de un sistema de cultivo para el aislamiento y multiplicación de <i>M. genitalium</i> en línea celular	57
3.5.2 Obtención de aislados autóctonos de <i>M. genitalium</i>	57
3.5.2.1 Genotipificación de <i>M. genitalium</i>	58
3.5.2.1.1 PCR simple para el gen <i>mgpB</i> de <i>M. genitalium</i>	58
3.5.2.1.1.1 Mezcla de reacción	58
3.5.2.1.1.2 Amplificación	59
3.5.2.1.1.3 Visualización de los resultados	59
3.5.2.1.1.4 Purificación de los productos de la PCR	60
3.5.2.1.2 Reacción de secuencia y análisis de los resultados	60
3.5.2.1.2.1 Mezcla de secuencia	60
3.5.2.1.2.2 Amplificación de las reacciones de secuencia	60
3.5.2.1.2.3 Purificación de la reacción de secuencia	60
3.5.3 Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>M. genitalium</i>	61
3.5.3.1 Preparación de la placa	62
3.5.3.2 Inoculación de los aislados	62
3.5.3.3 Cepa control de <i>M. genitalium</i>	63
3.5.3.4 Lectura de la concentración mínima inhibitoria	63

3.5.3.5 Confirmación de la resistencia a los macrólidos y a las fluoroquinolonas mediante secuenciación	63
3.5.3.5.1 Confirmación de la resistencia a los macrólidos	63
3.5.3.5.1.1 PCR ARNr 23S de <i>M. genitalium</i>	63
3.5.3.5.1.1.1 Mezcla de reacción	63
3.5.3.5.1.1.2 Amplificación y visualización de los resultados de la PCR	63
3.5.3.5.1.1.3 Secuenciación de los productos de la PCR ARNr 23S	63
3.5.3.5.2 Confirmación de la resistencia a fluoroquinolonas	65
3.6 Aspectos éticos	65
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Frecuencia de infección por <i>M. genitalium</i> en pacientes cubanos	68
4.1.1 <i>Mycoplasma genitalium</i> en mujeres	69
4.1.2 <i>Mycoplasma genitalium</i> en hombres	73
4.1.3 Comparación de la frecuencia de positividad y concentración de <i>M. genitalium</i> entre ambas series de casos	76
4.3 Caracterización microbiológica de los aislados de <i>M. genitalium</i> obtenidos a partir de las muestras urogenitales	77
4.3.1 Evaluación del crecimiento de <i>M. genitalium</i> en el sistema de cultivo	78
4.3.2 Obtención y genotipificación de los aislados autóctonos de <i>M. genitalium</i>	79
4.3.3 Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>M. genitalium</i>	84

4.3.3.1 Confirmación de la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas mediante secuenciación	85
5. CONSIDERACIONES GENERALES	87
6. CONCLUSIONES	95
7. RECOMENDACIONES	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
NOVEDAD CIENTÍFICA, VALOR TEÓRICO Y PRÁCTICO	
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR	
ANEXOS	

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AE:** aborto espontáneo
- **APS:** atención primaria de salud
- **ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal
- **ATCC:** Colección Americana de Cultivos Tipo, Estados Unidos, del inglés American Type Culture Collection.
- **ATP:** trifosfato de adenosina, del inglés Adenosine Triphosphate.
- **C:** citosina
- **CDC:** Centros para el control de enfermedades de los Estados Unidos, del inglés: Center for Disease Control
- **CIA:** control interno de amplificación
- **CLSI:** Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio, Estados Unidos, del inglés Clinical Laboratory Standars Institute.
- **CMI:** concentración mínima inhibitoria
- **CV:** coeficiente de variación
- **EPA:** enfermedad pélvica aguda
- **EUA:** Estados Unidos de América
- **FB:** medio Friis modificado
- **G:** guanina

- **geq:** equivalentes de genoma o genoma-equivalentes
- **HSH:** hombres que tienen sexo con otros hombres
- **IC:** intervalo de confianza
- **IPK:** Instituto Pedro Kourí
- **ITS:** infecciones de transmisión sexual
- **LNRIM:** Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas
- **MEM:** medio esencial mínimo
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OR:** del inglés Odds ratio. Razón de prevalencia
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction.
- **PNO:** procedimientos normalizados operacionales
- **qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés Quantitative Polymerase Chain Reaction.
- **QRDR:** región determinante de resistencia a quinolonas, del inglés Quinolone-Resistance Determinant Region.
- **SDAB:** síndrome de dolor abdominal bajo
- **SFB:** suero fetal bovino
- **SFV:** síndrome de flujo vaginal
- **SSI:** Instituto Estatal del Suero, Dinamarca, del inglés Statens Serum Institut.
- **SU:** síndrome uretral

- **SUG:** síndrome uretral por gonococo
- **TF:** trastorno de la fertilidad
- **UNG:** uretritis no gonocócica
- **UNGNC:** uretritis no gonocócica no clamidial
- **UTM-RT:** Medio de transporte universal para virus, clamidias, micoplasmas y ureaplasmas, del inglés Universal Transport Medium (Copan, Italia)
- **VB:** vaginosis bacteriana
- **VCNT:** suplemento antimicrobiano de vancomicina, colistina, nistatina y sulfametoxazol-trimetropin

CONTROL SEMÁNTICO

- **Aislado:** población de células de una sola especie microbiana en cultivo puro, obtenida mediante un único procedimiento de aislamiento a partir de una muestra clínica, que no necesariamente se derivan de una única célula microbiana.
- **Aislamiento:** procedimiento o conjunto de procedimientos de laboratorio que permiten la selección, recuperación y multiplicación in vitro de una única población microbiana denominada aislado.
- **Co-cultivo:** crecimiento de un microorganismo a expensas del crecimiento de un cultivo o línea celular.
- **Concentración mínima inhibitoria:** menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el 99% del crecimiento microbiano.
- **Cultivo axénico:** cultivo puro de una especie microbiana, genéticamente homogéneo, derivado de una sola célula microbiana (clon).
- **Equivalentes de genoma:** unidad de medida en biología molecular para describir o cuantificar las copias de un gen o fragmento genómico empleado para el establecimiento de concentraciones de un microorganismo. Un equivalente de genoma es igual a una copia génica y a su vez a una célula microbiana.
- **Triple clonación:** procedimiento de purificación de un cultivo puro mediante el cual se obtiene una población genéticamente homogénea o cultivo axénico. Generalmente se realiza mediante la repetición seriada por tres veces de la

disgregación, dilución al máximo, selección de células microbianas individuales y multiplicación en un sistema o medio de cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Mycoplasma genitalium es una especie de micoplasma de origen humano, reconocida como el organismo de vida libre más pequeño con capacidad de autorreplicación. El genoma de 580 kb, compuesto por unos 500 genes, es el número mínimo necesario para la síntesis de elementos estructurales, vías metabólicas y componentes de la maquinaria de síntesis proteica, lo que coloca a la especie como el modelo del concepto de “células mínimas o básicas” (1).

En un principio *M. genitalium* se asoció con la uretritis no gonocócica (UNG) en el hombre; sin embargo, en la actualidad se le reconoce como el agente etiológico de otras patologías, tanto en los hombres como en las mujeres. En estas últimas, se asocia con cervicitis mucopurulenta, uretritis, enfermedad pélvica aguda, aborto espontáneo, infertilidad y leucorrea. La asociación con la vaginosis bacteriana no está bien dilucidada (1-8).

Uno de los principales problemas para el estudio de las infecciones por *M. genitalium* radica en que el diagnóstico de laboratorio mediante los métodos bacteriológicos tradicionales es laborioso y poco práctico. Este microorganismo demora hasta 90 días en multiplicarse en un medio de cultivo específico debido a su limitado metabolismo. Las herramientas serológicas carecen de especificidad debido a la homología antigénica y la consecuente reactividad cruzada entre *M. genitalium* y *Mycoplasma pneumoniae* (2).

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

Debido a las dificultades antes mencionadas se desarrollan de forma acelerada métodos moleculares basados en la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), los cuales constituyen herramientas sensibles, específicas y rápidas para la detección y cuantificación de *M. genitalium* en muestras clínicas (1, 9-12). Sin embargo, estos ensayos deben tener un límite de detección que permita revelar concentraciones muy bajas del microorganismo, pues la concentración de *M. genitalium* en muestras de pacientes sintomáticos es 100 veces menor que la concentración de otros microorganismos como *Chlamydia trachomatis* (13).

Mycoplasma genitalium se aísla por primera vez en el año 1980 a partir de exudados urogenitales provenientes de hombres ingleses con uretritis. En los años sucesivos no se obtienen nuevos aislados, aunque continúan los intentos de mejorar los métodos de aislamiento y cultivo (14). En los primeros años de la década del 90 del siglo pasado, Jensen y colaboradores lograron el aislamiento de *M. genitalium* mediante co-cultivo en células Vero (15, 16). La incorporación del monitoreo del crecimiento mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) perfeccionó la metodología de aislamiento. Hasta 2015 se notifican en la literatura internacional alrededor de 81 aislados en todo el mundo (17-20).

Los aislados de *M. genitalium* se agrupan o clasifican según la similitud en las secuencias parciales del gen *mgpB*, uno de los genes que codifica para la adhesina celular MgPa, y hasta el momento se informan alrededor de 190 genotipos (21-23). Mediante este sistema de genotipificación se puede estudiar y comprobar la transmisión sexual entre individuos infectados y sus contactos sexuales, así como autenticar los

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

posibles nuevos aislados por la comparación entre el genotipo presente en la muestra y el aislado (21, 24).

El tratamiento de las infecciones por *M. genitalium* se basa en la utilización de macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas. La azitromicina constituye el tratamiento de primera línea de las infecciones urogenitales por este microorganismo, aunque en algunos países se utilizan las tetraciclinas como primera opción de tratamiento. Existen pocos estudios de susceptibilidad antimicrobiana in vitro, como consecuencia de la poca disponibilidad de aislados y de las dificultades para el cultivo ya comentadas. (17, 19, 20, 25-34). Los patrones de susceptibilidad de *M. genitalium* en el continente americano se desconocen, lo cual dificulta la corroboración de la efectividad del tratamiento sintomático aplicado en la región. En la actualidad, *M. genitalium* es el único agente patógeno bacteriano responsable del desarrollo de infecciones de transmisión sexual (ITS) no tratables, debido a la emergencia de cepas multidrogorresistentes, las cuales carecen de opciones terapéuticas para su tratamiento (35).

La presencia de *M. genitalium* se informó por primera vez en Cuba al estudiar muestras de pacientes masculinos con infecciones urogenitales, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el año 2008 (36, 37). Sin embargo, se desconoce la contribución real de este germen al desarrollo de ITS en mujeres y hombres cubanos. La no disponibilidad de aislados autóctonos ha impedido el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana frente a los antibióticos recomendados en el tratamiento sintomático de las infecciones de transmisión sexual (ITS) y de los genotipos circulantes en el país (35, 38, 39).

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

Este desconocimiento dificulta el manejo sindrómico de las ITS, pues el mismo depende de que se proporcione el tratamiento efectivo contra los agentes patógenos comunes que causan los síntomas. En consecuencia, es importante evaluar de forma periódica los agentes patógenos causantes de un síndrome particular, para orientar los protocolos de tratamiento y el manejo clínico (40). Los resultados de estos estudios brindan información útil al Sistema Nacional de Salud para la actualización y el fortalecimiento del Programa Nacional de Control de las ITS/sida.

1.1 Problema científico

¿Es frecuente la infección por *Mycoplasma genitalium* en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de ITS, aborto espontáneo e infertilidad? ¿Son sensibles las cepas circulantes a los tratamientos antimicrobianos recomendados?

1.2 Objetivos

Objetivo general

Obtener evidencias sobre la ocurrencia e importancia de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba, así como de las características propias de cepas circulantes en el país entre 2009 a 2015.

Objetivos específicos

- Describir la frecuencia de infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos con síndrome de flujo vaginal y dolor abdominal bajo, síndrome uretral, aborto espontáneo y trastornos de la fertilidad.
- Obtener aislados autóctonos de *M. genitalium* e identificar los genotipos de los mismos.

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

- Definir los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados cubanos de *M. genitalium* a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones urogenitales con esta bacteria.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades

Mycoplasma genitalium (del latín *genitalia*: genitales, - *ium*: de los) es uno de los llamados micoplasmas de origen humano. Como todos los miembros de la clase *Mollicutes*, carece de pared celular y en su lugar presenta una membrana lipídica trilaminar, es sensible a los solventes orgánicos, desinfectantes y metales pesados, es propenso a sufrir lisis celular debido a desbalances iónicos y térmicos, requiere un estricto balance osmótico para su crecimiento y es microaerófilo (14).

2.2 Estructura celular de *M. genitalium*

La mayoría de las células de *M. genitalium* presentan forma de botija o matraz con una longitud media de 590 nm, que al igual que *M. pneumoniae*, presentan una estructura terminal que le permiten la adhesión a las células hospedadas y superficies plásticas y le confieren la capacidad de adsorber glóbulos rojos de diferentes especies animales. Esta estructura terminal se denomina organelo de adhesión celular y está conformada por una sección cilíndrica en forma de “mango” de 170 nm de largo y 80 nm de ancho, la que termina en un nudo o perilla de 80 nm de largo y ancho (figura 2.1) (41).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

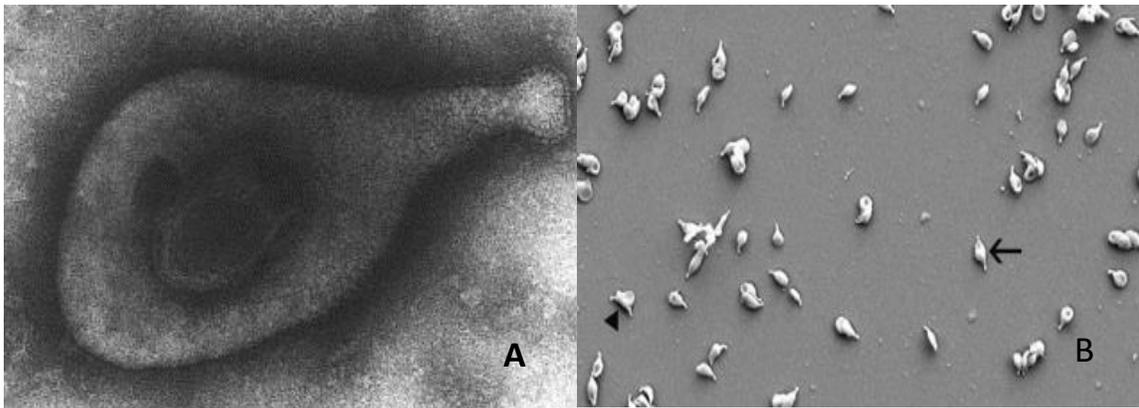


Figura 2.1 Microfotografías electrónicas de *Mycoplasma genitalium*. **A-** Célula con estructura terminal en forma de punta y **B-** Células con forma de matraz, la flecha negra señala a una célula en división celular. Tomado de Tully y colaboradores (14) y Pich y colaboradores (42).

Estos microorganismos poseen un sofisticado citoesqueleto proteico que juega un papel esencial en su biología y le confiere a la célula su forma distintiva en cada caso. El entramado proteico se encuentra conformado por un gran número de proteínas estructurales y no estructurales relacionadas con el metabolismo energético, lipoproteínas, proteínas de estrés térmico y proteínas asociadas con la citoadherencia (43).

El citoesqueleto juega un papel fundamental en el desplazamiento y en el proceso de división celular. *M. genitalium* muestra un desplazamiento por deslizamiento. Este movimiento celular ocurre en el sentido de la curvatura de la estructura terminal, describiendo patrones circulares a una velocidad media de 111 nm/seg (1, 42).

La división celular sucede por simple fisión binaria. Durante el proceso aparece un nuevo organelo de adhesión adyacente al existente, comienza un movimiento o reorganización del citoesqueleto que termina con la migración y posicionamiento final del nuevo organelo en el polo celular opuesto antes de la división final del citoplasma.

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El citoplasma celular de *M. genitalium* muestra una gran cantidad de cuerpos electrodensos, que se corresponden con una acumulación de ribosomas y agregados proteicos, además de un único cromosoma circular (1).

2.3 Biología molecular de *M. genitalium*

Los micoplasmas son patógenos que tienen nichos ecológicos constantes por lo que requieren muy poca capacidad adaptativa. *M. genitalium* es el patógeno humano con una mayor expresión de parsimonia genómica, pues en un genoma de 580 kb, presenta 482 genes que codifican para proteínas, siendo el microorganismo con el menor genoma de todos los organismos de vida libre capaz de crecer en un cultivo axénico. Presenta una aparente redundancia enzimática y una baja especificidad de sustratos, con lo cual esta bacteria es capaz de cubrir las necesidades metabólicas con un número mínimo de genes (44).

De los 482 genes codificadores para proteínas, 382 son esenciales para el desarrollo de las funciones celulares. Algunos genes no esenciales como MG414 y MG415 son claves en el control del ciclo celular, específicamente en la velocidad de crecimiento, lo cual le permite a este patógeno escapar de los mecanismos de vigilancia y defensa del sistema inmune del hospedero (44, 45).

El genoma de *M. genitalium* posee una cantidad baja de guanina y citocina (31%), que influye en la utilización de los codones de parada como codificantes para algunos aminoácidos, la cual llega hasta un 72% en el caso de UAA. Este comportamiento es similar al encontrado en otros micoplasmas y en mitocondrias y cloroplastos, lo que reafirma la gran capacidad de economía celular y optimización metabólica de este

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

patógeno (45). Los genes que codifican para el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) ribosomal se encuentran organizados en un operón, localizado en una copia simple en el genoma. De todos estos genes, el gen del ARNr 16S es el más estudiado y revela una gran homología con *M. pneumoniae* (46).

El metabolismo energético se basa en la obtención de trifosfato de adenosina (ATP) mediante la degradación de la glucosa en la vía glicolítica, aunque los modelos *in silico* demuestran la posibilidad de utilización de la fructosa y el glicerol como sustratos energéticos alternativos.

Como consecuencia de la pérdida de genes esenciales para las vías metabólicas, la capacidad biosintética de *M. genitalium* se encuentra limitada, por consiguiente, necesita la incorporación de los precursores macromoleculares de fuentes ambientales externas. Estos altos requerimientos nutricionales junto con el lento crecimiento, hacen que el cultivo *in vitro* en medios artificiales sea difícil y laborioso (45).

Mycoplasma genitalium presenta un organelo de adhesión celular, formado en su gran mayoría por fosfoproteínas y proteínas de membrana. Dentro de estas proteínas se encuentra la proteína de adhesión celular o MgPa. Los genes de la MgPa se encuentran organizados en un operón formado por tres genes: *mgpA* (MG190), *mgpB* (MG191) y *mgpC* (MG192) (figura 2.2). Estos genes son cotranscritos y según estudios moleculares de mutantes que carecen de MG191 o MG192, se conoce que ambos genes codifican proteínas esenciales para el ensamblaje y funcionamiento del organelo de adhesión (2, 47).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

De acuerdo con la secuencia completa del genoma de la cepa tipo de *M. genitalium* (G37^T), estos genes se encuentran en una copia única en el genoma, pero además existen nueve elementos repetitivos o copias truncadas de los genes MG191 y MG192, denominadas *mgspar1* – 9, no contiguas al operón MgPa, que se encuentran dispersos a través de todo el genoma.

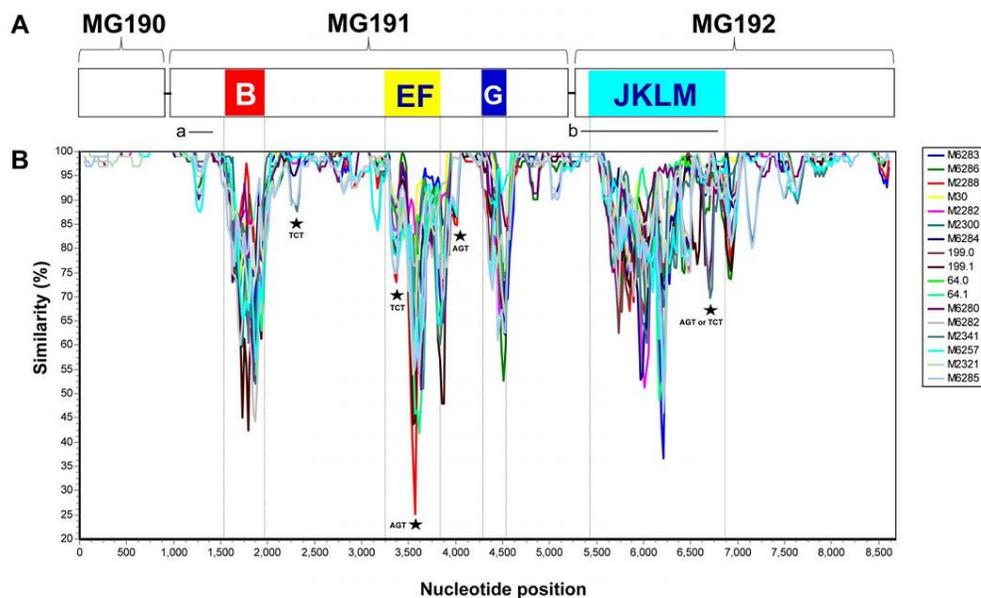


Figura 2.2 Organización y variación nucleotídica del operón de la proteína MgPa de *Mycoplasma genitalium*. **A-** Representación esquemática de la estructura del operón MgPa basada en la secuencia de la cepa G37 (número de GenBank NC_000908). **B-** Gráfico de similitud nucleotídica del operón MgPa de 15 cepas de *Mycoplasma genitalium*. Tomado de Ma y colaboradores (47).

La identidad u homología de estos elementos con la secuencia del operón es de 70 – 90%. Considerando la gran presión evolutiva a que está sometido este microorganismo, no cabe duda alguna de que estos genes truncados juegan un papel esencial en la supervivencia y adaptación de este patógeno (47, 48). Estos hallazgos, unidos a la existencia de una gran variación en la secuencia de estas regiones del operón MgPa de *M. genitalium*, sugieren la ocurrencia de eventos de recombinación homóloga entre los

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

genes del operón y las secuencias *mgp*ar (figura 2.3) que le permiten a este patógeno evadir la respuesta inmune y la adaptación a los diferentes microambientes del hospedero durante el establecimiento de la infección persistente (2, 49, 50).

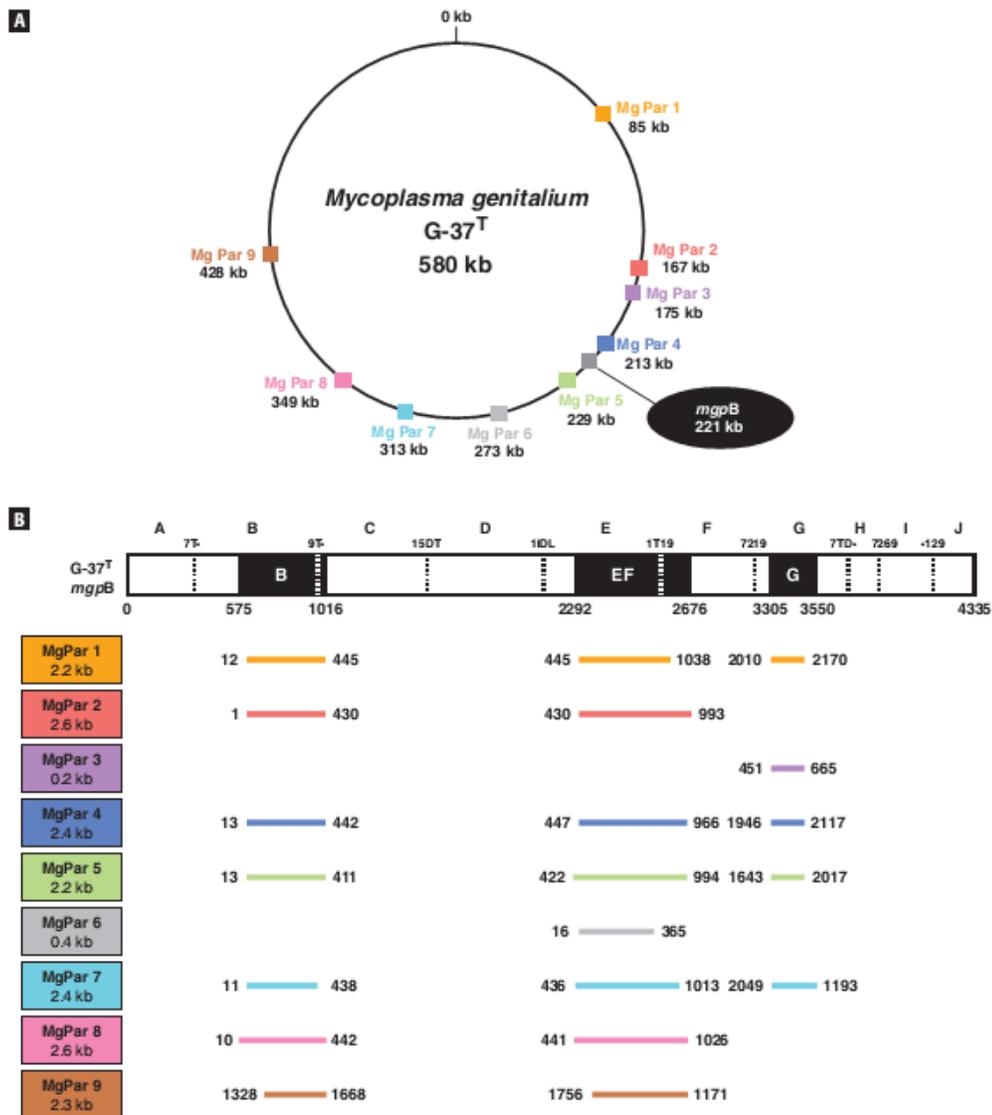


Figura 2.3 Localización genómica del gen *mgpB* y las secuencias truncadas *mgp*ar de la proteína MgPa de *Mycoplasma genitalium*. **A-** Representación esquemática del genoma de *Mycoplasma genitalium* mostrando la localización del gen *mgpB* y las secuencias *mgp*ar. **B-** Representación esquemática del gen *mgpB* y las secuencias *mgp*ar con su talla correspondiente. En cuadros negros se representan las zonas de *mgpB* con una gran variación nucleotídica. Las líneas de colores representan las zonas homólogas de cada *mgp*ar al gen *mgpB*. Tomado de Iverson-Cabral y colaboradores (50).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.4 Patogénesis

Los micoplasmas pueden considerarse parásitos perfectos debido a la baja frecuencia con que producen infecciones fulminantes y que tienden más a la colonización y el establecimiento de infecciones de curso crónico. El tracto urogenital parece ser el sitio primario de colonización de *M. genitalium*, aunque no existe información suficiente sobre la preferencia por un tipo celular específico. Sin embargo, en estudios in vitro, *M. genitalium* no parece estar confinado solamente a las células de tipo epitelial (1). La ruptura del dogma del tropismo selectivo se demuestra en algunos casos donde *M. genitalium* se aisló de muestras respiratorias; sin embargo, este último hecho permanece aún en duda (51, 52).

Durante el proceso de infección, *M. genitalium* es capaz de causar daño tisular mediante la producción de metabolitos tóxicos como el peróxido de hidrógeno y otros superóxidos. Otro mecanismo patogénico es la inducción de daño causado por la propia respuesta celular del hospedero. Este mecanismo se explica por la interacción entre este patógeno y algunos componentes del sistema inmune, que inducen la activación de macrófagos y la producción de citoquinas (53, 54).

Después de la transmisión sexual, *M. genitalium* realiza el primer contacto con las células epiteliales de la vagina y el endocervix, esto desencadena una cascada inmunológica que termina en la activación temprana de la respuesta inmune innata. Esta activación permite la extravasación de células inmunitarias, principalmente macrófagos, que fagocitan y destruyen las células de micoplasmas (54, 55). Algunas fracciones de lipoproteínas de la membrana celular de esta especie son capaces de inducir la

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

producción de varias citoquinas proinflamatorias que exacerbaban la respuesta inmune local e inducen la activación de otras células de los mecanismos de respuesta celular del sistema inmune, lo cual aumenta el daño del tejido colonizado (1, 53, 54).

Otro aspecto importante en la inmunopatogenia de *M. genitalium* radica en el hecho de que algunos de los componentes celulares mayoritarios de este patógeno actúan como superantígenos, ejerciendo un papel fundamental en la aparición común de síndromes autoinmunes que acompañan las infecciones crónicas (56, 57).

2.5 Localización intracelular de *M. genitalium*

Durante varios años se disputó la localización extracelular *versus* intracelular. En la década de los 80 (siglo pasado), la mayoría de las evidencias favorecían la hipótesis de que los micoplasmas eran solamente patógenos extracelulares. Sin embargo, las investigaciones sobre algunas especies que afectan a los pacientes con sida lograron demostrar que algunos micoplasmas no solo eran capaces de parasitar las superficies celulares, sino que también tienen la capacidad de invadir el interior de las células eucariotas. Para reafirmar dichas evidencias, este hecho se demostró en células urogenitales provenientes de pacientes infectados. La persistencia intracelular de los micoplasmas puede explicar el enigma del fallo en la erradicación de las infecciones tanto en los cultivos celulares como en los humanos (57).

La internalización de *M. genitalium* se demostró mediante microscopía electrónica en cultivos celulares (figura 2.5). Dentro de las células, este patógeno se encuentra unido a la membrana de las vacuolas y el núcleo. Este mecanismo de internalización le permite escapar de la respuesta inmune, de las condiciones extracelulares adversas y

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

determinados antimicrobianos, lo cual puede explicar la recurrencia en las infecciones uretrales y urogenitales en general (16, 57).

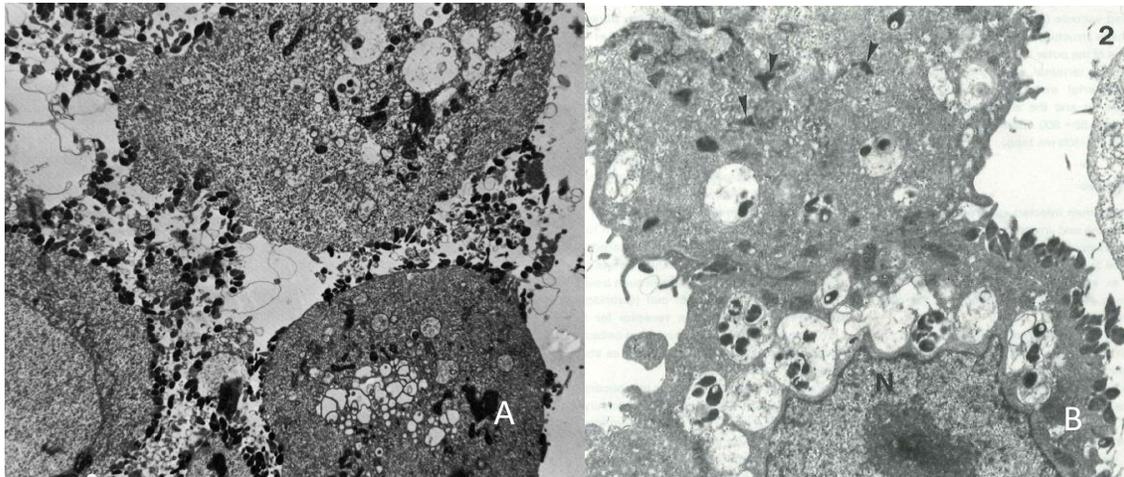


Figura 2.5 Microfotografías electrónicas de *Mycoplasma genitalium* creciendo en células Vero. **A-** Cepa G37^T; **B-** Cepa M2300. Las células de micoplasma aparecen como estructuras electrodensas de color negro. Tomado de Tully y colaboradores (14) y Jensen y colaboradores (16).

2.6 Principales enfermedades causadas por *M. genitalium*

2.6.1 Enfermedades en los hombres

Durante los últimos años se han acumulado considerables evidencias que demuestran el papel patogénico de *M. genitalium* como agente etiológico causal de infecciones urogenitales en los hombres (18, 58, 59). Al contrario de las mujeres, el 70 % de los hombres con una infección por *M. genitalium* presentan síntomas y desarrollan una de las patologías descritas a continuación (60, 61).

2.6.1.1 Síndrome uretral

Se denomina síndrome uretral a la presencia de secreción uretral en hombres, con o sin disuria, comprobada con el prepucio retraído o si es necesario por la compresión de la raíz del pene en dirección al glande (40, 62). Las directrices para la vigilancia de las

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

infecciones de transmisión sexual de ONUSIDA/OMS recomiendan que el síndrome de secreción uretral es uno de los únicos síndromes que son útiles para vigilar la tendencia de la incidencia de las ITS en países con manejo sindrómico de las ITS (40). Los agentes etiológicos más frecuentes son *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Trichomona vaginalis*. El diagnóstico etiológico definitivo es necesario y recomendado para evitar complicaciones, reinfecciones y transmisión de la infección (39).

2.6.1.2 Uretritis no- gonocócica

Se denomina uretritis no- gonocócica (UNG) o uretritis inespecífica al síndrome uretral con o sin diagnóstico etiológico, causado por agentes etiológicos diferentes a *N. gonorrhoeae*. Su diagnóstico clínico se basa en la observación de frotis de exudado uretral teñidos por azul de metileno o Gram, donde se observan abundantes polimorfonucleares con ausencia de diplococos Gramnegativos, arriñonados intracelulares (39). *M. genitalium* se asocia entre un 10 – 30 % de los casos (Odds ratio (OR) 5,5 (IC 95% I: 4.4–7.0)), al desarrollo de UNG en hombres (63-67). Sin embargo, *C. trachomatis* es el patógeno que se encuentra con más frecuencia, entre un 15 – 50 % de los casos (39, 68). Otros microorganismos menos frecuentes como responsables del desarrollo de esta patología son *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, bacterias anaerobias, virus del herpes simple y algunos adenovirus (69, 70).

2.6.1.3 Uretritis persistente o recurrente

Se denomina uretritis persistente o recurrente (UR) al síndrome uretral no- gonocócico (o UNG) mantenido, posterior a una terapia antimicrobiana específica contra los

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

principales agentes etiológicos asociados al desarrollo del síndrome uretral (39). *M. genitalium* se encuentra en aproximadamente el 40 % de los pacientes con UR (OR: 26 (IC 95%: 11,49 – 56,99)), sobre todo en aquellos casos con fallo al tratamiento con doxiciclina o macrólidos (35, 60, 71).

2.6.1.4 Prostatitis

La prostatitis, definida como la inflamación de la próstata, caracterizada por la aparición de dolor perineal persistente, malestar o dolor en la región pélvica, en el pene, ardor o dolor a la eyaculación, constituye una de las complicaciones más comunes de las infecciones por *M. genitalium* no tratadas o recurrentes (60, 72, 73). En los países con manejo sintomático, el mantenimiento de los síntomas post-tratamiento a una UNG o la aparición de síntomas de prostatitis, no justifica el re-tratamiento antimicrobiano sin una confirmación de laboratorio de inflamación de la uretra, la presencia de polimorfonucleares en el semen, y el diagnóstico etiológico (39).

2.6.1.5 Proctitis

La proctitis se define como la inflamación de la porción distal del recto (10 – 12 cm) y forma parte de los síndromes gastrointestinales de origen sexual comunes en los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) y mujeres que practican sexo anal receptivo. Los principales síntomas de esta patología son la aparición de dolor anorectal, tenesmos y descargas rectales (39). *M. genitalium* se encuentra dentro de los patógenos que contribuyen a la aparición de proctitis hasta en el 12 % de los casos (60, 74), junto a *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* (incluyendo los serovares LGV), *T. pallidum*, y VHS (39).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.6.2 Enfermedades en las mujeres

El 70 % de las mujeres infectadas con *M. genitalium* son asintomáticas. De forma general, el número de estudios en las mujeres es menor que en los hombres (75-77). La prevalencia de las infecciones por *M. genitalium* en las mujeres oscila entre 1,3 y 18 %, siendo similar, en algunas poblaciones, a la encontrada para las infecciones causadas por *C. trachomatis* (2, 8, 78-80). Dentro del manejo sindrómico de las ITS, *M. genitalium* contribuye en menor o mayor grado al desarrollo de varios síndromes y patologías que se exponen a continuación.

2.6.2.1 Síndrome de flujo vaginal

Se define como síndrome de flujo vaginal (SFV) al síndrome urogenital que engloba entidades clínicas como la cervicitis y la vaginosis bacteriana. Su semiología se basa principalmente a la presencia de secreción vaginal anormal en cuanto a cantidad, color y olor (leucorrea), acompañada o no de dolor abdominal bajo y síntomas específicos de cervicitis (81). Esta clasificación se aplica como parte del manejo sindrómico de las ITS e incluye entidades clínicas relacionadas con *M. genitalium* (cervicitis) y otras no relacionadas (vaginosis bacteriana (VB)) (77) .

2.6.2.2 Cervicitis

La cervicitis se define atendiendo a criterios clínicos o de laboratorio. La cervicitis clínica es el proceso inflamatorio, agudo o crónico, del cuello del útero o cérvix con enrojecimiento, friabilidad, producción de secreción mucopurulenta, con o sin leucorrea. Por otro lado, la definición microscópica de cervicitis se basa en la presencia

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de ≥ 10 polimorfonucleares por campo en el frotis de la secreción cervical, lo cual es un marcador de leucorrea (39, 81). La presencia de leucorrea como marcador de cervicitis tiene un valor predictivo negativo alto (la presencia de cervicitis es poco probable en ausencia de leucorrea) (39, 77). Estudios de meta-análisis muestran que *M. genitalium* se asocia al desarrollo de cervicitis (OR:1,66 (IC 95%, 1,35–2,04)) y alrededor del 50 % de las mujeres con cervicitis están infectadas con *M. genitalium* (60, 61).

2.6.2.3 Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana (VB) es un síndrome de origen polimicrobiano, resultado del remplazo de *Lactobacillus* spp. productores de peróxido de hidrógeno por comunidades microbianas de bacterias anaerobias, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp. y otras bacterias no cultivables. La VB es la entidad clínica que más contribuye al desarrollo del SFV. Aunque la mayoría de las mujeres con VB son asintomáticas, todas las que presentan síntomas pueden ser clasificadas dentro del SFV (39). El diagnóstico clínico se basa en la presencia de tres de los cuatro criterios de Amsel para la VB: leucorrea blanca homogénea, presencia de células guías en el exudado vaginal, pH > 4,5 y desprendimiento de aminas (olor a pescado) de la secreción vaginal antes o después de la adición de KOH al 10% (39, 81). No existen evidencias que vinculen la infección por *M. genitalium* como agente causal del desarrollo de VB (9, 39, 60, 61).

2.6.2.4 Síndrome de dolor abdominal bajo

El síndrome de dolor abdominal bajo (SDAB) o enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), se caracteriza por la aparición de síntomas de dolor abdominal bajo referido o dolor durante las relaciones sexuales, con signos al examen físico de dolor a la descompresión o defensa muscular abdominal o dolor a la movilización del cuello uterino, que algunos

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

casos pueden acompañarse de dolor a la movilización de los anejos y cervicitis. Puede aparecer temperatura mayor a 37,8°C (81). Este síndrome incluye un conjunto de entidades clínicas inflamatorias del aparato urogenital femenino alto, incluyendo cualquier combinación de endometritis, salpingitis, absceso tubo-ovárico y peritonitis (39). Aunque la etiología del SDAB es de naturaleza polimicrobiana, *M. genitalium* se asocia a este síndrome urogenital con un OR de 2,53 (IC 95%, 1,03–6,26) teniendo las mujeres infectadas, dos veces más riesgo de desarrollar EPI (39, 60, 61, 77).

2.6.2.5 Nacimiento pretérmino

Según el consenso cubano, se reconoce como nacimiento o parto pretérmino a todo el niño nacido antes de las 37 semanas de gestación y/o con un peso inferior a los 2500 g (81). La etiología de este trastorno se debe a factores constantes o variables, dependientes o independientes, repetitivos o no recurrentes, prevenibles o inevitables, agudos o crónicos y simples o múltiples. Dentro de estos factores, las causas infecciosas juegan un papel importante (81). *M. genitalium* se asocia con un riesgo moderado al desencadenamiento de un parto pretérmino (OR: 1,89 (95% CI, 1,25–2,85)), aunque su contribución en esta situación no ha sido dilucidada en su totalidad (77).

2.6.2.6 Trastornos de la fertilidad

Según el consenso cubano, se considera a una paciente infértil o con trastornos de la fertilidad (TF), cuando existe la imposibilidad de concebir un embarazo de forma natural después de un año de intentos (81). Los factores etiológicos de este trastorno pueden deberse a diferentes alteraciones del aparato reproductor y de la fecundación en sí. Las causas infecciosas de estas alteraciones se deben a secuelas como consecuencia de infecciones no tratadas o asintomáticas, principalmente como una complicación de la

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

EPI. *M. genitalium* tiene una fuerte asociación al desarrollo de trastornos de la fertilidad en mujeres sexualmente activas infectadas, con un OR de 2,43 (CI 95%, 0,93–6,34), aunque los estudios disponibles a nivel internacional son pocos (60, 61, 77).

2.6.2.7 Aborto espontáneo

Se reconoce como aborto espontáneo a la pérdida de un embrión o feto por causas no provocadas intencionalmente. Esta patología es multifactorial, aunque de manera general pueden dividirse en ovulares o maternas. Las causas infecciosas entran dentro de la clasificación materna y se deben al desarrollo de procesos inflamatorios del endometrio, donde los micoplasmas se reconocen como uno de los agentes principales (81). Las infecciones por *M. genitalium* en mujeres embarazadas se asocia a la ocurrencia de abortos espontáneos con un OR de 1,82 (IC 95%, 1,10–3,03) (77).

2.7 Diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por *M. genitalium*

2.7.1 Muestras clínicas

La muestra clínica ideal para la detección de las infecciones urogenitales por *M. genitalium* no está del todo establecida. Sin embargo, existen algunas recomendaciones en cuanto al tipo de espécimen clínico, colecta y conservación de las muestras en dependencia al tipo de paciente.

2.7.1.1 Muestras provenientes de mujeres

2.7.1.1.1 Exudado endocervical

El exudado endocervical constituye una de las muestras clínicas con mejor sensibilidad para el diagnóstico de infecciones por *M. genitalium* en mujeres con ITS. Si se inocula

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

el exudado endocervical en una muestra de orina de la misma paciente, la sensibilidad llega a ser de hasta un 96 %. La desventaja de este tipo de espécimen resulta en que la toma de la muestra debe realizarse por un técnico o profesional calificado para estos procedimientos (9, 82).

2.7.1.1.2 Exudado vaginal

El exudado vaginal resulta la muestra femenina más útil para el diagnóstico de las infecciones por *M. genitalium*. La sensibilidad de este espécimen es del 84 % cuando se analiza cómo muestra única. Cuando se combina con una muestra de orina, la sensibilidad es superior al 98 % (60, 61, 82). Junto a la alta sensibilidad de este tipo de espécimen, se encuentra que puede ser una muestra autocolectada por las pacientes lo cual no genera ningún tipo de molestia o dolor para la misma. Sin embargo, este tipo de espécimen no resulta útil para estudios microbiológicos donde además de *M. genitalium*, se busquen otros micoplasmas como *M. hominis* y *Ureaplasma spp.*, pues estos forman parte de la microbiota normal de la vagina (37). Por tanto, esto limita la utilidad de este espécimen solo para aquellos casos donde los criterios clínico-epidemiológicos justifiquen solo el diagnóstico de *M. genitalium* (13, 60, 61).

2.7.1.2 Muestras provenientes de hombres

2.7.1.2.1 Muestras de orina

En el caso de los hombres con alguna ITS asociada a *M. genitalium*, las muestras de orina autocolectadas (10 -15 mL) permiten una alta sensibilidad (98 %) en la detección molecular de esta bacteria. No existen datos sobre el tiempo medio en que puede ser

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

conservada la muestra de orina, por lo que se sugiere utilizar los criterios establecidos para el caso de *C. trachomatis* (muestras conservadas a 4°C hasta dos horas después de tomadas o -70°C para períodos más largos). Para los ensayos moleculares, la muestra de orina debe ser concentrada a 20 000 xg durante 30 min., y el sedimento sometido a extracción de ADN (9, 60, 61). Para los intentos de aislamiento de *M. genitalium*, la muestra de orina debe ser centrifugada a 20 000 xg y el sedimento resuspendido en un medio de transporte adecuado (Friis, SP4 o UTM) e inmediatamente conservado a -80°C (24).

2.7.1.2.2 Exudado uretral

En hombres con SU, el exudado uretral profundo (5 -10 cm), colectado por un médico o especialista, resulta una muestra útil con una buena sensibilidad (82 %) para el diagnóstico molecular y el aislamiento de *M. genitalium* (9, 15, 83). Los especímenes uretrales deben ser tomados con hisopos de Dracón, alginato u otro material diferente al algodón, pues este último puede interferir tanto en la detección como en recuperación de *M. genitalium* (9).

2.7.1.2.3 Exudado rectal

El exudado rectal profundo (10-12 cm) resulta la muestra de elección en el caso de los HSH o en mujeres, que declaren tener relaciones anales receptivas desprotegidas. La alta prevalencia de *M. genitalium* en muestras rectales de HSH sugieren que en caso de no ser muestreado este sitio anatómico, el 70 % de los hombres infectados con esta bacteria no son detectados (60, 61).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.7.1.3 Medios de transporte para los exudados urogenitales y rectales

Una vez colectada la muestra, el hisopo con el espécimen clínico (exudado) se inocular en un medio de transporte adecuado, que permita tanto la viabilidad como la integridad celular de *M. genitalium* para evitar la destrucción del ADN y la consiguiente ocurrencia de falsos negativos en las PCR (24). Existen varias formulaciones de medios de transporte, tanto comerciales como caseros, que permiten el mantenimiento eficiente de la integridad celular de *M. genitalium*. Dentro de los medios caseros, los medios 2-SP, Friis y SP4 son los que mejores resultados muestran en la literatura (9, 15, 24). Varios medios comerciales como ProbeTec medium (BD, Sparks, EUA), Amplicor UTM (Roche Molecular Diagnostics, Alemania), Copan Universal Transport Medium (UTM) (Copan, Italia), han sido evaluados para la conservación de especímenes para el diagnóstico de infecciones por *M. genitalium* utilizando la PCR. De estos, los mejores resultados de sensibilidad se obtuvieron con el medio UTM (Copan, Italia), con un 100 % de sensibilidad al re-muestrear los exudados conservados a -20°C a más de 1 año de haberlos colectados (84). No obstante, para una mejor sensibilidad clínica se sugiere conservar las muestras en este medio, y una vez en el laboratorio, realizar inmediatamente de ser posible la extracción de ADN y la PCR. (9, 60, 61, 84).

2.7.2 Cultivo in vitro y obtención de aislados de *M. genitalium*

Contrario a otras especies de micoplasmas de origen humano, *M. genitalium* se aísla muy rara vez a partir de muestras clínicas inoculadas directamente en medios de cultivo para micoplasmas (14). El crecimiento en medio sólido es muy lento, y en un principio las colonias no muestran la forma típica de “huevo frito”; sin embargo, después de la

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

adaptación del microorganismo al cultivo, las colonias presentan las características similares al crecimiento de otros micoplasmas.

2.7.2.1 Medios de cultivo para *M. genitalium*

Mycoplasma genitalium es una bacteria exigente que requiere de varios precursores metabólicos para la síntesis de biomoléculas y otras funciones celulares claves. Uno de sus principales requerimientos es la demanda de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, monosacáridos, ácidos grasos y aminoácidos esenciales. Todos estos nutrientes deben ser incorporados a los medios de cultivo que pretendan utilizarse para la propagación in vitro de *M. genitalium* (45, 85, 86). Existen varias formulaciones de medios de cultivo que permiten el crecimiento de *Mycoplasma genitalium*. Los más utilizados son el medio SP4, Friis y Hayflick (14, 15, 18, 24, 33). En todos estos medios se identifican cuatro componentes claves: suero animal (fuente de colesterol y ácidos grasos), extracto de levadura (fuente de precursores de ácidos nucleicos), agar (agente gelificante) y suplementos antimicrobianos. El suero de caballo resulta un poco más efectivo en la promoción del crecimiento de *M. genitalium* que el suero fetal bovino. Ambos, son fuente de precursores del metabolismo de lípidos y proteínas, y el suero a una concentración del 20 %, resulta óptima para la multiplicación en cultivo axénico de *M. genitalium*. La utilización de extracto de levadura fresco, obtenido por el método de hidrólisis ácida, resulta superior a otras formulaciones caseras y comerciales. Para la preparación de los medios sólidos, la agarosa y el agar noble (purificado) son las únicas presentaciones de agentes gelificantes que permiten el desarrollo de colonias de

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

M. genitalium, pues otras formulaciones comerciales resultan tóxicas para esta especie de micoplasma (15).

Mycoplasma genitalium es un mal competidor, y la microbiota acompañante en las muestras urogenitales resulta un problema para el aislamiento de este microorganismo en medios de cultivo de alto valor nutricional (18). Es por ello que se incorporan un grupo de agentes antimicrobianos selectivos que no afecten la multiplicación de *M. genitalium*. Se prefiere utilizar antimicrobianos que actúen sobre la síntesis de la pared celular (penicilinas y cefalosporinas), polimixinas, inhibidores de la vía del ácido fólico (sulfamidas) y antifúngicos (azoles). Sin embargo, aun cuando el sitio de acción de estas drogas no se encuentra presente en *M. genitalium*, se ha visto que altas concentraciones de estos agentes pueden inhibir el crecimiento del mismo, tal vez debido a impurezas químicas derivadas del proceso de síntesis farmacológica. Bajas concentraciones de penicilina G resultan menos inhibitorias que la ampicilina. En el caso de los antifúngicos que se utilizan (azoles), se evidencia cierta toxicidad a concentraciones superiores a 12,5 mg/L. Este efecto antagónico residual, se explica por la similitud química entre el colesterol de la membrana celular de *M. genitalium* y el ergosterol de la pared de los hongos, diana de las drogas antifúngicas empleadas (17, 33).

2.7.2.2 Co-cultivo de *M. genitalium* en cultivos celulares

Después de los primeros intentos de aislamiento de *M. genitalium* en medio SP4 en la década del 80 del siglo pasado, no se obtuvieron nuevos aislados en medios de cultivo libre de células (2).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 1996, se describió un nuevo método para el aislamiento de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas, utilizando el co-cultivo en células Vero y la posterior adaptación a medio libre de células. En este caso solo se inocularon aquellas muestras positivas mediante PCR, lo cual permitió el ahorro de recursos y tiempo (15). Esta metodología fue optimizada mediante la incorporación del monitoreo del crecimiento de *M. genitalium* mediante qPCR (17, 24).

Para el co-cultivo en células Vero, se utiliza una suspensión fresca de 200 000 células/mL en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 2 % de Ultroser G (Pall Life Sciences, EUA), 500 U/mL de penicilina G y 250 µg/mL de polimixin B (24). Las muestras de exudado se inoculan directamente, mientras que, en el caso de las muestras de orina, se recomienda realizar una concentración de la muestra a 20 000 xg durante 30 min y luego resuspender el sedimento en medio MEM y después proceder a la inoculación (17, 24). Para lograr una mayor concentración de *M. genitalium* en los cultivos, el medio sobrenadante no se cambia, aun cuando muestre signos de acidificación. Según los resultados obtenidos sobre la dinámica de crecimiento de *M. genitalium* en MEM con Ultroser G, los cultivos deben ser incubados hasta 14 días a 37°C con un 5 % de CO₂. Luego, las células se desprenden con ayuda de un asa bacteriológica desechable estéril y se resuspenden en el medio sobrenadante. Un mL de esta suspensión se conserva a -80°C como respaldo, 0,1 mL se utiliza para la extracción de ADN (monitoreo del crecimiento por qPCR) y el resto se re-inocula en un nuevo frasco con suspensión fresca de Vero. Este procedimiento se repite hasta obtener concentraciones de 10⁶ genoma equivalentes por mL (geq/mL) de *M. genitalium*, luego

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de lo cual, se inocula el sobrenadante en medio Friis para adaptar al aislado a crecer en medio libre de células (24).

Para la autenticación de los nuevos aislados se utiliza la genotipificación a partir del ADN genómico del mismo y de la extracción de ADN de la muestra clínica original. Esto se debe a que durante los procedimientos de cultivo de varias muestras a la vez, es posible que ocurran contaminaciones cruzadas, como se ha visto en el pasado (15).

Otros autores han utilizado el co-cultivo en otras líneas celulares con medio suplementado con suero fetal bovino al 10 %, logrando el aislamiento de al menos seis nuevos aislados (18). Sin embargo, la comparación del Ultroser G con el suero fetal al 10 % demostró la superioridad del primero para la recuperación de aislados de *M. genitalium* (15). Hasta el momento, no existen evidencias publicadas sobre la comparación de otras concentraciones de suero y el Ultroser G para el cultivo de este micoplasma. Hasta el momento se notifican un total de 81 aislados en todo el mundo, de estos, 46 (obtenidos mediante co-cultivo en Vero) se confirmaron como nuevos aislados mediante la secuenciación del gen *mgpB* (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Aislados de *Mycoplasma genitalium* notificados en la literatura internacional.

País de origen	Número de aislados	Lugar del aislamiento	Referencia
Reino Unido	2	Estados Unidos	(14)
Dinamarca	7	Dinamarca	(15, 19, 20)
Francia	3	Dinamarca	(11, 17)
Suecia	12	Dinamarca	(17, 19, 20)
Noruega	4	Dinamarca	(19, 20)
Japón	4	Dinamarca	(24)
Australia	7	Dinamarca	(19, 20)
Estados Unidos	34	Estados Unidos	(18, 20, 87)
China	8	China	(88)

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.7.3 Diagnóstico molecular

2.7.3.1 Extracción de ADN a partir de muestras clínicas

Para la extracción de ADN a partir de las muestras clínicas se han utilizado diferentes procedimientos. En los inicios del diagnóstico molecular de *M. genitalium*, el método de tampón-lisis-proteinasa K se utilizó en varios estudios (11, 64, 78, 89-91). Otros estudios han utilizado metodologías más sencillas como el choque osmótico y térmico, aunque este procedimiento no garantiza la eliminación de posibles inhibidores presentes en las muestras clínicas (36, 37).

El método del Chelex® 100 constituye un procedimiento sencillo, rápido (15 min) y sensible. Este resulta uno de los procedimientos más utilizados en la literatura para la extracción de ADN con fines de realizar el diagnóstico de *M. genitalium*. El Chelex® 100 es un polímero orgánico quelante, que tiene la propiedad de secuestrar iones divalentes presentes en las muestras clínicas e inactivar a los principales inhibidores de la *Taq*-polimerasa. Sumado a esto, la manipulación de la muestra clínica para la extracción con Chelex® 100 es ínfima, lo cual garantiza que se evite una posible contaminación cruzada entre las muestras clínicas, con la consiguiente ocurrencia de falsos positivos (2, 19, 21, 24, 68, 92-97).

Por otro lado, los métodos de extracción y purificación de ADN mediante estuches comerciales, se utilizan con frecuencia en el diagnóstico de *M. genitalium* para la obtención de ADN a partir de muestras clínicas urogenitales. Algunos de los estuches comerciales más utilizados son el QIAmp® DNA mini kit (Qiagen, Alemania) y el MagNa Pure 96 (Roche, Alemania). Estos estuches comerciales garantizan la extracción

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

eficiente del ADN y su posterior purificación, dando como resultado un extracto libre de inhibidores de la PCR. De igual manera se humaniza el trabajo al utilizar equipos de extracción automatizados con estos estuches comerciales, lo cual permite la realización de una mayor número de extracciones sin riesgo de contaminación cruzada por mala manipulación (98-102).

2.7.3.2 Ensayos de PCR punto final para *M. genitalium*

El primer ensayo de la PCR para la detección de *M. genitalium* se publicó en 1991 y se basó en la amplificación de un fragmento de 281 pb del gen que codifica para la proteína MgPa (89). Poco tiempo después, Palmer y colaboradores publicaron un método semejante, utilizando otro juego de cebadores para el mismo gen. Este último ensayo se basó en una PCR semi-anidada, la cual tiene como principal desventaja la ocurrencia de falsos positivos debido a contaminaciones durante la amplificación (103). La utilización como diana de este gen se fundamentó en aquel entonces, en que el gen *mgpB* fue uno de los primeros genes de *M. genitalium* secuenciado. Hasta ese momento se creía que los genes de la MgPa eran conservados. Sin embargo, cuando posteriormente se analizó la secuencia de esos genes, se encontró la existencia de regiones variables e hipervariables (2, 89). Se necesitaba entonces desarrollar nuevos métodos de PCR que utilizara como diana genes de *M. genitalium* más conservados (9).

Uno de los genes más utilizados para el diagnóstico molecular de *M. genitalium* es el del ARNr 16S; sin embargo, cuando los ensayos de PCR para MgPa se desarrollaron, la secuencia del mismo se desconocía. Este gen se encuentra muy conservado y no existe una marcada variación entre las cepas de *M. genitalium*. No obstante, algunas especies

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de micoplasmas, como *M. pneumoniae*, relacionadas filogenéticamente con *M. genitalium*, muestran similitud en la secuencia del ARNr 16S. Estas especies no se encuentran de forma común en el tracto urogenital del hombre, por lo que la posible ocurrencia de falsos positivos constituye un hecho fortuito. Sin embargo, los ensayos de PCR punto final basados en este gen son los más utilizados en estudios epidemiológicos sobre infecciones por *M. genitalium* (46, 48, 104-106).

De forma general, para el diagnóstico molecular de *M. genitalium* mediante PCR cualitativos se prefiere realizar un ensayo de pesquisa con los cebadores para el gen del ARNr 16S y en la mayoría de los casos confirmar los resultados positivos con un juego de cebadores para el gen de la MgPa (9, 91, 107).

2.7.3.3 Ensayos de PCR en tiempo real cuantitativos

El primer ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) publicado para *M. genitalium* utilizaba también como diana el gen del ARNr 16S y se desarrolló en 2002. La especificidad del ensayo depende de la sonda utilizada, pues el juego de cebadores empleado es complementario a la mayoría de las especies de *Mollicutes*. A ello se suma las mismas desventajas antes mencionadas para la PCR cualitativa (108).

Dada estas dificultades y desventajas en la utilización del ARNr 16S como diana molecular, se desarrollaron otros qPCR basados en la amplificación de los genes de la adhesina celular *mgpA* y *mgpB* (11, 109), el gen de la gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa (110) y el gen MG299 de la proteína P115 de *M. genitalium* (111). Todos estos ensayos resultan muy sensibles y comparables entre sí, con un límite de detección de menos de 5 copias por mL. Esta bacteria se encuentra en muy baja

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

concentración (mediana de 100 – 1000 geq/mL) en las muestras clínicas, siendo 100 veces inferior a *C. trachomatis* incluso en pacientes con una sintomatología aguda (figura 2.6) (112).

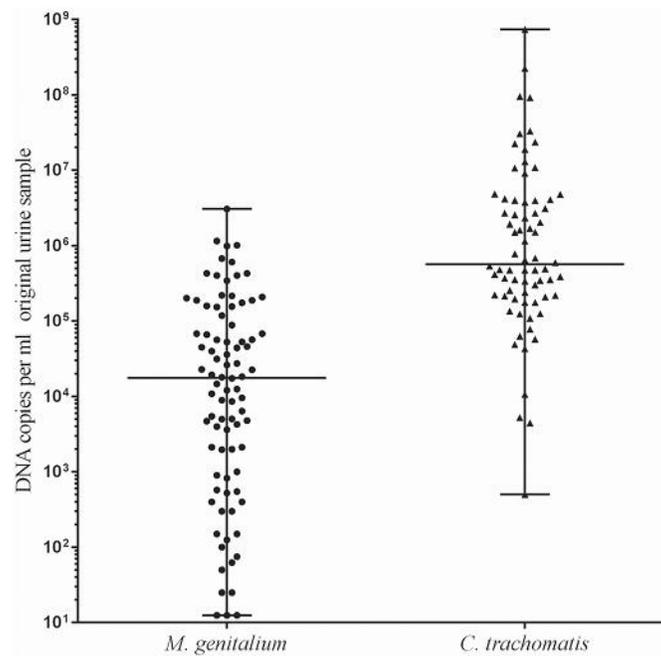


Figura 2.6 Comparación de la concentración de *Mycoplasma genitalium* y *Chlamydia trachomatis* (copias por mL de orina) en muestras de pacientes con síndrome uretral (la barra negra representa las medianas, $p < 0.0001$, Mann–Whitney test). Tomado de Frølund y colaboradores (112).

Otro aspecto importante de las qPCR es que son sistemas cerrados, donde la amplificación y detección se realizan en un vial o pocillo de una placa, sin necesidad de electroforesis u otras manipulaciones adicionales del producto amplificado. Este aspecto condiciona que a diferencia de la PCR punto final, la qPCR tiene menor riesgo de contaminación (2).

Hasta el momento no existe ninguna qPCR comercial aprobada por el Departamento Federal de Medicamentos de los EUA (FDA, del inglés Federal –Drugs Administration) para uso diagnóstico. Solo existe un ensayo de qPCR comercial, fabricado y utilizado

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

en Rusia, que ha sido validado según los requerimientos internacionales de calidad para ensayos biomédicos. Los valores de sensibilidad de esta qPCR comercial van desde el 70 hasta el 100 % y la especificidad es del 100 %, en dependencia del tipo de muestra utilizada (60, 61, 94).

Los ensayos de qPCR no solo han sido utilizados en los estudios epidemiológicos o como diagnóstico de infecciones por *M. genitalium*, sino que también permitieron mejorar los procedimientos de aislamiento en cuanto al monitoreo del crecimiento de *M. genitalium* en cultivos celulares, así como la implementación de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Estas bondades se lograron gracias a la posibilidad de cuantificación de esta metodología, ya que el crecimiento de *M. genitalium* en cultivos celulares muy pocas veces se evidencia por efectos citopáticos (17, 19, 20, 24).

Para considerar optima una qPCR en la detección de *M. genitalium*, se debe obtener un valor del coeficiente de regresión lineal (r^2) > 0,95, mientras que para validar los resultados de cuantificación el valor de r^2 debe ser >0,98 (113).

2.8 Clasificación genotípica de *M. genitalium*

La clasificación genotípica de *M. genitalium* se describe por primera vez en 2006 por Hjorth y colaboradores como resultado del estudio del gen *mgpB* durante el diseño de la qPCR (11, 21). Esta clasificación se basa en el polimorfismo de simple nucleótido de la región hipervariable B del gen *mgpB*, y se demuestra que el sistema de genotipificación tiene un índice de discriminación superior al 0,98 (21). Este sistema es el más utilizado para la autenticación de los nuevos aislamientos, y se han identificado más de 190 genotipos *mgpB* (2, 19, 21, 24, 114-117). Otros sistemas se basan en el número de

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

secuencias cortas repetidas del gen MG309, o en el polimorfismo de simple nucleótido de los genes del ARNr (118). Sin embargo, la combinación de sistemas de clasificación multilocus basado en el gen *mgpB* (MG191) y el gen MG309 muestra un índice de discriminación de 0,99 y se aplica en estudios de cadenas de transmisión sexual (23, 118-120).

2.9 Resistencia antimicrobiana y tratamiento de las infecciones por *M. genitalium*

2.9.1 Resistencia intrínseca

Mycoplasma genitalium, al igual que el resto de los *Mollicutes*, carecen de pared celular, por lo que las drogas antimicrobianas con efecto o diana de acción sobre la síntesis de la misma (beta-lactámicos y aminoglucósidos) no afectan su integridad celular. De manera semejante, esta bacteria no posee la vía de síntesis de folato, lo que hace que sea resistente a las sulfamidas y al ácido nalidíxico (28, 34, 121, 122).

2.9.2 Resistencia adquirida

Los primeros estudios in vitro de susceptibilidad antimicrobiana de *M. genitalium* mostraron que este micoplasma tenía una alta sensibilidad a los macrólidos, en especial a la azitromicina, pero una sensibilidad reducida a las tetraciclinas y a las quinolonas de primera y segunda generación (17, 31, 123-125).

Las evidencias actuales muestran que las infecciones urogenitales por *M. genitalium* constituyen una de las ITS emergentes y en algunos casos no tratables debido a la emergencia de cepas multirresistentes, provocan una cierta preocupación sobre la efectividad del manejo de las ITS a nivel internacional (4, 35).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.9.2.1 Tetraciclinas

Durante varios años, se utilizó la doxiciclina para el manejo clínico de las infecciones por *M. genitalium*. Sin embargo, los ensayos clínicos publicados muestran que el porcentaje de cura microbiológica con doxiciclina se encuentra entre 17 – 94 % (4), por lo que actualmente los tratamientos con tetraciclinas como primera línea están en desuso.

Según datos de concentración mínima inhibitoria (CMI), la mayoría de las cepas de *M. genitalium* evaluadas son susceptibles a la doxiciclina, pues presentan valores de CMI₉₀ de 1 mg/L (20). Sin embargo, estos resultados parecen ser contradictorios a los de varios ensayos clínicos donde el uso de doxiciclina solo mostró una baja efectividad (30 – 40 %) en la eliminación de *M. genitalium* de pacientes con ITS (71, 126-128). Esta discrepancia entre los resultados in vitro y el bajo porcentaje de efectividad in vivo no tiene hasta el momento ningún estudio ha encontrado alguno de los determinantes genéticos de resistencia a tetraciclinas, por lo que este fenómeno permanece sin explicación (35).

2.9.2.2 Macrólidos

Todas las cepas de *M. genitalium* disponibles y aisladas anterior a 2003 son susceptibles a los macrólidos (35). Durante varios años, los estudios epidemiológicos mostraron una buena respuesta en la utilización de azitromicina para el tratamiento de las ITS por este micoplasma (92, 123, 124, 129-132). En 2008 se publica por primera vez los resultados de la confirmación molecular de resistencia a azitromicina en aislados de *M. genitalium* provenientes de pacientes con fallo al tratamiento con macrólidos (19). La resistencia a

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

los macrólidos en *M. genitalium* se debe por una mutación en la región V del gen que codifica para el ARNr 23S, en las posiciones 2058, 2059 (para eritromicina, claritromicina y azitromicina) y 2062 para josamicina (numeración de *Escherichia coli*). Atendiendo a estas mutaciones, se definen siete genotipos de los cuales, solo el 1, 2 y 3 han sido encontrado en aislados de pacientes con fallo al tratamiento. El resto de los genotipos solo se han detectado en muestras clínicas y su contribución a la resistencia fenotípica de *M. genitalium* no ha sido demostrada (19, 35, 133). Las mutaciones A2058G, A20159G y A2058C son las más comunes en las muestras de pacientes con fallo al tratamiento con macrólidos (19, 20, 97, 99, 113, 116, 134).

El gen del ARNr 23S se encuentra en copia única y dada la alta tasa de mutación que tienen los micoplasmas, estas mutaciones puntuales ocurren de forma natural y aleatoria. De esta forma en cada población microbiana salvaje de *M. genitalium* existe una proporción de células mutantes, lo cual se denomina resistencia heterotípica (35). La utilización de dosis única de azitromicina se asocia con la selección y emergencia de la resistencia a los macrólidos, como consecuencia de una dosis subóptima que funciona como presión selectiva sobre una población heterogénea (19). Este hecho puede explicar las observaciones de tres estudios recientes donde se relaciona una alta concentración microbiana con un aumento en el riesgo de fallo al tratamiento con macrólidos, o sea por cada aumento de la concentración de *M. genitalium* en $10 \log_{10}$, se duplica la probabilidad de fallo al tratamiento con 1 g de azitromicina (OR ajustado: 1,8, $p= 0,018$) (35, 119, 133, 135).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este mismo sentido, la utilización de dosis subóptimas de azitromicina durante más de 10 años a nivel internacional, condiciona, en cierta medida, la emergencia creciente de cepas resistentes a los macrólidos, las cuales superan en frecuencia el 40 % (23, 97, 136) y en algunos casos como en Groenlandia, la frecuencia es de 100 % (96).

2.9.2.3 Quinolonas

Las quinolonas han sido utilizadas a lo largo de los años para el tratamiento de las infecciones por *M. genitalium*. No obstante, si analizamos los valores de CMI de las cepas disponibles para las fluoroquinolonas de segunda generación (ciprofloxacina y ofloxacina) (17, 20), se evidencia una baja probabilidad de cura al utilizar estos antibióticos in vivo como ha sido comprobado en algunos estudios observacionales donde se ha obtenido un 59 % de éxito de cura (137, 138). Basado en datos in vitro, la levofloxacina (fluoroquinolona de tercera generación) resulta mucho más prometedora para el tratamiento de las infecciones por *M. genitalium*. Sin embargo, en los resultados de estudios observacionales, solo se ha obtenido un 54 % de éxito del tratamiento (139-142).

La moxifloxacina, una fluoroquinolona de cuarta generación, es altamente efectiva in vitro e in vivo para el tratamiento de *M. genitalium* (31). Una de las principales desventajas de esta quinolona es la gran cantidad de efectos tóxicos secundarios y su alto precio en el mercado. Es por ello que los esquemas de tratamiento incluyen esta droga como esquema de segunda línea, solo en aquellos casos donde se ha evidenciado el fallo al tratamiento con azitromicina (60). La resistencia a las quinolonas está mediada por mutaciones puntuales en las regiones determinantes de resistencia a

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

quinolonas (QRDR, del inglés , quinolone resistance determining regions) del gen *parC*, principalmente en los puntos calientes de mutación del aminoácido S83 y D87 (numeración de *M. genitalium*) (143). Mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parE* se han detectado en muestras clínicas de pacientes con uretritis por *M. genitalium*. La contribución a la resistencia fenotípica frente a quinolonas de estos genes no se ha determinado debido la ausencia de aislados con estas mutaciones (144). La prevalencia de *M. genitalium* resistente a moxifloxacinina varía en dependencia de la región geográfica, de un 5 % en Europa hasta un 47 % en Japón (23, 145-147).

En los últimos años, la emergencia de cepas de *M. genitalium* resistente a macrólidos y fluoroquinolonas constituye un problema en el manejo de las ITS. Estas cepas multirresistentes han hecho que las infecciones por *M. genitalium* sean consideradas las primeras ITS bacteriana intratables (136, 146).

2.9.3 Tratamiento de las infecciones por *M. genitalium*

A partir de 2015, *M. genitalium* se incorporó en los esquemas de tratamiento de las guías del Centro para el Control de Enfermedades de EUA (CDC, del inglés, Center for Disease Control). En estas guías, los protocolos de tratamiento sintomático y específico para *M. genitalium* en la uretritis, cervicitis, EPI, entre otras conciben la utilización de una dosis única de 1 g de azitromicina o doxiciclina 100 mg dos veces al día por siete días y como tratamientos alternativos: eritromicina 500 mg cuatro veces al día durante siete días, levofloxacinina 500 mg una vez al día por siete días u ofloxacinina 300 mg dos veces al día por siete días. En caso de fallo al tratamiento, se recomienda utilizar moxifloxacinina 400 mg diarios durante 10 días (39).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 2016 se publican las primeras guías para el diagnóstico, tratamiento y manejo de las infecciones por *M. genitalium*. Como recomendaciones a los pacientes se tiene que toda persona infectada con *M. genitalium* no debe tener relaciones sexuales desprotegidas, hasta que su pareja complete el tratamiento, sus síntomas hayan desaparecidos y el test de cura de ambos, a los 30 días, sea negativo. Aquellos pacientes con infección rectal por esta bacteria deben conocer el alto riesgo de transmisión de este sitio anatómico y que la eliminación con antimicrobianos resulta muy difícil en comparación con la uretra, por lo que el test de cura es muy importante. De igual manera los pacientes positivos deben ser analizados para otras ITS, pues la infección por *M. genitalium* duplica el riesgo de infección con otros patógenos de transmisión sexual (60, 61).

El tratamiento antimicrobiano específico depende del estatus de sensibilidad a macrólidos de la cepa de *M. genitalium* infectante. Aquellos pacientes infectados con *M. genitalium* sensible a macrólidos deben ser tratados con un tratamiento extendido de azitromicina (500 mg el primer día, seguido de 250 mg/día durante los días dos – cuatro). El test de cura se realiza a los 30 días posterior al inicio del tratamiento. En caso de fallo al tratamiento con azitromicina o estar infectado con una cepa resistente a macrólidos, se utiliza moxifloxacina 400 mg diarios durante 10 días. En caso de evidenciarse un fallo a tratamiento de segunda línea con moxifloxacina, se recomienda utilizar pristinamicina o doxiciclina por 14 días como tratamiento de tercera línea (60, 61).

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.9.4 Manejo sindrómico de las ITS

En los países de altos ingresos se utilizan ampliamente pruebas de diagnóstico de ITS muy precisas. Esas pruebas son particularmente útiles para diagnosticar infecciones asintomáticas. Ahora bien, en los países de ingresos bajos y medianos las pruebas de diagnóstico generalmente no están disponibles. Cuando lo están, suelen ser costosas y geográficamente inaccesibles; además, con frecuencia, los pacientes tienen que esperar mucho tiempo (o deben regresar) para recibir los resultados. En consecuencia, el seguimiento puede ser difícil y la atención o el tratamiento pueden quedar incompletos (13).

En los países de ingresos bajos y medianos, el manejo de casos se centra en la identificación de grupos coherentes de signos y síntomas fácilmente reconocibles, que luego determinarán el tratamiento a seguir, sin recurrirse a pruebas de laboratorio. Esto se conoce como manejo sindrómico. Este método, que suele fundamentarse en el uso de algoritmos clínicos, permite a los trabajadores sanitarios diagnosticar determinadas infecciones sobre la base de los síndromes observados (por ejemplo, secreción vaginal, secreción uretral, úlceras genitales, dolor abdominal) (13). Los componentes fundamentales de la vigilancia de las ITS para que los programas de control sean eficaces son: 1- la notificación de los casos de ITS utilizando enfoques sindrómicos y etiológicos. La información obtenida a partir de la notificación de casos, se emplea para definir la magnitud del problema en las poblaciones que acuden a recibir la atención correspondiente; 2- la evaluación de las etiologías de los síndromes: deben evaluarse periódicamente las etiologías de los síndromes de las ITS, a fin de fundamentar las

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

recomendaciones de tratamiento correctas y calcular la carga de morbilidad al hacer la combinación con los informes de casos sindrómicos. La gestión de los síndromes es sencilla, asegura un tratamiento rápido en el día y evita pruebas de diagnóstico costosas o no disponibles. No obstante, este enfoque pasa por alto las infecciones que no presentan ningún síndrome, que son la mayoría de la ITS en todo el mundo (148). Si bien los médicos pueden hacer un diagnóstico seguro basándose en los síntomas y signos clínicos, un diagnóstico certero por lo general exige la realización de pruebas de laboratorio específicas (13, 148).

2.10 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana para *M. genitalium*

Uno de los principales obstáculos en la realización de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana para *M. genitalium*, lo constituye la poca disponibilidad internacional de aislados. Los primeros ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se evalúan en las pocas cepas adaptadas a crecer en medios libres de células disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipos (ATCC) (26, 149). En 2005, Hamasuna y colaboradores describen por primera vez una metodología basada en el co-cultivo de *M. genitalium* en células Vero, que permite la realización de estudios de susceptibilidad antimicrobiana en un menor tiempo que el necesario para la realización de los ensayos de dilución en caldo. A modo general, esta metodología se basa en la realización de diluciones seriadas de los antimicrobianos a ensayar, en una placa de cultivo celular que contiene 2 mL de una suspensión de células Vero. Estas placas son inoculadas con una concentración de aproximadamente de 10 000 geq/mL de *M. genitalium* y transcurrido el tiempo de

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

incubación se calcula el porcentaje de inhibición para cada dilución del antimicrobiano mediante la determinación de la concentración microbiana por qPCR (17, 19, 20, 33).

En la actualidad no existen normas internacionales para el establecimiento de los métodos a utilizar en el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana y los puntos de corte a aplicar para *M. genitalium*, dada la imposibilidad de realizar estudios interlaboratorios multicéntricos que evalúen una gran cantidad de aislados, así como la dificultad, aún hoy existente, para el cultivo de *M. genitalium* a partir de las muestras clínicas (34). Es por ello que los esfuerzos se focalizan en la detección directa de genotipos o determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana, directamente de la muestra clínica o del ADN genómico del aislado.

El primer estudio realizado para la detección de genotipos resistentes a los macrólidos mediante PCR y la secuenciación del gen del ARNr 23S se realizó en 2008 (19). Este ensayo permite la detección de los genotipos mutantes directamente de los especímenes clínicos provenientes de pacientes con fallo al tratamiento con azitromicina, lo cual se correlaciona con el aislamiento y la corroboración de este genotipo en los aislados. Desde ese entonces, varios ensayos de PCR, más recientemente qPCR, se desarrollaron y evaluaron para la detección directa de mutaciones de resistencia a los macrólidos. Estas qPCR mostraron una excelente correlación con los resultados de la secuenciación del gen del ARNr 23S (99, 135, 136, 147).

La detección directa de resistencia a las quinolonas se implementó mediante la secuenciación de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*. Sin embargo, hasta el momento no se ha

CAPÍTULO 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

notificado ningún ensayo de PCR independiente de secuenciación que permita la detección de dichas mutaciones (12, 23, 147, 150).

2.11 Infecciones urogenitales por *M. genitalium* en Cuba. Antecedentes

El estudio de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba comenzó en el año 2006 en el IPK, con la colaboración de otros centros de salud de La Habana. La presencia de *M. genitalium* en muestras de pacientes masculinos con infecciones urogenitales se demuestra en estudios previos mediante PCR (36, 37). En 2012, Fernández establece varios algoritmos de diagnóstico molecular para los micoplasmas de origen humano, incluida la implementación de dos PCR simples para la detección de *M. genitalium* y presenta resultados preliminares de la aplicación de estos ensayos en grupos de pacientes masculinos y femeninos (37). Esos estudios no contemplaron ensayos para determinar los genotipos circulantes en el país ni la obtención de aislados autóctonos, lo que conlleva el desconocimiento de los perfiles de la susceptibilidad antimicrobiana, principalmente a los fármacos recomendados en el tratamiento sintomático de las ITS causadas por *M. genitalium* (35, 38, 39, 62), que dificulta, consecuentemente, el manejo de estas infecciones en la atención primaria de salud (APS). Esto último se debe a que el tratamiento sintomático de las ITS depende de que se proporcione el tratamiento contra los agentes patógenos comunes que causan los síntomas. En consecuencia, es importante evaluar de forma periódica los agentes patógenos causantes de un síndrome particular, para orientar los protocolos de tratamiento y el manejo clínico (40).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño general

Durante el período comprendido entre enero de 2009 a junio de 2015 se ejecutaron los siguientes estudios en el IPK para dar cumplimiento a los objetivos trazados.

- Se realizaron dos estudios de series de casos de 2009 a 2015 para diagnosticar la infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos con SFV, SDAB, TF, AE y SU (primer objetivo).
- Se realizaron tres estudios experimentales para la obtención y caracterización genotípica de aislados autóctonos de *M. genitalium* (segundo objetivo).
- Se realizaron dos estudios experimentales para la determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados cubanos frente a fármacos de primera y segunda líneas de tratamiento (tercer objetivo).

3.2 Material biológico de referencia

- **Línea celular:** se utilizó la línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano) ATCC CCL-81.
- **Microorganismos:** se utilizaron cepas de referencia de *M. genitalium* (Anexo I) donadas gentilmente por el Statens Serum Institut (SSI) – Copenhague, Dinamarca.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Se extrajo el ADN genómico de células Vero y de la cepa de *M. genitalium* G37-DK mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. En el extracto obtenido se cuantificó la concentración de ADN mediante espectrofotometría. Se prepararon diluciones decimales desde 10^6 hasta 1 000 geq/mL de ADN de *M. genitalium* G37-DK en solución de ADN de Vero, se tuvo en cuenta que 0,48 fg de ADN de *M. genitalium* equivalen a un genoma equivalente (geq) (91).

3.4 Frecuencia de infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos con síndrome de flujo vaginal y dolor abdominal bajo, síndrome uretral, aborto espontáneo y trastornos de la fertilidad

3.4.1 Serie de casos I: estudio en mujeres cubanas con el diagnóstico clínico de síndrome de flujo vaginal/ síndrome de dolor abdominal bajo, aborto espontáneo y trastornos de la fertilidad

Criterios de inclusión: fueron incluidas todas las pacientes cubanas que asistieron al Hospital del IPK durante el periodo comprendido entre enero de 2009 a junio de 2015, con manifestaciones urogenitales y un diagnóstico clínico previo de SFV/SDAB (62), AE y TF, realizado en la APS o en las consultas de reproducción asistida, que no recibieron tratamiento con antimicrobianos en un periodo de 28 días antes de su estudio microbiológico.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de exclusión: Fueron excluidas de estudio pacientes que no estuvieron de acuerdo en participar y aquellas que habían recibido un tratamiento antimicrobiano en menos de 28 días.

3.4.2 Serie de casos II: estudio de hombres cubanos con diagnóstico clínico de síndrome uretral.

Criterios de inclusión: fueron incluidos todos los pacientes masculinos que asistieron al Hospital del IPK durante el periodo comprendido entre enero de 2009 a junio de 2015, con manifestaciones urogenitales característica del SU (62), y que no recibieron tratamiento con antimicrobianos en un periodo de 28 días antes de su estudio microbiológico.

Criterios de exclusión: Fueron excluidos de estudio los pacientes que no estuvieron de acuerdo en participar y aquellos que habían recibido un tratamiento antimicrobiano en menos de 28 días.

3.4.3 Colecta, transporte y conservación de la muestra biológica

A cada paciente se le colectó una muestra de exudado endocervical (mujeres) o exudado uretral (hombres) siguiendo los procedimientos establecidos (9), los que se describen a continuación.

3.4.3.1 Muestras de exudado endocervical

Con la paciente en posición ginecológica, se introdujo suavemente el espéculo sin lubricar (o lubricado con agua templada). Con una torunda seca se limpió el exocérvix

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

de secreciones vaginales. Se comprimió cuidadosamente el cérvix con las palas del espéculo y se introdujo un hisopo en el canal endocervical con un suave movimiento de rotación con el objetivo de eliminar las secreciones y el mucus cervical. Luego se tomó otro hisopo y se repitió la misma operación, tratando de lograr una descamación del epitelio cervical y se retira cuidadosamente sin tocar las paredes vaginales. El hisopo con la muestra biológica se introdujo en un tubo con 3 mL de medio comercial UTM-RT (Copan, Italia). Los tubos de UTM con los especímenes clínicos se transportaron a 4°C en un contenedor de seguridad biológica hasta el LNRIM-IPK, donde se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.4.3.2 Muestras de exudado uretral

La muestra se tomó temprano en la mañana antes de que el paciente orinara o después de una hora de realizada la micción. Para ello, se limpió cuidadosamente la mucosa circundante con gasas estériles. Se introdujo un hisopo en la uretra unos 5 cm con un movimiento de rotación. El hisopo con la muestra biológica se introdujo en un tubo con 3 mL de medio comercial UTM-RT (Copan, Italia) y se transportó al LNRIM-IPK, en las mismas condiciones antes mencionadas para los exudados endocervicales.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.4 Diagnóstico molecular de *M. genitalium* en las muestras clínicas

El diagnóstico molecular de *M. genitalium* se implementó siguiendo el algoritmo que se muestra en la figura 3.1.

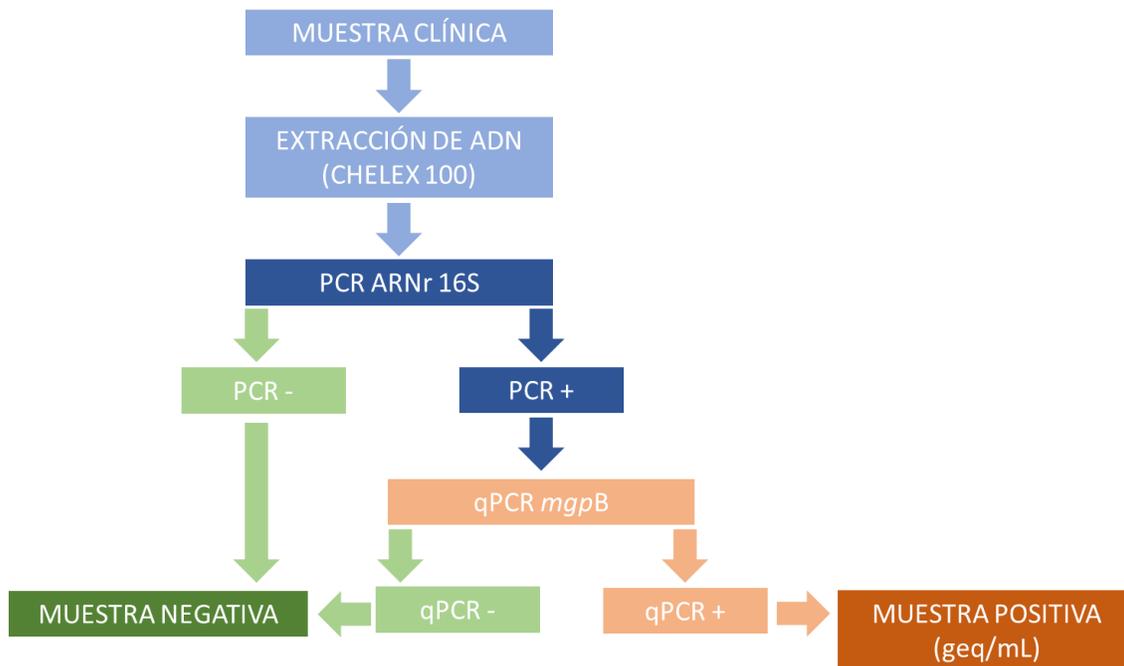


Figura 3.1 Algoritmo de trabajo en el LNRIM-IPK para el diagnóstico molecular de infección por *Mycoplasma genitalium* a partir de las muestras clínicas, 2009 - 2015.

3.4.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Chelex® 100 (11). Para ello, 0,1 mL del medio UTM con la muestra biológica, se adicionaron a un vial con 0,3 mL de Chelex® 100 al 5 % en tampón Tris-EDTA (TE) al 1X. Los viales se homogenizaron en vortex por 1 min y se colocaron en un bloque térmico a 100°C durante 15 min. Luego, los viales se homogenizaron en vortex, se centrifugaron a 10 000 xg durante 1 min y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

Por cada 20 muestras clínicas analizadas, se incluyó un tubo de UTM-RT sin inocular como control negativo de extracción, el cual se procesó después de las muestras clínicas para comprobar la no ocurrencia de contaminación cruzada.

3.4.4.2 PCR ARNr 16S de *M. genitalium*

Se realizó una PCR simple descrita por Jensen y colaboradores en 2003 que amplifica un fragmento de 427 pares de bases (pb) del gen del ARNr 16S de *M. genitalium*, un control interno de amplificación (CIA) con un límite de detección de 1000 geq/mL (46).

3.4.4.2.1 Mezcla de reacción

La mezcla se preparó para un volumen final de 50 μ L (45 μ L de mezcla más 5 μ L de muestra). Cada mezcla contenía 1X de Tampón de PCR (Qiagen, Alemania); 2,5 mM de MgCl₂ (Qiagen, Alemania); 200 nM de cada desoxirribonucleótidos (Qiagen, Alemania); 100 copias/ μ L del CIA; 400 nM de cada cebador Mg16S-45F: 5'TAC ATG CAA GTC GAT CGG AAG TAG C 3' y Mg16S-447R: 5' AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG 3'; 2 U de Top-*Taq*-polimerasa (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 45 μ L. Como molde se utilizaron 5 μ L de los extractos de ADN de las muestras obtenidos mediante Chelex® 100, 5 μ L de ADN de *M. genitalium* (10⁵ geq/mL) como control positivo y 5 μ L de agua ultrapura como control negativo.

3.4.4.2.2 Programa de amplificación

La amplificación se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-plex HRM (Qiagen, Alemania), sin lectura en ningún canal de fluorescencia, mediante un programa formado

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

por un ciclo de 94°C durante 4 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y una amplificación final a 72°C de 5 min.

3.4.4.2.3 Visualización de los resultados

Los productos de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio, empleando un voltaje de 100 V durante 30 min. La visualización de los resultados se realizó utilizando un sistema digital de captura y análisis de imágenes con luz ultravioleta Uvitec (Cambridge, Reino Unido). El ensayo se consideró válido cuando se obtuvo la talla esperada de los amplicones de 623 pb (CIA) y 427 pb (control positivo de *M. genitalium*), y los controles negativos solo mostraron la amplificación del CIA. En cualquier otro caso el ensayo se consideró no válido y se repitió. En las muestras que mostraron amplificación, los amplicones se compararon con los de los controles positivo. Se consideraron como muestras negativas válidas, aquellas que mostraron amplificación del CIA, de lo contrario se consideraron inhibidas, se informaron cómo no válidas y se recomendó repetir la toma de muestra.

3.4.4.3 PCR cuantitativo *mgpB* para *M. genitalium*

Se realizó una qPCR basada en la amplificación de un fragmento 78 pb del gen *mgpB* (MG191) de *M. genitalium*, con un límite de detección de 100 geq/mL, utilizando los cebadores y sonda descritos Jensen y colaboradores en 2004 (11).

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.4.3.1 Mezcla de reacción

La mezcla se preparó para un volumen final de 25 μL (20 μL de mezcla más 5 μL de muestra). Cada mezcla contenía 1X de Tampón de PCR (Qiagen, Alemania); 2,5 mM de MgCl_2 (Qiagen, Alemania); 200 nM de cada desoxirribonucleótidos (Qiagen, Alemania); 1 μM de cada cebador MgPa-35F: 5'GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA 3' y MgPa- 432R: 5' GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC 3'; 100 nM de la sonda MgPa 380: FAM- ACT TTG CAA TCA GAA GGT-BHQ1; 2 U de Top-*Taq*-polimerasa (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 25 μL . Como molde se utilizaron 5 μL de los extractos de ADN de las muestras obtenidos mediante Chelex® 100, 5 μL de cada dilución de ADN de *M. genitalium* ($10^6 - 10^3$ geq/mL) como patrones de la curva estándar y 5 μL de agua ultrapura como control negativo.

3.4.4.3.2 Amplificación y visualización de los resultados

La amplificación y el análisis de los resultados se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (Qiagen, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min con lectura de fluorescencia en el canal verde. Se evaluaron como valores de desempeño el cálculo de r^2 y la eficiencia del ensayo. El ensayo se consideró válido cuando se obtuvo la amplificación de todas las diluciones de ADN de *M. genitalium*, los controles negativos no mostraron amplificación; y el r^2 fue mayor que 0,98. En cualquier otro caso el ensayo se consideró no válido y se repitió.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

Aquellas muestras positivas al PCR de pesquisa que no mostraron amplificación mediante la qPCR *mgpB*, se consideraron como falsas positivas y fueron informadas como negativas.

3.4.5 Análisis estadístico

Se calculó la frecuencia de positividad de *M. genitalium* en las muestras analizadas, así como la media geométrica de la concentración microbiana. Se utilizó la prueba de Fisher para determinar la significación de la presencia de *M. genitalium* en las muestras de las pacientes con diagnóstico clínico de los síndromes urogenitales. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las medianas de la concentración microbiana en dichas muestras. Se utilizó el programa Prism 6 for Windows (2011, EUA) para realización de los análisis estadísticos.

3.4.6 Comparación de la frecuencia de positividad y concentración de *M. genitalium* entre las muestras de mujeres y hombres

Se utilizó la prueba de Fisher para determinar la significación de la presencia *M. genitalium* entre ambas series de casos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de las medianas de la concentración microbiana en las muestras clínicas de ambos grupos de estudios. Se utilizó el programa Prism 6 for Windows (2011, EUA) para la realización de todos los análisis estadísticos.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.5. Caracterización microbiológica de los aislados de *M. genitalium* obtenidos a partir de muestras urogenitales

3.5.1 Evaluación de un sistema de cultivo para el aislamiento y multiplicación de *M. genitalium* en línea celular

Para el aislamiento y multiplicación de *M. genitalium* se utilizó el sistema de cultivo descrito por Jensen y colaboradores con modificaciones (15). El mismo consistió en un cultivo de células Vero en medio 199 suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EUA).

Para la evaluación del crecimiento en el sistema de cultivo se utilizaron las cepas de *M. genitalium* M6271 y M6311, las cuales se inocularon a una concentración de 200 000 geq/mL (24). El monitoreo del crecimiento se realizó mediante qPCR los días 0, 7, 14, 21 y 28, y se construyó una curva de crecimiento para ambas cepas utilizando el programa Prism 6 for Windows (2011, EUA).

3.5.2 Obtención de aislados autóctonos de *M. genitalium*

Se utilizaron muestras positivas a *M. genitalium* obtenidas durante ambos estudios de series de casos descritos anteriormente y con concentraciones superiores a 1 000 geq/mL, conservadas a -80°C. Estas muestras se inocularon en una suspensión fresca de células Vero suplementado con 2 % de SFB (Hyclone, EUA), el suplemento antimicrobiano de vancomicina, colistina, nistatina y trimetropin (VCNT) (Biolife, Italia) y 500 U/mL de penicilina G (Sigma, EUA). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 14 días, sin realizar cambio del medio de cultivo.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el subcultivo correspondiente, se tomó una alícuota de 0,1 mL para la extracción de ADN mediante Chelex® 100 y el posterior monitoreo del crecimiento por qPCR (24).

Este procedimiento se repitió hasta obtener concentraciones de *M. genitalium* superiores a 10^6 geq/mL. Posteriormente se procedió a la adaptación de los aislados al crecimiento en medio FB (Anexo II) para la obtención de un cultivo axénico (24).

La confirmación de los nuevos aislados se realizó mediante la genotipificación de *M. genitalium*, tanto en las muestras clínicas utilizadas para la inoculación de los cultivos celulares como de los aislados obtenidos, siguiendo la metodología que se describe a continuación.

3.5.2.1 Genotipificación de *M. genitalium*

La genotipificación de *M. genitalium* se realizó según la metodología descrita por Hjorth y colaboradores en 2006 (21).

3.5.2.1.1 PCR simple para el gen *mgpB* de *M. genitalium*

Se realizó una PCR simple para un fragmento de 281 pb del gen *mgpB* según el procedimiento descrito por Jensen y colaboradores (89).

3.5.2.1.1.1 Mezcla de reacción

Se preparó una mezcla de PCR para un volumen final de 100 μ L, utilizando el mismo tampón de PCR, concentración de dNTP y *Taq*-polimerasa que para la PCR ARNr 16S.

Se excluyó de la mezcla el CIA y se remplazaron los cebadores por 500 nM de MgPa-1:

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

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'. y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 90 μ L. Como molde se utilizaron 10 μ L de los extractos de ADN de las muestras obtenidos mediante Chelex® 100, 10 μ L de ADN de *M. genitalium* G37^T (10^5 geq/mL) como control positivo y 10 μ L de agua ultrapura como control negativo.

3.5.2.1.1.2 Amplificación

La amplificación se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-plex HRM (Qiagen, Alemania), sin lectura en ningún canal de fluorescencia, mediante un programa formado por un ciclo de 94°C durante 4 min, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 min, y una amplificación final a 72°C de 5 min.

3.5.2.1.1.3 Visualización de los resultados

Los productos de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, empleando un voltaje de 100 V durante 30 min. La visualización de los resultados se realizó utilizando un sistema digital de captura y análisis de imágenes con luz ultravioleta Uvitec (Cambridge, Reino Unido). El ensayo se consideró válido cuando se obtuvo la talla esperada de 281 pb en el control positivo de *M. genitalium*, y el control negativo no mostró amplificación. En cualquier otro caso el ensayo se consideró no válido y se repitió. En las muestras que mostraron amplificación, los amplicones se compararon con el control positivo.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.2.1.1.4 Purificación de los productos de la PCR

Cada producto amplificado se purificó mediante el estuche QIAEX II (Qiagen, Alemania) de forma automática, utilizando el equipo QIAcube (Qiagen, Alemania), y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.5.2.1.2 Reacción de secuencia y análisis de los resultados

Para la reacción de secuencia se utilizó en estuche Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante y que se describe de forma resumida a continuación.

3.5.2.1.2.1 Mezcla de secuencia

Se preparó una mezcla de reacción por cada cebador MgPa-1 y MgPa-3, compuesta de 8 μL de DTCS Quick Start Mix (Beckman Coulter, EUA), 4 μM de cebador, y suficiente agua ultrapura para un volumen de 15 μL . Se utilizó como molde 5 μL de producto purificado de la PCR simple *mgpB*.

3.5.2.1.2.2 Amplificación de las reacciones de secuencia

La amplificación se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-plex HRM (Qiagen, Alemania), sin lectura en ningún canal de fluorescencia, mediante un programa formado por 30 ciclo de 96°C durante 20 s, 50°C durante 20 s y 60°C durante 4 min.

3.5.2.1.2.3 Purificación de la reacción de secuencia

Se preparó una solución de parada de la reacción formada por 2 μL de acetato de sodio al 3 μM , 2 μL de EDTA a 100 mM y 1 μL de glicógeno a 20 mg/mL. Se adicionó la

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

solución de parada a cada reacción de secuencia y se homogenizó en vortex. Luego se adicionaron 60 µL de etanol frío al 95 %, homogenizando en vortex, y se centrifugó a 20 000 xg por 15 min, a temperatura constante de 4°C. El sedimento se lavó dos veces con etanol al 70 % y se dejó secar. Cada pellet seco se resuspendió en el tampón de corrida (formamida). Las reacciones de secuencias se analizaron en el secuenciador CEQ™ 8800 (Beckman Coulter; USA) mediante electroforesis capilar, utilizando el método corto de secuenciación. Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el programa Sequencher version 4.10 (Gene Codes Corporation, EUA).

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a su análisis bioinformático mediante el programa libre Mega 6 (2013, EUA) y la comparación con las secuencias de los genotipos depositadas hasta septiembre de 2015 en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>).

Los resultados obtenidos mediante la secuenciación se corroboraron en el Staten Serum Institut (Dinamarca) como un control externo realizado en un centro de referencia.

3.5.3 Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados cubanos de *M. genitalium*

Se empleó el co-cultivo en línea celular Vero de los aislados para la detección de la CMI según la metodología descrita por Hamasuna y colaboradores (17) con modificaciones expuestas en los acápites siguientes.

Se utilizaron los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones urogenitales de esta bacteria: eritromicina, azitromicina, cirpofloxacina, levofloxacina,

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

ofloxacina, tetraciclina (Sigma, EUA); así como moxifloxacina y doxiciclina (Bayer, Italia). Cada antibiótico se disolvió según lo descrito en las guías del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de micoplasmas de origen humano, para una concentración final de 500 mg/L y se conservaron a -80°C (151).

3.5.3.1 Preparación de la placa

Por cada antibiótico se utilizó una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, EUA). A partir de la solución madre preparada en la etapa previa (500 mg/L) se realizaron diluciones seriadas de 1:2 en medio 199 (Sigma, EUA), desde una concentración de 16 hasta 0,016 mg/L, que se depositaron entre la columna 1 - 11. La columna 12 se utilizó como control de crecimiento, por lo que en esta no se adicionó antimicrobiano.

3.5.3.2 Inoculación de los aislados

De cada aislado se realizaron dos réplicas. En cada pocillo se adicionó 0,1 mL de una suspensión del inóculo conteniendo $10^4 - 10^6$ geq/mL de *M. genitalium* en una suspensión fresca de Vero en medio 199 con un 4 % de SFB (Hyclone, EUA). En la columna 12 se adicionó 0,1 mL de medio 199 con SFB (Hyclone, EUA) al 4 %. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 14 días.

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.3.3 Cepas controles de *M. genitalium*

Como controles del ensayo se utilizaron las cepas de *M. genitalium* M6271, M2300, M2341, M6489 (Anexo I), previamente caracterizadas en el SSI de Copenhague – Dinamarca (20).

3.5.3.4 Lectura de la CMI

A los 14 días se cuantificó la concentración de *M. genitalium* en cada pocillo mediante la qPCR *mgpB* antes mencionada. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que causó la inhibición del 99% del crecimiento de *M. genitalium* con respecto al control de crecimiento (17).

3.5.3.5 Confirmación de la resistencia a los macrólidos y las fluoroquinolonas mediante secuenciación

3.5.3.5.1 Confirmación de la resistencia a los macrólidos

Para la confirmación de la resistencia a los macrólidos se realizó la secuenciación de un fragmento de 147 pb del gen que codifica para el ARNr 23S de *M. genitalium* (19), como se resume a continuación.

3.5.3.5.1.1 PCR ARNr 23S de *M. genitalium*

3.5.3.5.1.1.1 Mezcla de reacción

Se preparó una mezcla de PCR para un volumen final de 100 μ L, utilizando el mismo tampón de PCR, concentración de dNTP y *Taq*-polimerasa que para la PCR ARNr 16S. Se excluyó de la mezcla el CIA y se remplazaron los cebadores por 500 nM de Mg 23S-

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

1992F: 5'CCA TCT CTT GAC TGT CTC GGC TAT 3' y Mg 23S-2138R: CCT ACC TAT TCT CTA CAT GGT GGT GTT 3' y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 95 μ L. Como molde se utilizaron 5 μ L de los extractos de ADN, de las muestras y de los aislados en células Vero, obtenidos mediante Chelex 100, 5 μ L de ADN de *M. genitalium* G37^T (10^5 geq/mL) como control positivo y 5 μ L de agua ultrapura como control negativo.

3.5.3.5.1.1.2 Amplificación y visualización de los resultados de la PCR

Se realizó la amplificación y la visualización de los resultados de la PCR de manera similar al caso de la PCR ARNr 16S. El ensayo se consideró válido cuando se obtuvo la talla esperada de 147 pb en el control positivo de *M. genitalium*, y el control negativo no mostró amplificación. En cualquier otro caso el ensayo se consideró no válido y se repitió. En las muestras que mostraron amplificación, los amplicones se compararon con el control positivo.

3.5.3.5.1.1.3 Secuenciación de los productos de la PCR ARNr 23S

Los productos de la PCR ARNr 23S se purificaron y secuenciaron de la misma manera que para el caso de los productos de la PCR simple *mgpB*, utilizando los cebadores correspondientes.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia obtenida de la cepa *M. genitalium* G37^T, considerada el genotipo salvaje (susceptible). Aquellas muestras que mostraron transiciones en las posiciones 2058 y 2059 (numeración de *E.coli*) se

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

consideraron como resistentes a macrólidos y se definieron los genotipos de resistencia según la clasificación de Jensen y colaboradores (19).

3.5.3.5.2 Confirmación de la resistencia a fluoroquinolonas

Para la detección de la resistencia a las fluoroquinolona se realizó la secuenciación de un fragmento de la región QRDR del gen *parC* de *M. genitalium* (23). El ensayo se realizó siguiendo las mismas condiciones que para la detección de resistencia a macrólidos, pero utilizando los cebadores MGparC-F: 5'GTG CTG TTG GGG AGA TCA T 3' y MGparC-R: 5' CCA TGG ATA GAA ACA GTT GTT CA 3'. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la de la cepa *M. genitalium* G37^T, considerada el genotipo salvaje (susceptible). Aquellas muestras que mostraron cambios en los aminoácidos en las posiciones 80 y 87 se consideraron como resistentes a fluoroquinolonas.

3.6 Aspectos éticos

En los estudios realizados se cumplieron los preceptos éticos promulgados en la declaración de Helsinki (152) y de acuerdo con las regulaciones nacionales (153). El protocolo de estas investigaciones se analizó y aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología (Anexo III) y por el Comité de Ética del IPK con número de dictamen CEI-IPK-19-11 (Anexo IV).

Los individuos involucrados recibieron toda la información necesaria a través de charlas y pudieron decidir con libertad su participación en el estudio. Los participantes en este estudio manifestaron su consentimiento informado por escrito (Anexo V). Toda la

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y MÉTODOS

información individual relacionada con los sujetos quedó custodiada por los investigadores de forma tal que se garantizara la absoluta confidencialidad de los datos personales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Frecuencia de infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos

Distribución de las muestras estudiadas

Durante los siete años del estudio, se analizaron 4 219 muestras de pacientes cubanos. De ellas 390 (9,2 %) muestras correspondieron a hombres con SU y 3 829 (90,8 %) a mujeres con síndromes urogenitales. De acuerdo con el diagnóstico clínico, 73,5 % (2 816/3 829) de las mujeres estudiadas tenían diagnóstico de SFV/SDAB, el 13,9 % (534/3 829) presentaron TF y el 12,5 % (479/3 829) sufrieron de AE.

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo planteado por otros autores. Es común que la mayor cantidad de muestras clínicas analizadas para el diagnóstico de *M. genitalium*, sean provenientes de mujeres (80, 97, 154). Según estadísticas del MINSAP, en el año 2012, en Cuba se reportan cuatro veces más casos de síndromes urogenitales en mujeres, en contraposición al reporte de síndrome uretral en hombres, siendo el SFV el que más contribuye a este acumulado (62). Por lo que no resulta extraño encontrar que, durante los siete años del estudio, las muestras provenientes de mujeres fueron 10 veces superior a la cantidad de muestras de hombres analizadas.

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 *M. genitalium* en mujeres

Al estudiar las muestras clínicas y analizar la frecuencia de *M. genitalium* en cada grupo de mujeres no se obtuvieron diferencias significativas entre estos (tabla 4.4).

Tabla 4.4 *Mycoplasma genitalium* en los diferentes grupos de pacientes femeninas estudiadas. IPK, 2009 – 2015.

Grupo de mujeres	Número	Positivas a MG (%)	Valor de p
SFV/SDAB	2 816	59 (2,1)	0,8165
TF	534	11 (2,06)	0,9954
AE	479	9 (1,88)	0,7616
Total	3 829	79 (2,06)	-

Leyenda: SFV/SDAB: síndrome de flujo vaginal/síndrome de dolor abdominal bajo; TF: trastornos de la fertilidad; AE: aborto espontáneo; MG: *Mycoplasma genitalium*.

En esta investigación, la frecuencia de infección por *M. genitalium* en las mujeres con SFV/SDAB fue baja, en comparación a lo que reportan otros autores. Si bien la clasificación sindrómica no se ha utilizado en muchas investigaciones sobre esta bacteria, *M. genitalium* se encuentra entre el 28,4 – 73,6 % de pacientes con cervicitis y leucorrea (patologías agrupadas dentro de SFV y SDAB) en los estudios publicados (77, 155-157). Solo un estudio, realizado en Bangladesh, mostró una frecuencia de positividad a *M. genitalium* de 0,8 % en mujeres con SFV atendidas en las APS de Dhaka (158).

Nuestros resultados se asemejan a los valores de prevalencia de *M. genitalium* en mujeres en estudios epidemiológicos de población abierta, donde la prevalencia de infección es menor al 10 % (78, 80, 159). Las razones de esta baja frecuencia en las muestras estudiadas, puede ser resultado del sesgo introducido al asumir la clasificación sindrómica como criterio de inclusión, puesto que como se explicó anteriormente, la VB

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

es el síndrome que más contribuye en pacientes al SFV. Por tanto, es muy posible que otros agentes microbianos como *C. albicans*, *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. y otras bacterias anaerobias exigentes, no estudiados en esta investigación, pudieran ser los responsables de las manifestaciones clínicas en las mujeres estudiadas (39, 158, 160-162). Otro factor a tener en cuenta, es la posible infección por otros agentes asociados al desarrollo de cervicitis y EPI, como *C. trachomatis*, la cual no fue estudiada en la presente investigación (163-165). Estudios futuros debe tener en cuenta la realización de este diagnóstico diferencial de la infección por *M. genitalium*.

Para conocer la prevalencia real y la asociación de la infección por *M. genitalium* con el desarrollo de cervicitis y EPI, en mujeres cubanas, se hace necesario realizar otros estudios de causalidad. Dichos estudios deben tomar como criterio de inclusión los signos y síntomas de cada entidad clínica por separado y no la clasificación sindrómica aplicada para el manejo de las ITS en Cuba.

Como ya se explicó anteriormente, *M. genitalium* se asocia al desarrollo de trastornos de la fertilidad, aunque la mayoría de las evidencias encontradas son solo serológicas (166-170). Solo un estudio en 2015 logró detectar *M. genitalium* en muestras de mujeres infértiles, mediante una PCR para el gen *mgpB* (170).

En la presente investigación la frecuencia de positividad fue inferior al 3 %. Estos resultados difieren a lo encontrados por Rajkumari y colaboradores en la India, donde al realizar un estudio de casos y controles para determinar la asociación entre la infección por *M. genitalium* y el desarrollo de infertilidad, encontraron un 15 % de infección por

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este patógeno en el grupo de los casos y ninguno en el grupo de los controles (170). La baja frecuencia en de infección por *M. genitalium* encontrada en las mujeres cubanas con TF puede deberse a que muchas de estas han sido tratadas con varias terapias antimicrobianas de forma empírica, previo a los 28 días establecidos como criterio de inclusión, en las consultas de reproducción asistida donde son atendidas. Por otro lado, se conoce que la infertilidad por micoplasmas no está aparejada a la infección activa o crónica, sino es la secuela o complicación de una infección previa no tratada (39). Esta infección puede causar un daño irreversible del epitelio ciliado del aparato genital superior femenino y evita tanto la fecundación como la implantación del cigoto en el útero (167). Por tanto, es posible que aun cuando los TF en las mujeres estudiadas se deba a una infección por *M. genitalium*, este microorganismo ya no se encontrara en el tracto urogenital de las pacientes debido a la eliminación natural del patógeno, por el sistema inmune o por el tratamiento anterior antes mencionado, las cuales resultarían entonces negativas a las pruebas de laboratorio realizadas (171, 172).

En el grupo de las mujeres con aborto espontáneo, *M. genitalium* se encontró en menos del 2 % de las muestras estudiadas. Sin embargo, se plantea en la literatura que *M. genitalium* se encuentra asociado y en mayor frecuencia en mujeres con abortos espontáneos y partos pretérminos (173-179). Aunque se conoce que estas patologías son multicausales, como se explicó anteriormente en este documento, otros microorganismos de transmisión sexual, como *C. trachomatis*, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp., son más frecuentemente relacionado a la misma que *M. genitalium* (165, 180). En este sentido, estos patógenos no fueron objeto de la presente investigación. Tampoco se tuvo en cuenta el tiempo entre la ocurrencia del aborto y la colecta de la muestra en el

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

grupo de mujeres cubanas, periodo en el cual la paciente pudo ser tratada de forma empírica con antimicrobianos que eliminaran la infección por *M. genitalium*.

Como muestra la figura 4.3 no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) al comparar las medianas de la concentración de *M. genitalium* entre los grupos de estudio, siendo el grupo de las mujeres con SFV/SDAB en el que se encontró mayor concentración microbiana (figura 4.1).

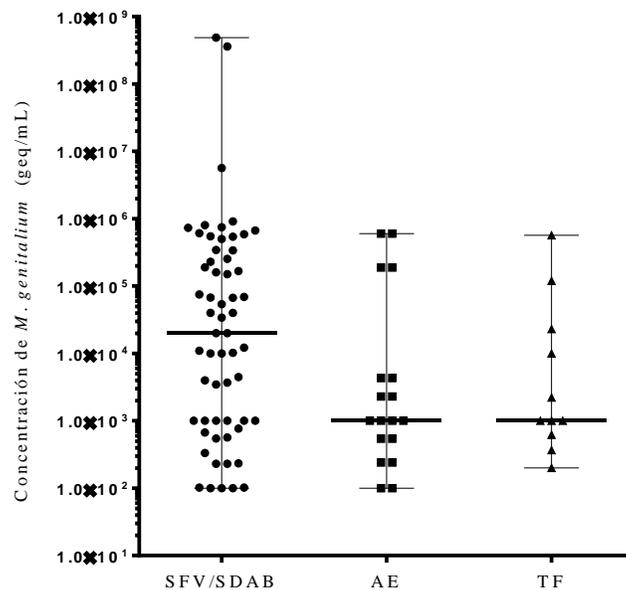


Figura 4.1 Concentración de *Mycoplasma genitalium* en las muestras de mujeres estudiadas. La barra negra representa la mediana de la concentración con un IC de 95%, SFV/SDAB: $20\ 000$ geq/mL; AE: $1\ 000$ geq/mL y TF: $1\ 000$ geq/mL.

No se observaron diferencias al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los informados por Svenstrup y colaboradores quienes describen la presencia de *M. genitalium* en concentraciones de aproximadamente 10^4 geq/mL (164). Como ya fue explicado y se comprueba en esta investigación, *M. genitalium* se encuentra en baja concentración en las muestras clínicas, lo que enfatiza la necesidad de utilizar métodos

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

diagnósticos de una alta sensibilidad, tanto para la detección inicial como para la evaluación post- tratamiento de las pacientes (60, 61).

En este estudio se presentan resultados del análisis de un número suficientes de muestras provenientes de pacientes con sospecha de posibles infecciones por micoplasmas, en especial *M. genitalium* (teniendo en cuenta una prevalencia esperada del 25 % en ITS en la mayoría de los estudios internacionales, según recomienda la OMS (148)) que, si bien no permitió inferir el comportamiento poblacional nacional, si evidenciaron la contribución de esta bacteria como patógeno urogenital potencial de pacientes cubanas. Cabe resaltar que se contempló el análisis de muestras colectadas en alrededor de siete años, lo cual aportó mayor robustez a las observaciones realizadas. La información obtenida en el presente estudio brinda una confirmación objetiva del diagnóstico y el manejo clínico que se realiza, ya que el tratamiento sintomático de las ITS depende de que se proporcione una información certera y específica de los agentes patógenos que causan los síntomas de las entidades clínicas en la población estudiada en cuestión. En consecuencia, es importante la evaluación periódica de los agentes patógenos causantes de un síndrome particular para orientar los protocolos de tratamiento aplicados en cada país (40).

4.1.2 *M. genitalium* en hombres

Mycoplasma genitalium se encontró en el 16,2 % (63/390) en el total de las muestras obtenidas de hombres con SU. La positividad a *M. genitalium* encontrada fue similar a la descrita en otro estudio previo realizado en Cuba antes de 2009. En dicho estudio se incluyen 27 pacientes con SU atendidos en un Hospital Clínico de la ciudad de La

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Habana y 14,8 % (4/27) de las muestras analizadas fueron positivas a *M. genitalium* (37).

La frecuencia de positividad encontrada en el presente estudio, resulta similar a lo referido por otros autores internacionales (112, 133, 181). Pond y colaboradores en un estudio realizado en Londres en 2014, donde analizan 110 hombres con SU, informaron un 15,5 % (17/110) de positividad a *M. genitalium* cuando se aplica el mismo método de qPCR basado en el gen *mgbB* (23). Otro estudio realizado por Guschin y colaboradores al estudiar 320 pacientes rusos con UNG, encontró 47 (14,7 %) casos infectados con *M. genitalium*, donde además se asoció la alta concentración microbiana con fallo al tratamiento con macrólidos (133). Un estudio multicéntrico reciente en EUA, realizado por Getman y colaboradores, reportan un 17,2 % de infección por *M. genitalium* en hombres con SU (OR de 4,11), aunque en el mismo se incluyeron también pacientes asintomáticos pertenecientes a grupos claves, y riesgo o sospecha de una ITS, atendidos en diferentes centros de salud (154). Este último aspecto es importante a considerar, dada la posible ocurrencia de uretritis asintomática y su relación con la infección por *M. genitalium*.

En la actualidad, se reconoce que el 30 % de los hombres infectados son asintomáticos y la exclusión (por selección solo de pacientes con síntomas de uretritis) o no muestreo de hombres asintomáticos perteneciente a grupos claves (de riesgo), podría sesgar los estudios de frecuencia de infección por *M. genitalium* (63, 182, 183). Futuras investigaciones sobre la prevalencia y la de infección por *M. genitalium* en la población

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

masculina cubana, deberían incluir hombres asintomáticos de grupos claves identificados para el control de las ITS (62).

De igual manera, resultaría muy útil incluir la determinación de la presencia de leucocitos en la orina, mediante microscopía o por la utilización de tiras reactivas para detectar la leucocitoesterasas en el sedimento de la misma, como criterio de clasificación clínica de la ocurrencia de SU (183-185). Este hecho se justifica por el alto valor predictivo positivo que relaciona a la presencia de más de 70 leucocitos por microlitros de orina y la infección por varios agentes etiológicos, incluyendo *M. genitalium* (39, 60, 61). Cumpliendo este criterio, se disminuiría el sesgo de la investigación, al incluir en los estudios todos los pacientes con signos de SU, lo que permitiría conocer con mayor exactitud la contribución de *M. genitalium* y el desarrollo de SU en hombres cubanos.

Según los lineamientos internacionales modernos para el diagnóstico, tratamiento y control de las ITS, *M. genitalium* tiene una mayor contribución al desarrollo del SU en hombres que *N. gonorrhoeae* y menos que *C. trachomatis* (39, 63, 67, 69, 112). Aunque en el presente estudio no se estudió la presencia de estos dos patógenos, es apropiado asumir que parte de los pacientes negativos a *M. genitalium*, pudieron estar infectados por los mismos. Para conocer la prevalencia y la contribución real de cada uno de estos gérmenes como agentes etiológicos del SU en Cuba, los estudios futuros deben contemplar la realización del diagnóstico molecular diferencial entre la infección por *M. genitalium*, *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.3 Comparación de la frecuencia de positividad y concentración de *M. genitalium* entre las mujeres y los hombres estudiados

Al analizar de forma global los resultados de la frecuencia de infección por *M. genitalium* en hombres y mujeres estudiados, se observan diferencias significativas entre la positividad a *M. genitalium* identificada en los hombres con respecto a la positividad en las mujeres [$p=0.000^*$; OR=14,65 (10,32 – 20,79)], lo que sugiere la necesidad de considerar la inclusión de este diagnóstico en los protocolos cubanos ante los casos de hombres con SU, específicamente en la UNG. De igual manera, reafirmaron la necesidad de continuar y ampliar los estudios epidemiológicos en este grupo de pacientes, que permitan establecer la relación causal entre la infección por *M. genitalium* y el desarrollo de SU en el contexto de Cuba.

Dada la baja frecuencia de positividad detectada en el estudio de mujeres en contraposición a la identificada en los hombres, este autor se propuso determinar si esta pudo estar relacionada con diferencias en la concentración microbiana de *M. genitalium* en las muestras de ambos grupos. De existir estas diferencias, las mismas pudieron influir en la detección de *M. genitalium* mediante las pruebas moleculares empleadas en el diagnóstico (9). Sin embargo, cuando comparamos la mediana de la concentración de *M. genitalium* en las muestras de hombres (30 000 geq/mL), con la mediana de la concentración en el total de muestras positivas de mujeres (10 030 geq/mL), no se encontraron diferencias significativas ($p =0,2383$) (figura 4.2), por lo que otros elementos no considerados en esta investigación, como la orientación sexual, la edad y

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el nivel sociocultural, pudieron influir en que la infección por *M. genitalium* fuera más frecuente en los hombres que en las mujeres (154, 186).

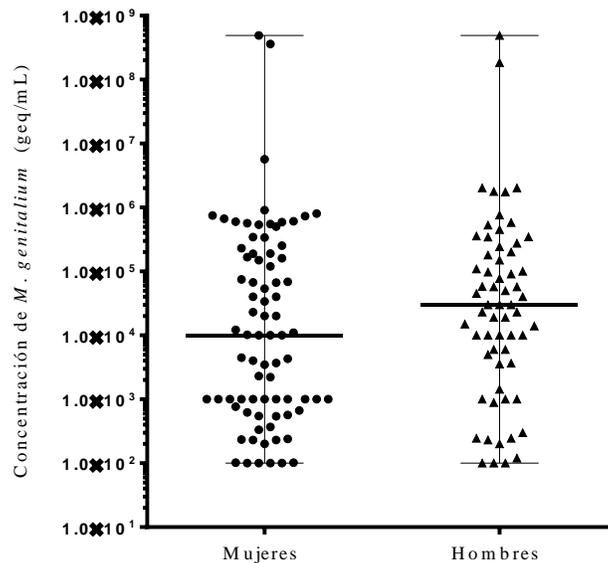


Figura 4.2 Concentración de *Mycoplasma genitalium* en las muestras de mujeres y hombres. La barra negra representa la mediana de la concentración con un IC de 95%.

4.3 Caracterización microbiológica de los aislados de *M. genitalium* obtenidos a partir de las muestras urogenitales

El co-cultivo de *M. genitalium* en el medio MEM enriquecido con Ultrosor G, un suplemento que tiene las desventajas de ser caro y tener una variable disponibilidad en el mercado, no es una alternativa sustentable. La elección de un sistema de cultivo simple y económico es una cuestión fundamental para la multiplicación eficiente de aislados de *M. genitalium* (15-17, 19, 24, 33).

En esta investigación se seleccionó, como suplemento alternativo, el SFB en bajas concentraciones (2 %) junto con un medio altamente nutritivo como el 199 (Sigma, EUA). Esta elección se justificó en la hipótesis de que la disminución de la

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentración de SFB traería aparejada dos ventajas fundamentales: la disminución de la velocidad de crecimiento de las células Vero a punto de permitir la formación de la monocapa celular a los 10 - 14 días, con una disminución considerable del metabolismo y sin causar el agotamiento de todos los nutrientes del medio; además de la dilución de los posibles inhibidores presentes en el suero animal como anticuerpos, que pudiesen interferir con el desarrollo de *M. genitalium* (15, 187).

4.3.1 Evaluación del crecimiento de *M. genitalium* en el sistema de cultivo

En esta investigación la dinámica de crecimiento obtenida mediante la utilización del sistema de cultivo celular Vero con SFB al 2 % mostró un crecimiento exponencial en los cultivos a partir del día 7 hasta el 14, lo que coincidió con lo reportado al utilizar Ultroser G (figura 4.3) (17, 24).

A nivel internacional existen dos estudios que evalúan la dinámica de crecimiento y requerimientos nutricionales de *M. genitalium* en los cultivos in vitro. El primer estudio se realizó comparando los beneficios para el co-cultivo de *M. genitalium* con el Ultroser G y SFB al 10 % como suplemento nutritivo. El segundo estudio evaluó la dinámica de crecimiento solo con el Ultroser G. Ambos estudios demuestran la utilidad del Ultroser G para la multiplicación de *M. genitalium*. La capacidad de promover el crecimiento del SFB al 10 % fue inferior debido posiblemente a la presencia de inhibidores (15, 17). El utilizar una menor concentración de suero fetal bovino disminuye la concentración de inhibidores para la multiplicación de *M. genitalium* descritos anteriormente (17, 24, 187).

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

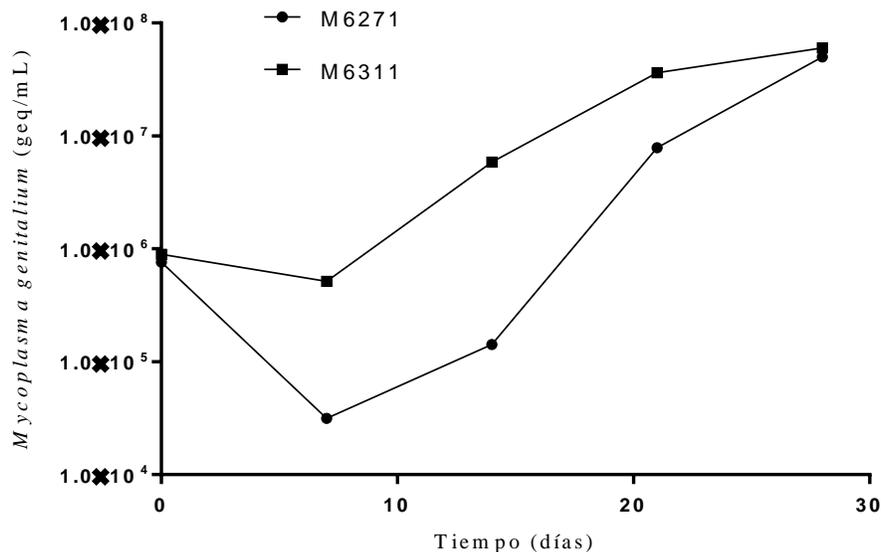


Figura 4.3 Curva de crecimiento de las cepas de *Mycoplasma genitalium* M6271 y M6311 en el sistema de cultivo modificado. LNRIM-IPK, 2012.

Estos resultados muestran que el sistema celular modificado fue permisivo y eficiente para la propagación y el mantenimiento de *M. genitalium*, lo que posibilitó su posterior utilización para el aislamiento a partir de muestras de pacientes con sintomatología urogenital.

4.3.2 Obtención y genotipificación de los aislados autóctonos de *M. genitalium*

Se utilizaron 22 muestras urogenitales (Tabla 4.2) con una concentración mayor a 1 000 geq/mL. De estas, 59 % (13/22) mostró crecimiento de *M. genitalium* en el sistema celular. En 22,7 % (5/22) de los cultivos inoculados se evidenció el sobrecrecimiento de contaminantes microbianos, principalmente levaduras y bacterias Gramnegativas. En el 18,3 % (4/22) cuatro de los cultivos celulares inoculados no se observó crecimiento después de tres subcultivos consecutivos por lo que se informaron como negativos.

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.2 Muestras urogenitales positivas a *Mycoplasma genitalium* cultivadas en células Vero para la obtención de aislados autóctonos.

Muestra	Tipo de muestra	Diagnóstico clínico	Concentración de <i>Mycoplasma genitalium</i> (geq/mL)	Identificación del aislado	Primer día de confirmación del crecimiento en Vero (días post-inoculación)
MICH1	Exudado endocervical	SFV/SDAB	6 700	B1	70
RAPH2	Exudado endocervical	SFV/SDAB	540 000	B2	42
GAB3	Exudado endocervical	AE	670 000	B3	56
JOF4	Exudado endocervical	AE	601 000	B4	28
CHAM5	Exudado endocervical	SFV/SDAB	509 000	B5	28
URI6	Exudado endocervical	SFV/SDAB	901 000	B6	28
ZAQ7	Exudado endocervical	SFV/SDAB	705 000	B7	42
PHE9	Exudado endocervical	TF	160 000	B8	42
JVH10	Exudado endocervical	TF	230 000	B9	42
BAM11	Exudado endocervical	SFV/SDAB	150 000	B10	14
347U	Exudado uretral	SU	190 000	B12	14
51U	Exudado uretral	SU	580 000	Contaminado	-
49U	Exudado uretral	SU	120 000	-	-
35U	Exudado uretral	SU	10 000	Contaminado	-
66U	Exudado uretral	SU	12 000	Contaminado	-
1U	Exudado uretral	SU	1 200 000	-	-
60U	Exudado uretral	SU	3 000	-	-
719U	Exudado uretral	SU	2 027 000	B19	14
61U	Exudado uretral	SU	34 000	-	-
341EE	Exudado endocervical	SFV/SDAB	12 000	Contaminado	-
456EE	Exudado endocervical	SFV/SDAB	235 000	-	-
567EE	Exudado endocervical	SFV/SDAB	67 000	-	-

Al realizar la identificación genotípica de los aislados se demostró una contaminación cruzada durante el co-cultivo en Vero para 10 de los mismos (B1, B2, B4 –B11), por la detección del mismo genotipo de *mgpB*. Esta contaminación cruzada se describe previamente como una de las principales desventajas de este método de co-cultivo. Ciertos factores técnicos, en combinación con la alta concentración microbiana que se logra en los cultivos, propician la ocurrencia de la misma (15).

En las investigaciones publicadas el número de aislados de *M. genitalium* oscila entre dos y 15, por lo que la recuperación eficiente de al menos tres nuevos aislados de

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

M. genitalium en Cuba constituye un hecho relevante desde el punto de vista internacional (15-17, 19, 24, 33).

Dos de los aislados cubanos mostraron un genotipo diferente a todos los descritos hasta el momento en la literatura y depositados en las bases de datos internacionales (figura 4.4). Este hallazgo descarta una posible contaminación con cualquiera de las cepas de referencia durante los intentos de aislamientos, hecho informado con anterioridad por Jensen y colaboradores (15).

De esta manera quedaron establecidos dos nuevos genotipos de *M. genitalium*: cuba1 (B3) y cuba2 (B12), cuyas secuencias se depositaron en el GeneBank con los números de acceso KF017612 y KF017613, respectivamente. El tercer aislado cubano (B19) mostró un genotipo similar a la cepa japonesa M6283 (genotipo 4) (24), que se informa en Japón, EUA y el Reino Unido (164, 188). Al analizar la dinámica de crecimiento de estos aislados en el sistema celular empleado se obtuvo un comportamiento similar al de las cepas de referencia M6271 y M6311, con una fase de crecimiento exponencial posterior a los 14 días.

El efecto citopático predominante durante el crecimiento de *M. genitalium* fue la vacuolización intensa del citoplasma de las células infectadas (figura 4.5), en un período que varió desde 3 hasta 56 días en los que se observó por primera vez. Jensen y colaboradores en 1994 encuentran que en co-cultivos de *M. genitalium* con células Vero, 10 % de las células muestran una internalización y multiplicación de micoplasmas, acompañadas de la aparición de efectos citopáticos e incluso de la muerte de la célula hospedera (16).

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

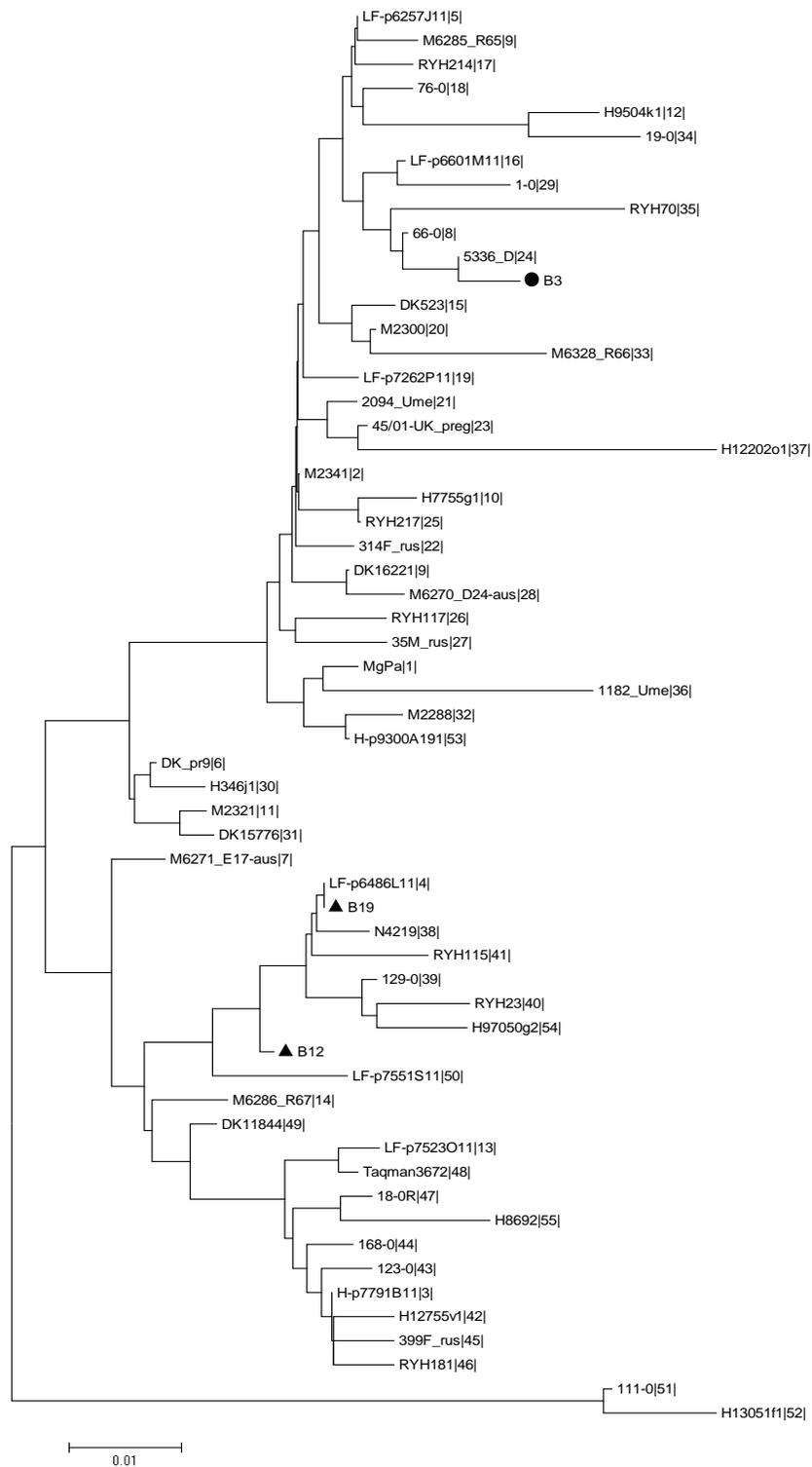


Figura 4.4 Dendrograma del análisis filogenético de la secuencia parcial del gen *mgpB* de los aislados cubanos con 56 genotipos de *Mycoplasma genitalium*, según el método de Neighbor Joining Tree. Círculo negro: aislado B3; triángulo negro: aislados B12 y B19.

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

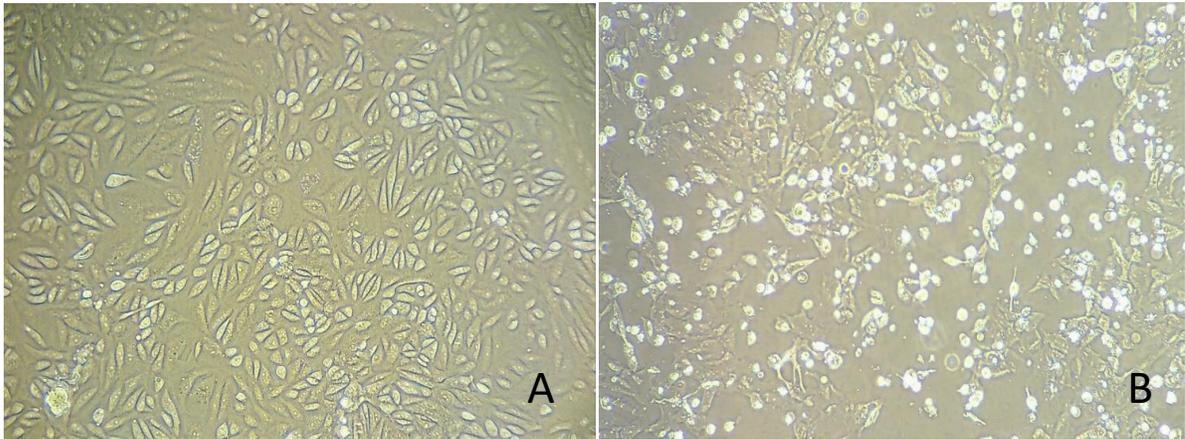


Figura 4.5. Microfotografía del aislado cubano B19 creciendo en línea Vero (200X). **A-** control sin inocular; **B-** *Mycoplasma genitalium* B19- 10 días, mostrando efectos citopáticos y destrucción de la monocapa.

Los tres aislados cubanos crecieron en medio Friis líquido y sólido, en cultivo axénico, a partir de los cuales se procedió a guardar en alícuotas a -80°C como un respaldo para futuras investigaciones. La adaptación de los aislados de *M. genitalium* a crecer en medio libre de células, constituye un proceso lento que no se logra en todos los casos (15, 19, 24). De manera general se necesitan entre tres meses a un año para el mismo, y depende en gran medida de la calidad del medio de cultivo utilizado (34). En la presente investigación se logró el crecimiento axénico a los seis meses posterior a la inoculación.

4.3.3 Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *M. genitalium*

Al analizar los resultados del ensayo modificado de determinación de la CMI utilizando como controles las cepas de referencia de *M. genitalium*, se comprobó la similitud de las CMI obtenidas mediante el mismo (tabla 4.3) y las publicadas con la metodología original (17, 19, 20).

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados cubanos mostraron altos valores de CMI para las tetraciclinas, sin embargo, la doxiciclina mostró los mejores valores. Para las fluoroquinolonas, se sugiere una susceptibilidad disminuida con valores de CMI entre 0,2 – 4 mg/L. Sin embargo, no se detectó ningún aislado resistente a este grupo de antibióticos. Los resultados de CMI de los macrólidos evaluados mostraron valores inferiores a 0,008 mg/L para los aislados B3 y B12, aun cuando el uso de azitromicina se encuentra generalizado en la práctica clínica.

Este hecho, si bien no permitió aseverar la inexistencia de cepas resistentes, está en total correspondencia con los resultados clínicos obtenidos en el manejo del SU en el IPK durante los años 2009 – 2013, periodo durante el cual se informa un 100% de cura de los pacientes con SU tratados con azitromicina.

Tabla 4.3 Resultados de la caracterización de aislados cubanos de *Mycoplasma genitalium* según a la susceptibilidad antimicrobiana con el método modificado de co-cultivo en Vero.

<i>M. genitalium</i>	CMI (mg/L)							
	Azi	Eri	Cipro	Oflo	Levo	Moxi	Tet	Dox
M6271	>8	>8	1	1	1	0,125	0,25	0,5
M2300	<0,008	<0,008	2	1	4	0,25	0,25	1
M2341	<0,008	<0,008	1	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25
M6489	>8	>8	>8	8	>8	>8	2	2
B3	<0,008	<0,008	4	4	0,5	0,25	2	2
B12	<0,008	<0,008	4	1	1	1	4	0,5
B19	>8	>8	2	1	1	1	4	0,5

Leyenda: Azi- azitromicina; Eri- eritromicina; Cipro- ciprofloxacina; Oflo- ofloxacina; Levo- levofloxacina; Mox- moxifloxacina; Tet- tetraciclina; Dox- doxiciclina. **Cepas de referencia:** M6271, M2300, M2341 y M6489. **Aislados:** B3, B12 y B19

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de la CMI del aislado B19 proveniente de un hombre con SU, que no refirió la utilización de macrólidos previo al diagnóstico de la infección por *M. genitalium*, fue evidente la resistencia del aislado a este grupo farmacológico, pues se obtuvo una CMI de >8 mg/L para la eritromicina y la azitromicina. Esta resistencia podría explicarse debido a que el paciente se infectó con una cepa resistente y no a través de una selección de la resistencia por un fallo de tratamiento, hecho notificado en la literatura con anterioridad (19, 135, 189-192). Este constituye el primer hallazgo de resistencia a los macrólidos notificado en Cuba y en América Latina.

4.3.3.1 Confirmación de la resistencia a los macrólidos y las fluoroquinolonas mediante secuenciación

La secuenciación del fragmento de 147 pb del gen del ARNr 23S de los tres aislados cubanos de *M. genitalium* corroboraron los resultados del método fenotípico de estudio de susceptibilidad. Los aislados B3 y B12 mostraron un genotipo salvaje y en el aislado B19 se encontró la mutación A2059G correspondiente al genotipo mutante 1 (113). Esta mutación constituye una de las más comunes en el caso de *M. genitalium* y se asocia no solo con la resistencia a los macrólidos, sino que influye sobre el aumento de la CMI de otros antimicrobianos que pueden ser utilizados como alternativa terapéutica, como el fluoroketólido solitromicin (20).

La secuenciación de la región QRDR del gen *parC* de los aislados autóctonos de *M. genitalium* no mostró la presencia de mutaciones puntuales que le confieran o determinen resistencia a las fluoroquinolonas. Por tanto, los valores de CMI obtenidos

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

para las fluoroquinolonas con mayor actividad anti-*M. genitalium* pudo deberse a variaciones aleatorias normales del método de laboratorio (34).

Los hallazgos obtenidos hasta el momento, no sugieren la necesidad de un cambio en el tratamiento sintomático en Cuba, sino una modificación de la dosificación de la azitromicina a un tratamiento extendido (1 g dosis única, seguido de 250 mg durante cuatro días), así como la introducción en el cuadro básico de fármacos más activos frente a *M. genitalium* como la moxifloxacina y las fluoroquinolonas de última generación. Estas últimas deben utilizarse como tratamiento de segunda línea para el manejo de pacientes con un fallo a los macrólidos. Todo esto debe estar aparejado al mantenimiento de la vigilancia continua de la resistencia y a los fallos de tratamiento de los pacientes cubanos con síndromes urogenitales.

5. CONSIDERACIONES GENERALES

5. CONSIDERACIONES GENERALES

Por más de 25 años, las investigaciones sobre ITS enfocan su atención sobre el papel de *M. genitalium* como un patógeno con una importancia cada vez más creciente (39, 77, 80, 121, 193, 194). Sin embargo, el estudio de este microorganismo y las infecciones que provoca es difícil dada las características biológicas que condicionan su carácter exigente para el aislamiento en cultivo puro (34). En la actualidad, pocos países en el mundo cuentan con laboratorios capacitados y con éxito en el aislamiento de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas, lo que limita el establecimiento de métodos diagnósticos diferentes a la PCR y de estudios multicéntricos de susceptibilidad antimicrobiana que permitan llegar a los puntos de corte para los antimicrobianos empleados en la práctica clínica (34).

En la última década, aumenta el número de evidencias científicas acumuladas en relación con el papel de este micoplasma como agente etiológico causal de ITS, así como el clamor de la comunidad científica internacional sobre la necesidad de un mejor estudio de todos los tópicos referentes al diagnóstico microbiológico, la caracterización genética y los estudios de susceptibilidad antimicrobiana (75, 193).

Uno de los aspectos más importantes lo constituyen los actuales métodos diagnósticos disponibles y su aplicabilidad, reproducibilidad y robustez (9). En el presente trabajo se

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

implementó una estrategia de diagnóstico para las infecciones por *M. genitalium*, que se basó en una combinación de métodos moleculares utilizados en numerosos estudios clínicos a nivel internacional y publicados en revistas especializadas de alto impacto (2, 11, 46, 97, 113, 195). Entre los principales aspectos a tener en cuenta en la implementación de los métodos de PCR para el diagnóstico de *M. genitalium* está la necesidad de contar con un bajo límite de detección, preferiblemente $<10^4$ geq/mL; así como una especificidad superior al 99% (9, 113).

Como se explicó en los capítulos anteriores, el método de la PCR utilizado con anterioridad en Cuba, tenía un límite de detección de 50 000 geq/mL (36, 37), que es insuficiente para el diagnóstico microbiológico, según el consenso internacional (9). En este sentido, si se hubiese utilizado el método de Fernández (37), alrededor de 50 % de las muestras positivas detectadas en el presente estudio habrían sido clasificadas como negativas, pues la concentración de *M. genitalium* en las mismas se encontraba por debajo del límite de detección de ese ensayo. Aunque en la estrategia molecular presentada se utilizaron los mismos cebadores señalados por Fernández (37), se incorporó la tecnología de qPCR, que tiene como ventaja sobreañadida la posibilidad de brindar información sobre la concentración microbiana en las muestras clínicas. Este último aspecto es importante en el manejo clínico de las infecciones por este patógeno, y permite al médico de asistencia conocer la existencia o no de una mayor probabilidad de ocurrencia de fallos terapéuticos frente al esquema de tratamiento establecido en Cuba para el manejo sindrómico de las ITS.

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

Una vez aplicada esta estrategia de diagnóstico, se pudo demostrar que *M. genitalium* es un patógeno de mayor importancia en los hombres cubanos con SU que en las mujeres cubanas con síndromes urogenitales, AE y TF. Este hecho es significativo y de vital importancia en el manejo sindrómico de dichas infecciones a nivel de la APS, pues brinda al Sistema Nacional de Salud una información útil y pertinente sobre la etiología de las ITS en Cuba.

La implementación de un sistema de cultivo para *M. genitalium* que permite la obtención de aislados autóctonos de este microorganismo exigente, reviste importancia no solo para una mejor comprensión y estudio del mismo, sino que coloca al IPK en la puntera de las investigaciones sobre este patógeno. En este mismo sentido, la obtención de tres nuevos aislados autóctonos de *M. genitalium* constituye el primer reporte en América Latina. Numerosos intentos previos del aislamiento en disímiles medios de cultivo realizados tanto en Cuba como en otras partes del mundo, fueron fallidos (2); se reafirma la necesidad de métodos más eficientes y que basados en la biología de *M. genitalium*, permitan su cultivo in vitro. Hasta el momento y como se comprobó en la presente investigación, la metodología del co-cultivo en línea celular constituye la más efectiva para este fin. Sin embargo, esta no deja de ser laboriosa y consumidora de tiempo, además de requerir determinadas condiciones logísticas no disponibles en todos los laboratorios. Por otro lado, aunque se conoce que el co-cultivo en células ofrece ventajas para el crecimiento y multiplicación de *M. genitalium*, depende de variables constatadas en la presente investigación, como son una correcta colecta y conservación de la muestra clínica, la microbiota acompañante, la naturaleza de la muestra en sí, y otras que no se encuentran sujetas al control por parte de los investigadores como la

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

concentración en la misma de *M. genitalium* y su viabilidad. Todas estas variables, así como su influencia e importancia en el éxito del aislamiento a partir de muestras clínicas se comprobaron en la presente investigación. Una de las más críticas fue la presencia de la microbiota acompañante, sobre todo resistente a los agentes antimicrobianos selectivos utilizados. Estos contaminantes dieron al traste con la recuperación de algunos aislados, pues la utilización de antimicrobianos selectivos que permitan el crecimiento de *M. genitalium*, es restringida, no solo en la naturaleza química y farmacológica, sino también en cuanto a su concentración (24). Uno de los antimicrobianos que se emplea y específicamente se utilizó en la presente investigación, es la penicilina G; sin embargo, aun cuando biológicamente es inactivo contra *M. genitalium*, si se puede comprobar que independiente a este hecho, la concentración utilizada puede influir sobre el crecimiento in vitro de este micoplasma, debido quizás a impurezas químicas u otros mecanismos de acción no descritos. Este mismo caso, puede extenderse a los otros antimicrobianos empleados, como las polimixinas, la vancomicina y las sulfamidas (24).

En el mismo sentido, los compuestos antifúngicos que actúan sobre el ergosterol de la pared de los hongos, influyen y destruyen los esteroides de la membrana trilaminar de *M. genitalium* (24), por lo que son tóxicos, siendo imposible evitar su influencia en la multiplicación de este germen. Se deben utilizar concentraciones “seguras” de estos agentes selectivos, como las utilizadas en la presente investigación y que de manera tradicional se adicionan para el cultivo de otros patógenos fastidiosos en menor grado como *N. gonorrhoeae*. Es posible que las muestras inoculadas que no mostraron crecimiento ni contaminación pudieron inhibirse por dichos antimicrobianos.

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

En la presente investigación se demostró un evento de contaminación cruzada entre el aislado B3 y el resto de los aislados provenientes de mujeres (B1,B2, B4 – B11), que pudo ocurrir durante las primeras etapas del co-cultivo en la línea celular, debido posiblemente al crecimiento acelerado de la muestra clínica B3, que, al alcanzar concentraciones altas del microorganismo en cuestión, junto con la generación de aerosoles durante los procedimientos de subcultivo, pudo de forma inadvertida contaminar otros cultivos celulares. Este evento se describió, con anterioridad, en los intentos de aislamiento publicados y es por ello que se recomienda la confirmación genotípica por comparación entre la muestra clínica y el aislado (15, 24).

Aunque el número de aislados fue bajo, es importante señalar que son los primeros notificados en la región de América Latina. En este sentido, la genotipificación de los mismos mostró genotipos únicos no vistos anteriormente, por lo que se puede presumir la probabilidad de un origen común. Se requieren otros estudios que impliquen una caracterización multilocus para esclarecer este hecho. Se hace necesario el estudio más profundo de otras características de virulencia de los aislados que permitan determinar si existe una relación entre esta y alguna característica genotípica. La variabilidad de la adhesina celular puede ser la teoría que sustente la afirmación anterior. Esta es la proteína inmunodominante de *M. genitalium* y está sometida a cambios en la secuencia de aminoácidos de los epítopes principales mediante eventos de recombinación homóloga de los genes MG190, MG191 y MG192, lo que conlleva a un mecanismo de escape al sistema inmune, demostrado en muestras provenientes de pacientes con infección crónica (171).

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

La implementación de una modificación del protocolo de determinación de la CMI para *M. genitalium* mediante el empleo de un cultivo celular, permitió la optimización del procedimiento por el desescalamiento a micrométodo del método original. La utilización como referencia de cepas de *M. genitalium* previamente estudiadas por el método original, permitió comprobar que no existen diferencias entre este y la modificación empleada. Una vez comprobada la validez del método, los valores de la CMI de los aislados cubanos mostraron una disminución de la sensibilidad antimicrobiana a las drogas de elección de los protocolos de tratamiento cubano. Al analizar los valores de la CMI del aislado B19 se evidencia la emergencia de cepas multiresistentes en Cuba, lo que constituye una alarma para el sistema de salud. En este caso, junto con la presencia de una marcada resistencia a los macrólidos, se detectó una susceptibilidad disminuida a las tetraciclinas. Este hecho constituye la punta del iceberg sobre la circulación y trasmisión de cepas de *M. genitalium* resistentes, las cuales pueden ser importadas o como resultado de la presión selectiva por el uso indiscriminado de antimicrobianos y dosis subóptimas de los mismos (por ejemplo, azitromicina 1 g dosis única). Estos resultados no justifican la necesidad de un cambio en los protocolos de manejo de las ITS en Cuba, pero si apoyan la idea de una modificación en la dosificación de los antimicrobianos, específicamente de la azitromicina, a un esquema extendido que disminuya la emergencia de cepas resistentes. Es necesario incorporar otras drogas con mayor efecto anti-*M. genitalium* a los esquemas de primera y segunda línea disponibles en Cuba que permitan el manejo de fallos de tratamiento.

CAPÍTULO 5- CONSIDERACIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana permiten contar con una herramienta útil para la evaluación de nuevos aislados de *M. genitalium*, como parte de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana llevada a cabo por el LNRIM-IPK. Esto posibilita en Cuba establecer correcciones o ajustes al manejo clínico-farmacológico de las ITS por *M. genitalium*, que fortalezcan el Programa de Control de las ITS y contribuyan a un uso mejor y más racional de los antimicrobianos disponibles.

En la presente investigación se implementó un conjunto de métodos microbiológicos para el diagnóstico de las infecciones por *M. genitalium* en los grupos de pacientes cubanos vulnerables, así como la caracterización genotípica y el establecimiento de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados autóctonos de este germen. Se obtuvieron resultados relevantes a nivel internacional en el estudio de *M. genitalium*, específicamente en su aislamiento y cultivo in vitro, que contribuyen al desarrollo de futuras investigaciones encaminadas a un mejor conocimiento y manejo de las infecciones causadas por este microorganismo.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- *Mycoplasma genitalium* se demuestra como agente etiológico poco frecuente en mujeres con ITS, aborto espontáneo y trastornos de la fertilidad; mientras que su contribución al desarrollo de síndrome uretral en hombres es mayor, lo que denota la necesidad de que esta bacteria sea considerada en los protocolos de diagnóstico y tratamiento de estas infecciones en Cuba.
- Se obtienen por primera vez en Cuba, aislados autóctonos de *M. genitalium* y se demuestran genotipos nunca antes informados a nivel internacional; lo que sugiere la circulación de cepas endémicas en el país.
- Los aislados cubanos de *M. genitalium* muestran una susceptibilidad a fluoroquinolonas y tetraciclinas, y se detecta por primera vez en Cuba, *M. genitalium* resistente a macrólidos, lo que plantea la importancia de implementar una vigilancia sistemática de la susceptibilidad antimicrobiana de este patógeno como parte del Plan Estratégico Nacional para el Control de las ITS en Cuba.

7. RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios epidemiológicos de causalidad que permitan determinar la relación entre la infección por *M. genitalium* y la ocurrencia de síndromes urogenitales en Cuba.
- Implementar la detección molecular de resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes cubanos positivos a *M. genitalium*.
- Realizar estudios que permitan correlacionar el fallo de tratamiento sintomático en pacientes cubanos con síndromes urogenitales con la detección de genotipos resistentes de *M. genitalium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Taylor-Robinson D, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. **Clinical Microbiology Reviews.** 2011;24(3):498-514.
2. **Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium* infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis. **Danish Medical Bulletin.** 2006;53(1):1-27.
3. **Manhart LE, Holmes KK, Hughes JP, Houston LS, Totten PA.** *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. **American Journal of Public Health.** 2007;97(6):1118-25.
4. **Manhart LE, Broad JM, Golden MR.** *Mycoplasma genitalium*: should we treat and how? **Clinical Infectious Diseases.** 2011;53 Suppl 3:S129-42.
5. **Pepin J, Labbe AC, Khonde N, Deslandes S, Alary M, Dzokoto A, et al.** *Mycoplasma genitalium*: an organism commonly associated with cervicitis among west African sex workers. **Sexually Transmitted Infections.** 2005;81(1):67-72.
6. **Ross JD.** Is *Mycoplasma genitalium* a cause of pelvic inflammatory disease? **Infectious Disease Clinics of North America.** 2005;19(2):407-13.
7. **Korte JE, Baseman JB, Cagle MP, Herrera C, Piper JM, Holden AE, et al.** Cervicitis and genitourinary symptoms in women culture positive for *Mycoplasma genitalium*. **American Journal of Reproductive Immunology.** 2006;55(4):265-75.
8. **McGowin CL, Anderson-Smits C.** *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. **PLoS pathogens.** 2011;7(5):e1001324.
9. **Shipitsyna E, Savicheva A, Solokovskiy E, Ballard RC, Domeika M, Unemo M, et al.** Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in East European countries. **Acta Dermato-Venereologica.** 2010;90(5):461-7.

10. **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. **Journal of Medical Microbiology.** 2005;54(Pt 1):23-9.
11. **Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P.** Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. **Journal of Clinical Microbiology.** 2004;42(2):683-92.
12. **Manhart LE.** Diagnostic and resistance testing for *Mycoplasma genitalium*: what will it take? **Clinical Infectious Diseases.** 2014;59(1):31-3.
13. **WHO.** Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus 2013. Geneva-Switzerland: **World Health Organization; 2013.**
14. **Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL.** A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet.** 1981;1(8233):1288-91.
15. **Jensen JS, Hansen HT, Lind K.** Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. **Journal of Clinical Microbiology.** 1996;34(2):286-91.
16. **Jensen JS, Blom J, Lind K.** Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. **International Journal of Experimental Pathology.** 1994;75(2):91-8.
17. **Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS.** Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2005;49(12):4993-8.
18. **Totten PA, Schwartz MA, Sjostrom KE, Kenny GE, Handsfield HH, Weiss JB, et al.** Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. **Journal of Infectious Diseases.** 2001;183(2):269-76.
19. **Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R.** Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. **Clinical Infectious Diseases.** 2008;47(12):1546-53.
20. **Jensen JS, Fernandes P, Unemo M.** In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against macrolide-resistant and -susceptible

Mycoplasma genitalium strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2014;58(6):3151-6.

21. **Hjorth SV, Bjornelius E, Lidbrink P, Falk L, Dohn B, Berthelsen L, et al.** Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. **Journal of Clinical Microbiology.** 2006;44(6):2078-83.

22. **Musatovova O, Baseman JB.** Analysis identifying common and distinct sequences among Texas clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology.** 2009;47(5):1469-75.

23. **Pond MJ, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST.** High prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: the need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. **Clinical Infectious Diseases.** 2014;58(5):631-7.

24. **Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS.** Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. **Journal of Clinical Microbiology.** 2007;45(3):847-50.

25. **Furneri PM, Tempera G, Lepore AM, Bonfanti C, Nicoletti G.** In vitro activity of flurithromycin against some genital pathogens. **Drugs Under Experimental and Clinical Research.** 1991;17(3):175-80.

26. **Renaudin H, Tully JG, Bebear C.** In vitro susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 1992;36(4):870-2.

27. **Bebear C, Bouanchaud DH.** A review of the in-vitro activity of quinupristin/dalfopristin against intracellular pathogens and mycoplasmas. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 1997;39 Suppl A:59-62.

28. **Hannan PC.** Comparative susceptibilities of various AIDS-associated and human urogenital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agent in vitro. **Journal of Medical Microbiology.** 1998;47(12):1115-22.

29. **Duffy LB, Crabb D, Searcey K, Kempf MC.** Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2000;45 Suppl 1:29-33.

30. **Hannan PC, Woodnutt G.** In vitro activity of gemifloxacin (SB 265805; LB20304a) against human mycoplasmas. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** **2000**;45(3):367-9.
31. **Yasuda M, Maeda S, Deguchi T.** In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycoplasma genitalium* and their bacteriological efficacy for treatment of *M. genitalium*-positive nongonococcal urethritis in men. **Clinical Infectious Diseases.** **2005**;41(9):1357-9.
32. **Waites KB, Crabb DM, Duffy LB.** Comparative in vitro activities of the investigational fluoroquinolone DC-159a and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** **2008**;52(10):3776-8.
33. **Hamasuna R, Jensen JS, Osada Y.** Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* strains examined by broth dilution and quantitative PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** **2009**;53(11):4938-9.
34. **Hamasuna R.** Identification of treatment strategies for *Mycoplasma genitalium*-related urethritis in male patients by culturing and antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Infection and Chemotherapy.** **2013**;19(1):1-11.
35. **Jensen JS, Bradshaw C.** Management of *Mycoplasma genitalium* infections - can we hit a moving target? **BMC Infectious Diseases.** **2015**;15:343.
36. **Fernandez-Molina C, Rodriguez-Preval N, Rodriguez-Gonzalez I, Agnese-Latino M, Rivera-Tapia JA, Ayala-Rodriguez I.** [Diagnosis of *Mycoplasma genitalium* by MgPa and rRNA 16S gene amplification]. **Salud Publica de Mexico.** **2008**;50(5):358-61.
37. **Fernández C.** Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas y ureaplasmas de interés clínico en Cuba [Tesis Doctoral]. La Habana, Cuba: **Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**; **2012.**
38. **Chen MY, Tabrizi SN.** Challenges to the management of curable sexually transmitted infections. **BMC Infectious Diseases.** **2015**;15:337.
39. **Workowski KA, Bolan GA.** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control.** **2015**;64(Rr-03):1-137.

40. **OMS.** Estrategias y métodos de laboratorio para reforzar la vigilancia de las infecciones de transmisión sexual 2012. ONUSIDA/OMS Grupo de Trabajo sobre la Vigilancia Mundial del VIH y las Infecciones de Trasmisión Sexual, editors. Ginebra. **Organización Mundial de la Salud; 2012.**
41. **Hatchel JM, Balish MF.** Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in *Mycoplasma pneumoniae* relatives. **Medical Microbiology. 2009.** Suplemento.
42. **Pich OQ, Burgos R, Querol E, Pinol J.** P110 and P140 cytheadherence-related proteins are negative effectors of terminal organelle duplication in *Mycoplasma genitalium*. **PloS one. 2009;**4(10):e7452.
43. **Hatchel JM, Balish Rs Fau - Duley ML, Duley MI Fau - Balish MF, Balish MF.** Ultrastructure and gliding motility of *Mycoplasma amphoriforme*, a possible human respiratory pathogen. **Microbiology. 2008** (1350-0872 (Print)).
44. **Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, et al.** Essential genes of a minimal bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;**103(2):425-30.
45. **Suthers PF, Dasika MS, Kumar VS, Denisov G, Glass JI, Maranas CD.** A genome-scale metabolic reconstruction of *Mycoplasma genitalium*, iPS189. **PLoS Computational Biology. 2009;**5(2):e1000285.
46. **Jensen JS, Borre MB, Dohn B.** Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. **Journal of Clinical Microbiology. 2003;**41(1):261-6.
47. **Ma L, Jensen JS, Mancuso M, Hamasuna R, Jia Q, McGowin CL, et al.** Genetic variation in the complete MgPa operon and its repetitive chromosomal elements in clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. **PloS one. 2010;**5(12):e15660.
48. **Ma L, Jensen JS, Myers L, Burnett J, Welch M, Jia Q, et al.** *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. **Molecular Microbiology. 2007;**66(1):220-36.
49. **Opitz O, Jacobs E.** Adherence epitopes of *Mycoplasma genitalium* adhesin. **Journal of General Microbiology. 1992;**138(9):1785-90.

50. **Iverson-Cabral SL, Astete SG, Cohen CR, Rocha EP, Totten PA.** Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive in vitro and in vivo and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. **Infection and Immunity.** 2006;74(7):3715-26.
51. **Baseman JB, Dallo SF, Tully JG, Rose DL.** Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. **Journal of Clinical Microbiology.** 1988;26(11):2266-9.
52. **Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Nakano M, Ito S, Ohkusu K, et al.** Failure to detect *Mycoplasma genitalium* in the pharynges of female sex workers in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy.** 2009;15(6):410-3.
53. **Wu Y, Qiu H, Zeng Y, You X, Deng Z, Yu M, et al.** *Mycoplasma genitalium* lipoproteins induce human monocytic cell expression of proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor *kappaB*. **Mediators of Inflammation.** 2008;2008:195427.
54. **McGowin CL, Ma L, Martin DH, Pyles RB.** *Mycoplasma genitalium*-encoded MG309 activates NF-*kappaB* via Toll-like receptors 2 and 6 to elicit proinflammatory cytokine secretion from human genital epithelial cells. **Infection and immunity.** 2009;77(3):1175-81.
55. **McGowin CL, Popov VL, Pyles RB.** Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. **BMC Microbiology.** 2009;9:139.
56. **Shimizu T, Kida Y, Kuwano K.** A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-*kappaB* through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. **Infection and Immunity.** 2008;76(8):3672-8.
57. **Ueno PM, Timenetsky J, Centonze VE, Wewer JJ, Cagle M, Stein MA, et al.** Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. **Microbiology.** 2008;154(Pt 10):3033-41.
58. **Salari MH, Karimi A.** Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in men with non-gonococcal urethritis. **Eastern Mediterranean Health Journal.** 2003;9(3):291-5.

59. **Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T.** *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 2004;24 Suppl 1:S23-7.
60. **Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H.** 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.** 2016. DOI: 10.1111/jdv.13849.
61. **Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H.** Background review for the 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.** 2016. DOI: 10.1111/jdv.13850.
62. **MINSAP.** Plan Estratégico Nacional para la Prevención y el Control de las ITS y el VIH/SIDA 2014-2018. La Habana: **Ministerio de Salud Pública de Cuba;** 2013. 250 p.
63. **Horner P, Blee K, O'Mahony C, Muir P, Evans C, Radcliffe K.** 2015 UK National Guideline on the management of non-gonococcal urethritis. **International Journal of STD & AIDS.** 2016;27(2):85-96.
64. **Jensen JS, Orsum R, Dohn B, Uldum S, Worm AM, Lind K.** *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? **Genitourinary Medicine.** 1993;69(4):265-9.
65. **Bjornelius E, Lidbrink P, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis--a study in Swedish male STD patients. **International Journal of STD & AIDS.** 2000;11(5):292-6.
66. **Hamasuna R.** *Mycoplasma genitalium* in male urethritis: diagnosis and treatment in Japan. **International Journal of Urology.** 2013;20(7):676-84.
67. **Bachmann LH, Manhart LE, Martin DH, Sena AC, Dimitrakoff J, Jensen JS, et al.** Advances in the understanding and treatment of male urethritis. **Clinical Infectious Diseases.** 2015;61 Suppl 8:S763-9.
68. **Jensen AJ, Kleveland CR, Moghaddam A, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Skogen V.** *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* among students in northern Norway. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.** 2013;27(1):e91-6.

69. **Moi H, Blee K, Horner PJ.** Management of non-gonococcal urethritis. **BMC Infectious Diseases.** 2015;15:294.
70. **Ng A, Ross JD.** *Trichomonas vaginalis* infection: How significant is it in men presenting with recurrent or persistent symptoms of urethritis? **International Journal of STD & AIDS.** 2016;27(1):63-5.
71. **Wikstrom A, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium*: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline. **Sexually Transmitted Infections.** 2006;82(4):276-9.
72. **Krieger JN, Riley DE.** Prostatitis: what is the role of infection. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 2002;19(6):475-9.
73. **Mandar R, Raukas E, Turk S, Korrovits P, Punab M.** Mycoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology.** 2005;39(6):479-82.
74. **Bissessor M, Tabrizi SN, Bradshaw CS, Fairley CK, Hocking JS, Garland SM, et al.** The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. **Clinical Microbiology and Infection.** 2015. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.11.016.
75. **Manhart LE, Kay N.** *Mycoplasma genitalium*: Is It a Sexually Transmitted Pathogen? **Current Infectious Disease Reports.** 2010;12(4):306-13.
76. **Carne CA, Gibbs J, Delaney A, Sonnex C, Verlander NQ, Smielewska A, et al.** Prevalence, clinical features and quantification of genital non-viral infections. **International Journal of STD & AIDS.** 2013;24(4):273-7.
77. **Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE.** *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases.** 2015;61(3):418-26.
78. **Anagrus C, Lore B, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. **Sexually Transmitted Infections.** 2005;81(6):458-62.
79. **Khryanin A, Reshetnikov O.** Detection rates of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* infections in Novosibirsk, Siberia, in 2010-2011. **Sexually Transmitted Infections.** 2012;88(6):469.

80. **Sonnenberg P, Ison CA, Clifton S, Field N, Tanton C, Soldan K, et al.** Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16-44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). **International Journal of Epidemiology**. 2015. DOI:10.1093/ije/dyv194.
81. **Rigol O, Santiesteban S, Cutié E, Cabezas E, Farnot G, et al.** Obstetricia y Ginecología. 3 ed. La Habana: **Editorial Ciencias Médicas**; 2014. 212 p.
82. **Wroblewski JK, Manhart LE, Dickey KA, Hudspeth MK, Totten PA.** Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006;44(9):3306-12.
83. **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 polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. **Sexually Transmitted Diseases**. 2004;31(8):499-507.
84. **Carlsen KH, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium* PCR: does freezing of specimens affect sensitivity? **Journal of Clinical Microbiology**. 2010;48(10):3624-7.
85. **Butt AM, Tahir S, Nasrullah I, Idrees M, Lu J, Tong Y.** *Mycoplasma genitalium*: a comparative genomics study of metabolic pathways for the identification of drug and vaccine targets. **Infection, Genetics and Evolution**. 2012;12(1):53-62.
86. **Shu HW, Liu TT, Chan HI, Liu YM, Wu KM, Shu HY, et al.** Complexity of the *Mycoplasma fermentans* M64 genome and metabolic essentiality and diversity among mycoplasmas. **PloS one**. 2012;7(4):e32940.
87. **Baseman JB, Cagle M, Korte JE, Herrera C, Rasmussen WG, Baseman JG, et al.** Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. **Journal of Clinical Microbiology**. 2004;42(1):203-11.
88. **Luo D, Xu W, Liang G, Wang S, Wang Z, Bi Z, et al.** Isolation and identification of *Mycoplasma genitalium* from high risk populations of sexually transmitted diseases in China. **Chinese Medical Journal**. 1999;112(6):489-92.

89. **Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology.** 1991;29(1):46-50.
90. **Falk L, Fredlund H, Jensen JS.** Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. **Sexually Transmitted Infections.** 2004;80(4):289-93.
91. **Eastick K, Leeming JP, Caul EO, Horner PJ, Millar MR.** A novel polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma genitalium*. **Molecular Pathology.** 2003;56(1):25-8.
92. **Bjornelius E, Anagrius C, Bojs G, Carlberg H, Johannisson G, Johansson E, et al.** Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia: a controlled clinical trial. **Sexually Transmitted Infections.** 2008;84(1):72-6.
93. **Hamasuna R, Imai H, Tsukino H, Jensen JS, Osada Y.** Prevalence of *Mycoplasma genitalium* among female students in vocational schools in Japan. **Sexually Transmitted infections.** 2008;84(4):303-5.
94. **Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Dohn B, Benkovich A, Savicheva A, Sokolovsky E, et al.** First evaluation of polymerase chain reaction assays used for diagnosis of *Mycoplasma genitalium* in Russia. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.** 2009;23(10):1164-72.
95. **Taylor-Robinson D, Renton A, Jensen JS, Ison CA, Filatova E, Dmitriev G, et al.** Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis in Russian men: a comparison with gonococcal and chlamydial urethritis. **International Journal of STD & AIDS.** 2009;20(4):234-7.
96. **Gesink DC, Mulvad G, Montgomery-Andersen R, Poppel U, Montgomery-Andersen S, Binzer A, et al.** *Mycoplasma genitalium* presence, resistance and epidemiology in Greenland. **International Journal of Circumpolar Health.** 2012;71:1-8.
97. **Salado-Rasmussen K, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium* testing pattern and macrolide resistance: a Danish nationwide retrospective survey. **Clinical Infectious Diseases.** 2014;59(1):24-30.

98. **Le Roy C, Pereyre S, Bebear C.** Evaluation of two commercial real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens. **Journal of Clinical Microbiology.** 2014;52(3):971-3.
99. **Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bebear C, Pereyre S.** Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology.** 2014;52(5):1549-55.
100. **Hay B, Dubbink JH, Ouburg S, Le Roy C, Pereyre S, van der Eem L, et al.** Prevalence and macrolide resistance of *Mycoplasma genitalium* in South African women. **Sexually Transmitted Diseases.** 2015;42(3):140-2.
101. **Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, et al.** Screening for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma genitalium* should it be integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 2015;82(1):14-9.
102. **Dubbink JH, de Waaij DJ, Bos M, van der Eem L, Bebear C, Mbambazela N, et al.** Microbiological characteristics of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in south african women. **Journal of Clinical Microbiology.** 2016;54(1):200-3.
103. **Palmer HM, Gilroy CB, Furr PM, Taylor-Robinson D.** Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Microbiology Letters.** 1991;61(2-3):199-203.
104. **Ma L, Jensen JS, Mancuso M, Hamasuna R, Jia Q, McGowin CL, et al.** Variability of trinucleotide tandem repeats in the MgPa operon and its repetitive chromosomal elements in *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Medical Microbiology.** 2012;61(Pt 2):191-7.
105. **Ma L, Mancuso M, Williams JA, Van Der Pol B, Fortenberry JD, Jia Q, et al.** Extensive variation and rapid shift of the MG192 sequence in *Mycoplasma genitalium* strains from patients with chronic infection. **Infection and Immunity.** 2014;82(3):1326-34.

106. **Ma L, Jensen JS, Mancuso M, Myers L, Martin DH.** Kinetics of Genetic Variation of the *Mycoplasma genitalium* MG192 gene in experimentally infected chimpanzees. **Infection and Immunity.** 2015;DOI: 10.1128/iai.01162-15.
107. **Anagrius C, Lore B.** [*Chlamydia*-like symptoms can have another etiology. *Mycoplasma genitalium* - an important and common sexually transmitted disease]. **Lakartidningen.** 2002;99(48):4854-5, 8-9.
108. **Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H.** Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology.** 2002;40(4):1451-5.
109. **McGowin CL, Annan RS, Quayle AJ, Greene SJ, Ma L, Mancuso MM, et al.** Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. **Infection and Immunity.** 2012;80(11):3842-9.
110. **Svenstrup HF, Jensen JS, Bjornelius E, Lidbrink P, Birkelund S, Christiansen G.** Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology.** 2005;43(7):3121-8.
111. **Dupin N, Bijaoui G, Schwarzinger M, Ernault P, Gerhardt P, Jdid R, et al.** Detection and quantification of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis. **Clinical Infectious Diseases.** 2003;37(4):602-5.
112. **Frolund M, Lidbrink P, Wikstrom A, Cowan S, Ahrens P, Skov Jensen J.** Urethritis-associated pathogens in urine from men with non-gonococcal urethritis: a case-control study. **Acta Dermato-Venereologica.** 2015. DOI 10.2340/00015555-2314.
113. **Jensen JS.** Protocol for the detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance-mediating mutations in region V of the 23S rRNA gene. **Methods in Molecular Biology.** 2012;903:129-39.
114. **Iverson-Cabral SL, Astete SG, Cohen CR, Totten PA.** *mgpB* and *mgpC* sequence diversity in *Mycoplasma genitalium* is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences. **Molecular Microbiology.** 2007;66(1):55-73.

115. **Sethi S, Singh G, Samanta P, Sharma M.** *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. **Indian Journal of Medical Research.** 2012;136(6):942-55.
116. **Twin J, Jensen JS, Bradshaw CS, Garland SM, Fairley CK, Min LY, et al.** Transmission and selection of macrolide resistant *Mycoplasma genitalium* infections detected by rapid high resolution melt analysis. **PloS one.** 2012;7(4):e35593.
117. **McGowin CL, Rohde RE, Redwine G.** Molecular diagnosis of sexually transmitted infections: a diverse and dynamic landscape. **Clinical Laboratory Science.** 2014;27(1):40-2.
118. **Ma L, Taylor S, Jensen JS, Myers L, Lillis R, Martin DH.** Short tandem repeat sequences in the *Mycoplasma genitalium* genome and their use in a multilocus genotyping system. **BMC Microbiology.** 2008;8:130.
119. **Walker J, Fairley CK, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Twin J, Chen MY, et al.** *Mycoplasma genitalium* incidence, organism load, and treatment failure in a cohort of young Australian women. **Clinical Infectious Diseases.** 2013;56(8):1094-100.
120. **Hartgill U, Kalidindi K, Molin SB, Kaste SR.** Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium*; is first void urine or genital swab best? **Sexually Transmitted Infections.** 2015;91(2):141.
121. **Taylor-Robinson D.** Diagnosis and antimicrobial treatment of *Mycoplasma genitalium* infection: sobering thoughts. **Expert Review of Anti-infective Therapy.** 2014;12(6):715-22.
122. **Manhart LE, Jensen JS, Bradshaw CS, Golden MR, Martin DH.** Efficacy of Antimicrobial Therapy for *Mycoplasma genitalium* Infections. **Clinical Infectious Diseases.** 2015;61 Suppl 8:S802-17.
123. **Bebear C, de Barbeyrac B, Bebear CM, Renaudin H, Allery A.** New developments in diagnostic and treatment of mycoplasma infections in humans. **Wiener klinische Wochenschrift.** 1997;109(14-15):594-9.
124. **Taylor-Robinson D, Bebear C.** Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 1997;40(5):622-30.

125. **Falk L, Fredlund H, Jensen JS.** Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. **Sexually Transmitted Infections.** 2003;79(4):318-9.
126. **Haggerty CL, Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, Kelsey SF, et al.** Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. **Sexually Transmitted Infections.** 2008;84(5):338-42.
127. **Mena LA, Mroczkowski TF, Nsuami M, Martin DH.** A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men. **Clinical Infectious Diseases.** 2009;48(12):1649-54.
128. **Khosropour CM, Manhart LE, Colombara DV, Gillespie CW, Lowens MS, Totten PA, et al.** Suboptimal adherence to doxycycline and treatment outcomes among men with non-gonococcal urethritis: a prospective cohort study. **Sexually Transmitted Infections.** 2014;90(1):3-7.
129. **Ross JD, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. **Sexually Transmitted Infections.** 2006;82(4):269-71.
130. **Workowski KA, Berman SM.** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. **MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control.** 2006;55(Rr-11):1-94.
131. **Maeda S, Tamaki M, Kubota Y, Nguyen PB, Yasuda M, Deguchi T.** Treatment of men with urethritis negative for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. **International Journal of Urology.** 2007;14(5):422-5.
132. **Jensen JS.** Single-dose azithromycin treatment for *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis: best but not good enough. **Clinical Infectious Diseases.** 2009;48(12):1655-6.
133. **Guschin A, Ryzhikh P, Rumyantseva T, Gomberg M, Unemo M.** Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high

load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with josamycin. **BMC Infectious Diseases**. 2015;15:40.

134. **Wold C, Sorthe J, Hartgill U, Olsen AO, Moghaddam A, Reinton N.** Identification of macrolide-resistant *Mycoplasma genitalium* using real-time PCR. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. 2015;29(8):1616-20.

135. **Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, et al.** Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. **Clinical Infectious Diseases**. 2015;60(8):1228-36.

136. **Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL.** Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2013;51(7):2245-9.

137. **Johannisson G, Enstrom Y, Lowhagen GB, Nagy V, Ryberg K, Seeberg S, et al.** Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. **International Journal of STD & AIDS**. 2000;11(5):324-6.

138. **Jernberg E, Moghaddam A, Moi H.** Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. **International Journal of STD & AIDS**. 2008;19(10):676-9.

139. **Maeda SI, Tamaki M, Kojima K, Yoshida T, Ishiko H, Yasuda M, et al.** Association of *Mycoplasma genitalium* persistence in the urethra with recurrence of nongonococcal urethritis. **Sexually Transmitted Diseases**. 2001;28(8):472-6.

140. **Takahashi S, Ichihara K, Hashimoto J, Kurimura Y, Iwasawa A, Hayashi K, et al.** Clinical efficacy of levofloxacin 500 mg once daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2011;17(3):392-6.

141. **Terada M, Izumi K, Ohki E, Yamagishi Y, Mikamo H.** Antimicrobial efficacies of several antibiotics against uterine cervicitis caused by *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2012;18(3):313-7.

142. **Deguchi T, Maeda S, Tamaki M, Yoshida T, Ishiko H, Ito M, et al.** Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of

men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2001;48(5):742-4.

143. Shimada Y, Deguchi T, Nakane K, Masue T, Yasuda M, Yokoi S, et al. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in *ParC* associated with fluoroquinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 2010;36(3):255-8.

144. Shimada Y, Deguchi T, Yamaguchi Y, Yasuda M, Nakane K, Yokoi S, et al. *gyrB* and *parE* mutations in urinary *Mycoplasma genitalium* DNA from men with non-gonococcal urethritis. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 2010;36(5):477-8.

145. Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, et al. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2014;69(9):2376-82.

146. Deguchi T, Kikuchi M, Yasuda M, Ito S. Multidrug-Resistant *Mycoplasma genitalium* is increasing. **Clinical Infectious Diseases.** 2015. Supplement.

147. Deguchi T, Yasuda M, Horie K, Seike K, Kikuchi M, Mizutani K, et al. Drug resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* in female sex workers, Japan. **Emerging Infectious Diseases.** 2015;21(6):1062-4.

148. OMS. Estrategias y métodos de laboratorio para reforzar la vigilancia de las infecciones de transmisión sexual 2012. Ginebra: **ONUSIDA/OMS Grupo de Trabajo sobre la Vigilancia Mundial del VIH, el Sida y las Infecciones de Transmisión Sexual;** 2014.

149. Renaudin H, Bebear C. [In vitro activity of sparfloxacin against mycoplasmas]. **Pathologie-Biologie.** 1992;40(5):450-4.

150. Couldwell DL, Tagg KA, Jeffreys NJ, Gilbert GL. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. **International Journal of STD & AIDS.** 2013;24(10):822-8.

151. CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; Approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

152. **World Medical Association.** Helsinki Declaration. Ethical principles for medical research involving human subjects. **JAMA** **2013**;310:4.
153. **CEDMEC.** Requerimientos para la certificación de buenas prácticas clínicas, 52-2008 (**2008**).
154. **Getman D, Jiang A, O'Donnell M, Cohen C.** *Mycoplasma genitalium* prevalence, coinfection, and macrolide antibiotic resistance frequency in a multicenter clinical study cohort in the United States. **Journal of Clinical Microbiology.** **2016**;54(9):2278–83.
155. **McGowin CL, Rohde RE, Redwine G.** Epidemiological and clinical rationale for screening and diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections. **Clinical Laboratory Science.** **2014**;27(1):47-52.
156. **Daley G, Russell D, Tabrizi S, McBride J.** *Mycoplasma genitalium*: a review. **International Journal of STD & AIDS.** **2014**;25(7):475-87.
157. **Manhart LE.** *Mycoplasma genitalium*: An emergent sexually transmitted disease? **Infectious Disease Clinics of North America.** **2013**;27(4):779-92.
158. **Rahman S, Garland S, Currie M, Tabrizi SN, Rahman M, Nessa K, et al.** Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in health clinic attendees complaining of vaginal discharge in Bangladesh. **International Journal of STD & AIDS.** **2008**;19(11):772-4.
159. **Jobe KA, Downey RF, Hammar D, Van Slyke L, Schmidt TA.** Epidemiology of sexually transmitted infections in rural southwestern Haiti: the Grand'Anse Women's Health Study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** **2014**;91(5):881-6.
160. **Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-Robinson D.** The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. **International Journal of STD & AIDS.** **2000**;11(6):356-60.
161. **Pepin J, Sobela F, Khonde N, Agyarko-Poku T, Diakite S, Deslandes S, et al.** The syndromic management of vaginal discharge using single-dose treatments: a randomized controlled trial in West Africa. **Bulletin of the World Health Organization.** **2006**;84(9):729-38.

162. **Mhlongo S, Magooa P, Muller EE, Nel N, Radebe F, Wasserman E, et al.** Etiology and STI/HIV coinfections among patients with urethral and vaginal discharge syndromes in South Africa. **Sexually Transmitted Diseases.** 2010;37(9):566-70.
163. **De Seta F, Banco R, Turrisi A, Airoud M, De Leo R, Stabile G, et al.** Pelvic inflammatory disease (PID) from *Chlamydia trachomatis* versus PID from *Neisseria gonorrhoea*: from clinical suspicion to therapy. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia.** 2012;147(5):423-30.
164. **Svenstrup HF, Dave SS, Carder C, Grant P, Morris-Jones S, Kidd M, et al.** A cross-sectional study of *Mycoplasma genitalium* infection and correlates in women undergoing population-based screening or clinic-based testing for *Chlamydia* infection in London. **BMJ open.** 2014;4(2):e003947.
165. **Wesbonk J, Chmiel C, Rosemann T, Seidenberg A, Senn O.** Prevalence and determinants of sexually transmitted infections in women at risk undergoing abortion in a Swiss primary care setting. **Praxis.** 2014;103(15):875-82.
166. **Moller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM, Toft B, Allen J.** Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility of women. **Journal of Reproduction and Fertility.** 1985;73(1):237-40.
167. **Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G.** *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility--a prospective study. **Fertility and Sterility.** 2008;90(3):513-20.
168. **Costoya A, Morales F, Borda P, Vargas R, Fuhrer J, Salgado N, et al.** Mycoplasma species are not found in Fallopian tubes of women with tuboperitoneal infertility. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.** 2012;16(3):273-8.
169. **Huang C, Zhu HL, Xu KR, Wang SY, Fan LQ, Zhu WB.** *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. **Andrology.** 2015;3(5):809-16.
170. **Rajkumari N, Kaur H, Roy A, Gupta N, Dhaliwal LK, Sethi S.** Association of *Mycoplasma genitalium* with infertility in North Indian women. **Indian journal of Sexually Transmitted Diseases.** 2015;36(2):144-8.

171. **Cohen CR, Nosek M, Meier A, Astete SG, Iverson-Cabral S, Mugo NR, et al.** *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. **Sexually Transmitted Diseases.** 2007;34(5):274-9.
172. **Vandepitte J, Weiss HA, Kyakuwa N, Nakubulwa S, Muller E, Buve A, et al.** Natural history of *Mycoplasma genitalium* infection in a cohort of female sex workers in Kampala, Uganda. **Sexually Transmitted Diseases.** 2013;40(5):422-7.
173. **Lu GC, Schwebke JR, Duffy LB, Cassell GH, Hauth JC, Andrews WW, et al.** Midtrimester vaginal *Mycoplasma genitalium* in women with subsequent spontaneous preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** 2001;185(1):163-5.
174. **Kovachev E, Popova A, Protopopov F, Minkov R, Tsvetkova S.** [Association between *Mycoplasma genitalium* and preterm labor]. **Akusherstvo i Ginekologija.** 2002;41(6):26-9.
175. **Edwards RK, Ferguson RJ, Reyes L, Brown M, Theriaque DW, Duff P.** Assessing the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract. **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.** 2006;19(6):357-63.
176. **Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, et al.** Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology.** 2006;44(1):51-5.
177. **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. **Sexually Transmitted Diseases.** 2010;37(2):81-5.
178. **Choi SJ, Park SD, Jang IH, Uh Y, Lee A.** The prevalence of vaginal microorganisms in pregnant women with preterm labor and preterm birth. **Annals of Laboratory Medicine.** 2012;32(3):194-200.
179. **Averbach SH, Hacker MR, Yiu T, Modest AM, Dimitrakoff J, Ricciotti HA.** *Mycoplasma genitalium* and preterm delivery at an urban community health center. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics.** 2013;123(1):54-7.
180. **Baczynska A, Hvid M, Lamy P, Birkelund S, Christiansen G, Fedder J.** Prevalence of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and

Chlamydia trachomatis among Danish patients requesting abortion. **Systems Biology in Reproductive Medicine.** 2008;54(3):127-34.

181. **Khatib N, Bradbury C, Chalker V, Koh GC, Smit E, Wilson S, et al.** Prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in men with urethritis attending an urban sexual health clinic. **International Journal of STD & AIDS.** 2015;26(6):388-92.

182. **Gillespie CW, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR.** Asymptomatic urethritis is common and is associated with characteristics that suggest sexually transmitted etiology. **Sexually Transmitted Diseases.** 2013;40(3):271-4.

183. **Ito S, Mizutani K, Seike K, Sugawara T, Tsuchiya T, Yasuda M, et al.** Prediction of the persistence of *Mycoplasma genitalium* after antimicrobial chemotherapy by quantification of leukocytes in first-void urine from patients with non-gonococcal urethritis. **Journal of Infection and Chemotherapy.** 2014;20(5):298-302.

184. **Leutscher PD, Pedersen M, Raharisolo C, Jensen JS, Hoffmann S, Lisse I, et al.** Increased prevalence of leukocytes and elevated cytokine levels in semen from *Schistosoma haematobium*-infected individuals. **Journal of Infectious Diseases.** 2005;191(10):1639-47.

185. **Ito S, Horie K, Seike K, Yasuda M, Tsuchiya T, Yokoi S, et al.** Usefulness of quantifying leukocytes in first-voided urine to predict positivity for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic men at high risk for chlamydial infection. **Journal of Infection and Chemotherapy.** 2014;20(12):748-51.

186. **Mezzini TM, Waddell RG, Douglas RJ, Sadlon TA.** *Mycoplasma genitalium*: prevalence in men presenting with urethritis to a South Australian public sexual health clinic. **Internal Medicine Journal.** 2013;43(5):494-500.

187. **Volokhov D, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov V.** Biological enrichment of mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. **Applied and Environmental Microbiology.** 2008;74(17):9.

188. **Dehon PM, McGowin CL.** *Mycoplasma genitalium* infection is associated with microscopic signs of cervical inflammation in liquid cytology specimens. **Journal of Clinical Microbiology.** 2014;52(7):2398-405.

189. **Bradshaw CS, Jensen JS, Tabrizi SN, Read TR, Garland SM, Hopkins CA, et al.** Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. **Emerging Infectious Diseases.** 2006;12(7):1149-52.
190. **Bradshaw CS, Chen MY, Fairley CK.** Persistence of *Mycoplasma genitalium* following azithromycin therapy. **PloS one.** 2008;3(11):e3618.
191. **Hagiwara N, Yasuda M, Maeda S, Deguchi T.** In vitro activity of azithromycin against *Mycoplasma genitalium* and its efficacy in the treatment of male *Mycoplasma genitalium*-positive nongonococcal urethritis. **Journal of Infection and Chemotherapy.** 2011;17(6):821-4.
192. **Lau A, Bradshaw CS, Lewis D, Fairley CK, Chen MY, Kong FY, et al.** The Efficacy of Azithromycin for the Treatment of Genital *Mycoplasma genitalium*: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases.** 2015;61(9):1389-99.
193. **Plecko V, Zele Starcevic L, Tripkovic V, Rezo Vranjes V, Skerlev M.** *Mycoplasma genitalium*: clinical significance and diagnosis. **Acta Dermatovenerologica Croatica.** 2013;21(4):236-40.
194. **Aavitsland P.** Screening for *Mycoplasma genitalium* infection? (0807-7096 (Electronic)).
195. **Andersen B, Sokolowski I, Ostergaard L, Kjolseth Moller J, Olesen F, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. **Sexually Transmitted Infections.** 2007;83(3):237-41.

**NOVEDAD CIENTÍFICA, VALOR TEÓRICO
Y PRÁCTICO**

Novedad Científica

La novedad científica de este trabajo radica en que en el mismo:

- Se aplica una metodología integral novedosa para el diagnóstico molecular de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba.
- Se establece y aplica por primera vez en Cuba un sistema de cultivo modificado para *M. genitalium*.
- Se informa por primera vez en Cuba y América Latina el aislamiento de *M. genitalium*.

Valor Teórico

El presente documento contiene toda la información relacionada con el primer estudio microbiológico integral de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba, que incluye:

- La implementación de una metodología integrada de diagnóstico molecular para las infecciones por *M. genitalium*.
- La implementación de un sistema de cultivo celular modificado para el aislamiento y propagación *in vitro* de *M. genitalium*.
- La detección de la presencia de *M. genitalium* en pacientes cubanos.
- El estudio por primera vez en Cuba y América Latina de la diversidad genética de cepas autóctonas de *M. genitalium*.

- La propuesta de una metodología optimizada para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *M. genitalium*.

Valor Práctico

- Se implementa por primera vez en Cuba, en el LNRIM-IPK, un algoritmo de diagnóstico microbiológico integral para la detección y cuantificación, aislamiento, caracterización genética y el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de *M. genitalium*.
- Se estudia un número grande de pacientes cubanos con ITS, aborto espontáneo y trastornos de la fertilidad, para el diagnóstico de *M. genitalium*.
- Se obtienen y caracterizan aislados autóctonos de *M. genitalium*, llegándose a conocer su genotipo y sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana frente a los medicamentos de elección para el manejo sintomático de las ITS en Cuba.
- Se detecta por primera vez en Cuba, *M. genitalium* resistente a macrólidos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- **Mondeja BA**, Jensen JS, Rodríguez I, Morier LF, Kourí V, Rodríguez NM, Fernández C. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from patients with urogenital infections, first report from the Latin-American region. **New Microbes and New Infections** 2013; 1: 22-6.
- **Mondeja BA**, Jensen JS, Rodríguez-Preval NM, Capote-Tabares M, Rodríguez-Gonzalez I, et al. Detección de *Mycoplasma genitalium* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras urogenitales de individuos cubanos sexualmente activos. **VacciMonitor** 2014; 23(1):17-23.
- **Mondeja BA**, Jensen JS, Rodríguez-Preval NM, Rodríguez-Gonzalez I y C Fernández-Molina. Implementación de una Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa para la detección de *Mycoplasma genitalium*. **VacciMonitor** 2014; 23(2):57-62.
- **Mondeja BA**, Rodríguez NM, Barreto B, Blanco O, Jensen JS. Susceptibility patterns of recent Cuban *Mycoplasma genitalium* isolates determined by a modified cell-culture-based method. **PLoS ONE** 2016; 11 (9).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA NO RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- C Fernández, Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez NM, Rodríguez Y, **Mondeja BA**, et al. Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de la Leptospirosis Humana. Manual de Laboratorio. **IPK 2010**.
- C Fernández, **Mondeja BA**, Rodríguez NM, E Echevarría. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones causadas por micoplasmas y ureaplasmas de interés en salud pública. **IPK 2012**.
- Fraga J, Rodríguez N, Fernández C, **Mondeja B**, Sariego I, Fernández-Calienes A, L Rojas. *Mycoplasma hominis* in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: Association with parasite genetic polymorphism. **Experimental Parasitology 2012**, 131. 393-98.
- Noda AA, Rodríguez I, **Mondeja BA**, Fernández C. Design, Optimization and Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for Detection of *Borrelia* spp. **Advance in Clinical Experimental Medicine 2013**, 22, 5, 639–653.
- **Mondeja BA**, Fernández Molina C, Rodríguez González I, Rodríguez Preval NM, Martínez Romero MR, Mederos Cuervo LM. Aislamiento de *Mycoplasma* spp. a partir de pacientes cubanos VIH-positivos con síntomas respiratorios. **Revista Cubana de Medicina Tropical. 2013**; 65(3): 381-387.
- Rodríguez NM, Rivera-Tapia JA, Fernández C, **Mondeja BA**, Echevarria E, Verdasquera D. Detection of urogenital mycoplasmas in Cuban women with infertility antecedents. **J Pure Appl Microbio 2014**; 08 (1): 171-175.

- Rodríguez NM, Rivera A, Fernández C, **Mondeja BA**, Álvarez A. Urogenital micoplasmas detection in new born child's with respiratory complication. **International Journal of Science 2016; 5 (07).**

PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS RELACIONADAS CON EL TEMA DE
TESIS

- Jornada Científica Institucional, IPK, La Habana - Cuba 15/12/2011.

Título: Detección de *Mycoplasma genitalium* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.

Mondeja BA, Fernández C, Rodríguez I, Castellanos Y, Rosario D, JS Jensen.

- II Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis: Espiroquetas Habana 2012, La Habana – Cuba 23/04/2012 – 25/04/2012.

Título: Comparación de métodos de extracción de ácidos nucleicos de espiroquetas y micoplasmas.

Mondeja BA, Noda AA, Rodríguez I, C Fernández.

- 19th Congress of the International Organization in Mycoplasmology (IOM), Toulouse, Francia, 15/07/2012 – 20/07/2012.

Título: First Successful Isolation of *Mycoplasma genitalium* in the Latin-American Region by Co-culture in Vero Cells. (abstract 109)

Mondeja BA, Fernández C, Jensen JS, Rodríguez I, Morier LF, Rodríguez NM, E Echevarría.

Título: Molecular Identification of *Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma parvum* and *U. urealyticum* by Singleplex PCR and Multiplex PCR Methods in Cuba. (abstract 108)

Fernández C, **Mondeja BA,** Rodríguez NM, Echevarría E, Obregón AM, Rodríguez I, Jensen JS, MA Latino.

- 20th Congress of the International Organization in Mycoplasmology (IOM), Blumenau, Brasil, 1/06/2014 – 6/06/2014.

Título: Susceptibility of Cuban *Mycoplasma genitalium* strains against Azithromycin, Tetracycline and Levofloxacin determined by a cell-culture-based method. (abstract 76)

Mondeja BA, Jensen JS, Rodríguez NM, Rodríguez I, Noda AA, Fernández C.

- VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, V Congreso Nacional de Medicina Tropical y V Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el SIDA. La Habana, Cuba. Octubre 2014

Título: Genotipificación de aislamientos cubanos de *Mycoplasma genitalium* provenientes de individuos sexualmente activos

Mondeja BA, Jensen JS, Rodríguez NM, Rodríguez I, Noda AA, Fernández C.

- IV Taller de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias y Hongos patógenos. La Habana, Cuba. 4/11/15 – 6/11/15

Título: Emergencia de la resistencia de *Mycoplasma genitalium* y otros patógenos responsables de Síndrome Uretral en pacientes cubanos sexualmente activos.

Mondeja BA, Jensen JS, Rodríguez NM, Blanco O, Fernández C.

- I Taller de Micoplasmas de interés de en Salud Pública. La Habana, Cuba. 24-28/10/2016.

Título: Infecciones por *Mycoplasma genitalium* en Cuba. Diagnóstico y caracterización microbiológica.

Mondeja BA

Título: Susceptibilidad antimicrobiana de *Mycoplasma genitalium* en Cuba
Emergencia de la resistencia a las drogas de elección. Triple terapia antimicrobiana – primeros resultados en Cuba

Mondeja BA

- Forum Internacional de Higiene y Epidemiología. 17/11/2016.

Título: Infecciones emergentes por *Mycoplasma genitalium*: la nueva ITS del siglo XXI. Evidencias en Cuba

Mondeja BA

RESULTADOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS

I- PREMIOS

- **Resultado Relevante Institucional – IPK 2012.** *Mycoplasma genitalium*: nueva estrategia para el diagnóstico molecular en individuos cubanos sexualmente activos.

Autor principal: Brian A. Mondeja Rodríguez

Autores: Carmen Fernández Molina; Nadia M. Rodríguez Preval; Islay Rodríguez González; Milena Capote Tabares; Jørgen Skov Jensen; Orestes Blanco; Angel A. Noda Ramos; Ana M. Obregón; Yaindrys Rodriguez Olivera; Yoana Baños; Jose E. Rodriguez Silverira; Yanais Labrador Valdez; Eduardo Echevarría Pérez

- **Resultado Relevante Institucional – IPK 2016.** Infecciones por *Mycoplasma genitalium* en Cuba. Nuevos genotipos y emergencia de la resistencia antimicrobiana.

Autor principal: Brian A. Mondeja Rodríguez

Autores: Nadia M. Rodríguez; Jorgen Skov Jensen; Orestes Blanco; Luis Morier; Javier Curi; Carmen Fernández; Mario Barrientos

- **Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba 2016- Biomedicina.** Infecciones por *Mycoplasma genitalium* en Cuba. Nuevos genotipos y emergencia de la resistencia antimicrobiana.

Autor principal: Brian A. Mondeja Rodríguez

Autores: Nadia M. Rodríguez; Jorgen Skov Jensen; Orestes Blanco; Luis Morier;
Javier Curi; Carmen Fernández; Mario Barrientos

Anexo I. Cepas de referencia utilizadas, donadas por el Statens Serum Institut- Copenhague, Dinamarca

Especie	Cepa	Característica
<i>Mycoplasma genitalium</i>	G37 ^T (DK)	Cepa tipo, Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M30 (early)	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M2288	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M2300	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M2321	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M2341	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6257	Resistente a macrólidos
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6271	Resistente a macrólidos
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6302	Resistente a macrólidos
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6303	Resistente a macrólidos
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6311	Sensible a macrólidos y fluoroquinolonas
<i>Mycoplasma genitalium</i>	M6489	Resistente a macrólidos y fluoroquinolonas

Anexo II. Medio Friis (Medio FB modificado)

Medio Base Friis (150 mL)

Agua (Milli Q)	54,2 mL
Solución de Hanks - Friis	96,0 mL
Caldo Cerebro – Corazón	0,6 g
Caldo PPLO sin CV	0,6 g

- Ajustar pH a $7,5 \pm 0,2$ con NaOH al 1N estéril
- Autoclavear 120°C/10 min.
- Enfriar a 56°C y adicionar los siguientes suplementos estériles

Medio Friis completo (200 mL)

		Concentración final
Medio Base Friis	150,0 mL	
Extracto fresco de levadura al 15 %	11,9 mL	0,9 %
Suero de Caballo, inactivado a 56°C/60 min.	42,5 mL	20 %
Glucosa, solución al 33%	6,0 mL	1 %
Ceftriazona (200 mg/mL)	0,5 mL	0,5 mg/mL
Colistina (200 mg/mL)	0,5 mL	0,5 mg/mL
Anfotericina B (1 mg/mL)	0,5 mL	0,0025 mg/mL
Rojo fenol, solución al 0,2 %	1,0 mL	0,001 %

- Ajustar pH a $7,5 \pm 0,2$ con NaOH al 1N estéril

Control de la calidad del medio Friis

- Comprobar pH $7,5 \pm 0,2$.
- Control de esterilidad.
- Promoción del crecimiento con 10^4 geq/mL de *M. genitalium* M2288 (cambio de color en 14 días), M2300 (cambio de color en 4 días).

Solución de Hanks- Friis (96 mL)

Solución salina de Hanks - Stock A (20X)	4,8 mL
Solución salina de Hanks - Stock B (20X)	4,8 mL
Agua (Milli Q)	86,4 mL

Solución salina de Hanks- Stock A, 20 x conc.

Cloruro de sodio	16,0 g
Cloruro de potasio	0,8 g
Sulfato de magnesio - $7H_2O$	0,2 g
Cloruro de magnesio - $6H_2O$	0,2 g
Cloruro de calcio, anhidro	0,28 g
Agua Milli Q	hasta completar 100 mL

- Autoclavear $120^\circ C/20$ min.
- Dispensar 20 mL en frascos estériles

Solución salina de Hanks - Stock B, 20 x conc.

NA ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
D(+)-Glucosa	2,0 g
Rojo fenol al 0,2 %	20,0 mL
Agua Milli Q	hasta completar 100 mL

- Autoclavear 120°C/20 min.
- Dispensar 20 mL en frascos estériles

Solución de rojo fenol al 0,2%

- Pesar 0,02 g de rojo fenol (sal de sodio) en un recipiente estéril (frasco Erlenmeyer), utilizando una balanza analítica.
- Adicionar 2,4 mL de una solución de NaOH al 1N agitando constantemente hasta disolver el rojo fenol.
- Adicionar agua ultrapura (Milli Q) hasta completar un volumen de 10,0 mL.
- Colocar etiqueta con identificación.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min.
- Dispensar asepticamente en volúmenes 2,0 mL
- Colocar etiqueta con identificación.
- Conservar a 4°C hasta su utilización.

Extracto fresco de levadura al 15 % (Método de hidrólisis ácida)

- Pesar en un recipiente estéril 15,0 g de levadura panadera fresca con conteo bajo de bacterias.

- Adicionar 100,0 mL de agua ultrapura homogenizando hasta lograr obtener suspensión uniforme de levadura.
- Incubar en baño termostado a 37°C durante 30 min.
- Ajustar el pH a 4,5 con HCl al 38 % (concentrado).
- Calentar a 80°C durante 60 minutos agitando constantemente.
- Enfriar y centrifugar a 4 000 rpm (10 000 xg) durante 30 min.
- Recuperar el sobrenadante.
- Clarificar mediante filtración con papel Whatman #1 o repetir la centrifugación.
- Adicionar 0,5 g de glutamina y 0,1 g de cisteína.
- Esterilizar mediante filtro prelavado de 0,45 y 0,22 μm y dispensar en volúmenes de 50,0 mL en tubos de centrifuga estériles.
- Conservar a -20°C hasta su utilización.

Solución de glucosa al 33,3 %

- Pesar en un recipiente estéril 33,3 g de D-glucosa (calidad cultivo celular, ultrapura) utilizando una balanza analítica.
- Adicionar 100,0 mL de agua ultrapura homogenizando suavemente hasta disolver completamente la glucosa.
- Colocar etiqueta con identificación.
- Esterilizar mediante filtro prelavado de 0,45 y 0,22 μm y dispensar en volúmenes de 50,0 mL en tubos de centrifuga estériles.
- Enfriar a temperatura ambiente y conservar a 4°C hasta su utilización.



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Víricas
En Tuberculosis y Micobacterias
Para el estudio del Dengue y su vector



La Habana, 1º de junio de 2011

Dra. Nereyda Cantelar
Subdirectora docente
IPK

Estimada Dra. Cantelar:

Después de analizar la importancia y pertinencia del tema, la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CEEM) del IPK ha aprobado el Protocolo de Tesis de Maestría en Bacteriología Micología del Lic. Brian Arturo Mondeja Rodríguez.

El tema propuesto por el aspirante, titulado *Aislamiento de Mycoplasma genitalium a partir de muestras urogenitales*, aportará una metodología de trabajo que permitirá el aislamiento de este importante patógeno y de esta forma contribuir al perfeccionamiento del diagnóstico de las infecciones causadas *M. genitalium* en nuestro país.

El Lic. Brian Mondeja es Reserva Científica y desarrolla su actividad en el Laboratorio de Micoplasmas del IPK

Dr. Carlos M. Fernández Andreu
Secretario CCEM
IPK





INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Víricas
En Tuberculosis y Micobacterias
Para el estudio del Dengue y su vector



COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 19-11

"Aislamiento de *Mycoplasma genitalium* a partir de muestras urogenitales"

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Lic. Brian A. Mondeja Rodríguez

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dado, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 31 días del mes de mayo de 2011

Dr. Pedro Más Bernejo
Presidente

Lic. Iliana Valdés Hernández
Secretaria

Dr. René Gato Armas



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Viricas
En Tuberculosis y Micobacterias
Para el estudio del Dengue y su vector



CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 31 de mayo de 2011

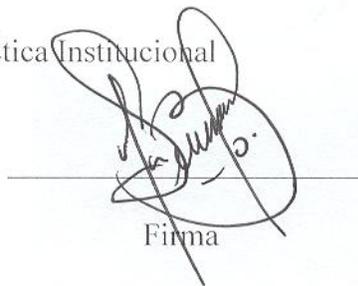
(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/institución
Dr. Pedro Más Bermejo (Presidente)	Médico	Invest Titular/IPK
Lic. Iliana Valdés Hernández (Secretaria)	Lic. Microbiología	Invest. Agregado/IPK
Dra René Gato Armas	Médico	Investigador/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

Dr. Pedro Más Bermejo


Firma

31-5-2011

Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

ESTUDIO DE INFECCIONES UROGENITALES DE TRANSMISIÓN SEXUAL POR *MYCOPLASMA GENITALIUM*

CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. **Propósito del estudio:** *Mycoplasma genitalium* es una bacteria de transmisión sexual que causa infecciones uretrales y cervicales tanto en hombres como en mujeres, las cuales traen como consecuencia secuelas como infertilidad, uretritis crónica, prostatitis y favorecen la aparición de cáncer cervico-uterino y de próstata, así como facilitan la infección por VIH. Desde el punto de vista clínico estas infecciones resultan indistinguibles de las causadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. Mediante la presente investigación se pretende establecer algoritmos diagnósticos diferenciales de laboratorio, ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, seguido del análisis integral clínico y epidemiológico para conocer la prevalencia de estos microorganismos y su asociación a factores de riesgo en el desarrollo de infecciones urogenitales en el grupo de pacientes cubanos.
2. **Procedimientos generales del estudio:** el doctor o la doctora/enfermera/técnico responsable de la toma de muestra le realizará un conjunto de preguntas recogidas en la encuesta epidemiológica que permitirán conocer algunos aspectos claves sobre la infección que usted padece, así como le será tomadas muestras de exudado uretral o endocervical, y se le solicitará que terminada la toma de muestra recoja una muestra del primer chorro de orina. Todas las muestras serán destruidas una vez terminado el estudio y usted recibirá después de la toma de muestra el tratamiento antimicrobiano específico para estos gérmenes.
3. **Participación Voluntaria:** la decisión de participar o no en la presente investigación no influirá en la calidad de la atención médica que usted recibirá. Una vez incluido en el estudio, usted puede retirarse de forma voluntaria sin dar ninguna explicación, sin que ello afecte la calidad de la atención médica que usted recibirá. Durante la entrevista de la encuesta epidemiológica usted puede escoger no responder o no una pregunta en particular.
4. **Riesgos y molestias:** usted puede sentir o sufrir algún tipo de molestia, ligero sangramiento o dolor, durante el procedimiento de toma de la muestra, lo cual resulta normal en este tipo de examen.
5. **Beneficios:** dado que estas bacterias son responsables de ITS con secuelas importantes en la mayoría de los casos en que no se diagnostican y se tratan, la participación en este estudio le traerá como beneficio el diagnóstico y tratamiento oportuno de las mismas, así como permitan el establecimiento de pautas para su tratamiento y control en la población susceptible y con ellos brindar conclusiones científicas a nuestro Sistema Nacional de Salud para lograr una mejor atención de las ITS en Cuba.
6. **Declaración de confidencialidad:** los registro de participación en este estudio se utilizaran solo con fines investigativos durante el mismo. Su nombre o alguna identificación personal no será utilizado para identificar ninguna muestra de laboratorio, ni aparecerá en ningún tipo de informe o publicación de los resultados del presente estudio. Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, a usted se le asignará un código numérico único, lo que garantizará la confidencialidad durante toda la investigación. Solo los investigadores involucrados tendrán acceso a esta información, la cual será de carácter restringida a excepción de ser requerida por las autoridades

