

PCR-MÚLTIPLE PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* Y *Ureaplasma urealyticum*

Nadia Rodríguez-Preval^{1a}, Carmen Fernández-Molina^{1b}, Islay Rodríguez G^{1a},
Denis Berdasquera C^{1c}, José Rivera-Tapia^{2d}

RESUMEN

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* son especies relacionadas con enfermedades del tracto genitourinario, y particularmente con la uretritis no gonocócica (UNG) en el hombre. Los cultivos de estos microorganismos resultan complicados, por lo que las técnicas moleculares, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han convertido en el principal método de detección de estos organismos. **Objetivo:** Implementar un método molecular basado en tecnología de genes para el diagnóstico de estas cuatro especies de micoplasmas genitales, aplicándolo en muestras clínicas de pacientes con UNG. **Material y métodos:** Se crearon las condiciones para un PCR-Múltiple para identificar estas especies empleando como muestra ADN de referencia, utilizando los juegos de cebadores complementarios a fragmentos de los genes de la proteína adhesiva de *M. genitalium* (MgPa), ARN ribosomal 16S de *M. hominis*, región espaciadora entre los genes del ARN ribosomal 16S y 23S de *U. parvum*, y de la región espaciadora adyacente al gen de la ureasa y específico para *U. urealyticum*, siendo un método específico y sensible. **Resultados:** Al analizar 34 muestras de exudado uretral, 27 correspondieron a la clase Mollicutes, obteniéndose 14,8% de positividad a *M. genitalium*, 18,5% a *M. hominis*, 11,1% a *U. urealyticum* y 3,7% a *U. parvum*. Con este trabajo se realizó por primera vez el diagnóstico de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en muestras uretrales de pacientes cubanos. **Conclusión:** Se recomienda incluir el diagnóstico de estas especies en un mayor número de pacientes cubanos con síntomas uretrales, para validar el método propuesto y conocer la relación de estos microorganismos con la UNG.

Palabras clave: Infecciones por Micoplasma; Infecciones por Ureaplasma, Reacción en cadena de la polimerasa, Uretritis no gonocócica (fuente: DeCS BIREME).

MÚLTIPLEX-PCR FOR THE DIAGNOSIS OF *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* AND *Ureaplasma urealyticum*

ABSTRACT

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are species related with some pathologies of the urogenital tract, and particularly with non gonococcal urethritis (NGU) in men. The culture of these microorganisms is very difficult, that's why the molecular techniques, mainly the polymerase chain reaction, have become in the main detection method of this organisms. **Objectives:** To improve a molecular method based in technology of genes for the diagnosis of this four genital micoplasma species, applying the same in clinical samples from patients with NGU. **Materials and methods:** The conditions were created for a Multiplex-PCR for identify this species, using as sample reference DNA, the pairs of primer complementary to the adhesion protein gene of *M. genitalium* (MgPa), the rRNA 16S of *M. hominis*, an specific region between rRNA 16S and rRNA 23S genes of *U. parvum*, and the adjacent region to the urease gene specific for *U. urealyticum*, being a specific and sensitive method. **Results:** When analyzing 34 urethral sawbs samples, 27 corresponded to the Mollicutes Class, being 14,8% positive to *M. genitalium*, 18,5% to *M. hominis*, 11,1% to *U. urealyticum* and 3,7% to *U. parvum*. It was realized for fist time the diagnosis of *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* and *U. urealyticum* in urethral samples from Cuban patients. **Conclusion:** It is recommended to include the diagnosis of these species in other Cuban patients with urethral symptoms, to validate the proposed method and to know the relation of these microorganisms with the NGU.

Key words: *Mycoplasma* infections; *Ureaplasma* infections; polymerase chain reaction; Non gonococcal urethritis (source: DeCS BIREME).

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, Cuba.

² Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

^a Microbiólogo; ^b Médico Veterinario; ^c Médico; ^d Biólogo.

INTRODUCCIÓN

Especies de micoplasma y ureaplasma han sido asociadas con diferentes enfermedades del tracto respiratorio y urogenital, tanto en mujeres, hombres y niños. *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* han sido las especies identificadas con mayor frecuencia¹.

Estos microorganismos pertenecientes a la Clase Mollicutes, son considerados extremadamente dificultosas para su multiplicación *in vitro*, tanto por los requerimientos nutricionales para su multiplicación, como por su marcada sensibilidad a cambios de pH, temperatura, presión osmótica, rayos ultravioletas, agentes tensoactivos, anticuerpos y complemento, hecho que dificulta el aislamiento mediante el cultivo bacteriológico^{2,3}.

Por tales razones, las técnicas de biología molecular, y particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), ha sido aplicada para la detección de estas especies en hombres con uretritis no gonocócica (UNG), infección en la que con frecuencia el agente etiológico no es identificado. Esta técnica ha demostrado la asociación entre estas especies y esta enfermedad del tracto urogenital^{4,5}.

En este trabajo se implementó un método molecular basado en tecnología de genes para el diagnóstico de las cuatro especies de micoplasmas genitales, aplicándolo en muestras clínicas de pacientes con UNG.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA DE ADN DE REFERENCIA

Se utilizó ADN de *Mycoplasma genitalium*, cepa R32G (donado por el Dr. Branko Kokotovic del Laboratorio de Micoplasmas del Instituto Danés para Investigaciones

Veterinarias y Alimentos, Copenhagen, Dinamarca). Además, muestras de ADN de *Mycoplasma hominis* cepa ATCC 23114, *Ureaplasma urealyticum* cepa ATCC 27618 y *Ureaplasma parvum* cepa ATCC 2815 (todas de la colección de cepas del Laboratorio de Micoplasma del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba).

JUEGOS DE CEBADORES PARA EL MÉTODO DE PCR-MÚLTIPLE

Se utilizaron los juegos de cebadores MgPaF-MgPaR complementarios a una región del gen de la proteína adhesiva de *M. genitalium* (MgPa), descritos por Jensen *et al.*⁶, el juego de cebadores complementarios a un fragmento de 280 pb del gen del ARN ribosomal 16S de *M. hominis*, y dos juegos de cebadores, uno de ellos complementarios a un fragmento de la región espaciadora entre los genes del ARN ribosomal 16S y 23S de *U. parvum*, y el otro juego complementario a un fragmento de la región espaciadora adyacente al gen de la ureasa y específico para *U. urealyticum*, descrito por Fernández *et al.*⁷ (Tabla 1).

MEZCLA DE REACCIÓN

En un volumen final de 50 µL, la mezcla contenía 37,25 µL de agua bidestilada estéril, 5 µL de tampón NL al 10X, 1,25 µL de cada cebador en una concentración de 10 pmol/µL, 0,25 µL (1,25 U) de *Taq* polimerasa, y 5 µL de ADN de referencia.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador "Mastercycler^R personal" (Eppendorf, Alemania), ajustando las condiciones para la amplificación del ADN de las cepas de referencia, programado a 95 °C por cuatro minutos, seguido de ciclos de 94 °C por 30 segundos, ensayando con tres temperaturas de hibridación diferentes: 55, 57 y 60 °C por 30 segundos

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del ADN.

Especie	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del fragmento
<i>M. genitalium</i>	MgPaF MgPaR	GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC	78 pb.
<i>U. urealyticum</i>	UUS2 UUA2	CAG GAT CAT CAA ATC AAT TCA C CAT AAT GTT CCC CTT CGT CTA	418 pb.
<i>U. parvum</i>	UPS UPSA	CAT CAT TAA ATG TCG GCC CGA ATG G TAG AAT CCG ACC ATA TGA ATT TTT A	812 pb.
<i>M. hominis</i>	MH1 MH2	TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC GTC TGC AAT CAT TTC CTA TTG CAA A	280 pb.

y 72 °C por un minuto, con una extensión final a 72 °C por cinco minutos, evaluándose con 35 y 40 ciclos.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos de ADN amplificados fueron analizados por electroforesis submarina, para lo cual se tomaron 10 µL de cada producto y se añadieron 2 µL de tampón de corrida electroforética (*Loading Buffer* 6X, Promega, E.U.A). Posteriormente, se aplicaron en un gel de agarosa al 4% para ácidos nucleicos (Pharmacia NA, Suecia) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 110 voltios con Tris Borato EDTA (TBE), pH 8, con una duración de una hora. Los resultados de la electroforesis fueron visualizados a través de un transiluminador con luz UV (LKB 2011, Suecia), determinando sus tallas por comparación con marcadores de peso molecular de ADN (DNA Molecular Weight Marker VIII. Roche, Germany).

ENSAYO CON MUESTRAS CLÍNICAS

Se analizaron 34 muestras de exudado uretral, negativas en los exámenes para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, de igual número de pacientes masculinos, que acudieron al Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar "Carlos Juan Finlay", en el período comprendido entre octubre a diciembre de 2005.

EXTRACCIÓN DEL ADN DE LA MUESTRA

La extracción del ADN se realizó según describe Fernández *et al.*⁷. De cada tubo, con la muestra de exudado uretral en el medio de transporte se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo de centrífuga "Eppendorf", se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante y al sedimento se le adicionó 1 mL de *buffer* fosfato salino (PBS) a pH 7,4, se homogeneizó utilizando un vortex durante dos minutos, y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, el sobrenadante se eliminó y al sedimento se le añadió 0,1 mL de agua bidestilada estéril, se homogeneizó nuevamente durante un minuto, después se colocó en un bloque térmico a 100 °C por diez minutos, e

inmediatamente se pasó a un recipiente con hielo, y se guardó a -20 °C hasta su uso.

PCR-CLASE MOLLICUTES

El ADN obtenido de cada muestra clínica fue analizado mediante el PCR-Clase específica para Mollicutes, según describe Fernández *et al.*⁸, a las que resultaron positivas se les realizó el PCR-Múltiple para la identificación de las especies estudiadas.

PCR-MÚLTIPLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* Y *Ureaplasma urealyticum*

En una mezcla de reacción, con un volumen final de 50 µL, se adicionaron los cuatro juegos de cebadores descritos anteriormente. Para la amplificación del ADN de las muestras clínicas se empleó el programa utilizado en la amplificación del ADN de referencia. Se analizaron los productos amplificados como se describió anteriormente.

RESULTADOS

En la amplificación del ADN de las cepas de referencia por el método de PCR-Múltiple se escogió el programa con la temperatura óptima de hibridación de 55 °C y 35 ciclos para la amplificación del ADN. Se obtuvieron los tamaños de los fragmentos correspondientes a cada una de las especies: *M. genitalium* 78 pb, *M. hominis* 280 pb, *U. urealyticum* 418 pb y *U. parvum* 812 pb (Figura 1).

De las muestras clínicas de exudado uretral estudiadas el 79,4% (27/34) se identificaron positivas a Mollicutes por el PCR-Clase. De ellas, mediante el PCR-Múltiple; el 14,8% (4/27) fueron positivas a *M. genitalium*; 18,5% (5/27) a *M. hominis*, mientras que 11,1% (3/27) se identificaron como *U. urealyticum*, y 3,7% (1/27) como *U. parvum*. El 55,6% (15/27) restante no correspondió a ninguna de las especies estudiadas (Tabla 2). Dos de las muestras resultaron coinfectadas, una con *M. hominis* y *U. parvum*, y otra con *M. hominis* y *U. urealyticum*.

Tabla 2. Identificación de micoplasmas genitales en muestras clínicas.

Método de PCR	Resultados (n=34)	Método de PCR-Múltiple	Resultados (n=27)
Clase Mollicutes	79,4% (27/34)	<i>M. genitalium</i>	Gen proteína adhesiva 14,8% (4/27)
		<i>M. hominis</i>	Gen ARNr 16S 18,5% (5/27)
		<i>U. urealyticum</i>	Gen ureasa 11,1% (3/27)
		<i>U. parvum</i>	Gen ARNr 16S 3,7% (1/27)
		Otros mollicutes no identificados	55,6% (15/27)

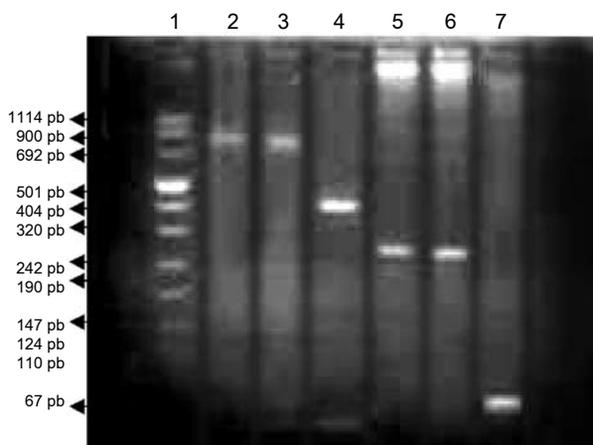


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 4% mostrando resultados del PCR-Múltiple para la detección de *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis* y *M. genitalium* en muestras clínicas de exudado uretral. Línea 1 marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker VIII. Roche, Germany), líneas 2-3 muestras positivas a *U. parvum*, línea 4 muestra positiva a *U. urealyticum*, líneas 5-6 muestras positivas a *M. hominis*, línea 7 muestra positiva a *M. genitalium*, línea 8 control negativo.

DISCUSIÓN

Los métodos de cultivo y pruebas serológicas son utilizados para el diagnóstico clásico de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas, pero no son suficientemente óptimos, propiciando el desarrollo y uso de métodos moleculares, como el PCR y sus variantes⁹. Estos métodos tienen una alta sensibilidad y especificidad, y permiten obtener resultados en un corto periodo.

Una de las variantes utilizadas fue el PCR-múltiple, donde se utiliza más de un juego de cebadores, y de esta forma se logra la amplificación de fragmentos de ADN de agentes pertenecientes al mismo género, empleando para ello cebadores diseñados de zonas con una amplia heterogeneidad, por lo general de regiones espaciadoras intergénicas, garantizando que los fragmentos amplificados posean tallas diferentes, lo cual permite que sean identificadas las distintas especies a través de una simple electroforesis en gel de agarosa¹⁰.

En el estudio de las muestras clínicas de exudado uretral, la positividad de *M. genitalium* coincide con los resultados obtenidos en otras investigaciones. Gubelin *et al.*¹¹, investigaron mediante el PCR, la presencia de *M. genitalium* en muestras de secreción uretral de 23 hombres con UNG, detectando esta especie en 13,04%, encontrando además *Ureaplasma* spp. en 34,7% de las muestras. En un estudio realizado en Turquía, se investigó la incidencia de *M. genitalium* en muestras de orina de 63 pacientes con síntomas de uretritis,

encontrando 6,3% de positividad, así como 4,8% a *U. urealyticum*, y 3,2% a *M. hominis*¹².

M. hominis, el primer micoplasma aislado en humanos, es frecuentemente identificado en el tracto urogenital, siendo causa importante de vaginosis bacteriana, una condición en la mujer que podría ser la causa de UNG en hombres. En este trabajo también se identificaron muestras positivas a *M. hominis*, coincidiendo con otros estudios donde se describe la presencia de esta especie en hombres sintomáticos con UNG^{13,14}.

En el presente estudio se encontró que la frecuencia con que se presenta *U. urealyticum* es mayor que la frecuencia con que se detectó *U. parvum*. Este resultado coincide con el reportado por Deguchi *et al.* quienes realizaron un estudio para determinar la asociación entre las especies de *Ureaplasma* y UNG, en muestras de orina de hombres con UNG, encontrando un mayor porcentaje de positividad a *U. urealyticum* (15,8%), que a *U. parvum* (8,5%), y concluyendo que *U. urealyticum* pudiera tener un potencial patogénico para el desarrollo de la UNG en hombres¹⁵.

Los resultados aquí obtenidos mostraron que 15 muestras pertenecientes a la Clase Mollicutes no correspondieron a ninguna de las especies estudiadas. Se han descrito aislamientos de otras especies de micoplasmas, como *M. penetrans*, en muestras uretrales de hombres con UNG aguda, aunque existen controversias en relación al papel patogénico de este microorganismo en esta enfermedad, al igual que otras especies como *M. fermentans*, *M. spermatophilum* e incluso *M. pneumoniae*, que tienen la capacidad de causar enfermedades del tracto urogenital, pero no hay evidencias claras que lo confirmen¹⁶. Estas especies no fueron analizadas en la presente investigación.

Stellrecht *et al.*, desarrollaron un método de PCR-múltiple para determinar las especies más frecuentemente asociadas con las infecciones del tracto genitourinario: *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp., encontrando una alta sensibilidad y especificidad del método, considerándola una herramienta eficaz para la detección de micoplasmas genitales¹⁰. Por su parte, Fernández *et al.* desarrollaron un método de PCR-múltiple para la identificación de *U. parvum* y *U. urealyticum*, el cual ha sido aplicado en la detección de estas especies en muestras de exudado uretral⁸.

En el presente estudio, esta técnica de PCR-Múltiple permitió la amplificación y diferenciación entre las especies de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*, estando presentes como organismos individuales o en una mezcla.

El diagnóstico de estas especies en hombres con uretritis, reafirma el hecho de que debe incluirse en el exudado uretral la búsqueda de estos gérmenes como prueba rutinaria en la práctica clínica diaria en pacientes con UNG, y en particular implementar este diagnóstico en muestras de pacientes cubanos, y realizar investigaciones dirigidas a conocer la relación de estos microorganismos con la UNG en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor-Robinson D, Ainsworth JG, McCormack WM. Genital mycoplasmas. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh P-A, et al. Sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill; 2004. p. 533-48.
2. Rivera- Tapia JA, Rodríguez-Preval N. Micoplasmas y antibióticos. Salud Pública Mex. 2006; 48(1):1-2.
3. Stellrecht K, Woron A, Mishrik N, Venezia R. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. J Clin Microbiol. 2004; 42(4):1528-33.
4. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR- microtiter plate hybridization assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(5): 1850-55.
5. Takahashi S, Takeyama K, Miyamoto S, Ichihara K, Maeda T, Kunishima Y, et al. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. J Infect Chemoter. 2006; 12(5): 269-71.
6. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. J Clin Microbiol. 2004; 42(2): 683-92.
7. Fernández C, Alvarez K, Muy L, Martínez M. Detección por técnicas de biología molecular de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras urogenitales. Rev Argent Microbiol. 1998; 30(2): 53-58.
8. Fernandez Molina C, Latino MA, Zamora Martinez Y, Pellicchia M, Neve V, Llanes R, et al. Desarrollo de un método de PCR-Múltiple para la identificación de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Rev Argent Microbiol. 2003; 35(3): 138-42.
9. Svenstrup HF, Jensen JS, Björnelius E, Lidbrink P, Birkelund S, Christiansen G. Development of a quantitative real - time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. J Clin Microbiol. 2005; 43(7): 3121- 28.
10. Stellrecht K, Woron A, Mishrik N, Venezia R. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. J Clin Microbiol. 2004; 42(4): 1528-33.
11. Gubelin W, Martinez MA, Cespedes P, Fich F, Fuenzalida H, De la Parra R, et al. Aplicación de método molecular en la detección de *M. genitalium* en hombres y en mujeres embarazadas. Rev Chil Infect. 2006; 23(1): 15-19.
12. Dolapci I, Tekeli A, Ozsan M, Yaman O, Ergin S, Elhan A. Detecting of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis symptoms in Turkey by polymerase chain reaction. Saudi Med J. 2005; 26(1): 64-68.
13. Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. Int J STD AIDS. 2000; 11(6): 356-60.
14. Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. J Clin Microbiol. 2004; 42(10): 4636-40.
15. Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, Yasuda M, Tamaki M, Ishiko H, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) with nongonococcal urethritis. Sex Transm Dis. 2004; 31(3): 192-95.
16. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Keane FE. Detection of several *Mycoplasma* species at various anatomical sites of homosexual men. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22(5): 291-93.

Correspondencia: Nadia Rodríguez Preval. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".
 Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, AP 601, Marianao 13. Ciudad de la Habana., Cuba.
 Correo electrónico: nadia@ipk.sld.cu