

Implementación de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para la detección de *Mycoplasma genitalium*

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

¹Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”; Avenida Novia del Mediodía Km 6½. P.O. Box: 601. Marianao 13. La Lisa. La Habana. Cuba.

²Mycoplasma Laboratory, Statens Serum Institut, DK-2300. Copenhagen S, Denmark.

³Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Espiroquetas. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Avenida Novia del Mediodía Km 6½. P.O. Box: 601. Marianao 13. La Lisa, La Habana, Cuba.

email: bmondeja@ipk.sld.cu

El diagnóstico de las infecciones por *Mycoplasma genitalium* mediante métodos bacteriológicos tradicionales resulta laborioso y poco práctico. Es por ello que los métodos moleculares basados en la amplificación del ADN se utilizan con fines diagnósticos de infecciones causadas por este microorganismo. En Cuba no existen informes de la implementación y utilización de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para la detección y cuantificación de este patógeno. En este trabajo se implementó una qPCR para la detección y cuantificación de *M. genitalium* mediante la amplificación de un fragmento del gen *mgpB* que codifica para la proteína adhesina celular, mediante la tecnología *LightCycler®* (Roche), utilizando los métodos de qPCR SYBR Green I y TaqMan. Se evaluó la especificidad y sensibilidad de dicha PCR utilizando ADN de *M. genitalium* y de otros micoplasmas de origen humanos. Se logró la implementación de ambos métodos de qPCR con un límite de detección de 3,6 geq/µL, siendo la plataforma TaqMan la que mostró mejor eficiencia. Ambos métodos mostraron una alta especificidad para la detección de *M. genitalium* y no se detectaron reacciones cruzadas con otros micoplasmas de origen humano. Se implementó por primera vez en Cuba una qPCR para la detección de *M. genitalium*. El método TaqMan mostró mejor desempeño para la futura aplicación de esta metodología en muestras clínicas. El presente trabajo permitirá realizar estudios de caracterización genética y antigénica de las cepas circulantes en Cuba, útiles para conformar un inmunógeno vacunal.

Palabras clave: *Mycoplasma genitalium*, qPCR, PCR en Tiempo Real, *TaqMan*, *SYBR Green I*, *LightCycler®*.

Introducción

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

El diagnóstico de las infecciones por *M. genitalium* mediante los métodos bacteriológicos tradicionales

resulta laborioso y poco práctico, pues el crecimiento de los aislamientos primarios es extremadamente lento con el empleo de un medio de cultivo específico para micoplasmas, debido a su limitado metabolismo. Por otra parte, debido a la homología antigénica y la consecuente reactividad cruzada entre *M. genitalium* y *M. pneumoniae*, las herramientas serológicas carecen de especificidad en la práctica diaria. Es por ello que los métodos moleculares basados en la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), son ampliamente utilizados para el diagnóstico de infecciones causadas por este microorganismo (2, 3).

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

Los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*), constituyen herramientas sensibles, específicas y rápidas para la detección y cuantificación de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas (2, 4).

En Cuba, la presencia de *M. genitalium* en muestras de pacientes masculinos con infecciones urogenitales se demostró previamente mediante PCR cualitativa (5). Sin embargo, no existen informes de la implementación y utilización de métodos de qPCR para la detección y cuantificación de este microorganismo.

El presente trabajo tuvo como objetivo implementar un método de qPCR para la detección y cuantificación de *M. genitalium* en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (LNRIM-IPK).

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

Materiales y Métodos

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

La cepa tipo de *M. genitalium* G37^T (ATCC 33530) se cultivó en 50 mL de medio de cultivo Friis (6) durante 7 días a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 30 min y a partir del sedimento celular obtenido se procedió a la extracción del ADN utilizando el estuche comercial *High Pure DNA Template Preparation Kit* (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto de ADN concentrado se cuantificó mediante análisis espectofotométrico (7) y se realizaron diluciones seriadas desde 10⁷ copias de equivalentes de genomas (geq) hasta 0,1 geq.

Preparación de los controles de ADN de *M. genitalium* y de las especies de micoplasmas de origen humano

Se utilizaron las cepas de *M. genitalium* M-30, M2288, M2300, M2321, M2341, así como las del resto de las especies de micoplasmas de origen humano: *M. amorphiforme* A39^T (ATCC BAA-992), *M. buccale* CH 20247^T (ATCC 23636), *M. faecium* DC 333^T (ATCC 25293), *M. fermentans* PG 18^T (ATCC 19989), *M. hominis* PG 21^T (ATCC 23114), *M. orale* Patt (ATCC 15544), *M. penetrans* GTU-54-6A1^T (ATCC 55252), *M. pirum* ZEUS (AMRC-C1555), *M. pneumoniae* Mac (ATCC 15492), *M. primatum* Navel (ATCC 15497), *M. salivarium* PG 20^T (ATCC 23064), *Ureaplasma parvum* Serotype 3^T (ATCC 27815) y *U. urealyticum* Serotype 8^T (ATCC 27618).

Las mismas fueron donadas amablemente por el Laboratorio de Micoplasmas, Instituto Estatal del Suero, Copenhague - Dinamarca a la colección de cepas del LNRIM-IPK.

Las cepas del género *Mycoplasma* se subcultivaron en 50 mL de medio Friis hasta 7 días a 37 °C, mientras que las del género *Ureaplasma* se cultivaron en 50 mL de medio de cultivo UN (8) durante 48 h a 37 °C. A partir de estos cultivos en medio líquido se procedió a la extracción del ADN mediante el estuche comercial *High Pure DNA Template Preparation Kit* (Roche, Alemania) como se describió anteriormente para la cepa G37^T de *M. genitalium*.

Implementación de la qPCR para *M. genitalium*

Una qPCR se implementó para la detección y cuantificación de *M. genitalium* utilizando la tecnología *LightCycler®* (Roche, Alemania) en dos plataformas, *SYBR Green I* y *TaqMan*. Para ello se utilizó el juego de cebadores MgPa-355F: 5'- GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA-3' y MgPa-432R: 5'- GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC-3', descritos por Jensen y cols. en el 2004 (9), los que amplificaron un fragmento de 78 pares de bases del gen *mgpB*, así como los estuches comerciales *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* y *LightCycler® TaqMan® Master* (Roche, Alemania).

En el caso de la plataforma *SYBR Green I*, se evaluaron tres mezclas de reacción con variaciones en las concentraciones finales de los cebadores, cloruro de magnesio y la adición o no de seroalbúmina bovina (BSA).

En este sentido, experiencias previas en nuestro laboratorio evidenciaron que la adición de BSA solo eliminaba la aparición de dímeros de cebadores, sin modificar ningún otro parámetro estadístico del ensayo de qPCR.

En la Tabla 1 se muestran las mezclas de cada reacción para un volumen final de 20 µL (18 µL de mezcla más 2 µL de muestra).

enfriamiento a 40 °C 30 s. Mientras que para la plataforma *TaqMan* se utilizó un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C 15 min, seguido

Tabla 1. Mezclas de reacción empleadas para la estandarización de la qPCR en plataforma SYBR Green I.

Componentes	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
MgCl ₂	1,5 µM	2,5 µM	2,5 µM
MgPa-355F	0,4 µM	0,15 µM	0,2 µM
MgPa-432R	0,4 µM	0,15 µM	0,2 µM
Seroalbúmina bovina	-	-	0,05 %
<i>LigthCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I</i>	1X	1X	1X
Agua ultrapura estéril	Completar a 18 µL	Completar a 18 µL	Completar a 18 µL

En la estandarización de la qPCR en la plataforma *TaqMan* se evaluaron tres mezclas de reacción con variaciones en las concentraciones finales de los cebadores. En la Tabla 2 se muestran las mezclas de cada reacción para un volumen final de 20 µL (18 µL de mezcla más 2 µL de muestra).

de 45 ciclos a 95 °C 10 s, 62 °C 10 s y 72 °C 5 s, y se finalizó con un ciclo de enfriamiento a 40 °C por 30 s.

Los resultados de la qPCR se analizaron a través del programa *LightCycler® 3,5* (Roche). Se realizó el

Tabla 2. Mezclas de reacción empleadas para la estandarización de la qPCR en plataforma *TaqMan*.

Componentes	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
MgPa-355F (10 µM)	0,2 µM	0,25 µM	1 µM
MgPa-432R (10 µM)	0,2 µM	0,25 µM	1 µM
Sonda MgPa-380	0,75 nM	0,75 nM	0,75 nM
<i>LightCycler® Taqman® Master Mix</i>	1X	1X	1X
Agua ultrapura estéril	Completar a 18 µL	Completar a 18 µL	Completar a 18 µL

Se utilizó como sonda la MgPa-380 *TaqMan* MGB: FAM - ACT TTG CAA TCA GAA GGT-MGB publicada por Jensen y cols (9). Las mezclas obtenidas para ambas plataformas se dispensaron en volúmenes de 18 µL en capilares de vidrio (Roche) y se añadieron 2 µL de ADN a cada capilar.

La amplificación y detección de los productos amplificados se realizó en un equipo *LightCycler® 1,5* (Roche, Alemania). Para la plataforma SYBR Green I se utilizó un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C 15 min, seguido de 42 ciclos de 95 °C 10 s, 62 °C 10 s y 72 °C 5 s; le continuó un ciclo de análisis o curva melting de 95 °C 1 s, 65 °C 10 s y luego se aumentó la temperatura 0,1 °C/s hasta 95 °C. Como ciclo final se realizó un

análisis de las temperaturas melting para la plataforma SYBR Green I, así como la elaboración de una curva estándar y el cálculo de la eficiencia del ensayo para ambas plataformas.

Ensayos de sensibilidad y especificidad de la qPCR

Dos µL de cada uno de los patrones de ADN de *M. genitalium* se utilizaron como muestra para la elaboración de la curva estándar y el cálculo del límite de detección del ensayo de cada plataforma de qPCR. Para los ensayos de especificidad, 2 µL de cada una de los extractos de ADN de cepas de *M. genitalium*, así como del resto de las cepas de micoplasmas de origen humano, se utilizaron como muestra en cada plataforma de qPCR.

Resultados

En la plataforma SYBR Green I, el límite de detección para este ensayo fue 3,6 geq/ μ L, lo que se traduce en 7,2 geq por reacción. La mezcla de reacción número 3 se seleccionó dada la escasa formación de dímeros, así como la obtención de amplicones con temperaturas *melting* homogéneas de 77 °C en la amplificación mediante qPCR de los estándares de ADN de *M. genitalium*. En el caso de las restantes mezclas (1 y 2), se obtuvo el mismo límite de detección que al utilizar la mezcla 3, aunque se observó la aparición de amplificaciones inespecíficas (dímeros de cebadores).

Al realizar la curva de calibración para el cálculo de la eficiencia de la qPCR se obtuvo una pendiente de -5,133, lo cual se traduce en una eficiencia de 56,6% (Fig. 1).

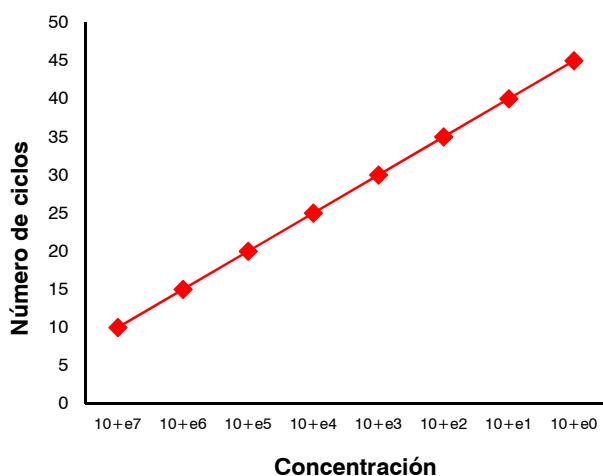


Fig. 1. Curva estándar de la amplificación de los patrones de ADN de *M. genitalium* (10⁷ – 1 geq) mediante la plataforma SYBR Green I.

Al emplear la plataforma TaqMan se obtuvieron los mejores resultados al utilizar la mezcla de reacción número 3. Al realizar la amplificación de los estándares de ADN y la curva de calibración de la qPCR, se logró un límite de detección de 3,6 geq/ μ L (7,2 geq por reacción) y se obtuvo una pendiente de -3,275, con una eficiencia de la PCR del 100% (Fig. 2).

Ambas plataformas de qPCR mostraron una elevada especificidad al ser evaluadas con los ADN de las cepas de referencia de *M. genitalium* y de los otros micoplasmas de origen humano. Solo se observó amplificación a partir de los ADN de *M. genitalium*.

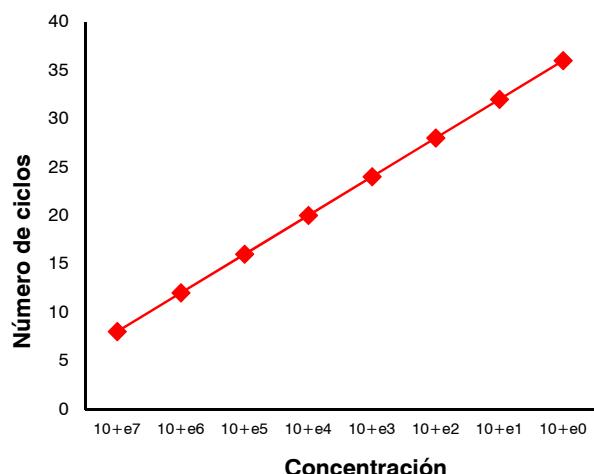


Fig. 2. Curva estándar de la amplificación de los patrones de ADN de *M. genitalium* (10⁷–1 geq) mediante la plataforma TaqMan.

Discusión

M. genitalium está presente en muy baja concentración en las muestras clínicas, por lo que para su detección molecular se prefieren métodos con un bajo límite de detección, antecedidos por uno de extracción que garantice la menor pérdida posible de ADN (2, 10).

Pfaffl en 2010 (11), planteó que una qPCR en la que se genera un único producto de amplificación al utilizar cebadores bien diseñados, los agentes intercalantes como SYBR Green I funcionan perfectamente, aumentan la sensibilidad del ensayo sin que aparezcan fluorescencias generadas por amplificaciones inespecíficas, las cuales solos son detectadas cuando se utilizan un número alto de ciclos.

Además, en ensayos bien estandarizados la plataforma SYBR Green I y TaqMan producen resultados similares de sensibilidad, aunque la detección y cuantificación mediante SYBR Green I es mucho más sensible y menos específica que los ensayos basados en sondas (11, 12).

En la presente investigación se redujo la formación de dímeros con la incorporación de seroalbúmina bovina a la mezcla de reacción de la PCR, lo que garantiza el aumento de las condiciones de astringencia en la misma (13).

La utilización del ensayo de qPCR para *M. genitalium*, basado en SYBR Green I constituye una novedad de

esta investigación. Hasta el momento se han reportado varios ensayos de qPCR para este microorganismo en los que se utiliza como diana de amplificación los genes que codifican para el ARNr 16S, proteína de adhesión MgPa, *gap* y *gyrA*. Todos ellos tienen en común el empleo de plataformas *TaqMan* y sondas de hibridación (2, 6, 10, 14-16); sin embargo, dada la sensibilidad y abaratamiento de los costos, la plataforma *SYBR Green I* se emplea en la detección e identificación de otras especies de micoplasmas como *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, en los que se ha logrado un límite de detección de 30 copias por reacción y una eficiencia de un 100% (17).

El valor de la eficiencia obtenido en la presente investigación para el caso de la plataforma *SYBR Green I* resulta relativamente bajo; sin embargo, dado que el fragmento del gen *mgpB* utilizado como diana posee un porcentaje bajo de guanina-citosina, así como un tamaño inferior a lo recomendado para los ensayos que utilizan *SYBR Green I*, la temperatura *melting* del amplicón resultante es muy similar a la de los dímeros de cebadores, lo cual no permite el aumento de la concentración de estos últimos en la mezcla de reacción con el objetivo de incrementar la sensibilidad general del ensayo (2, 18, 19).

Estos resultados coinciden con lo planteado por Jensen y cols. en el 2004 (9) al desarrollar una qPCR basada en la plataforma *TaqMan* para la detección y cuantificación de *M. genitalium* en muestras urogenitales, en las que utilizó los mismos cebadores y sonda empleados en esta investigación. En este sentido, el límite de detección no se vio afectado por la disminución del volumen de la muestra de ADN de 5 µL (9) a 2 µL, lo que permite la racionalización de la muestra clínica y el aumento del número de determinaciones o ensayos a realizar. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la cuantificación de los patrones de ADN de *M. genitalium* se realizó mediante espectrofotometría, lo que causa que la cuantificación no es absoluta y se puede estar subestimando la concentración real del ADN. Por otro lado, Twin y cols. en el 2011 (20) realizaron una comparación entre dos metodologías de qPCR para *M. genitalium*, en las que obtuvieron también un límite de detección inferior a 6 geq y una eficiencia de 100% para el caso de la plataforma *TaqMan* del gen *mgpB*.

Para el empleo de métodos moleculares con fines diagnósticos, aún cuando se utilicen cebadores reportados, debe evaluarse la especificidad de los

mismos en nuestras condiciones, puesto que la robustez del método debe ser evaluada, dada por la diferencia de equipos, reactivos, analistas, en comparación con la publicación anterior. La alta especificidad de la qPCR obtenida coincide con lo planteado por Jensen y cols. (9) al diseñar y evaluar el juego de cebadores y la sonda seleccionados para la presente investigación (9), lo que reafirma la robustez del método normalizado.

De forma general, se logró la implementación en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, de una qPCR para la detección y cuantificación de *M. genitalium*, lo que permitirá, después de la validación en muestras clínicas, la ampliación de las capacidades diagnósticas de las infecciones causadas por este patógeno en la población cubana.

Referencias

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from chrysalis to Multicolored Butterfly. Clin Microbiol Rev 2011;24(3):498-514.
2. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. JEADV 2004;18:1-11.
3. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis. Dan Med Bull 2006;53:1-27.
4. Shipitsyna E, Savicheva A, Sokolovskiy E, Ballard RC, Domeika M, Unemo M, et al. Guidelines for the Laboratory Diagnosis of *Mycoplasma genitalium* Infections in East European Countries. Acta Derm Venereol 2010;90:461-7.
5. Rodríguez N, Fernández C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera-Tapia J. PCR múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2007;24(2):152-6.
6. Jensen JS, Hansen HT, Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. J Clin Microbiol 1996;34(2):286-91.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Analysis of Genomic DNA. In: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.p.445-56.
8. Bolske G. Survey of mycoplasma infections in cell cultures and comparison of detection methods. Zbl Bakteriol Microbiol Hyg All 1988;69:331-40.
9. 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;42:683-92.
10. Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Molling P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. *J Med Microbiol* 2005;54:23-9.
11. Pfaffl MW. The road from qualitative to quantitative assay: what is next? In: Bustin SA (editor). The PCR revolution. Basic technologies and amplifications. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.p.110-28.
12. Reynisson E, Josefson MH, Krause M, Hoorfar J. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J Microbiol Method* 2005;66(2):206-16.
13. Theuringer Th, Jedrysiak P, Lu A, Junglass A. Real-Time PCR Brochure 07/2010. In: Critical factors for successful Real-Time PCR. Hilden: Qiagen-Sample & Assay Technologies Edition; 2010.p.1-62.
14. Blaylock MW, Musatovova O, Baseman JG, Baseman JB. Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):746-52.
15. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:1451-5.
16. Svenstrup HF, Jensen JS, Bjornelius E, Lidbrink P, Birkeland S, Christiansen G. Development of a Quantitative Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3121-8.
17. Jarquin R, Schultz J, Hanning I, Ricke SC. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* under industry conditions. *Avian Diseases* 2009;53:73-7.
18. Roche Applied Science. Real-Time PCR Methods. In: PCR Applications Manual. 3rd edition. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Roche Applied Science Edition; 2005.p.193-226.
19. Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, Atwood AA, O'Keefe DS. False negative results from using common PCR reagents. *BMC Research Notes* 2011;4:457. doi:10.1186/1756-0500-4-457
20. Twin J, Taylor N, Garland SM, Hocking JS, Walker J, Bradshaw CS. Comparison of two *Mycoplasma genitalium* real-time PCR detection methodologies. *J Clin Microbiol* 2011;49(3):1140-2.

Implementation of a quantitative-polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma genitalium*

Abstract

The diagnosis of *M. genitalium* infections by bacteriological culture is not feasible due to slow growth and that is time-consuming. Consequently, molecular methods using DNA amplification are widely used in the infection diagnosis procedure. There are no reports in Cuba of the implementation and use of quantitative Polymerase Chain Reaction methods for the detection and quantification of this pathogen. The aim of this study was to implement a qPCR method for the detection of *M. genitalium* by the amplification of the *mgpB* adhesin gene using two LightCycler® (Roche) protocols, SYBR Green I and TaqMan. The specificity and sensitivity were evaluated by using DNA of *M. genitalium* as well as other mycoplasmas of human origin. In both qPCR-protocols, a limit of detection of 3.6 genome equivalents per μL template (geq/μL) was reached. The TaqMan protocol showed better efficiency than the SYBR Green assay. Both protocols showed a high specificity for the detection of *M. genitalium*, without cross-reactions with other mycoplasmas of human origin. For the first time in Cuba, a qPCR for detection of *M. genitalium* was implemented. The TaqMan method showed a better performance than the SYBR method and should be used for future applications in clinical samples. The present work will allow performing future studies of genetic and antigenic characterization of the circulating strains in Cuba, useful as vaccine immunogen.

Keys words: *Mycoplasma genitalium*, qPCR, Real-Time PCR, TaqMan, SYBR Green I, LightCycler®.
