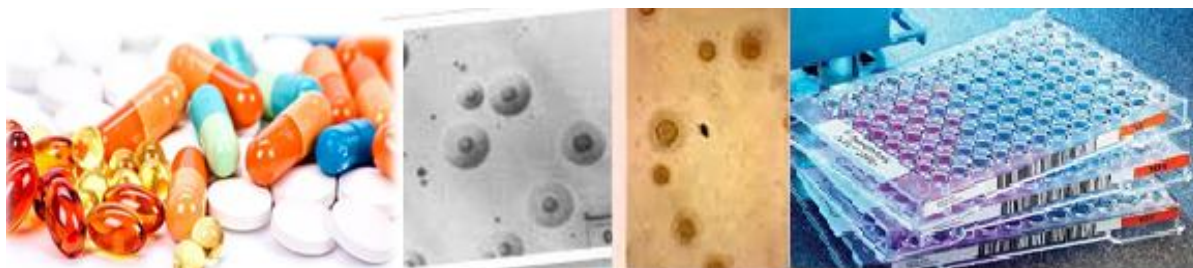


Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas  
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia  
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”



Detección y susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Mycoplasma hominis*  
en pacientes con infecciones urogenitales (IPK, 2020-2021)

Trabajo en opción al Grado de Máster en Bacteriología-Micología



Autor: Lic. Yenis Ramírez Cintra

La Habana  
Año 2022

Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas  
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia  
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Detección y susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Mycoplasma hominis* en  
pacientes con infecciones urogenitales (IPK, 2020-2021)

Trabajo en opción al Grado de Máster en Bacteriología-Micología

Autor: Lic. Yenis Ramírez Cintra

Tutores: Lic. Nadia María Rodríguez Preval, Dr. C.

Lic. Ruxana Sardiñas Morales, M. Sc

Asesor: Dra. Carmen Fernández Molina, Dr. C.

La Habana

Año 2022

## Evaluación del documento

El presente trabajo fue sometido a evaluación por el siguiente tribunal examinador:

Presidente: \_\_\_\_\_  
(Nombre y apellidos)

Secretario \_\_\_\_\_  
(Nombre y apellidos)

Miembro: \_\_\_\_\_  
(Nombre y apellidos)

Oponente: \_\_\_\_\_  
(Nombre y apellidos)

El cual sesionó en \_\_\_\_\_  
el \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
(día) (mes) (año)

El mismo acuerda otorgar la calificación de \_\_\_\_\_

Firman como constancia:

\_\_\_\_\_  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Miembro

\_\_\_\_\_  
Tutor

\_\_\_\_\_  
Asesor

\_\_\_\_\_  
Aspirante

*“En lo tocante a la ciencia, la autoridad de un millar no es superior al humilde razonamiento de una sola persona”*

*Miguel de Unamuno*

## **DEDICATORIA**

Quiero iniciar dedicando esta tesis a mis padres por los valores que sembraron en mí; por la confianza y apoyo.

A mi hermana, por ser mi guía e inspiración.

A mi sobrino, por ser mi motivación de esfuerzo y entrega.

A mis abuelos por el amor, la ternura y la enseñanza. EPD.

A mi tía Belkis por sus sabias palabras y apoyo incondicional. EPD.

A usted por mostrar interés en el tema abordado en esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Medicina Pedro Kourí que me permitió crecer como profesional.

A Dianeya y a mi tutora Nadia por la oportunidad, por compartir sus conocimientos y por el apoyo para la realización de mi Trabajo de Grado.

A Rux, mi otra tutora por su colaboración en estos dos años y su paciencia para explicar todas las dudas.

Agradezco a Carmen por sus consejos a lo largo de este proyecto.

A las chicas del Laboratorio de Diagnóstico y Rabia (Yahisel, Yani, Marialys e Idorkis) por acogerme como una más del grupo y su interés y disposición de transmitirme sus conocimientos. Por su amistad y sinceridad.

Al personal del Departamento de Bacteriología-Micología, me gustaría nombrarlos a todos porque he recibido de ustedes cariño, amistad y apoyo: Lilita, Misle, Miriam, Iraida, Grechen, Gilda, Brenda, Mayra, Rosarys, Islay, Lily, Rosario, Diadenys, Adalberto, Leydis, en fin, a todos.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron con este trabajo, no pueden faltar los que me prestaron su ayuda incondicional cuando la necesitaba: Dunita, Daylin, Mailyn, la profe Liset, Yoana, Rosmery, María Karla, Nayfi, Xiomara, Sonia, Danae, Lay, Emidalys y demás compañeros del Departamento de Virología. Al profe Waldemar.

A los integrantes del Grupo de Emergencia Epidemiológica, Cary, Mirelys y Mariannnys, con quienes compartí mis primeros días de trabajo.

A Ana María y Tony por su colaboración y ayuda.

A mi familia que me apoyó en todo momento a lo largo de este arduo trayecto.

A mis mejores amigos, gracias por apoyarme en las buenas y en las malas, por ser parte de mi vida, de mis alegrías, preocupaciones y tristezas. Mi corazón está con ustedes y saben que para mí son mi familia, especialmente Glenis, Amalita, Denisito, Juanqui, Carlos Luis, Yamile, Elizabeth, Osmara y Anay.

A mis compañeros de estudio en el curso de Maestría, quienes resultaron convertirse en amigos y a quienes deseo tengan la satisfacción de alcanzar el objetivo que nos propusimos: Celeste, Dianelvys, Nankyu, Mandy, Rosa, Yaumara y demás.

A Oscar por su colaboración y cariño.

A mi madre Hilda, Libia, Onelia, Olguita, mi prima Rosario y Jenny.

Gracias a todos, muchas gracias.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** *Mycoplasma hominis* reside como comensal en la vagina de las mujeres, y se asocia a infecciones del tracto genitourinario. Su tratamiento se limita al uso de fluoroquinolonas, tetraciclinas y lincosamidas, para los cuales se describe resistencia adquirida. Estudios en Cuba demuestran la presencia de *M. hominis* en pacientes con infecciones urogenitales, y reportan porcentajes elevados de resistencia antimicrobiana mediante el empleo de estuches comerciales.

**OBJETIVO:** Determinar la frecuencia de *M. hominis* en muestras clínicas de pacientes con infecciones urogenitales y de la resistencia a los antimicrobianos recomendados para su tratamiento; así como demostrar el mecanismo de resistencia a tetraciclina.

**METODOLOGÍA:** Se realizó una investigación descriptiva de corte transversal entre enero 2019 - septiembre 2021 en el Laboratorio de Micoplasmas del Instituto Pedro Kourí, para la detección de *M. hominis* en muestras clínicas de pacientes con infecciones urogenitales y del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos, así como la presencia del gen *tet(M)*.

**RESULTADOS:** Se identificó el 13,94 % (23/165) de muestras positivas a *M. hominis*, coinfectadas con *Ureaplasma* spp. y *M. genitalium*. Se obtuvieron ocho aislados, de los cuales uno mostró resistencia a tetraciclina, uno a clindamicina, y cinco mostraron resistencia a tetraciclina y clindamicina. Se detectó el gen *tet(M)* en los aislados resistentes a tetraciclina y en dos aislados sensibles.

**CONCLUSIONES:** Se identificó *M. hominis* junto a otras especies de micoplasmas urogenitales en las muestras analizadas, y se identificaron aislados clínicos resistentes a clindamicina y tetraciclina; esta última fue confirmada mediante la detección del gen *tet(M)*.

# ÍNDICE

|                                                                                                        | Pág.      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                                                                 | <b>2</b>  |
| 1.2. Objetivos                                                                                         | 4         |
| <b>II. MARCO TEÓRICO</b>                                                                               | <b>6</b>  |
| 2.1. Características generales de los micoplasmas                                                      | 6         |
| 2.2. <i>Mycoplasma hominis</i>                                                                         | 8         |
| 2.2.1. Patogénesis                                                                                     | 9         |
| 2.2.2. Epidemiología de las infecciones por <i>Mycoplasma hominis</i>                                  | 9         |
| 2.2.2a. Enfermedad inflamatoria pélvica                                                                | 9         |
| 2.2.2b. Vaginosis bacteriana                                                                           | 10        |
| 2.2.2c. Infertilidad en mujeres                                                                        | 11        |
| 2.2.2d. Endometriosis y abortos                                                                        | 11        |
| 2.2.2e. Infertilidad en hombres                                                                        | 12        |
| 2.2.2f. Infecciones extragenitales causadas por <i>Mycoplasma hominis</i>                              | 12        |
| 2.2.3. Simbiosis <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>                              | 13        |
| 2.2.4. Métodos para el diagnóstico microbiológico de <i>Mycoplasma hominis</i>                         | 13        |
| 2.2.5. Tratamiento antimicrobiano de las infecciones por <i>Mycoplasma hominis</i>                     | 15        |
| 2.2.6. Resistencia de micoplasmas a los antimicrobianos de elección                                    | 15        |
| 2.2.7. Métodos de determinación de la susceptibilidad de aislados de micoplasmas a los antimicrobianos | 16        |
| 2.2.8 Antecedentes de infecciones por <i>Mycoplasma hominis</i> en Cuba                                | 17        |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                       | <b>19</b> |
| 3.1. Diseño general de la investigación                                                                | 19        |
| 3.2. Muestras clínicas de estudio                                                                      | 19        |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3. Material biológico de referencia                                                                                 | 19        |
| 3.4. Diagnóstico de <i>Mycoplasma hominis</i> a partir de muestras clínicas mediante la PCR-Múltiple en tiempo real   | 19        |
| 3.4.1. Extracción de ADN de las muestras clínicas                                                                     | 19        |
| 3.4.2. Método de PCR-Múltiple en tiempo real para la detección de <i>Mycoplasma hominis</i>                           | 19        |
| 3.5. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de <i>Mycoplasma hominis</i> | 21        |
| 3.5.1. Recuperación de aislados de <i>Mycoplasma hominis</i> mediante el cultivo bacteriológico                       | 21        |
| 3.5.2. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana                                                     | 21        |
| 3.5.2a. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos en estudio.                                   | 22        |
| 3.5.2b. Determinación de la concentración óptima del inóculo para cada aislado                                        | 22        |
| 3.5.2c. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados                                            | 22        |
| 3.6. Detección del gen <i>tet(M)</i> en aislados de <i>Mycoplasma hominis</i>                                         | 23        |
| 3.7. Análisis estadístico.                                                                                            | 24        |
| 3.8. Operacionalización de las variables                                                                              | 24        |
| 3.9. Consideraciones éticas                                                                                           | 25        |
| 3.10. Limitaciones del estudio                                                                                        | 25        |
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                                                                                 | <b>28</b> |
| 4.1. Diagnóstico de <i>Mycoplasma hominis</i> a partir de muestras clínicas mediante la PCR-Múltiple en tiempo real   | 28        |
| 4.2. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de <i>Mycoplasma hominis</i> | 30        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1. Recuperación de aislados de <i>Mycoplasma hominis</i> mediante el cultivo bacteriológico           | 30        |
| 4.2.2. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de aislados de <i>Mycoplasma hominis</i>               | 30        |
| 4.3. Detección del gen <i>tet</i> (M) en aislados de <i>Mycoplasma hominis</i> resistentes a tetraciclina | 31        |
| <b>V. DISCUSIÓN</b>                                                                                       | <b>33</b> |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>                                                                                   | <b>40</b> |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b>                                                                               | <b>42</b> |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                   | <b>44</b> |

## **LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal

**ARNr 16S:** Subunidad 16S del ARNr

**ARNr 23S:** Subunidad 23S del ARNr

**ATCC:** Colección Americana de Cultivos Tipo

**ATP:** Siglas en inglés de Trifosfato de adenosina

**CLSI:** Siglas en inglés de Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**dNTP:** Deoxinucleótido trifosfato

**EIP:** Enfermedad Inflamatoria Pélvica

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IPK:** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

**Kb:** kilobase

**kDa:** kilodalton

**LNR-M:** Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas

**MINSAP:** Ministerio de Salud Pública

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**VB:** Vaginosis Bacteriana

## **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Mycoplasma*, perteneciente a la clase *Mollicutes*, cuenta con alrededor de 125 especies que poseen un genoma por debajo de los 1 000 kb y capacidades de biosíntesis limitadas. Estas bacterias carecen de pared celular y están separadas del medio externo por una membrana trilaminar, que a diferencia de otras bacterias contiene esteroides. Estas características explican su estilo de vida saprófita o parasitaria, su sensibilidad a los factores ambientales y la resistencia a los antimicrobianos que actúan sobre la pared celular (Kühner y cols., 2009). Su estructura celular les otorga una extraordinaria plasticidad y polimorfismo, por lo que pueden presentarse en forma cocobacilar, filamentosa, estrellada o cocoide; esta última es la predominante. Dentro de las especies de este género cuyo sitio primario de infección es el tracto urogenital, son conocidos como micoplasmas genitales: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma genitalium* (Cercenado y Canton, 2011).

*M. hominis* reside como comensal en la superficie de las mucosas del cérvix y la vagina de las mujeres y su tasa de colonización varía entre 20 % y 30 % (Moridi y cols., 2020). Diversos estudios proponen que esta bacteria es potencialmente patógena y en algunas ocasiones se asocia a una variedad de desórdenes que incluyen vaginosis bacteriana, pielonefritis, enfermedad pélvica inflamatoria, corioamnionitis, endometritis, parto pretérmino, abortos espontáneos, mortalidad perinatal y desarrollo de infertilidad (Waites y cols., 2009; Veiga y cols., 2019; Isaac y cols., 2021).

El cultivo bacteriológico constituye la prueba de oro para la detección e identificación de *M. hominis* a partir de muestras clínicas (Waites, 2006; Farmacopea Europea 8.0, 2008). No obstante, su diagnóstico mediante este método es complejo pues demanda de medios de cultivo específicos con suplementos nutricionales especiales para su crecimiento. Otros métodos de avanzada con base en el microcultivo son muy utilizados para el diagnóstico de esta especie, así como diferentes métodos moleculares que constituyen herramientas diagnósticas de sensibilidad y especificidad mayor (Machado y cols., 2014; Leli y cols., 2018).

El tratamiento de las infecciones por *M. hominis* se limita al uso de las fluoroquinolonas, tetraciclinas, estreptograminas y lincosamidas, debido a su resistencia intrínseca a la

mayoría de los antimicrobianos que se utilizan de rutina en la terapéutica (Pereyre y cols., 2006). No obstante, para estos grupos farmacológicos se describe resistencia adquirida, asociada a mutaciones puntuales y a la ganancia de genes de resistencia (Fagundo y cols., 2006; Xue y cols., 2018).

Un ejemplo de lo anterior lo constituye el gen *tet(M)*, único determinante de resistencia a antibióticos adquirido de forma natural en especies de micoplasmas humanos, que se reconoce como el responsable de la resistencia a tetraciclinas. Este se localiza en el transposón conjugativo Tn916 y codifica la proteína Tet(M) que confiere protección al ribosoma ante la acción de las tetraciclinas (Meygret y cols., 2018; Boujemaa y cols., 2020). Las variantes de este gen pueden rendir fenotipos distintos de resistencia inducible en presencia de bajos niveles de tetraciclina (Dégrange y cols., 2008). Asimismo, la resistencia a las fluoroquinolonas se relaciona con mutaciones en las regiones conservadas de los genes *gyrA* de la ADN girasa y los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV (Meygret y cols., 2018). En contraste, la resistencia a clindamicina en aislados clínicos de *M. hominis* no se describe hasta el presente (Valentine-King y cols., 2017; Chalker y cols., 2021).

En el año 2011 se publican las normas internacionales del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, siglas en inglés de *Clinical Laboratory Standard Institute*), en las que se describen los métodos de referencia para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de algunas especies de micoplasmas, incluyendo *M. hominis* (CLSI, 2011). La técnica de microdilución en caldo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es el método más ampliamente utilizado con este propósito.

En Cuba, investigaciones previas demuestran la presencia de *M. hominis* en pacientes con signos y síntomas de infecciones urogenitales, entre las que se incluyen: secreción vaginal, leucorrea, vaginosis bacteriana, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, así como pacientes con antecedentes de infertilidad (Fernández y cols., 2007; Sanchén y cols., 2013; Arnold y cols., 2015). La mayoría de estas emplean estuches comerciales para el diagnóstico de la especie, así como para la determinación del perfil de su susceptibilidad a los antimicrobianos (Ramírez y cols., 2018; López y cols., 2020). En base a sus hallazgos se informa una resistencia elevada (57 – 100 %) a los antimicrobianos de

elección para el tratamiento, pero estos resultados no se han confirmado mediante los métodos de determinación de la CMI considerados de referencia (microdilución en caldo y dilución en agar).

El único antecedente al respecto es un estudio realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas (LNR-M) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), en el que se determina el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo de siete aislados clínicos de *M. hominis* recuperados a partir de muestras de pacientes con derrame pleural. En este se demuestran tres aislados resistentes a tetraciclina para los que se confirma la presencia del gen *tet(M)* (Mondeja B; comunicación personal de resultados del proyecto sectorial “Infecciones por Micoplasmas respiratorios en Cuba. Estudios de susceptibilidad y mecanismos de resistencia antimicrobiana, 2021-2023”). Posteriormente, estos aislados se seleccionaron para un estudio de secuenciación de genoma completo en el que, en cambio, se demuestran susceptibles a fluoroquinolonas (Sharratt y cols., 2021).

Atendiendo a la necesidad de confirmar con métodos convencionales y moleculares la asociación de *M. hominis* con los síndromes urogenitales y los informes previos de resistencia a la tetraciclina, tratamiento de elección para estos, se propone una investigación en el LNR-M del IPK entre el 2020 - 2021 para dar continuidad a los estudios antes comentados.

## **1.2. Objetivos**

1. Determinar la frecuencia de *Mycoplasma hominis* en muestras clínicas de pacientes con infecciones urogenitales.
2. Describir la frecuencia de resistencia a los macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas en aislados de *Mycoplasma hominis*.
3. Demostrar la presencia del gen *tet(M)* en los aislados de *Mycoplasma hominis* con fenotipo resistente y sensible a tetraciclina.

## **II. MARCO TEÓRICO**

## **I. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Características generales de los micoplasma**

Las bacterias del género *Mycoplasma* (familia *Mycoplasmataceae*, orden *Mycoplasmatales*) pertenecen a la clase *Mollicutes*, palabra derivada del latín mollis (suave, flexible) y cutis (piel, referida aquí al recubrimiento celular). Representan un grupo de microorganismos complejos, sofisticados y únicos por su naturaleza entre los procariotas. Los micoplasmas se conocen en el reino animal desde finales del siglo XIX, siendo el primer caso de infección humana causada por estas bacterias un absceso de la glándula de Bartholin, descrito en 1937 por Diènes y Edsall (Cercenado y Canton, 2011; Sleha y cols., 2013).

Estos microorganismos poseen características biológicas particulares que los diferencian del resto de las bacterias, y que definen su comportamiento en relación con el hospedador. En primer lugar, carecen de pared celular, por lo que tienen una morfología celular pleomórfica, y presentan una membrana trilaminar rica en esteroides. Como consecuencia son sensibles a la acción de solventes orgánicos, desinfectantes, metales pesados y propensos a sufrir lisis celular debido a desbalances iónicos y térmicos del medio donde se desarrollen. De igual manera requieren un estricto balance osmótico para su crecimiento y son microaerófilos (Kühner y cols., 2009). La ausencia de la pared celular les confiere resistencia a los antibióticos que bloquean la síntesis de la misma, como la penicilina u otros antibióticos betalactámicos (Waites, 2006).

Los micoplasmas son las bacterias con el tamaño más pequeño conocido en un microorganismo de vida libre, tanto en su dimensión celular (0,2 - 0,8  $\mu\text{m}$ ) como en el tamaño del genoma. Por otra parte, tienen una escasa dotación de vías metabólicas, por lo que son dependientes de su aporte exógeno, ya sea proveniente de las células del hospedador o bien de los complejos y enriquecidos medios de cultivo. También establecen una íntima relación microorganismo-hospedador que se manifiesta como parasitismo de superficie con las células de los epitelios y células del sistema inmunitario y como localización intracelular en algunas especies (Brooks y cols., 2007).

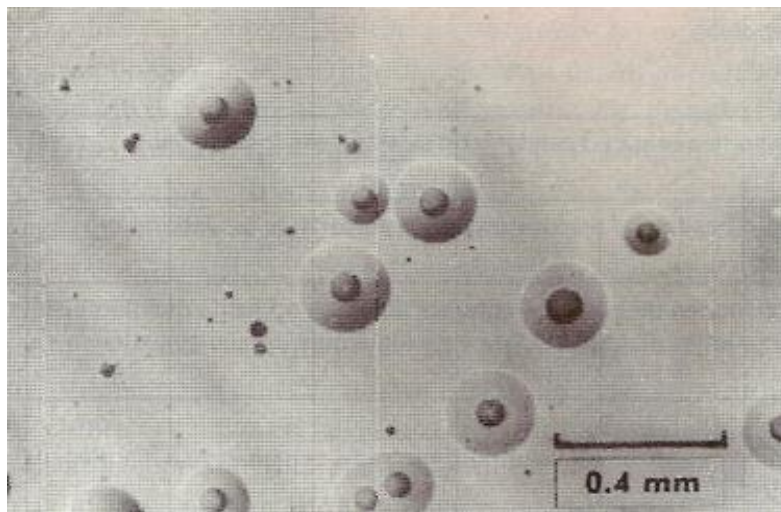
El tamaño del genoma de estas bacterias comprende desde los 580 kb hasta 1 358 kb, que varía según las especies y en general presentan un bajo contenido Guanina- Citosina (24 – 40 %) (Lluch, 2010; Sleha y cols., 2013). Se dividen por fisión binaria y crecen en medios artificiales acelulares. Son anaerobios facultativos, excepto *Mycoplasma genitalium* (que es anaerobio estricto) y necesitan esteroides exógenos que les proporciona el suero animal que se añade al medio de crecimiento (Cercenado y Canton, 2011).

Aunque las bases moleculares de la patogenicidad de los micoplasmas no son bien conocidas, se describen factores de virulencia en casi todas las especies que actúan de forma directa en el proceso patológico. Se detecta la presencia de estructuras especializadas para la adherencia y la penetración celular, así como fracciones proteicas asociadas a la virulencia. Algunas especies secretan enzimas, toxinas y aniones superóxido que tienen efecto en la célula del hospedador. La inducción de una amplia variedad de citocinas por activación de macrófagos, monocitos, células endoteliales, células epiteliales y otras células, da lugar a la expresión y secreción de las principales citocinas proinflamatorias, lo que puede tener efecto inmunomodulador sobre el sistema inmunitario del hospedador (Cercenado y Canton, 2011).

La mayoría de las infecciones por micoplasmas se limitan a las superficies mucosas, donde se encuentran en estrecha relación y adheridos a las células epiteliales del hospedero. Algunas especies, en particular *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. genitalium*, invaden las células y residen en el interior de la célula; rara vez se diseminan, a menos que exista una alteración de las defensas del huésped susceptible, como sucede durante el desarrollo del feto y el recién nacido pretérmino. El grupo de microorganismos denominados "micoplasmas genitales" por su localización en las mucosas del tracto urogenital incluye las especies *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* (Combaz-Söhnchen y Kuhn, 2017).

## 2.2. *Mycoplasma hominis*

*M. hominis* mide entre 0,2 - 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y al carecer de pared celular, es incapaz de teñirse con la tinción de Gram. Se cree que su incapacidad para formar la pared celular se debe a que su ADN está compuesto solo por 500 000 pares de bases, por lo que es muy pequeño. La morfología típica de las colonias en medios sólidos es en forma de huevo frito, que miden de 50 a 300  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gil, 2018).  
Figura 1.



**Figura 1.** Imagen de colonias en forma de “huevo frito” de *Mycoplasma hominis* en medio de cultivo Hayflick sólido. Fuente: Razin y cols., 1961)

*M. hominis* utiliza la arginina como fuente principal de obtención de ATP, y forma productos finales básicos a partir de ella, característica que la diferencia de otras especies dentro del género *Mycoplasma* (Pereyre y cols., 2009; Gil, 2018). Crece a un pH óptimo de 5,5 a 8 con atmósfera de  $\text{CO}_2$  a 37 °C, aunque también puede ser en condiciones de anaerobiosis. Al igual que otras especies del género es exigente desde el punto de vista nutricional, necesitando para su crecimiento *in vitro* la adición de esteroides, purinas y pirimidinas (Gil, 2018).

Estudios recientes describen la caracterización del lipoproteoma de superficie de este microorganismo, y refieren 148 proteínas con un peso molecular entre 14 y 319 kDa, incluidas 36 lipoproteínas entre las 48 predichas *in silico* durante la anotación del genoma.

Entre ellas, nueve lipoproteínas eran específicas de *M. hominis* y unas 15 eran proteínas hipotéticas conservadas entre las especies de micoplasmas (Goret y cols., 2016). También se investigaron los genes de las lipoproteínas de *M. hominis*, refiriendo que cuando esta bacteria estuvo en contacto con las células dendríticas se sobreexpresaron 21 genes de su lipoproteoma. De estos 21 genes, seis codifican para proteínas asociadas con la adhesión o una mayor absorción (Truchetet y cols., 2011; Goret y cols., 2017).

### **2.2.1. Patogénesis**

Poco se conoce sobre los factores de virulencia de *M. hominis*, sin embargo, está claro que la adhesión de la bacteria a las células hospedadoras es un requisito previo para la colonización y la infección (Citti y cols., 2010). Dentro de los polipéptidos que posee *M. hominis* en su superficie, los denominados P50, P100, P140, P110, MG218 y MG317 cumplen función de adhesinas, permitiendo la adherencia a las células eucariotas (Gil, 2018). También posee otra proteína superficial, llamada antígeno variable que se asocia a la adherencia (Vaa, siglas en inglés de variable adherence-associated), que facilita la diseminación de una célula a otra y es altamente inmunogénica (Boujemaa y cols., 2018).

Otro mecanismo de patogenicidad lo constituye el efecto de los productos finales del metabolismo; por ejemplo, el amoníaco resultante del metabolismo de la arginina, que puede producir toxicidad local. Por otro lado, la producción de proteasas activas frente a la IgA facilita la invasión de las mucosas (Ahmed y cols., 2021).

### **2.2.2. Epidemiología de las infecciones por *Mycoplasma hominis***

*M. hominis* coloniza el tracto urogenital tanto en mujeres como en hombres. El papel de esta bacteria como microorganismo patógeno es controversial, ya que se ha encontrado en personas asintomáticas, y también se asocia a infecciones urogenitales. Se les considera como patógenos oportunistas porque pueden aislarse del tracto urogenital bajo tanto en personas saludables y enfermas (Gil, 2018; Moridi y cols., 2020).

*M. hominis* puede transmitirse por contacto directo a través de contacto genital u oral, de forma vertical al nacer o en el útero, y a través de tejidos trasplantados. Se describe una tasa de transmisión vertical entre 18-55 % entre los recién nacidos a término y entre 29-55 % entre los bebés prematuros, que pudiera ser más alta en los lactantes de muy bajo peso al nacer (López y cols., 2014). Esta vía de contagio se afecta por el método de parto,

pero aumenta significativamente cuando la mujer tiene corioamnionitis (Cercenado y Canton, 2011). Se reportan casos de *M. hominis* como agente patológico en pacientes con trasplantes de órganos, en los que se sugiere valorar la transmisión de esta bacteria del donante al receptor (Dixit y cols., 2017).

Esta especie se relaciona con síndromes urogenitales que incluyen enfermedad inflamatoria pélvica e infección ginecológica durante el embarazo, así como con la infección neonatal (Waites y cols., 2009). Además, ante un desequilibrio en la microbiota vaginal con aumento del pH y su multiplicación exacerbada, puede llegar a las partes altas del tracto genital y causar vaginosis bacteriana (Fernández y cols., 2007). También se asocia su presencia en algunos casos con infertilidad femenina y masculina, y se describe además como un patógeno frecuente en pacientes con sospecha de Infección de Transmisión Sexual (Rodríguez y cols., 2013; Rodríguez y cols., 2014; Zotta y cols., 2017; Rodríguez y cols. 2019).

#### **2.2.2a. Enfermedad inflamatoria pélvica**

La Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) es una enfermedad de etiología multifactorial, que aparece como resultado de una infección por varias bacterias, como *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En menor frecuencia se detecta a *M. hominis* en pacientes con esta patología, y se detecta la presencia de esta especie en muestras de exudados endocervicales de pacientes con antecedentes de infertilidad y de infecciones de transmisión sexual previas que desarrollan enfermedad inflamatoria pélvica (Cercenado y Canton, 2011; Rodríguez y cols., 2019). Además, se demuestra en pacientes con vaginosis bacteriana donde un aumento de las concentraciones y variabilidad de microorganismos anaerobios como *Gardnerella vaginalis* y *M. hominis* aumentan el riesgo de adquirir la enfermedad inflamatoria pélvica (Ness y cols., 2005).

#### **2.2.2b. Vaginosis bacteriana**

En las mujeres con vaginosis bacteriana (VB) la microbiota vaginal normal se encuentra alterada en su composición, con pérdida de uno de los componentes principales, *Lactobacillus spp.*, por lo que ocurre un reemplazamiento por otras bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Ureaplasma spp.* y *M. hominis*. En esta condición la colonización por *M. hominis* alcanza recuentos de hasta 10.000 veces mayores que en mujeres sin esta patología, y algunos autores consideran que después de las 24 semanas

de gestación esto constituye un factor de riesgo del parto pretérmino. Es probable que este microorganismo encuentre condiciones adecuadas para su crecimiento en el medio creado por otras bacterias, y que cuando estas últimas sean erradicadas, él también lo sea.

En consecuencia, es difícil saber si es un patógeno *per se*, si necesita de otras bacterias para serlo, si es cofactor de la VB o, un acompañante. Se describe que si *M. hominis* contribuye de forma importante en los desenlaces adversos del embarazo, es probable que sea a través de su implicación en la VB (Vallely y cols., 2018).

### **2.2.2c. Infertilidad en mujeres**

En relación con la infertilidad se conoce que los micoplasmas ascienden por las mucosas situándose en glándulas y epitelios del revestimiento del aparato reproductor femenino; además realizan movimientos de adhesión a las superficies celulares lo que constituye un requisito esencial para la colonización e infección. Los cambios producidos en el pH vaginal alteran las características del cérvix y moco cervical, lo que provoca adelgazamiento del epitelio endocervical y aumento de la fragilidad capilar que facilita el sangrado; todo lo cual interfiere en la interacción moco cervical- semen (López y cols., 2014). Diversos estudios reportan la presencia de *M. hominis* en casos de infertilidad en proporciones que varían desde 0,8 % hasta 6,2 % (Arnold y Domínguez, 2015; Rodríguez y cols., 2019; Doroftei y cols., 2021). Otros investigadores revelan una prevalencia mayor de infección por *M. hominis* en mujeres atendidas en consultas de infertilidad con respecto a mujeres en el grupo control (Paira y cols., 2021).

### **2.2.2d. Endometriosis y abortos**

La presencia de *M. hominis* en el endometrio y/o a las trompas de Falopio se asocia a la capacidad de los espermatozoides para transportarlas a estos sitios, donde pueden causar alteraciones reproductivas como endometritis, aborto espontáneo, ruptura de membranas y/o parto pretérmino (López y cols., 2014). Los mecanismos por los que la infección intrauterina induce el parto pretérmino están relacionados con la activación del sistema inmune innato. En el feto, además del riesgo directo de infección y sepsis, la respuesta inflamatoria produce lesión de la sustancia blanca cerebral que puede causar parálisis cerebral y otras alteraciones neurológicas (Cercenado y Canton, 2011).

### **2.2.2e. Infertilidad en hombres**

Al igual que en las mujeres, las especies de micoplasmas ascienden por las mucosas situándose en glándulas y epitelios del revestimiento del aparato reproductor masculino. Se reporta la presencia de *M. hominis* en pacientes infértiles, en los que se observa una disminución en la motilidad espermática y alteraciones morfológicas de los espermatozoides (López y cols., 2014). Existen evidencias específicas y concluyentes de la adhesión e invasividad de *M. hominis* hacia los espermatozoides humanos, lo que parece no afectar su viabilidad, y sugiere que una interacción de ambos a corto plazo da como resultado un daño no aparente o sutil, que puede tener implicaciones para la fertilidad a largo plazo del hombre o de la pareja (Díaz y cols., 2006).

Se han observado agrupaciones de *M. hominis* adheridos a la cabeza, el medio o la cola del espermatozoide. Una pequeña proporción de estos mostró colas dobladas o enrolladas y/o engrosamiento de la pieza central, aunque no se demuestra alteración en la viabilidad de los espermatozoides infectados con *M. hominis* (Díaz y cols., 2006). Se describe una mayor prevalencia de *M. hominis* en pacientes masculinos en consultas de infertilidad que en hombres sanos (Paira y cols., 2021).

### **2.2.2f. Infecciones extragenitales causadas por *Mycoplasma hominis***

*M. hominis* se asocia a infecciones extragenitales en pacientes inmunodeprimidos, así como en afectados con otros procesos crónicos como la enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso, trasplante renal y enfermedad cardíaca. También se describe la infección de heridas y la producción de abscesos pélvico e inguinal causados por *M. hominis*, en la primera semana del posoperatorio. Además, se asocia a septicemia, infección articular e infección del Sistema Nervioso Central (Bergin y cols., 2017; Okumura y cols., 2018; Hum y cols., 2022).

En pacientes inmunodeprimidos con síntomas respiratorios también se manifiesta la presencia de *M. hominis*, así como un reporte de un caso de bacteriemia luego de un legrado uterino por aborto incompleto (Mondeja y cols., 2013; Posse y cols., 2018). Otros reportes de caso incluyen pacientes adultos y neonatos con meningitis, endocarditis, absceso cerebral (Pailhoriès y cols., 2014; Gagneux y cols., 2015; Zhou y cols., 2016). Otras evidencias muestran a esta especie como causante de infecciones en pacientes con

trasplante de pulmón e infecciones óseas (Dixit y cols., 2017; Xiang y Lu, 2019; Ansari y cols., 2021).

### **2.2.3 Simbiosis *Mycoplasma hominis* y *Trichomonas vaginalis***

La simbiosis entre el protista parasitario *Trichomonas vaginalis* y la bacteria oportunista *M. hominis* involucra a dos simbioses mucosas humanas obligados con capacidades patógenas que pueden causar enfermedades independientes en el mismo sitio anatómico: el tracto urogenital inferior.

*T. vaginalis* puede internalizar microorganismos de la microbiota bacteriana a través de la fagocitosis, contribuyendo a la disbiosis vaginal posiblemente al matar de manera diferencial a miembros de las bacterias lactobacilos protectoras y al hospedar y transmitir especies oportunistas, como las pertenecientes a la Clase *Mollicutes* (Bär y cols., 2015).

La prevalencia de *M. hominis* en los aislados de *T. vaginalis* varía desde un 5 % hasta 89 % (Fichorova y cols., 2017). Múltiples estudios sugieren que esta simbiosis favorece la patogénesis de la infección por este parásito (Fiori y cols., 2013; Margarita y cols., 2020). Entre ambos se crea una simbiosis capaz de elevar la resistencia a los mecanismos de defensa del huésped y a los tratamientos farmacológicos (Fraga y cols., 2012; Fürnkranz y cols., 2018).

### **2.2.4. Métodos para el diagnóstico microbiológico de *Mycoplasma hominis***

La capacidad de *M. hominis* de colonizar las mucosas del tracto urogenital dificulta la interpretación de los títulos de anticuerpos obtenidos mediante el diagnóstico serológico, y su mera presencia no se considera significativa. Las técnicas serológicas descritas, como la inmunofluorescencia, ensayos inmunoenzimáticos y la inhibición metabólica no se encuentran disponibles de forma comercial (Waites y cols., 2005).

El cultivo bacteriológico constituye la prueba de oro para la detección e identificación de *M. hominis* a partir de muestras clínicas (Waites, 2006). Para ello se requieren medios de cultivos complejos que están compuestos por caldo cerebro-corazón, peptonas, extracto de levadura, suero animal, aminoácidos, antibióticos (para inhibir la contaminación acompañante), un metabolito (arginina) y rojo fenol como indicador del pH. Su elaboración es minuciosa y requiere controles de todos y cada uno de sus componentes (Spiller, 2017; Waites y Bébéar, 2019). Como el diagnóstico microbiológico mediante este método es

complejo, se han desarrollado métodos de biología molecular que son utilizados debido a su rapidez, elevada sensibilidad y especificidad en la detección e identificación de estas bacterias “fastidiosas” (Machado y cols., 2014; Leli y cols., 2018).

Las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) son útiles para detectar *M. hominis* en muestras clínicas en las que el cultivo carece de sensibilidad, como líquido amniótico, muestras del tracto genital alto y extragenitales. Se describen varias técnicas de PCR convencionales y en tiempo real, las que se dirigen al ARNr 16S y al gen *gap* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), pero la variabilidad de secuencia de estos genes entre cepas limita la sensibilidad de estas técnicas. También se describe una PCR en tiempo real dirigida al gen conservado *yidC*, que codifica una translocasa de membrana (Baczynska y cols., 2004; Férandon y cols., 2011).

Se han desarrollado estuches diagnósticos comerciales de PCR múltiple en Tiempo Real, que incluyen la detección de *M. hominis* junto a otros patógenos urogenitales (Rodríguez y cols., 2007; Waites y Bébéar, 2016; Pereyre y Bébéar, 2019). Las ventajas de los métodos de PCR sobre el cultivo y la serología radican en que tienen una mayor sensibilidad, permiten completar el procesamiento de la muestra en un solo día y obtener el resultado en menor tiempo.

Por otro lado, actualmente existen estuches diagnósticos comerciales basados en microcultivo para el diagnóstico de avanzada de micoplasmas urogenitales. Los más generalizados por su uso son los sistemas para la detección e identificación de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis*. Estos constituyen pruebas más rápidas y una alternativa de diagnóstico útil en sitios donde los métodos de diagnóstico de estas bacterias no están disponibles o son de pobre acceso (Kokkayil y Dhawan, 2015). La mayoría de estos sistemas diagnósticos permiten una identificación y cuantificación rápida de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* entre 24 y 48 h, que se fundamentan en la habilidad de estas bacterias de metabolizar la urea y la arginina, respectivamente. Ejemplos de ellos son: Mycoplasma IST2, Mycofast RevolutionN, MYCO WELL D-ONE, SIR Mycoplasma (Redelinghuys y cols., 2013; D'Inzeo y cols., 2017; Morris y cols., 2020).

### **2.2.5. Tratamiento antimicrobiano de las infecciones por *Mycoplasma hominis***

El tratamiento de las infecciones por micoplasmas es complicado debido a su resistencia intrínseca a los antimicrobianos que se usan de rutina en la terapéutica. Entre los antimicrobianos con gran potencial terapéutico para las infecciones causadas por micoplasmas se incluyen las tetraciclinas, el grupo de los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y ketólidos (MLSK), así como las fluoroquinolonas. Otros como los aminoglucósidos y el cloranfenicol muestran *in vitro* actividad contra los micoplasmas, pero solo se utilizan ante la resistencia a tetraciclinas o el fracaso clínico tras el empleo de otros antimicrobianos (Waites, 2008; Bébéar, 2010; Ponyai y cols., 2013).

En algunos casos de infecciones graves por *M. hominis* que se producen en pacientes inmunodeprimidos se recomienda una combinación de fármacos habitualmente efectivos contra los micoplasmas, que podría ser clindamicina y doxiciclina o una fluoroquinolona y doxiciclina. Las fluoroquinolonas más nuevas como la levofloxacin y la moxifloxacin tienen mayor efectividad que las más antiguas. En infecciones persistentes también se recomienda el uso combinado de doxiciclina y azitromicina (Pereyre y cols., 2020). Por otro lado, el cloranfenicol, antimicrobiano empleado con poca frecuencia, se reporta como eficaz y seguro para el tratamiento de una infección por *M. hominis* en un recién nacido prematuro con meningitis (Watson y cols., 2008).

### **2.2.6 Resistencia de micoplasmas a los antimicrobianos de elección**

Los micoplasmas carecen de pared celular, característica que les confiere resistencia intrínseca a todos los antibióticos que actúan sobre la síntesis de la misma, que incluyen  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos (Taylor, 2014). La incapacidad de síntesis de ácido fólico los hace resistentes a las sulfonamidas y diamonipirimidinas (Pereyre y cols., 2006). De forma adicional *M. hominis* tiene resistencia intrínseca a todos los macrólidos con anillos de 14 átomos (roxitromicina, claritromicina, eritromicina) y de 15 átomos (azitromicina), que se asocia con una transición de guanina a adenina en la posición 2057 (numeración de *Escherichia coli*) en el dominio V del ARNr 23S (Pereyre y cols., 2002).

Para grupos farmacológicos como las fluoroquinolonas, tetraciclinas, estreptograminas y lincosamidas se describe resistencia adquirida en esta especie, la que está asociada a mutaciones puntuales y la adquisición de genes (Fagundo y cols., 2006; Xue y cols., 2018). La resistencia a tetraciclina se asocia con la adquisición del gen *tet(M)* que codifica

la proteína Tet(M), la cual protege al ribosoma de la acción de este antibiótico y confiere resistencia cruzada a todas las tetraciclinas (Boujemaa y cols., 2020). Por su parte la resistencia adquirida a las fluoroquinolonas se relaciona con mutaciones en los genes *gyrA* de la ADN girasa, y los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV (Meygret y cols., 2018).

### **2.2.7. Métodos de determinación de la susceptibilidad de aislados de micoplasmas a los antimicrobianos**

En el año 2011 se publican las normas internacionales del CLSI en las que se describen los métodos de referencia para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de algunas especies de micoplasmas, que incluye *M. hominis*. La técnica de microdilución en caldo para la determinación de la CMI es el método más utilizado con este propósito (CLSI, 2011).

La dilución en agar que se utiliza de forma extensiva como método de referencia para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en muchos tipos de bacterias, constituye también un método útil en micoplasmas, en especial para aquellas especies que forman colonias fácilmente visibles. Desde el punto de vista práctico es más laboriosa y exige del examen de las placas bajo un microscopio, pero tiene como ventaja el brindar un valor de corte relativamente estable en el tiempo, permitir la detección de cultivos mixtos y el estudio de un número amplio de aislados clínicos frente a un mismo antimicrobiano de forma simultánea (Waites y cols., 2014).

Los estuches diagnósticos comerciales con base en el microcultivo que se utilizan para el diagnóstico de *M. hominis*, incluyen una galería con diferentes concentraciones de antimicrobianos deshidratados para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Sin embargo, la mayoría emplea concentraciones que se corresponden con los puntos de corte establecidos para otras bacterias y no para micoplasmas (Redelinghuys y cols., 2013; D'Inzeo y cols., 2017; Morris y cols., 2020). Estos sistemas son muy utilizados en países europeos y de Asia, aunque varios estudios reconocen las limitaciones que tienen al utilizar concentraciones de antibióticos por debajo de las establecidas por el CLSI para definir la resistencia verdadera, así como no contar con un método de dilución para cuantificar de forma correcta la concentración del inóculo que se adiciona en los pocillos (Beeton y Spiller, 2016).

### **2.2.8. Antecedentes de infecciones por *Mycoplasma hominis* en Cuba**

En Cuba, investigaciones previas demuestran la presencia de *M. hominis* en pacientes con signos y síntomas de infecciones urogenitales, que incluyen secreción vaginal, leucorrea, vaginosis bacteriana, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, así como pacientes con antecedentes de infertilidad (Sanchén y cols., 2013; Arnold y cols., 2015; López y cols., 2020). En la mayoría de estos estudios se emplean para el diagnóstico de esta especie estuches diagnósticos comerciales. Estudios realizados para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana que emplean estos sistemas diagnósticos describen porcentos elevados de resistencia a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de *M. hominis*; se reportan valores entre 57 % y 100 % de resistencia a tetraciclina, clindamicina, y levofloxacina (Díaz y cols., 2013; Ramírez y cols., 2018). Estos resultados no han sido confirmados mediante los métodos de referencia.

Por otra parte, en el LNR-M se realiza un estudio en el que se analizan aislados clínicos de *M. hominis* recuperados a partir de muestras de pacientes con derrame pleural, a los que se les determina el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo, demostró un 43 % (3/7) de resistencia a tetraciclina, que fue confirmada mediante la detección del gen *tet(M)* en los aislados resistentes (datos no publicados). Estos aislados fueron confirmados como susceptibles a fluoroquinolonas mediante un estudio por secuenciación de genoma completo (Sharratt y cols., 2021).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño general de la investigación

En el LNR-M del IPK, en el período comprendido entre enero 2020 - septiembre 2021, se realizó una investigación descriptiva de corte transversal para la detección de *M. hominis* a partir de muestras clínicas de pacientes con infección urogenital; así como para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de *M. hominis* recuperados a partir de las muestras positivas a esta especie, y la detección de la presencia del gen *tet(M)* en los mismos.

#### 3.2. Muestras clínicas de estudio

Se estudiaron 165 muestras clínicas de pacientes (89 mujeres y 76 hombres) con infección urogenital recibidas en el LNR-M del IPK para el diagnóstico de micoplasmas urogenitales en el período comprendido entre enero 2020 - septiembre 2021. Estas muestras incluían: 7 exudados endocervicales, 39 exudados uretrales y 119 muestras de orina.

#### 3.3. Material biológico de referencia

Se utilizaron como controles las cepas de referencia de micoplasmas de origen humano de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, siglas en inglés), pertenecientes a la colección de cepas del LNR-M del IPK: *M. hominis* PG 21<sup>T</sup> (ATCC 23114), *U. parvum* (ATCC 27815), *U. urealyticum* (ATCC 27618) y *M. genitalium* G37<sup>T</sup> (DK)

#### 3.4. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis* a partir de muestras clínicas mediante la PCR-Múltiple en tiempo real

##### 3.4.1. Extracción de ADN de las muestras clínicas

Se realizó la extracción de ADN de las muestras clínicas mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

##### 3.4.2. Método de PCR-Múltiple en tiempo real para la detección de *Mycoplasma hominis*

Para la identificación de *M. hominis* en las muestras clínicas se realizó una PCR-Múltiple previamente implementada en el LNR-M, que permite además la identificación de *M. genitalium*, *U. parvum* y *U. urealyticum*. Se utilizaron los cebadores y sondas diseñados por Spiller y colaboradores, donados al LNR-M por el laboratorio de Micoplasmas de la Unidad de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad de Cardiff, Gales (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Secuencia de los cebadores y sondas empleados en la PCR-Múltiple para la identificación de *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, LNR-M, enero 2020 - septiembre 2021.

| Especie                | Cebadores                     | Secuencia de nucleótidos                   |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>M. hominis</i>      | MH_FP                         | TCA CTA AAC CGG GGT GTA TTT<br>TCT AAC AA  |
|                        | MH_RP                         | TTG GCA TAT ATT GCG ATA GTG<br>CTT         |
|                        | MH_HP(sonda)                  | CTA CCA ATA ATT TTA ATA TCT GTC<br>GGT ATG |
| <i>M. genitalium</i>   | MG_FP                         | GAA GGT ATG ATA ACA ACG GTA<br>GAG CTT     |
|                        | FPMG-RP                       | CCA TTT AAA CCC CTT TGC ACC<br>GTT         |
|                        | MgpB_BnB_HP114_Cy5<br>(sonda) | ACT TAG CAA AAA TGG AAA ACC<br>CCT C       |
| <i>Ureaplasma spp.</i> | U_FP                          | TTC CTG TTG CCC CTC AGT CT                 |
|                        | U_RP                          | AAG GTC AAG GTA TGG AAG ATC<br>CAA         |
|                        | HEX UP_HP (sonda)             | TCC ACA AGC TCC AGC AGC AAT<br>TTG         |
|                        | FAM UU_HP (sonda)             | ACC ACA AGC ACC TGC TAC GAT<br>TTG TTC     |

El volumen final de reacción fue de 20 µL (15 µL de mezcla más 5 µL de muestra). Cada mezcla de reacción contenía 2X QuantiFast *Multiplex RT-PCR Master Mix* (QIAGEN, Alemania); 250 nM de los cebadores para *M. hominis* y *M. genitalium* y 500 nM de los cebadores para las especies de *Ureaplasma*; 1000 nM de cada sonda y suficiente agua

ultrapura para completar un volumen de 15 µL. Como control positivo se utilizaron 5 µL de ADN de las cepas control del ensayo y 5 µL de agua ultrapura como control negativo.

La amplificación y el análisis de los resultados se efectuó en un equipo Rotor Gene Q 5-plex (QIAGEN, Alemania), con un programa de amplificación de un ciclo inicial de 95 °C durante 5 minutos, 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos. La lectura se realizó en el canal de fluorescencia correspondiente al marcaje de cada sonda utilizada: canal verde para *U. urealyticum*, canal amarillo para *U. parvum*, canal rojo para *M. genitalium* y canal naranja para *M. hominis*. Se consideró como muestra positiva aquella que mostró una amplificación exponencial a partir de un ciclo umbral (ct, siglas en inglés de *Cycle Treshold*) de 23.

### **3.5. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de *Mycoplasma hominis***

#### **3.5.1. Recuperación de aislados de *Mycoplasma hominis* mediante el cultivo bacteriológico**

A partir de las muestras clínicas que resultaron positivas a *M. hominis* mediante el método de PCR Múltiple, anteriormente descrito, se tomaron 100 µL y se sembraron en tubos con medio de cultivo líquido Hayflick suplementado con arginina, específico para el crecimiento de *M. hominis*, que fueron incubados a 37 °C durante 48 horas. Los cultivos primarios que mostraron cambio de color de rojo a rosado intenso se sembraron en placas Petri con medio de cultivo sólido Hayflick y se incubaron en condiciones de microaerofilia durante 48 horas. Los cultivos a partir de los cuales se observaron colonias características en forma de huevo frito se consideraron positivos a *M. hominis*.

#### **3.5.2. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana**

Se determinó la CMI de tetraciclina, levofloxacin y clindamicina (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) para cada aislado clínico mediante la técnica de microdilución en caldo, siguiendo la metodología descrita por Beeton y colaboradores y las normas del CLSI para micoplasmas (Beeton ML y cols., 2009; CLSI, 2011).

##### **3.5.2a. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos en estudio.**

Se prepararon las soluciones de los antimicrobianos a las concentraciones recomendadas por Beeton y colaboradores en 2009, que se corresponden con los valores de corte

sugeridos por las CLSI para clasificar a los aislados como resistentes en cada caso: tetraciclina [8 µg/mL], levofloxacin [2 µg/mL] y clindamicina [0,5 µg/mL].

### **3.5.2b. Determinación de la concentración óptima del inóculo para cada aislado**

El ensayo se desarrolló en placas de poliestireno de fondo plano (Costar, USA). Se adicionaron 180 µL de medio Hayflick líquido en todos los pocillos de la placa y se destinó una columna para cada aislado. En el primer pocillo de cada columna se agregaron 20 µL del cultivo del aislado de *M. hominis* tras la incubación por 48 horas, a partir de este se realizaron diluciones seriadas, transfiriendo siempre 20 µL de un pocillo al otro hasta el séptimo, siempre haciendo cambio de puntas. El octavo pocillo se reservó como control de esterilidad del medio. La placa se cubrió con una tapa plástica y se incubó a 37 °C por 48 horas.

Los aislados donde se evidenció cambio de color del medio de rojo a rosado intenso al menos en cuatro diluciones del inóculo, se consideraron óptimos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana. Para ello se seleccionó la última dilución en la que se observó cambio de color del medio, lo que corresponde a una unidad cambiadora de color por cada microlitro de medio (UCC/ µL).

### **3.5.2c. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados**

Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano (Costar, USA) y se procedió de la siguiente forma:

- Se añadieron 135 µL de medio de cultivo Hayflick en los pocillos 1 al 12 de la fila A, para utilizarla como control de crecimiento del aislado en cuestión.
- Se adicionaron 135 µL de la solución de tetraciclina, clindamicina y levofloxacin previamente preparadas en todos los pocillos de las filas B, C y D, respectivamente.
- Se adicionó 10 µL de cada aislado (1 UCC/ µL), en el primer pocillo de cada una de las filas (A-D).
- Se realizaron diluciones seriadas a partir de este pocillo y hasta el pocillo 11, transfiriendo siempre 10 µL, que fueron eliminados al final de la última dilución.
- Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 días.
- La lectura se efectuó de forma visual a partir de las 48 horas de incubación

- Primero se corroboró cambio de color en la fila de control de crecimiento en el pocillo que se corresponde con  $10^4$  UCC/ $\mu$ L. Esto se interpretó como crecimiento del aislado en la concentración óptima del inóculo.
- Seguidamente se exploró, en las filas de cada uno de los antimicrobianos incluidos en la prueba, si se produjo cambio de color en el pocillo correspondiente a  $10^4$  UCC/ $\mu$ L. Se consideró como aislado resistente aquel que mostró crecimiento en dicho pocillo y como sensible aquel para el que no se observó cambio de color.

Se utilizó como control de la prueba la cepa de referencia *M. hominis* PG 21T (ATCC 23114), sensible a todos los antimicrobianos en estudio (CLSI, 2011).

### **3.6. Detección del gen *tet(M)* en aislados de *M. hominis*.**

Se realizó una PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento de 70 pb del gen *tet(M)* en los aislados de *M. hominis*. Se utilizaron los cebadores tetM\_775 (ATT TCC GCA AAG TTC AGA CG) y tetM\_302 (AAA AGA TGG CGT ACA AGC AC), y la sonda tetM qPCR 1309 F (GTG CCG CCA AAT CCT TTC TG), donados al LNR-M por el laboratorio de Micoplasmas de la Unidad de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad de Cardiff, Gales.

La extracción de ADN a partir del cultivo primario de los aislados se realizó tal como se describió en el acápite 2.4.1. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L (20  $\mu$ L de mezcla más 5  $\mu$ L de muestra). Cada mezcla estuvo compuesta por 1 X de Tampón de PCR (QIAGEN, Alemania); 2,5 mM de  $MgCl_2$  (QIAGEN, Alemania); 200 nM de cada dNTP (QIAGEN, Alemania); 100 nM de cada cebador, 50 nM de la sonda y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 20  $\mu$ L.

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 de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. La lectura de fluorescencia se realizó en el canal Crimson. Se consideró como muestra positiva aquella que mostró una amplificación exponencial a partir de un ct de 23.

### **3.7. Análisis estadístico.**

El almacenamiento y análisis de la información se realizó en una base de datos en Microsoft Excel. Se calculó la frecuencia de positividad a *M. hominis*. Se utilizó la prueba

de comparación de proporciones de muestras independientes para determinar la significación estadística entre sexos (IBM SPSS Statistics versión 21).

### 3.8. Operacionalización de las variables

| Variable                                                  | Tipo                           | Operacionalización                                     |                                                                                                                                  | Indicador                         |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|                                                           |                                | Categoría                                              | Descripción                                                                                                                      |                                   |
| Sexo                                                      | Cualitativa nominal dicotómica | Masculino<br>Femenino                                  | Según sexo biológico                                                                                                             | Frecuencias absolutas y relativas |
| Diagnóstico de <i>M. hominis</i>                          | Cualitativa nominal            | - Si<br>- No                                           | Según muestras en las que se detecte la presencia de <i>M. hominis</i>                                                           | Frecuencias absolutas y relativas |
| Tipo de muestra                                           | Cualitativa nominal            | - Exudado endocervical<br>- Exudado uretral<br>- Orina | Porción o volumen de cualquier material, que se obtenga del paciente. Esto en dependencia del lugar anatómico donde se recolecte | Frecuencias absolutas y relativas |
| Categorías clínicas de pruebas de susceptibilidad         | Cualitativa ordinal            | -Sensible(S)<br>-Resistente(R)                         | Según la respuesta in vitro del microorganismo a uno o varios antimicrobianos, como factor predictivo de eficacia clínica.       | Frecuencias absolutas y relativas |
| Aislados resistentes a Tetraciclina con gen <i>tet(M)</i> | Cualitativa nominal            | -Si<br>-No                                             | Según aislados en los que se detecte el gen <i>tet(M)</i>                                                                        | Frecuencias absolutas y relativas |

### **3.9. Consideraciones éticas**

El protocolo de la investigación se evaluó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y por el Comité de Ética de la Investigación del IPK. La investigación se realizó en el LNR-M del IPK. La confidencialidad de los resultados quedó en manos de estos cargos. No se reveló la identidad de los pacientes involucrados en el estudio. La información recopilada, por el equipo que participa en la investigación, fue protegida y se utilizó para fines investigativos.

No hubo interrupciones del estudio por concepto de no disponibilidad de recursos.

Una vez finalizado el trabajo experimental se elaboró un informe final con la discusión de los resultados, los cuales se presentan y publican de forma conjunta entre los investigadores participantes. Igualmente, los resultados forman parte del informe del proyecto sectorial asociado a programa del MINSAP del que forma parte "Caracterización clínica, epidemiológica y microbiológica de Infecciones de Transmisión Sexual en poblaciones clave en Cuba (2021-2023) ", Código: 2105007, fue revisado previamente por Comisión Científica Especializada de Microbiología y aprobado por el Comité de Ética Institucional.

Para el trabajo en el laboratorio se tuvieron en cuenta los procedimientos establecidos según los Protocolos Normalizados Operacionales del LNR-M del IPK. Se utilizó un gabinete de bioseguridad clase II según establece la resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA).

### **3.10. Limitaciones del estudio**

En el desarrollo de la investigación se presentaron las siguientes limitaciones:

- Las muestras analizadas provenían de exudado endocervical, exudado uretral y orina. No incluyéndose otros tipos de muestras como las de semen, espermocultivo y orina post semen lo que permitiría generalizar los resultados a la mayoría de muestras urogenitales.
- El tamaño o cantidad de aislados obtenidos, lo que influye en la comparación con estudios previos realizados y además que las pruebas estadísticas normalmente

requieren un tamaño de muestra lo suficientemente grande como para asegurar que es representativa.

- La fidelidad y veracidad de los datos, por tratarse de un trabajo con un componente subjetivo muy importante. En este caso se limita el estudio por la poca información en los datos que deben reflejarse en los modelos de las acompañan las muestras. Los que reflejan edad; antecedentes clínicos; diagnostico presuntivo, si procede y especificar si la persona ha recibido tratamiento médico y con qué fármaco.
- Pocos trabajos de investigación anteriores a citar, en este caso de estudios realizados en los se utilizan los métodos convencionales de referencia para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiano de *M. hominis*, y el estudio de este microorganismo como patógeno oportunista; pues la base de la revisión de la literatura ayuda a comprender el problema de investigación que se está encarando.

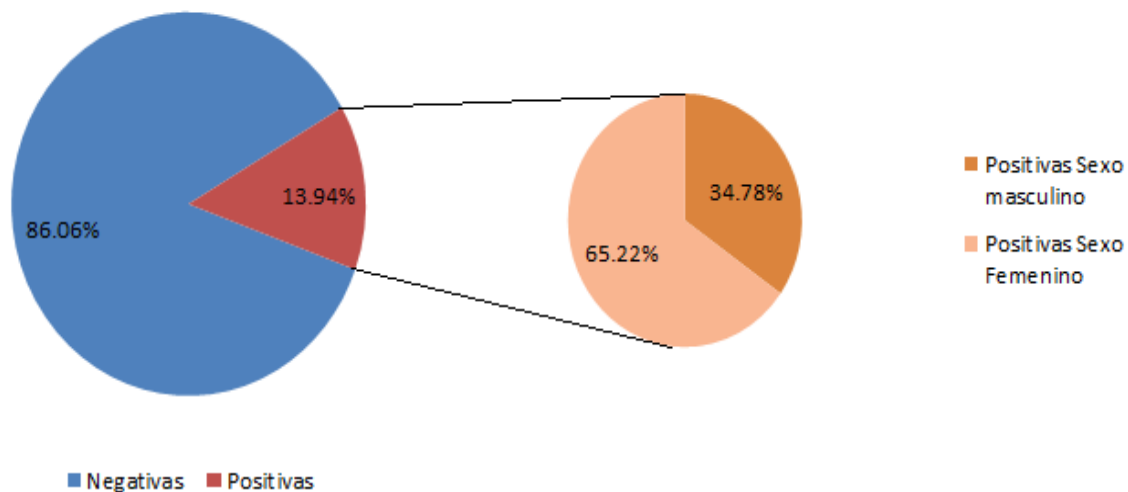
#### **IV. RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis* a partir de muestras clínicas mediante la PCR en tiempo real.

De los pacientes estudiados, el 46.1% (76/165) provenían de hombres con uretritis inespecífica, y el 53.94 % (89/165) de mujeres con antecedentes de infertilidad, abortos espontáneos, leucorrea y cervicitis.

El estudio de las 165 muestras clínicas a través del método de PCR en Tiempo Real permitió demostrar un 13.94 % (23/165) de positividad a *M. hominis*. Del total de muestras positivas el 34,78 % (8/23) provenían de pacientes masculinos y el 65,22 % (15/23) de pacientes femeninos (Figura 4.1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de positividad a *M. hominis* entre los grupos de pacientes según el sexo ( $p=0.345$ ).

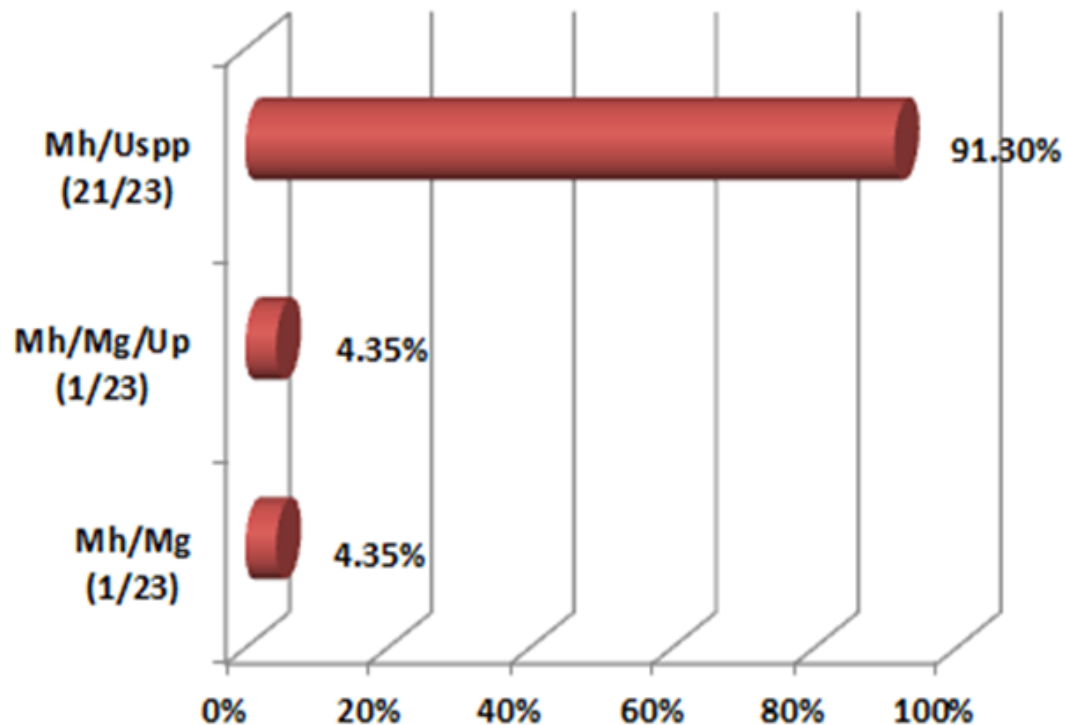


**Figura 4.1.** Frecuencia de positividad de *Mycoplasma hominis* en muestras clínicas de pacientes con infección urogenital. LNR-M, enero 2020 - septiembre 2021.

A partir de las muestras de orina se revelaron un número mayor de muestras positivas (78,3 %; 18/23), correspondiendo 3 muestras a pacientes masculinos y 15 muestras a féminas. Las cinco muestras positivas restantes se correspondieron con exudados

uretrales, representando un 21,7 % (5/23). De todos los especímenes colectados solo dos corresponden al mismo paciente.

De las muestras positivas a *M. hominis* el 91,3 % (21/23) mostró coinfección con *Ureaplasma* spp.; de ellas el 65,22 % (15/23) mostró coinfección con *Ureaplasma parvum*, el 17,39 % (4/23) con *U. urealyticum*, mientras que el 8,70 % (2/23) mostró coinfección con ambas especies de *Ureaplasma*. Además, el 4,35 % (1/23) de las muestras positivas a *M. hominis* reveló coinfección con *M. genitalium*, y el 4,35 % (1/23) con *M. genitalium* y *U. parvum*. Ninguna de las muestras analizadas fue positiva solamente a *M. hominis* (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Especies de micoplasmas identificadas en las muestras clínicas positivas a *Mycoplasma hominis*. LNR-M, enero 2020- septiembre 2021.

## 4.2. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos de *M. hominis*

### 4.2.1. Recuperación de aislados de *Mycoplasma hominis* mediante el cultivo bacteriológico

A partir de las 23 muestras clínicas positivas a *M. hominis* se lograron recuperar por cultivo ocho aislados. Cuatro de estos aislados se recuperaron a partir de muestras de orina y cuatro a partir de muestras de exudado uretral.

### 4.2.2. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de aislados de *Mycoplasma hominis*.

A través del método de microdilución en caldo para la determinación de la CMI de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento, se demostraron siete aislados resistentes entre los 8 estudiados (87,5 %). De ellos cinco aislados fueron resistentes a tetraciclina y clindamicina, mientras que un aislado fue resistente solamente a tetraciclina y uno resistente solamente a clindamicina. Todos los aislados fueron sensibles a la levofloxacin (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Aislados de *M. hominis* resistentes a antimicrobianos, LNR-M, enero 2020 - septiembre 2021

| No aislado (año) | Muestra de Procedencia | Resistencia demostrada      |
|------------------|------------------------|-----------------------------|
| 27 (2021)        | Orina                  | Clindamicina y Tetraciclina |
| 29 (2021)        | Orina                  | Clindamicina y Tetraciclina |
| 70 (2021)        | Exudado Uretral        | Tetraciclina                |
| 85 (2021)        | Exudado Uretral        | Clindamicina                |
| 86 (2021)        | Orina                  | Clindamicina y Tetraciclina |
| 97 (2021)        | Exudado Uretral        | ---                         |
| 102 (2021)       | Exudado Uretral        | Clindamicina y Tetraciclina |
| 70 (2020)        | Orina                  | Clindamicina y Tetraciclina |

#### **4.3. Detección del gen *tet(M)* en aislados clínicos de *M. hominis*.**

Se confirmó la resistencia a tetraciclina de los seis aislados de *M. hominis* que se revelaron resistentes por el método de microdilución en caldo, a través de la detección del gen *tet(M)* mediante la RT-PCR. Asimismo, se detectó dicho gen en dos de los aislados informados previamente como sensibles a través de la determinación de la CMI. No obstante, este hallazgo no modificó el informe de ambos aislados como sensibles a tetraciclina.

## **V. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

Durante la última década *M. hominis* se reafirma como un patógeno comensal en la superficie de las mucosas del cérvix y la vagina de las mujeres, con una tasa de colonización entre 20 % y 30 % (Moridi y cols., 2020). Su papel en las infecciones del tracto urogenital todavía es controversial, diversos estudios han propuesto que es patogénico y se asocia a vaginosis bacteriana, enfermedad pélvica inflamatoria, corioamnionitis, endometritis, parto pretérmino, abortos espontáneos e infertilidad (Waites y cols., 2009; Rodríguez y cols., 2013; Rodríguez y cols. 2019; Veiga y cols., 2019; Isaac y cols., 2021).

En el presente estudio la frecuencia de *M. hominis* (13,94 %) que se obtiene a partir del estudio de muestras clínicas de pacientes con infección urogenital coincide con lo que reportan otros autores. Kouegnigan y colaboradores en 2015, en Gabón, reportan 15.87 % de muestras clínicas positivas a *M. hominis*, que incluyen semen, orina, exudado uretral y vaginal, provenientes de pacientes de ambos sexos con sospecha de infección urogenital, y que fueron analizadas mediante el estuche comercial *Mycoplasma* IST 2 (Kouegnigan y cols., 2015). Resultados similares se informan en España en 2019 en un estudio en pacientes masculinos con diagnóstico presuntivo de infección genital que son atendidos en consulta especializada de infertilidad. En dicho estudio se analizan muestras de semen, orina postsemen y exudados uretrales mediante el estuche diagnóstico *Mycoplasma* IST 2 y un PCR múltiple, reportándose un 10,64 % de positividad (Foronda y cols., 2019).

Por otro lado, Robles y colaboradores en México en 2021 realizan un estudio en pacientes con infertilidad donde se examinan muestras clínicas de exudado vaginal y esperma de 172 parejas, y reportan una prevalencia de positividad a *M. hominis* de 34.9 % en los hombres y 15.1% en las mujeres (Robles y cols., 2021). Rodríguez y colaboradores en Cuba, en 2019 analizan muestras de mujeres atendidas en consulta de infertilidad, utilizando el estuche comercial Myco Well D-One y reportan 14,8 % (26/175) de infección por *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* (Rodríguez y cols., 2019). Rodríguez y colaboradores en el año 2007, en el país, refieren un 18,5 % de muestras positivas a *M. hominis* en muestras de exudado uretral que provienen de pacientes del sexo masculino con UNG. El método que emplean es una PCR-Múltiple (Rodríguez y cols., 2007).

Otros autores refieren porcentos de positividad a *M. hominis* inferiores a los que se obtiene en el presente trabajo. Por ejemplo, García y colaboradores en México en 2017 en un estudio realizado en pacientes con manifestaciones y patologías genitourinarias que se remiten de la consulta de Ginecología y Urología y en pacientes asintomáticos, reportan 1,9 % (1/54) de hombres y 5.54 % (5/93) de mujeres con infección por *M. hominis*, que se detecta a partir del estudio de muestras clínicas de exudado uretral y endocervical mediante PCR múltiple en tiempo real (García y cols., 2017). Por su parte, Arnold y Domínguez en Cuba en 2015 refieren un 2 % (1/66) de casos positivos con infección por *M. hominis*, al analizar muestras de exudado endocervical de mujeres que asisten a consulta de Infertilidad (Arnold y Domínguez, 2015). Rodríguez y colaboradores en Cuba en el año 2013 reportan 1,4 % (2/140) de muestras positivas a *M. hominis* a partir del estudio de muestras de semen de hombres que asistían a consulta de infertilidad (Rodríguez y cols., 2013). En ambos estudios se utiliza el estuche diagnóstico *Mycoplasma* System Plus.

Existe una gran variedad en la frecuencia de infección por *M. hominis* informada en las diferentes regiones del mundo e incluso dentro de un mismo país. Esta se asocia a diversos factores, que incluyen los antecedentes de enfermedades de los individuos estudiados, las muestras clínicas analizadas, así como los métodos microbiológicos empleados para el diagnóstico de esta especie. Debe destacarse el amplio uso que hacen los laboratorios a nivel internacional de diferentes estuches comerciales, que no siempre conducen a resultados precisos contra los métodos convencionales y moleculares (Beeton y Spiller, 2016).

En el presente estudio todas las muestras positivas a *M. hominis* muestran coinfección con otras especies de micoplasmas, en su mayoría con *Ureaplasma spp.* Este comportamiento se corresponde de manera general con lo descrito por otros autores. Redelinghuys y colaboradores en un estudio en mujeres embarazadas a partir de muestras de exudados vaginales, se identifica un 39,7 % (29/73) de muestras positivas a *M. hominis*, todas coinfectadas con *Ureaplasma spp.*, a través del empleo del estuche comercial Mycofast Revolution y un método de PCR múltiple (Redelinghuys y cols., 2014). Por su parte, Paira y colaboradores en Sudáfrica en 2021 realizan un estudio en hombres y mujeres con antecedentes de infecciones urogenitales asintomáticos y un grupo control, al analizar

muestras de exudado endocervical y semen informan 91 % de pacientes femeninas positivas a *M. hominis* y *Ureaplasma spp*, mientras que en los pacientes masculinos se detecta un 92,7 % de coinfección con ambas especies (Paira y cols., 2021).

Porcientos inferiores describen Lee y Yang en Corea del Sur, al estudiar pacientes del sexo femenino con síntomas de infección genitourinaria, en el que analizan muestras de exudado endocervical y detectan un 7.4 % de coinfección con *M. hominis* y *Ureaplasma spp*. (Lee y Yang, 2020). En Cuba, Ramírez y coautores llevan a cabo un estudio con mujeres que asisten a consultas de infertilidad y reportan un 4,7 % (2/43) de coinfección de *Ureaplasmas spp*. y *M. hominis* mediante el estuche comercial MYCO WELL D-ONE (Ramírez y cols., 2018).

Por otra parte, se describe con menor frecuencia la coinfección de *M. hominis* y *M. genitalium* en muestras clínicas de pacientes con infecciones urogenitales. En el presente estudio se identifica un 4,35 % de coinfección por estas especies de micoplasmas. Resultados similares reportan Campos y colaboradores en 2015 en Brasil al investigar mujeres con síntomas de infección urogenital y asintomáticas, donde se detecta un 4,97 % de coinfección a partir del análisis de muestras de exudados vaginales mediante un método de PCR cuantitativo (Campos y cols., 2015). Oh y colaboradores en Corea del Sur en el año 2021 reportan 2,82 % de coinfección de *M. hominis* y *M. genitalium* en diversas muestras de pacientes femeninos y masculinos ingresados en hospitales, y que se diagnostican mediante un método PCR en tiempo real (Oh y cols., 2021).

El tratamiento de las infecciones causadas por *M. hominis* está limitado al uso de tetraciclinas, clindamicina y fluoroquinolonas. La resistencia a estos grupos de antimicrobianos se documenta para aislados clínicos de *M. hominis* en diferentes regiones del mundo y se considera una resistencia adquirida fundamentalmente como consecuencia de mutaciones cromosomales (Beeton y cols., 2009; Meygret y cols., 2018). Los estudios precedentes en el país notifican porcentajes elevados de resistencia antimicrobiana en muestras informadas como positivas para *M. hominis*, pero en ellos solo se emplean sistemas diagnóstico comerciales y no se realiza la confirmación mediante métodos de referencia ni moleculares (Sanchen y cols., 2013; Arnold y cols., 2015; Ramírez y cols., 2018). De manera similar, la mayoría de los estudios que se realizan a

nivel internacional que reportan tasas de prevalencia de resistencia antimicrobiana para esta especie de micoplasmas se basa en el empleo de diferentes estuches diagnósticos comerciales (He y cols., 2016; Zheng y cols., 2021; Paira y cols., 2021). Solo se refieren cinco estudios en la literatura donde se utilizan los métodos de referencia para la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados clínicos de *M. hominis*.

La resistencia a tetraciclina (75 %, 5/7) que se reporta en el presente estudio es superior a lo que se describe a nivel internacional. Boujemaa y colaboradores en Túnez demuestran un 33,9 % de resistencia a tetraciclina al estudiar aislados clínicos de muestras de pacientes de ambos sexos con síntomas de infección urogenital o infertilidad (Boujemaa y cols., 2020). Resultados similares describen Férandon y coautores en un estudio realizado en Francia al analizar aislados clínicos de *M. hominis* obtenidos a partir de muestras colectadas de pacientes con infecciones urogenitales y extragenitales, describiendo un 39,5 % de resistencia a tetraciclina, y 1,2 % de resistencia a tetraciclina y ofloxacina (Férandon y cols., 2013). Mardassi y colaboradores en Túnez en el 2012 describen un 25 % de resistencia a tetraciclina en aislados clínicos de *M. hominis* obtenidos de muestras vaginales, cervicales y uretrales de pacientes con infecciones de transmisión sexual, complicaciones asociadas al embarazo, antecedentes de infertilidad y uretritis (Mardassi y cols., 2012).

Porcentos inferiores describen Meygret y colaboradores en Francia, quienes reportan un 14,8 % de resistencia a tetraciclina al analizar aislados de *M. hominis* obtenidos a partir de diversas muestras clínicas del tracto urogenital y respiratorio y de otros fluidos, recibidas en un hospital universitario para el diagnóstico de micoplasmas (Meygret y cols., 2018). Por su parte Chalker y colaboradores en Reino Unido, reporta un 14,8 % de resistencia a tetraciclina a partir del estudio de aislados clínicos de *M. hominis* obtenidos a partir de muestras de líquido cerebro-espinal, peritoneal y líquido pleural de pacientes con infecciones invasivas (Chalker y cols., 2021). Por otro lado, un estudio que se realiza en Estados Unidos en diez aislados clínicos obtenidos de muestras de orina de pacientes femeninas con infección del tracto genitourinario, no se detecta resistencia a tetraciclina (Valentine-King y Brown, 2017).

En el presente estudio se identifica cinco aislados resistentes a clindamicina (75 %, 5/7) del total de aislados analizados. Solo dos estudios en Estados Unidos y Reino Unido incluyen el análisis de este antimicrobiano en el estudio de aislados clínicos de *M. hominis*, coincidiendo ambos en no demostrar resistencia a este fármaco. (Valentine-King y Brown, 2017; Chalker y cols., 2021). Esta variación global en las tasas de resistencia a tetraciclina y clindamicina podría obedecer a las diferencias en las prácticas clínicas y políticas de tratamiento en cada país o región. En Cuba país la tetraciclina se utiliza en el tratamiento del síndrome de dolor abdominal bajo y de la sífilis en pacientes alérgicos a la penicilina, y además se utiliza como una opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones por clamidia, el síndrome de secreción uretral y el síndrome de flujo vaginal. Por su parte la clindamicina se usa también como opción para el tratamiento del síndrome de dolor abdominal bajo (Dirección de medicamentos y tecnologías médicas del Minsap, 2018).

En el caso de la levofloxacina, el 100 % de susceptibilidad que se informa en el presente estudio coincide con lo que reporta un estudio en Estados Unidos, en 2017 y otro estudio en Túnez, en 2020 (Valentine-King y cols., 2017; Boujemaa y cols., 2020). De forma general son bajos los porcentos de resistencia que se describen para este antimicrobiano, tal como refieren Meygret y colaboradores en una investigación que reporta un 3,3 % de resistencia, y Chalker y colaboradores, informan un 2,1 % de resistencia a esta droga (Meygret y cols., 2018; Chalker y cols., 2021). En Cuba, el uso de la levofloxacina está restringida al nivel hospitalario, lo que puede influir en los resultados del presente estudio (Dirección de medicamentos y tecnologías médicas del Minsap, 2018). ).

La resistencia a tetraciclina en *M. hominis* se reconoce que está mediada por el gen *tet(M)*, que se localiza en el transposón conjugativo Tn916 y constituye el único determinante de resistencia a antibióticos adquirido de forma natural que se describe en micoplasmas humanos. Este gen codifica para la síntesis de la proteína Tet(M) que confiere protección al ribosoma ante la acción de las tetraciclinas (Chopra y Roberts, 2001; Bébéar y Kempf, 2005; Dégrange y cols., 2008).

En el presente estudio se confirma la resistencia a tetraciclina en los aislados demostrados como resistentes mediante el método de microdilución en caldo, al corroborar la presencia del gen *tet(M)*. Varios estudios confirman la presencia de este gen como el mecanismo responsable de la resistencia a tetraciclina en los aislados clínicos de *M. hominis*

(Dégrange y cols., 2008; Meygret y cols., 2018; Boujemaa y cols., 2020, Chalker y cols., 2021).

El hecho que se detectara el gen *tet(M)* también en dos aislados sensibles a tetraciclina se corresponde con lo documentado por Dégrange y colaboradores en 2008, quienes refieren que esto obedece a algunas variantes del gen *tet(M)* que pueden rendir fenotipos de resistencia inducible en presencia de bajos niveles de tetraciclina. Atendiendo a ello, cuando se examina la resistencia a tetraciclina puede ser necesario el análisis tanto por microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad fenotípica, como a través de la detección del gen *tet(M)* (Dégrange y cols., 2008).

Se demuestra la presencia de clones resistentes asociado con la resistencia a tetraciclina, lo que puede contribuir a la investigación de nuevos biomarcadores genéticos para la predicción de la resistencia antimicrobiana en aislados de *M. hominis*. Esto podría impactar en el control de la resistencia y el monitoreo de las enfermedades causadas por esta bacteria (Boujemaa y cols., 2020).

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ La frecuencia baja de *Mycoplasma hominis* y su concomitancia con otras especies de micoplasmas en muestras de pacientes con infecciones urogenitales, estudiadas en el LNR-M del IPK, refuerza la hipótesis acerca de su papel como patógeno oportunista también en el contexto cubano.
- ✓ La detección de resistencia a tetraciclina y clindamicina en aislados clínicos de *Mycoplasma hominis*, aunque en un número limitado, sugiere que estos antimicrobianos podrían resultar no útiles para el tratamiento de las infecciones que producen. En cambio, la sensibilidad demostrada a levofloxacin ratifica la vigencia de su indicación para este propósito.
- ✓ La demostración del gen *tet(M)* tanto en los aislados de *Mycoplasma hominis* resistentes como sensibles a tetraciclina ratifica desaconsejar su uso en el tratamiento, teniendo en cuenta que los aislados con fenotipos sensibles pueden desarrollar resistencia ante concentraciones sub-inhibitorias del antimicrobiano.

## **VII. RECOMENDACIONES**

## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Incrementar el número de muestras de pacientes con síndromes urogenitales para dilucidar el posible papel patogénico de *M. hominis* y su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de elección para el tratamiento.
- ✓ Confirmar los resultados obtenidos de resistencia a clindamicina mediante estudios moleculares que permitan demostrar los mecanismos de resistencia implicados.

## **VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed J, Rawre J, Dhawan N, Khanna N, Dhawan B. *Mycoplasma hominis*: An under recognized pathogen. Indian J Med Microbiol 2021;39(1):88-97.
- Ansari NS, Asztalos E, Rolnitsky A. *Mycoplasma hominis* meningitis in an extremely preterm newborn: a case report. BMC Pediatrics 2021;21:69.
- Arnold M, Domínguez AR. Micoplasmas urogenitales como causa de infertilidad femenina. Rev Cubana Obstet Ginecol 2015;41(3):285-296.
- Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S and Christiansen G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. BMC Microbiol 2004;4:35.
- Bär AK, Phukan N, Pinheiro J, Simoes-Barbosa A. La interacción de la microbiota del huésped y los protozoos parásitos en las interfaces mucosas: implicaciones para los resultados de infecciones y enfermedades. PLoS Negl Trop Dis 2015;9(12).
- Bébéar CM, Kempf I. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. En: Blanchard A, Browning GF, editores. *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience. UK: Wymondham; 2005:535-569. ISBN: 0-8493-9861.
- Bébéar, C. *Mycoplasma, Ureaplasma*. En: Courvalin, P., Leclercq, R., Rice, L.B. (eds.). Antibiotogram. Portland, ESKA publishing, ASM Press.2010:519-529
- Beeton ML, Chalker VJ, Maxwell NC, Kotecha S, Spiller OB. Concurrent titration and determination of antibiotic resistance in *Ureaplasma* species with identification of novel point mutations in genes associated with resistance. Antimicrob Agents Chemother 2009;53 (5):2020–2027.
- Beeton ML, Spiller OB. Antibiotic resistance among *Ureaplasma spp.* isolates: cause for concern? J Antimicrob Chemother 2016;72:330-337.
- Bergin SM, Mendis SM, Young B, Izharuddin EB. Postoperative *Mycoplasma hominis* brain abscess: keep it in mind! BMJ Case Rep 2017. doi: 10.1136/bcr-2016-218022.
- Boujemaa S, Ben Allaya A, Mlik B, Mardassi H, Abdelmoumen B. Phylogenetics of *Mycoplasma hominis* clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme. Scientific Reports 2018;8:14854. doi:10.1038/s41598-018-33260-x.
- Boujemaa S, Mlik B, Mardassi H, Abdelmoumen Mardassi BB. Clonal spread of Tetracycline resistance among *Mycoplasma hominis* clinical strains, Tunisia. Infect Drug Resist 2020;13:2093-2097.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Micoplasmas y bacterias con pared celular defectuosa. En: Jawetz, E., Melnick JL, Adelberg EA, editores. Microbiología Médica. Edn 16. México, DF: Manual Modern; 2007:369-73.
- Campos GB, Lobão TN, Selis NN, Amorim AT, Martins HB, Barbosa MS, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of brazilian women. BMC Infectious Diseases 2015;15:60. doi 10.1186/s12879-015-0792-4.

- Cercenado E, Canton R.(editores) Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasmas spp.* y *Ureaplasma spp.* Capítulo 40. España. Seimc. 2011. Disponible en <https://www.seimc.org>.
- Combaz Söhnchen N, Kuhn AA. Systematic Review of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in Urogynaecology. Geburtshilfe Frauenheilkd 2017; 77 (12): 1299-1303.
- Chalker VJ, Sharratt MG, Rees CL, Bell OH, Portal E, Sands K, Payne MS, Jones LC, Spiller OB. 2021. Tetracycline resistance mediated by tet(M) has variable integrative conjugative element composition in *Mycoplasma hominis* strains isolated in the United Kingdom from 2005 to 2015. Antimicrob Agents Chemother 2021;65:e02513-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02513-20>.
- Citti C, Nouvel LX, Baranowski E. Phase and antigenic variation in *Mycoplasmas*. Future Microbiol 2010;5:1073-1085.
- CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human *Mycoplasmas*; Approved Guidelines. CLSI Document M-43A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2011.
- Dégrange S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Tetracycline resistance in *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*: Prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two tet(M) positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(2):742–744.
- Díaz García FJ, Herrera Mendoza AP, Giono Cerezo S, Guerra Infante F. *Mycoplasmas hominis* attaches to and locates intracellularly on human spermatozoa. Hum Reprod 2006;21:1591-98.
- Díaz L, Cabrera LE, Fernández T, Ibáñez I, Torres Y, Obregón Y, Rivero Y. Frequency and antimicrobial sensitivity of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in patients with vaginal discharge. Lessons from the Field. MEDICC Review 2013;15(4):45-47.
- Dirección de medicamentos y tecnologías médicas del Minsap. Cuadro básico de medicamentos y productos naturales. 2018. Disponible en <https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/vigilancia/farmacov/>
- Dixit A, Alexandrescu S, Boyer D, Graf EH, Vargas SO, Silverman M. *Mycoplasma hominis* empyema in an 18-year-old stem cell and lung transplant recipient: Case report and review of the literature. J Pediatric Infect Dis Soc. 2017; 6(4):173-716.
- D'Inzeo T, De Angelis G, Fior B, Menchinelli G, Liotti FM, Morandotti GA., et al. Comparison of Mycoplasma IES, Mycofast Revolution and Mycoplasma IST2 to detect genital *Mycoplasmas* in clinical samples. J Infect Dev Ctries 2017;11(1):98-101.
- Doroftei B, Ilie O, Armeanu T, Anton E, Scripcan I, Moftei R. The prevalence of *Ureaplasma Urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in infertility persons in the Northeast region of Romania. Medicina 2021;57:211.
- Fagundo Sierra R, Sánchez Saíenz A, Pérez Jáuregui J. Resistencia in vitro de aislamientos clínicos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en México. Bioquímica 2006;31(4):124-131.

- Farmacopea Europea 8.0. *Mycoplasmas*. Appendix 2.6.7. 2008; p: 3317-31.
- Férandon C, Peuchant O, Janis C, Benard A, Renaudin H, Pereyre S, *et al*. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. Clin Microbiol Infect 2011;17:155–159.
- Férandon C, Peuchant O, Renaudin H, Bébéar C. Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple locus variable-number tandem repeat analysis. BMC Microbiology 2013;13:120.
- Fernández Molina C, Zamora Martínez Y, Rodríguez Preval N, Rodríguez González I, Berdasquera Corcho D, Ortega González LM. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con Vaginosis Bacteriana. Rev Cubana Med Trop 2007;59(2):108-12.
- Fichorova R, Fraga J, Rappelli P, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonas*, virus and *Mycoplasma*. Res Microbiol 2017;168(9-10):882-891.
- Fiori PL, Díaz N, Cocco AR, Rappelli P, Dessì D. Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the in vitro proinflammatory response of human monocytes. Sex Transm Infect 2013;89(6):449-54.
- Foronda García-Hidalgo C, Liébana Martos C, Gutiérrez Soto B, Expósito Ruiz M, Navarro Marí JM, Gutiérrez Fernández J. Prevalencia en varones de la población general de agentes productores de infecciones no ulcerativas del aparato genital, asistidos en atención especializada. Rev Esp Quimioter 2019;32(6):545-550.
- Fraga J, Rodríguez N, Fernández C, Mondeja B, Sariago I, Fernández Calienes A, *et al*. *Mycoplasma hominis* in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: association with parasite genetic polymorphism. Exp Parasitol 2012;131(3):393-8.
- Fürnkranz U, Walochnik J, Henrich B. *Mycoplasma hominis* shows strain-dependent increase in resistance to selected antibiotics after symbiosis with *Trichomonas vaginalis*. J Glob Antimicrob Resist 2018;14:169-175.
- Gagneux Brunon A, Grattard F, Morel J, Suy F, Fuzellier JF, Verhoeven P, *et al*. *Mycoplasma hominis*, a rare but true cause of infective endocarditis. J Clin Microbiol. 2015; 53: 3068-71.
- García González I, López Díaz RI, Reyes Canché-Pech J, Ceballos López AA, López Novel ME. Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en pacientes sintomáticos y asintomáticos de Yucatán. Rev Lab Clin 2017;10(3):117-122.
- Gil M. *Mycoplasma hominis*: características, morfología, patogenia [internet]. Lifeder. (20 de octubre de 2018). Disponible en: <https://www.lifeder.com/Mycoplasma-hominis>.
- Goret J, Le Roy C, Touati A, Mesureur J, Renaudin H, Claverol S, *et al*. Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells. Future Microbiol 2016;11:179-194.
- Goret J, Béven L, Faustin B, Contin Bordes C, Le Roy C, Claverol S, *et al*. Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with human dendritic cells: interleukin-23- inducing

- mycoplasmal lipoproteins and inflammasome activation of the cell. *J Bacteriol* 2017;199(15):213-217.
- He M, Xie Y, Zhang R, Gao S, Xu G, Zhang L, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Mycoplasmas* and *Chlamydiae* in patients with genital tract infections in Shanghai, China. *J Infect Chemoter* 2016;22:548-552.
- Hum RM, Iftikhar H, Tang E, Ho P. Septic arthritis caused by *Mycoplasma hominis* in a patient with systemic lupus erythematosus. *BMJ Case Rep.* 2022; 15 (1).
- Isaac Echezarreta Y, Zayas Illas A, Marrero Delgado C, Escobar Yéndez NV, Mariño Castellanos MC. Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas urogenitales en pacientes con cervicitis y enfermedad inflamatoria pélvica. *Acta Médica* 2021;22(2):135.
- Kouegnigan Rerambiah L, Ndong JC, Medzegue S, Elisee Ndam M, Djoba Siawaya JF. Genital *Mycoplasma* infections and their resistance phenotypes in an african setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:1087–1090.
- Kokkayil P, Dhawan B. *Ureaplasma*: Current perspectives. *Indian J Med Microbiol* 2015;33:205-214.
- Kühner S, Van Noort V, Betts MJ, Leo-Macias A, Batisse C, Rode M, *et al.* Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* 2009;326(5957):1235-40.
- Lee JY, Yang JS. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in nonpregnant female patients in South Korea indicate an increasing trend of pristinamycin resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64(10).
- Leli C, Mencacc A, Agnese Latino M, Clerici P, Rassu M, Perito S, *et al.* Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect* 2018;51:220-225.
- Lluch M. Estudio de la expresión genética y división celular de *Mycoplasma genitalium*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2010. Disponible en <https://www.tdx.cat>.
- López Ávila KB, Zavala Castro J, Arias-León JJ, Puerto FI, Dzúl-Rosado KR. Infertilidad humana causada por *Mycoplasma spp.* *Rev Biomed* 2014;25:74-90.
- López Pérez M, Palma Mora S, García Gómez D. Infecciones cervicovaginales en pacientes sintomáticas atendidas en la Consulta externa de Ginecología. *Acta Médica del Centro* 2020;14(1):53-59.
- Machado L, Molinari MA Dos Santos L, De Cordova CM. Performance of four commercial kits for laboratory diagnosis of urogenital, *mollicute* infection. *Can J Microbiol* 2014;60:613-617.

- Margarita V, Fiori PL and Rappelli P. Impact of symbiosis between *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* on vaginal dysbiosis: a mini review. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:179.
- Meygret A, Le Roy C, Renaudin H, Bébéar C, Pereyre S. Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:2696–2703.
- Mondeja B, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez N, Martínez R, Mederos L. Aislamiento de *Mycoplasma spp.* a partir de pacientes cubanos VIH-positivos con síntomas respiratorios. *Rev Cubana Med Trop* 2013;65(3):381-387.
- Moridi K, Hemmaty M, Azimian A, Fallah MH, Abyaneh HK, Ghazvini K. Epidemiology of genital infections caused by *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in Iran; a systematic review and meta-analysis study. *BMC Public Health* 2020;20:1020.
- Morris D, Jones L, Davies R, Sands, K, Portal, E, Spiller O. MYCOWELL D-ONE detection of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* in sexual health patients in Wales. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis* 2020;39:2427–2440.
- Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL, *et al.* A cluster analysis of bacterial vaginosis associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am J Epidemiol* 2005;162(6):585-90.
- Oh EJ, Jang TS, Kim JK. *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* infection in South Korea during 2018-2020. *Iran J Microbiol* 2021;13(5):602-607.
- Okumura Y, Kajihara T, Koba Y, Onodera M, Hara T, Tahara H, *et al.* Multiple intraabdominal abscesses caused by *Mycoplasma hominis* infection following simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Ann Lab Med* 2018;38(4):381-383.
- Païra DA, Molina G, Tissera AD, Olivera C, Molina RI, Motrich RD. Results from a large cross-sectional study assessing *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* urogenital infections in patients with primary infertility. *Sci Rep* 2021;11(1).
- Pailhoriès H, Rabier V, Eveillard M, Mahaza C, Joly Guillou ML, Chennebault JM, *et al.* A case report of *Mycoplasma hominis* brain abscess identified by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Infect Dis* 2014;29:166–168.
- Pereyre S, Gonzalez P, Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, *et al.* Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to Macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(10):3142-3150.
- Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:753–756.
- Pereyre S, Sirand Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barre A, *et al.* Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with

- other human urogenital *Mycoplasmas*. PLoS genet 2009;5(10): e1000677. doi:10.1371/journal.pgen.1000677.
- Pereyre S, Bébéar C. Infecciones à *Mycoplasma hominis*. Encycl. Méd. Chir, Maladies infectieuses. Elsevier Masson SAS, Paris. 2019.
- Pereyre S, Bébéar C, Bébéar CM. *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* y *Ureaplasma spp*. Antimicrobe 2020. Disponible en <http://www.antimicrobe.org>. [Consultada el 22-10-2021].
- Ponyai K, Mihalik N, Ostorhazi E. Incidence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasmas* in sexually active individuals in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013;32:1423-142.
- Posse T, Prieto M, Cipolla L, Kaufman S. Bacteriemia por *Mycoplasma hominis*: un agente etiológico subestimado. Rev Argent Microbiol 2018;50(1):45-47
- Ramírez Salinas Y, Zayas Illas A, Mesa Castellanos I, Rodríguez Rodríguez L, Ramos Casero MN, Bell Brook Y. Infección por *Mycoplasmas* en mujeres infértiles. Rev Cuba de Obstet 2018;44(4).
- Redelinghuys MJ, Ehlers ME, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Comparison of the new Mycofast revolution assay with a molecular assay for the detection of genital *Mycoplasmas* from clinical specimens. BMC Infect Dis 2013;13:453.
- Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. BMC Infect Dis 2014;14:171.
- Robles Menchero MJ, Sánchez Aranda A, Alonso de Mendieta M, Carballo Mondragón E, Molina López JF, Kably Am A. Prevalencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en parejas con infertilidad en protocolo para fertilización in vitro. Ginecol Obstet Mex 2021;89(3):204-211.
- Rodríguez Pendás BV, Ortiz Rodríguez C, Santana Pérez F, Domínguez Alonso E, Nurquez Guerra B. *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y bacterias aeróbicas en el semen de hombres que consultan por infertilidad. Rev Cuba Endocrinol 2013;24(1):47-56.
- Rodríguez Pendás BV, Reyes Rodríguez H, Vázquez Niebla JC, Cabrera Gámez M, González Hernández O, Menéndez Castillo AM. *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma spp*. en mujeres que consultan por infertilidad. Rev Cuba Endocrinol 2019;30(3):211.
- Rodríguez Preval N, Fernández Molina C, Rodríguez GI, Berdasquera GD y Rivera Tapia J. PCR-múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2007;24 (2):152-56.
- Rodríguez Preval N, Rivera Tapia A, Fernández Molina C, Mondeja Rodríguez B, Echevarría Pérez E, Verdasquera Corcho D. Detection of urogenital *Mycoplasmas* in cuban women with infertility antecedents. J Pure Appl Micribio 2014;8:171-175.

- Sanchén Casas A, Rodríguez Fernández OM, Torres Frómeta LD, Pérez Hechavarría LM. Hallazgos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma Urealyticum* en mujeres con infecciones urogenitales. Rev. AMC 2013;17(3):239-251.
- Sharratt M, Sands K, Portal EA, Boostrom I, Mondeja BA, Rodríguez NM *et al.* Defining fluoroquinolone resistance mediating mutations from non-resistance polymorphisms in *Mycoplasma hominis* topoisomerases. Antibiotics 2021;10:1379.
- Sleha R, Bostikova V, Salavee M, Bostik P, Slehova E, Kukla R, *et al.* *Mycoplasma* infections in humans. Review article. Mil Med Sci Lett 2013;82(4):142-148.
- Spiller OB. Emerging pathogenic respiratory *Mycoplasma hominis* infections in lung transplant patients: Time to reassesses its role as a pathogen? EBioMedicine 2017;19:8–9.
- Taylor Robinson D. Diagnosis and antimicrobial treatment of *Mycoplasma genitalium* infection: sobering thoughts. Expert Review Anti Infective Ther 2014; 12(6):715-22.
- Truchetet ME, Beven L, Renaudin H, Douchet I, Férandon C, Charron A *et al.* Potential role of *Mycoplasma hominis* in interleukin (IL)-17-producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. J Infect Dis 2011;204:1796-1805.
- Valentine-King MA, Brown MB. Antibacterial resistance in *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* isolates from urine cultures in college-aged females. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(10).
- Vallely LM, Egli-Gany D, Pomat W. Adverse pregnancy and neonatal outcomes associated with *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum*: a systematic review and meta-analysis protocol. BMJ Open 2018;8:e024175. Published 2018 Nov 28. doi:10.1136/bmjopen-2018-02417.
- Veiga E, Treviño M, Romay AB, Navarro D, Trastoy R, Macia M. Prevalence of genital *Mycoplasma* and response to eradication in patients undergoing assisted reproductive techniques. Rev Esp Quimioter 2019;32(4):327-332.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogen. Clin Microbiol Rev 2005;18(4):757-789.
- Waites KB. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: Hutto C. (eds) Congenital and Perinatal Infections. Infectious Disease. Humana Press. 2006. Disponible en: <https://doi.org/10.1385/1-59259-965-6:271>. [Consultada el 22-10-2021].
- Waites KB. *Mycoplasma* in clinical infectious disease, Schlossberg, D., (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2008: 1145-1159.
- Waites KB, Schelonka RL, Xiao Li, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. Semin Fetal Neonatal Med 2009;14(4):190–199.
- Waites KB, Lysnyansky I, Bébéar CM. Emerging antimicrobial resistance in *Mycoplasmas* of humans and animals. In: *Mollicutes: molecular biology and pathogenesis*. UK: Caister Acad. Press P. 2014: 350.

- Waites KB, Bébéar C. *Mycoplasma*. In: Truant AL (ed). Manual of commercial methods in clinical microbiology, international edition. 2nd Ed. New Jersey: Wiley J. and Sons. 2016:195-213.
- Waites KB, Bébéar C. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. En: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS *et al.* (eds.). Manual of clinical microbiology. 12th edition. Washington DC: ASM Press. 2019.
- Watson L, Pang YM, Mitchell S, Dodgson A. Meningitis por *Mycoplasma hominis* en un recién nacido prematuro de 24 semanas: informe de un caso y breve revisión de la literatura. J Pediatr Pharmacol Ther 2008;13(4):251-254.
- Xiang L, Lu B. Infection due to *Mycoplasma hominis* after left hip replacement: case report and literature review. BMC Infect Dis 2019;9(1):50.
- Xue G, Crabb DM, Xiao L, Liu Y, Waites KB. In Vitro Activities of the benzoquinolizine, fluoroquinolone levonadifloxacin (WCK 771) and other antimicrobial agents against *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* in humans, including isolates with defined resistance mechanisms. Antimicrob Agents Chemother 2018;62(11):e01348-18. doi: 10.1128/AAC.01348-18.
- Zheng W, Zhang W, Cui D, Nie Z, Ding B, Cheng J, *et al.* Examination of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in 4082 Chinese patients. Braz J Med Biol Res 2021;54(2):e10099.
- Zhou M, Wang P, Chen S, Du B, Du J, Wang F, *et al.* Meningitis in a chinese adult patient caused by *Mycoplasma hominis*: a rare infection and literature review. BMC Infect Dis 2016;16(1):557.
- Zotta CM, Gómez D, Lavayén S, Galeano MG. Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. Artículos Originales Ginecología 2017;7:5-8.