

# Detección múltiple de *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis* en mujeres asintomáticas

José Antonio Rivera-Tapia<sup>1</sup>, Rayo Santellan-Olea<sup>1</sup>, José Antonio Sánchez-Hernández<sup>2</sup>, Constantino Gil-Juárez<sup>1</sup> y Silvia Giono-Cerezo<sup>3</sup>

Instituto de Ciencias<sup>1</sup>, Facultad de Medicina<sup>2</sup>, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas<sup>3</sup>  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla<sup>1,2</sup>, Instituto Politécnico Nacional<sup>3</sup>  
Puebla, Pue.<sup>1,2</sup>; México, D.F.<sup>3</sup>; México  
jart70@yahoo.com

**Abstract**— *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* are microorganism related to sexually transmitted infections and even can be isolated from asymptomatic patients. The aim of this work was the simultaneous detection of three microorganisms from asymptomatic women. An epidemiological study of retrospective August-September 2015 was performed from 62 samples of adult female patients consultants. The consultants were included in an age range of 18-70 years with an average age of 36.6 years, a median of 37 and a standard deviation of 13.6 years. PCR multiple detection showed a prevalence of 9.6% for *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* showed a prevalence of 72.5% and *Gardnerella vaginalis* with a prevalence of 51.6%. When analyzed in associated form, the highest prevalence occurred between *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma genitalium* with 35.4%. The data presented allows emphasizing the importance of diagnosis of mycoplasma and ureaplasmas well-presented associations with other sexually transmitted organisms.

**Key words**— *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, opportunistic infection, asymptomatic women.

**Resumen**— *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis* son microorganismo relacionados a infecciones de transmisión sexual e incluso se pueden aislar de pacientes asintomáticas. El objetivo de este trabajo fue la detección simultánea de estos tres microorganismos a partir de mujeres asintomáticas. Se realizó un estudio epidemiológico de tipo retrospectivo a partir de 62 muestras de pacientes adultos del sexo femenino consultantes de Agosto-Septiembre de 2015. Las consultantes estuvieron comprendidas en un rango de edad de 18 a 70 años, con un promedio de edad de 36.6 años, una mediana de 37 y una desviación estándar de 13.6 años. La detección por PCR múltiple mostró una prevalencia para *Ureaplasma urealyticum* de 9.6%, *Mycoplasma genitalium* mostró una prevalencia de 72.5% y *Gardnerella vaginalis* con una prevalencia de 51.6%. Cuando se analizó en forma asociada, la mayor prevalencia se presentó entre *Mycoplasma genitalium* y *Gardnerella vaginalis* con un 35.4%. Los datos presentados permiten hacer hincapié en la importancia del diagnóstico de micoplasmas y ureaplasmas además de las asociaciones que se presentan con otros microorganismos de transmisión sexual.

**Palabras clave**— *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, infección oportunista, mujeres asintomáticas.

## I. INTRODUCCION

Los microorganismos de los géneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Gardnerella* representan agentes involucrados en infecciones genitales, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum* se aíslan de tracto genitourinario de pacientes asintomáticas como comensales, sin embargo en la actualidad son considerados como agentes etiológicos de uretritis no gonocócica, prostatitis, epididimitis, vaginosis, inflamación pélvica, abortos, partos prematuros, infertilidad e infecciones en el recién nacido [1,2]. Si bien los micoplasmas y ureaplasmas condicionan enfermedades agudas, generalmente producen patología de evolución silenciosa que tienden a la cronicidad, afectando diferentes sitios anatómicos,

además de participar como cofactores en diversas enfermedades [3,4]. La frecuencia de aislamiento de *Gardnerella vaginalis* en casos de vaginosis bacteriana es alta, representando un problema de salud pública, resaltando la importancia de describirla con precisión, conocer el cuadro clínico que genera y lograr un diagnóstico oportuno para evitar posibles complicaciones [5]. La colonización por estos microorganismos se incrementa cuando los individuos comienzan a ser sexualmente activos, tratándose de portadores asintomáticos, aunque los microorganismos pueden ser patógenos oportunistas. Estos microorganismos se transmiten principalmente por vía sexual, las tasas de colonización del tracto genital tanto en hombres como en las mujeres se relacionan con la actividad sexual y la probabilidad de colonización en individuos con múltiples parejas sexuales [6]. Además se ha establecido que en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia adquirida existen alteraciones de las células T y la disminución de linfocitos CD4<sup>+</sup>, favoreciendo que en etapas avanzadas del padecimiento la frecuencia de infecciones oportunistas se presenten [7,8]. *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis* se relacionan como agente causales en diferentes cuadros patológicos, sin embargo también pueden aislarse en individuos asintomáticos, lo que sugiere que pueden comportarse como patógenos oportunistas. El objetivo del presente trabajo fue la detección simultánea de estos tres microorganismos a partir de mujeres asintomáticas.

## II. MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo retrospectivo a 62 mujeres adultas durante el periodo Agosto-Septiembre de 2015 en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se tomaron muestras de hisopados endocervicales para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis*. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, realizándose preparaciones en fresco y la técnica de PCR múltiple.

### A. Extracción de ADN

A partir de las muestras endocervicales se realizó la extracción de ADN empleando el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y almacenando las muestras a -70°C hasta su uso.

Como control positivo se utilizaron las cepas de referencia *Mycoplasma genitalium* R32G, *Ureaplasma urealyticum* 27618 y un aislado de *Gardnerella vaginalis*, todas de la colección del laboratorio de Micoplasmas. Todos los controles se sometieron al mismo procedimiento de extracción que las muestras problema.

La integridad del ADN de las cepas control y de los aislados se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 voltios, el cual fue teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) durante 5 minutos y se observó en un transiluminador de luz UV. La cuantificación se realizó en un nano-espectrofotómetro Nano Photometer<sup>TM</sup> Pearl a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN se determinó estableciendo la relación absorbancia 260/280 nm entre un rango de 1.8-2.0 nm.

### B. Iniciadores utilizados para la PCR múltiple

Se utilizaron los iniciadores MgPaF (5'- GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA-3'); MgPaR (5'- GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC-3') que amplifican un fragmento de

78 pb de una región del gen de la proteína adhesina de *Mycoplasma genitalium* MgPa, los iniciadores U4 (5'- ACG ACG TCC ATA AGC AAC T 3'); U5 (5'- CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C-3') que amplifican un fragmento de 429 pb del gen de la ureasa de *Ureaplasma urealyticum* y los iniciadores RGV1 (5'- TTA CTG GTG TAT CAC TGT AAG G-3'); RVG3 (5'- CCG TCA CAG GCT GAA CAG T-3') que amplifican un fragmento de 331 pb del gen ARN ribosomal 16S de *Gardnerella vaginalis* [9-12].

### C. Amplificación del ADN

Se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 50 µl; 25 µl de un amortiguador PCR Master Mix (2X) Thermo Scientific (0.05 U/µl Taq DNA polymerase, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dNTP), 0.4-0.8 µM de cada par de iniciadores y 5 µl de ADN muestra.

Previo a la optimización de la PCR múltiple, se realizaron pruebas preliminares, ajustando el gradiente de temperatura de hibridación y la concentración para cada par de iniciadores [13]. La amplificación se realizó en un termociclador Techne-TC-412 (Thermal Cycler), La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 95°C para la desnaturalización, 1 minuto a 50°C para el alineamiento y 1 minuto a 72°C para la extensión, seguidos de un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con Tris Borato EDTA a 80 voltios durante una hora, al término de la corrida el ADN fue teñido con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y se visualizó a través de un foto documentador BIO-RAD Molecular Imagen® (ChemicDoc<sup>TM</sup> XRS<sup>+</sup>), se analizó con el software ImageLab<sup>TH</sup> y se comparó con un marcador de peso molecular Hyper Ladder<sup>TM</sup> IV (BIOLINE).

La sensibilidad de la PCR fue evaluada por amplificación de una serie de diluciones seriadas del control positivo (UFC ml<sup>-1</sup> de micoplasmas), el ensayo fue capaz de detectar ADN de *Mycoplasma spp.*, con una sensibilidad de <100 copias/ml. La especificidad analítica de los oligonucleótidos se validó con muestras negativas y fue del 100%.

## III. RESULTADOS Y DISCUSION

Las consultantes estuvieron comprendidas en un rango de edad de 18 a 70 años, con un promedio de edad de 36.6 años, una mediana de 37 y una desviación estándar de 13.6 años.

La detección por PCR múltiple mostró que la prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* fue de 9.6% (n=6) en el total de muestras procesadas. *Mycoplasma genitalium* presentó una prevalencia de 72.5% (n=45) en el total de las muestras procesadas. Para *Gardnerella vaginalis* se observó una prevalencia de 51.6% (n=32) en el total de las muestras y en el estudio en fresco se observó una prevalencia de 19.3% (n=12) para *Gardnerella vaginalis*.

Durante la detección en forma simultánea de dos y tres microorganismos, la mayor prevalencia se presentó en la asociación de *Mycoplasma genitalium* y *Gardnerella vaginalis* con un 35.4% (n=22) respecto a las otras asociaciones observadas en el estudio (Tabla I).

La prevalencia de *Mycoplasma genitalium* juega un papel importante en los trastornos genitourinarios, si además se asocia con otros microorganismos, como puede ser el caso de *Gardnerella vaginalis* incluso otras especies de micoplasmas y ureaplasmas [14].

Martinelli *et al.*, (1999) mostraron que la prevalencia de *Mycoplasma genitalium* se incrementa en 10% en casos de pacientes con más de una pareja sexual, siendo esto un factor de riesgo importante [15].

La prevalencia de *Mycoplasma genitalium* juega un papel importante en los trastornos genitourinarios, si además se asocia con otros microorganismos, como puede ser el caso de *Gardnerella vaginalis* incluso otras especies de micoplasmas y ureaplasmas [14].

Martinelli *et al.*, (1999) mostraron que la prevalencia de *Mycoplasma genitalium* se incrementa en 10% en casos de pacientes con más de una pareja sexual, siendo esto un factor de riesgo importante [15].

Tabla I. Asociaciones en los microorganismos detectados

Microorganismos	Casos	%
<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Mycoplasma genitalium</i>	5	8.0
<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Gardnerella vaginalis</i>	3	4.8
<i>Mycoplasma genitalium</i> + <i>Gardnerella vaginalis</i>	22	35.4
<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Mycoplasma genitalium</i> + <i>Gardnerella vaginalis</i>	2	3.2

En el trabajo donde se reportan infecciones de transmisión sexual por *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* encontraron una prevalencia del 63.3% y 31.4%, respectivamente y una detección de forma simultánea para un mismo paciente del 30.2%,<sup>3</sup> datos que no son del todo compatibles con los obtenidos, sugiriéndose que esta variación tenga relación directa con el tipo de pacientes ya que en el presente trabajo el muestreo fue a partir de mujeres asintomáticas.

Siguiendo esta tendencia, Sanchén *et al.*, (2013) mostraron que en las asociaciones *Gardnerella vaginalis-Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis* asociada a *Ureaplasma urealyticum-Mycoplasma hominis* una prevalencia del 44.4% en ambas asociaciones con datos obtenidos a partir de pacientes con infecciones urogenitales [1].

Para el caso de *Gardnerella vaginalis* se han reportado prevalencias del 37.5% y 9.6% en trabajos recientes en Jalisco y Puebla respectivamente [16,17]. Existen diferentes factores de riesgo para contraer estos microorganismos dentro de los que se encuentra la edad, ya que la frecuencia es mayor en las mujeres en edad reproductiva, así como el uso de estrógenos y anticonceptivos orales. Otras posibles causas son la descompensación del equilibrio vaginal con la retención de tampones, dispositivos intrauterinos, diafragmas, duchas vaginales y el uso indiscriminado de antibióticos de alto espectro [10].

En conclusión, se observó que las mayores prevalencias fueron para *Mycoplasma genitalium* con un 72.5% y en asociación con *Gardnerella vaginalis* fue del 35.4% en mujeres asintomáticas de 18 a 70 años de edad. En relación a los datos presentados hacemos hincapié en la importancia del diagnóstico de micoplasmas y ureaplasmas además de las asociaciones que se presentan con otros microorganismos de transmisión sexual. De tal manera recomendamos a los médicos que incluyan en sus diagnósticos a los micoplasmas y ureaplasmas.

## REFERENCIAS

- [1] Sanchén, CA., Rodríguez, FOM., Torrez, FLD., Pérez, HLM. (2013) Hallazgos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en mujeres con infecciones urogenitales. Revista Archivo Médico de Camagüey 17: 309-321.
- [2] Aavitsland, P. (2016) Screening for *Mycoplasma genitalium* infection?. Tidsskr Nor Legeforen nr 2: 136.
- [3] Ramírez, IC., Casanova, RG., Menocal, TG., Ortiz, IFJ., Ahued, AR. (2004) Prevalencia de la infección cervicovaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecológicas del Instituto Nacional de Perinatología. Enf Inf Microbiol 24: 32-37.
- [4] Smieszek, T., White, PJ. (2016) Apparently-different clearance rates from cohort studies of *Mycoplasma genitalium* are consistent after accounting for incidence of infection, recurrent infection, and study design. PLoS ONE 11: 1-18.
- [5] Hernández, GJA., Castro, EG., Hernández, MJT., Aguilera, AMG. (2010) La importancia del diagnóstico oportuno de infecciones bacterianas del aparato sexual femenino que cursan con exudado: *Gardnerella vaginalis*. PACAL MEDLAB 2: 4-12.
- [6] Zotta, CM., Gomez, D., Lavayen, S., Galeano, MG. (2013) Infecciones de transmisión sexual por *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma genitalium*. Salud i Ciencia 20: 37-40.
- [7] Fauci, AS. (1991) Immunopathogenetic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med 114: 678-693.
- [8] Lane, HC. (1989) Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency viruses and the pathogenesis of AIDS. JAMA 261: 2997-3006.
- [9] Rodríguez- Preval, N., Fernández-Molina, C., Rodríguez, GI., Berdasquera, CD., Rivera-Tapia, JA. (2007) PCR-Múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Rev Peru Med Exp Salud Pública 24: 152-156.
- [10] Gergova, RT., Strateva, TV., Mitov, IG. (2013) *Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. Braz J Infect Dis 17: 313-318.
- [11] Nassar, FA., Abu-Elamreen, FH., Shubair, ME., Sharif, FA. (2008) Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in patients with sterile pyuria. Adv Med Sci 53: 80-86.
- [12] Povlsen, K., Jensen, JS., Lind, I. (1998) Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J Clin Microbiol 36: 3211-3216.
- [13] Bolívar-Sánchez, AM., Rojas, EA., García, LP. (2014) PCR y PCR-Múltiple: Parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en Biomedicina 3: 25-33.
- [14] Rivera-Tapia, JA., Rocha-Gracia, RC., Muñoz-Zurita, G. (2007) *Mycoplasma genitalium* e implicaciones en tracto genital femenino. Revista de Enfermedades del Tracto Genital Inferior 1: 63-65.
- [15] Martinelli, F., Garrafa, E., Turano, A., Caruso, A. (1999) Increased frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS patients without urethral symptoms. J Clin Microbiol 37: 2042-2044.
- [16] Altamirano-Cruz, MN., Cervantes-Orozco, IE., Meza-Reyes, GE. (2015) Prevalencia de gérmenes de transmisión sexual encontrados en mujeres de 15 a 49 años. Revista Médica MD 6: 290-293.
- [17] Valdez-García, JA., Abad-Camacho, MT., Vallejos-Medic, C., Pozos-Rocha, J., Enríquez-Guerra, MA., Téllez-Rubio, A. (2011) Prevalencia y características clínicas de infecciones de transmisión sexual (ITS) en pacientes, atendidos en el Hospital Universitario de Puebla durante el 2008. De Medicinis Expertis 1: 26-36.