

Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por amplificación de los genes MgPa y ARN ribosomal 16S

Carmen Fernández-Molina, M en C,⁽¹⁾ Nadia Rodríguez-Preval, M en C,⁽¹⁾ Islay Rodríguez-González, M en C,⁽¹⁾ María Agnese-Latino, Esp en Microbiol,⁽²⁾ José Antonio Rivera-Tapia, M en C,⁽³⁾ Idalia Ayala-Rodríguez, Esp en Microbiol.⁽⁴⁾

Fernández-Molina C, Rodríguez-Preval N,
Rodríguez-González I, Agnese-Latino M,
Rivera-Tapia JA, Ayala-Rodríguez I.

Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por
amplificación de los genes MgPa y ARN ribosomal 16S.
Salud Pública Mex 2008;50:358-361.

Fernández-Molina C, Rodríguez-Preval N,
Rodríguez-González I, Agnese-Latino M,
Rivera-Tapia JA, Ayala-Rodríguez I.

Diagnosis of *Mycoplasma genitalium* by MgPa
and rRNA 16S gene amplification.
Salud Pública Mex 2008;50:358-361.

Resumen

Objetivo. El microorganismo *Mycoplasma genitalium* se ha relacionado con la uretritis no gonocócica (UNG). La técnica de PCR se ha convertido en el principal método de detección de este patógeno. En consecuencia, debe aplicarse un método de diagnóstico mediante la amplificación de fragmentos de ADN por la técnica PCR. **Material y métodos.** Se seleccionaron los cebadores MGF-MGR y MgPaF-MgPaR, complementarios de los genes de ARNr 16S y MgPa de *M. genitalium*, respectivamente. Se efectuaron ensayos de especificidad y sensibilidad y se estudiaron muestras clínicas. **Resultados.** La PCR con cada grupo de cebadores utilizado fue específica sólo para *M. genitalium* y la sensibilidad fue mayor con el grupo de cebadores MGF-MGR. En el estudio de 34 muestras clínicas, 18.5% fue positivo a *M. genitalium* y se encontró un mayor número de muestras positivas al utilizar los cebadores MgPaF-MgPaR. **Conclusiones.** Debe aplicarse en la práctica clínica el diagnóstico de *M. genitalium* mediante la amplificación del ADN por PCR en los pacientes con UNG.

Palabras clave: diagnóstico; *Mycoplasma genitalium*; PCR; Cuba

Abstract

Objective. *Mycoplasma genitalium* has been associated with nongonococcal urethritis (NGU). Diagnosis by PCR has become the primary detection method for this organism. Thus, diagnosis by DNA amplification using the PCR technique should be utilized. **Material and Methods.** GMF/GMR and MgpF/MgpR primer pairs, complementary to the *M. genitalium* 16S rRNA and MgPa genes, respectively, were selected. Specificity and sensibility assays were conducted and clinical samples were studied. **Results.** The PCR with each primer pair was specific only for *M. genitalium*, and the sensibility was higher with the GMF/GMR primers. In the study of 34 clinical samples, 18.5% were positive for *M. genitalium*, with more positive samples when the MgpF/MgpR primers were used. **Conclusions.** DNA amplification by PCR should be applied in clinical practice to the diagnosis of *M. genitalium* in patients with NGU should using.

Key words: diagnosis; *Mycoplasma genitalium*; PCR; Cuba

(1) Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba.

(2) Departamento de Microbiología, Hospital Santa Anna. Turín, Italia.

(3) Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

(4) Hospital Militar Dr. Carlos J. Finlay. Cuba.

Fecha de recibido: 19 de junio de 2007 • Fecha de aceptado: 18 de abril de 2008
Solicitud de sobretiros: Dra. Carmen Fernández Molina. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.
Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, AP 601, Marianaao 13. Ciudad de La Habana.
Correo electrónico: carmen@ipk.sld.cu

Mycoplasma genitalium (*M. genitalium*) es uno de los agentes infecciosos relacionados con la uretritis no gonocócica (UNG). De manera original, este microorganismo se aisló de muestras uretrales de pacientes con uretritis y desde entonces se ha demostrado que existe una relación parasítica con células epiteliales cipliadas del tracto genital, así como del tracto respiratorio humano.^{1,2}

El diagnóstico de *M. genitalium* por los métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico y las técnicas serológicas y bioquímicas, resulta en extremo laborioso y se necesitan hasta tres meses para obtener un diagnóstico confirmatorio.³⁻⁵

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más aplicados en el diagnóstico de especies insidiosas, como es el caso de *M. genitalium*, y para este microorganismo se han notificado diversos genes como secuencias blanco para su identificación.^{6,7}

El objetivo de este estudio fue aplicar un método diagnóstico para *M. genitalium* mediante la amplificación de fragmentos de ADN a partir de dos grupos de cebadores señalados con frecuencia en las publicaciones especializadas y evaluarlos además en muestras clínicas de pacientes con UNG.

Material y métodos

Muestra de ADN de referencia. El ADN de *M. genitalium*, correspondiente a la cepa R32G, se obtuvo gracias a la donación del Dr. Branko Kokotovic, del Laboratorio de Micoplasmas del Instituto Danés para Investigaciones Veterinarias y Alimentos, de Copenhague, Dinamarca. **Grupos de cebadores empleados en el método PCR para *M. genitalium*.** Se utilizaron el grupo de cebadores MGF-MGR complementarios de un fragmento del gen del ARN ribosomal 16S de *M. genitalium*, que describieron Jensen y colaboradores,⁷ y el grupo de cebadores MgPaF-MgPaR complementarios de una región del gen de la proteína adhesiva de *M. genitalium* (MgPa), que describieron Jensen y colegas.⁸

Mezcla de reacción. El volumen final de 50 µl contenía 37.25 µl de agua bidestilada estéril, 5 µl de tampón para PCR al 10X, 20 mM de cada dNTP, 1.25 µl de cada cebador en una concentración de 10 pmol/µl, 0.25 µl (1.25 U) de polimerasa *Taq* y 5 µl de ADN de muestra.

Amplificación del ADN. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador "Mastercycler personal" (Eppendorf, Alemania). El programa de amplificación fue el siguiente: 95°C por cuatro minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos

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

Ánalisis de los productos amplificados. Los productos de ADN amplificados se analizaron por electroforesis submarina en gel de agarosa al 4% y los resultados de las electroforesis se observaron a través de un transiluminador con luz ultravioleta (LKB 2011, Suecia), y se determinaron sus tallas por comparación con marcadores de peso molecular de ADN (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche, Germany).

Ensayo de especificidad y sensibilidad de la PCR para *M. genitalium*. Con los grupos de cebadores MGF-MGR y MgPaF-MgPaR y la metodología de la PCR ya descrita se realizaron los experimentos de especificidad en ADN de *M. genitalium* (R32G), *Mycoplasma hominis* (ATCC 23114), *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27618) y *Ureaplasma parvum* (ATCC 2815), además de los experimentos de sensibilidad en ADN de *M. genitalium* (R32G); para ello se llevaron a cabo diluciones seriadas de 1:2 a partir de una concentración de 400 pg/µl hasta 12.5 pg/µl, y desde esta última se continuaron con diluciones seriadas de 1:10 hasta una concentración de 0.0125 pg/µl. De cada dilución se tomaron 5 µl para realizar el experimento de sensibilidad de la PCR.

Estudio de muestras clínicas. Para las muestras clínicas, el universo se conformó con todos los pacientes masculinos con diagnóstico de UNG que acudieron al Laboratorio del Hospital Carlos J. Finlay, en el periodo comprendido entre octubre y noviembre del año 2005. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes que participaron en el estudio. El Comité de Evaluación Ética del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK) aprobó el protocolo de investigación. Se analizaron 34 muestras de exudado uretral, negativas en los exámenes para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, de igual número de pacientes masculinos. Las muestras clínicas en medio líquido de transporte específico para micoplasmas se trasladaron en un contenedor de seguridad biológica al Laboratorio de Micoplasmas del IPK.

Extracción del ADN de la muestra. La extracción del ADN se realizó de acuerdo con la descripción de Fernández y colaboradores,⁹ con base en cambios bruscos de temperaturas y el fenómeno de ósmosis, tras mantener el ADN extraído a -20°C hasta su uso.

Identificación de *M. genitalium* en muestras clínicas por el método PCR. El ADN obtenido de cada muestra clínica se analizó mediante la técnica PCR-Clase específica para Mollicutes, según el informe de Fernández y colegas.¹⁰ Las muestras que resultaron positivas se sometieron a PCR específica para *M. genitalium*, como se indicó con anterioridad, y se emplearon los grupos de cebadores MGF-MGR y MgPaF-MgPaR.

Resultados

Especificidad del método PCR para *M. genitalium*. Al analizar el ADN de referencia con el grupo de cebadores MGF-MGR se obtuvo un fragmento de 425 pb correspondiente a la región del gen del ARNr 16S de *M. genitalium*; por su parte, con el grupo de cebadores MgPaF-MgPa se obtuvo un fragmento de 78 pb correspondiente a la región del gen de la proteína de adhesión de *M. genitalium*. No se encontraron bandas similares en las muestras de ADN de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, lo que demuestra que el método PCR no tuvo reacción cruzada con estas especies de micoplasmas genitales estudiadas con los cebadores usados y condiciones establecidas.

Sensibilidad del método PCR para *M. genitalium*. En las diluciones seriadas de 1:2 se obtuvieron amplificaciones del ADN hasta 12.5 pg/μl con ambos grupos de cebadores. Al continuar con las diluciones seriadas de 1:10 se consiguió una amplificación hasta 0.125 pg/μl con el grupo de cebadores MGF-MGR; por su parte, con el grupo de cebadores MgPaF-MgPaR se logró una amplificación en una dilución menor, es decir, hasta 1.25 pg/μl.

Identificación de *M. genitalium* en muestras clínicas por métodos PCR. De las muestras clínicas de exudado uretral estudiadas, 79.4% (27/34) fue positivo por PCR-Clase *Mollicutes* y de ellas 18.5% (5/27) resultó positivo a *M. genitalium* por PCR. El grupo de cebadores complementarios del gen MgPa detectó 14.8% (4/27) de muestras positivas a *M. genitalium*, mientras que el grupo de cebadores del gen del ARNr 16S reconoció sólo 7.4% (2/27), esto es, coincidió una muestra por ambos grupo de cebadores.

Discusión

Por lo general, las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas son silentes, su duración es limitada y muestran síntomas inespecíficos. Estos microorganismos constituyen elementos de la flora normal, lo cual dificulta el diagnóstico de estas infecciones. Los métodos de cultivo y pruebas serológicas se utilizan para el diagnóstico común de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas, pero no son óptimos en grado suficiente, lo que ha propiciado el desarrollo y uso de métodos moleculares, como la PCR y sus variantes.¹¹

En este estudio, el método de PCR utilizado, en el que se amplifican fragmentos de ADN de 425 pb y 78 pb, sólo fue específico para *M. genitalium* y no para otros ADN. Esto concuerda con las notificaciones de Jensen y colegas, quienes también emplearon estos cebadores complementarios del fragmento del gen de

la proteína de adhesión⁷ y los cebadores complementarios de un fragmento del gen del ARN ribosomal 16S.⁸ Sin embargo, estos autores encontraron una mayor sensibilidad que la obtenida en el presente protocolo, lo cual puede deberse al método de purificación del ADN de *M. genitalium* empleado como referencia en ambos estudios, que fue diferente y puede modificar los resultados conseguidos. También deben tomarse en cuenta los programas usados para la amplificación del ADN, ya que se emplearon diferentes números de ciclos. En el caso del PCR dirigido al gen MgPa, estos autores utilizaron el PCR en tiempo real, método más sensible que la técnica PCR convencional desarrollada en este trabajo.^{7,8}

En el análisis de las muestras clínicas de exudado uretral, la positividad a *M. genitalium* de 18.5% coincide con los resultados obtenidos en otras investigaciones. Gubelin y colaboradores investigaron, mediante PCR dirigida al gen MgPa, la presencia de *M. genitalium* en muestras de secreción uretral de 23 hombres con UNG, identificaron esta especie en 13.04% y encontraron además *Ureaplasma spp.* en 34.7% de las muestras.¹² Jensen y colegas, en un protocolo realizado en muestras de secreción uretral de 73 varones con síntomas uretrales, reconocieron 9.6% de muestras positivas a *M. genitalium* mediante PCR.⁷ Luo Dan y colaboradores, en un estudio conducido en China, hallaron 16.17% de positividad a *M. genitalium* con dos grupos de cebadores para la PCR;¹³ por su parte, Anagrius y colegas detectaron *M. genitalium* en 13.6% de 125 hombres con uretritis sintomática y observaron un nexo significativo entre este microorganismo y los síntomas y signos microscópicos.¹⁴ Dolapci y colaboradores, en un estudio realizado en Turquía, investigaron la incidencia de *M. genitalium* en muestras de orina de 63 pacientes con síntomas de uretritis y hallaron 6.34% de positividad, 4.76% a *U. urealyticum* y 3.17% a *M. hominis*;¹⁵ esta muestra fue más simple y el método de obtención no invasivo, lo que pudo influir en estos resultados.

En el presente estudio se obtuvo una mayor positividad con la PCR para *M. genitalium* mediante los cebadores complementarios del fragmento del gen MgPa, en comparación con el uso de los cebadores complementarios de un fragmento del gen de ARNr 16S. Estos resultados coinciden con los de Edberg y colaboradores, quienes realizaron un estudio comparativo entre tres métodos de PCR para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas y obtuvieron una mayor sensibilidad al aplicar la PCR para el gen MgPa.¹⁶ Hardick y colegas desarrollaron un método de PCR para múltiples blancos, dirigidos a los genes ARNr 16S y MgPa, y reconocieron un mayor número de muestras positivas al utilizar como blanco la región del gen

MgPa.¹⁷ Algunos estudios sugieren que la discrepancia en la temperatura de hibridación puede interferir en las diferentes sensibilidades analíticas de cada blanco de la reacción y que la región blanco del ARNr 16S es menos sensible para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas, respecto de otros sitios, como la proteína de adhesión MgPa, la cual se vincula con la patogenicidad del microorganismo, que es un determinante de virulencia.¹⁸ Aunque el ensayo de sensibilidad mostró resultados en los cuales la sensibilidad de la PCR del gen del ARN ribosomal es apenas mayor que la PCR del gen de la proteína de adhesión, en el caso del ADN de referencia se ha descrito que la secuencia del gen del ARNr 16S es relativamente estable y por tanto contiene pocos o ningún polimorfismo en la población de *M. genitalium*. Sin embargo, los antígenos expresados en la superficie muchas veces tienen secuencias de genes inestables y se han notificado variaciones intraespecie en el gen de la proteína MgPa.¹⁹ Eastick y colegas desarrollaron un ensayo de PCR para detectar *M. genitalium* en 54 muestras de orina de hombres con uretritis e identificaron una mayor positividad al emplear PCR dirigida al ARNr 16S.²⁰

La relación informada en las publicaciones de *M. genitalium* con diferentes enfermedades y los resultados obtenidos en este estudio señalan la necesidad de establecer en la práctica clínica el diagnóstico de *M. genitalium* en todos los individuos con UNG; esto es posible mediante la amplificación del ADN por PCR y la utilización de los grupos de cebadores complementarios del gen de la proteína adhesiva.

Agradecimientos

Los autores reconocen las facilidades del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología de Trieste, Italia, que contribuyó con el desarrollo de experimentos mediante becas posdoctorales otorgadas a uno de los autores de este estudio.

Referencia

- Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: an etiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:1-11.
- Wikstrom A, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline. *Sex Transm Infect* 2006;82(4):276-279.
- Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Molling P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. *J Med Microbiol* 2005;54:23-29.
- 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):1850-1855.
- Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with vero cells. *J Clin Microbiol* 2007;45(3):847-850.
- Hardick J, Giles J. Performance of the gen-probe transmission-mediated amplification research assay compared to that of a multitarget real-time PCR for *Mycoplasma genitalium* detection. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1236-1240.
- Jensen J, Borre M, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):261-266.
- 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;42:683-692.
- Fernandez CM, Alvarez K, Muy L, Martinez M. Detection using molecular biology techniques of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in urogenital samples. *Rev Argent Microbiol* 1998;30(2):53-58.
- Fernández CM, Latino MA, Zamora YM, Pellechia 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.
- Taylor-Robinson D, Ainsworth JG, McCormack WM. Genital mycoplasmas. In: *Sexually transmitted diseases*. Holmes KK, Sparling PF, Mardh P-A, et al, eds. New York: McGraw-Hill, 2004:533-548.
- Gubelin W, Martínez MA, Céspedes 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.
- Dan L, Wenyuan Z, Xiaojun Z, Xiping C, Shukui W, Zizheng W, et al. Molecular epidemiologic study of *Mycoplasma genitalium* infection in high risk populations of sexually transmitted diseases in China. *Chin Med J* 2000;113(11):1015-1018.
- Anagrius C, Loré B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* 2005;81:458-462.
- 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.
- Edberg A, Johansson E, Wikander E, Hoog A, Ahlgqvist T, Jurstrand M, et al. A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in genital specimens from men and women. In: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2006 April 1-4 de; Nice, France.
- Hardick J, Giles J. Performance of the gen-probe transmission-mediated amplification research assay compared to that of a multitarget real-time PCR for *Mycoplasma genitalium* detection. *J Clin Microbiol* 2006;44 (4):1236-1240.
- Svenstrup HF, Jensen JS, Bjornelius E, Lidbrink P, Birkeland S, Gunnar C. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 2005;43:3121-3128.
- Baseman JB, Cagle M, Korte JE, Herrera C, Rasmussen WG, Baseman JG, et al. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):203-211.
- Eastick K, Leeming JP, Caul EO, Horner PJ, Millar MR. A novel polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma genitalium*. *Mol Pathol* 2003;56(1):25-28.