

INFECCIONES POR *MYCOPLASMA GENITALIUM* EN CUBA. NUEVOS GENOTIPOS Y EMERGENCIA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

AUTOR PRINCIPAL: Brian Arturo Mondeja Rodríguez

OTROS AUTORES: Nadia María Rodríguez Preval; Jorgen Skov Jensen; Orestes Blanco González; Carmen Fernández Molina; Luis Francisco Morier Días; Javier Curi de Bardet; Mario Barrientos Rodríguez

COLABORADORES: Yamila Morales Pulido; Vivian Kourí Cardella; Yisel Torres Rojas; Sonia Resik; Yoan Alemán; Reynaldo Canga; Gilda Toraño; Brenda Barreto; Betsy Acosta; Ángel Alberto Noda; Dianeya Mendoza; Maira Munet; Ana Berta Álvarez Pineda

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Brian Arturo Mondeja Rodríguez.

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Autopista Novia del Mediodía Km. 6 entre Carretera Central y Autopista Nacional Apdo. postal 601 Marianao 13.

Teléfono: 72553535

Fax: 53 -7 204 6051

Correo electrónico: bmondeja@ipk.sld.cu

RESUMEN:

Antecedentes: A partir de 2015, la OMS considera a *Mycoplasma genitalium* como un patógeno de transmisión sexual emergente de importancia creciente. La emergencia de cepas multidrogasresistentes a todos los esquemas terapéuticos disponibles a nivel mundial, han conllevado que las infecciones por *M. genitalium* sean consideradas la primera ITS bacteriana no tratable. **Objetivos:** En el presente trabajo se recogen los resultados de investigaciones en Cuba sobre las infecciones por *Mycoplasma genitalium*, con el propósito de aportar evidencias científicas sobre la presencia de este patógeno emergente en pacientes cubanos con síndromes urogenitales (ITS), específicamente sobre la diversidad genética y la emergencia de cepas multirresistentes a los tratamientos de elección.

Diseño del estudio: A partir de un algoritmo diagnóstico molecular, implementado previamente en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas del IPK, para la detección y cuantificación de este patógeno en muestras clínicas de pacientes con síndromes urogenitales, se realizaron estudios epidemiológicos descriptivos de series de

casos tanto en hombres como en mujeres con síndromes urogenitales desde 2009 a 2015, con el objetivo de detectar la presencia de *M. genitalium* como agente etiológico de importancia en el desarrollo de infecciones de transmisión sexual en Cuba. De igual manera se diseñó e implementó un sistema único de cultivo celular modificado para el aislamiento de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas positivas. Los aislados obtenidos se caracterizaron genóticamente mediante la secuenciación del gen *mgpB* y se realizaron estudios de susceptibilidad antimicrobiana frente a las drogas antimicrobianas de elección para el tratamiento de las ITS por esta bacteria.

Resultados: Se analizaron 3829 muestras de mujeres con síndromes urogenitales y 390 muestras de hombres con síndrome uretral. La positividad en mujeres fue de un 2,1 %, mientras que en los hombres fue un 16,2 %, sugiriendo que *M. genitalium* puede estar jugando un papel importante como agente etiológico en este último grupo de pacientes. De igual manera, se aisló, por primera vez en América Latina, este microorganismo exigente a partir de muestras positivas, siendo obtenidos 7 aislados autóctonos. La caracterización genotípica de los aislados reportó la circulación de 3 nuevos genotipos a nivel internacional y dos genotipos comunes a otras regiones geográficas. De manera general, los aislados cubanos mostraron similitud genética con los circulantes en el sur de Estados Unidos. Se realizaron ensayos de susceptibilidad antimicrobiana a los aislados y se reportó la emergencia de cepas resistentes a algunos de los tratamientos de elección recomendados en el Plan Estratégico Nacional para el Control de las ITS 2014 – 2018.

Conclusiones: La demostración de *M. genitalium* como agente etiológico potencial de síndromes urogenitales entre pacientes cubanos, denota la necesidad de que esta bacteria sea considerada en los protocolos de diagnóstico y tratamiento de las ITS en Cuba. La cercanía genética de los aislados cubanos con los genotipos circulantes en el sur de los EEUU, sugiere un origen filogenético común. Sin embargo, para cuatro de los aislados se demuestran genotipos nunca antes informados a nivel internacional. Los resultados de la caracterización de los aislados autóctonos de *M. genitalium* atendiendo a la susceptibilidad antimicrobiana, ratifican la efectividad de los tratamientos recomendados en el país, pero el informe de aislados resistentes a macrólidos plantea la importancia de mantener una vigilancia sistemática de este fenómeno para contribuir al fortalecimiento del Plan Estratégico Nacional de Control de las ITS. Los resultados obtenidos en esta investigación ofrecen al Sistema Nacional de Salud evidencias claves para el perfeccionamiento de la vigilancia, manejo y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en el escenario epidemiológico mundial actual y enfatiza la necesidad de continuar estos estudios y llevar a cabo una vigilancia activa de la resistencia antimicrobiana de este patógeno.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

I. Antecedentes:

A partir de 2015, la OMS considera a *Mycoplasma genitalium* como un patógeno de transmisión sexual emergente de importancia creciente. Este microorganismo se asocia al desarrollo de síndromes urogenitales (flujo vaginal, dolor abdominal bajo, infertilidad y aborto espontáneo) en mujeres y síndrome uretral (uretritis no gonocócica) en hombres. La emergencia de cepas multidrogorresistentes a todos los esquemas terapéuticos disponibles a nivel mundial, han conllevado que las infecciones por *M. genitalium* sean consideradas la primera ITS bacteriana no tratable.

El Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones sobre Micoplasmas (LNRIM) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) comienza las investigaciones sobre *M. genitalium* en 2007. Sin embargo, no se cuenta con información suficiente sobre la frecuencia de infección por este patógeno emergente en nuestra población y la no disponibilidad de aislados autóctonos impide el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana recomendadas en el tratamiento sintomático de las ITS y de los genotipos circulantes en el país.

Por lo antes expuesto, en el LNRIM-IPK se hace necesario la realización de estudios que permitan conocer la frecuencia de infección por *M. genitalium* en pacientes cubanos con síndromes urogenitales, así como la implementación de ensayos que faciliten la recuperación de aislados autóctonos, su caracterización genotípica para conocer su diversidad e identidad genética, así como la realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana frente a las drogas antimicrobianas utilizadas en el manejo sintomático de las infecciones de transmisión sexual aplicado en Cuba desde 2001; logrando así, el abordaje integral del diagnóstico microbiológico de las infecciones por *M. genitalium* en Cuba.

II. Detección de *M. genitalium* en pacientes cubanos con síndromes urogenitales

Se realizaron dos estudios de series de casos descriptivos-prospectivos y multicéntricos en las provincias La Habana, Camagüey y Artemisa, durante el periodo enero de 2009 a junio de 2015, para detectar la presencia de *M. genitalium* en muestras clínicas de pacientes cubanos con síndromes urogenitales. Se estudiaron pacientes cubanos, con manifestaciones urogenitales y diagnóstico clínico previo de síndrome de flujo vaginal (SFV), síndrome de dolor abdominal bajo (SDAB), trastornos de la fertilidad (TF) y abortos espontáneos (AE); realizado en la APS o en las consultas de reproducción asistida, que fueron no tratadas con antimicrobianos en un periodo de 28 días antes de su estudio microbiológico. Así como pacientes masculinos con manifestaciones urogenitales característica del síndrome uretral (SU). El diagnóstico molecular de *M. genitalium* se realizó siguiendo un algoritmo basado en la realización de una PCR simple para el gen del ARNr de *M. genitalium* y la posterior confirmación de las muestras positivas mediante una PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) para el gen *mgpB* de esta bacteria.

El universo de estudio estuvo constituido por 4 219 muestras de pacientes cubanos. De ellas 390 (9,2 %) muestras correspondientes a hombres con SU y

3 829 (90,8 %) correspondientes a mujeres con síndromes urogenitales. De acuerdo con el diagnóstico clínico, el 73,5 % (2 816/3 829) de las mujeres estudiadas tenían diagnóstico de SFV/SBAB, el 13,9 % (534/3 829) presentaron TF y el 12,5 % (479/3 829) sufrieron de AE. Al estudiar las muestras clínicas y analizar la positividad a *M. genitalium* en cada grupo de mujeres no se obtuvieron diferencias significativas (tabla 1).

Tabla 1. Infección por *M. genitalium* en los diferentes grupos de pacientes femeninas con diagnóstico clínico de síndromes urogenitales, incluidas en el estudio de Serie de Casos I, LNRIM-IPK, 2009 – 2015.

| Grupo de mujeres | Número | Positivas a <i>M. genitalium</i> (%) | Valor de p | [Mg] (geq/mL) |
|------------------|--------|--------------------------------------|------------|---------------|
| SFV/SDAB | 2 816 | 59 (2,1) | 0,8165 | 19 904,947 |
| TF | 534 | 11 (2,06) | 0,9954 | 3 662,930 |
| AE | 479 | 9 (1,88) | 0,7616 | 2 902,780 |
| Total | 3 829 | 79 (2,06) | - | - |

Leyenda: SFV/SDAB: síndrome de flujo vaginal/síndrome de dolor abdominal bajo; TF: trastornos de la fertilidad; AE: aborto espontáneo; [Mg]: media de la concentración de *M. genitalium*

La frecuencia de positividad a *M. genitalium* obtenida fue baja (1,88 – 2,1 %) en comparación a lo reportado a nivel internacional, lo que sugiere que este patógeno podría tener una importancia menor en el desarrollo de síndromes urogenitales en mujeres cubanas.

No se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) al comparar las medias de las concentraciones de *M. genitalium* entre los grupos de estudio, siendo el grupo de las mujeres con SFV/SDAB en el que se encontró mayor concentración microbiana.

En el estudio de serie de casos de hombre con síndrome uretral, se encontró una positividad de 16,2 % (63/390) al analizar la frecuencia de *M. genitalium* en el total de muestras de hombres estudiadas. El 2,6 % (10/390) de las muestras resultaron positivas para *Neisseria gonorrhoeae*, encontrándose co-infección con *M. genitalium* en solo dos de estos casos (0,5 %). Al excluir aquellos casos diagnosticados con SUG, en los restantes 380 hombres, se detectó que el 16,1 % (61/380) mostraron infección por *M. genitalium*.

Al realizar la comparación de la frecuencia de positividad y concentración de *M. genitalium* entre ambas series de casos, se obtuvieron diferencias significativas entre la positividad en los hombres con respecto a la positividad en las mujeres [$p=0.000^*$; OR=14,65 (10,32 – 20,79)], lo que sugieren la necesidad de considerar la inclusión de este diagnóstico en los protocolos cubanos ante los casos de hombres con SU, específicamente de la uretritis no-gonocócica. De igual manera, reafirman la necesidad de continuar y ampliar los estudios epidemiológicos en este grupo de pacientes, que permitan establecer la relación causal entre la infección por *M. genitalium* y el desarrollo de SU en el contexto cubano. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de *M. genitalium* en las muestras de hombres y mujeres estudiadas.

III. Diseño, evaluación y aplicación de un sistema de cultivo para el aislamiento y multiplicación de *M. genitalium* en línea celular

Para el aislamiento y multiplicación de *M. genitalium* se utilizó un cultivo de células Vero en medio 199 suplementado con 2 % de SFB (Hyclone, EEUU). Para la evaluación del crecimiento en el sistema de cultivo se utilizaron las cepas de referencia de *M. genitalium* M6271 y M6311. El monitoreo del crecimiento se realizó mediante qPCR los días 0, 7, 14, 21 y 28, y se construyó una curva de crecimiento para ambas cepas utilizando el programa Prism 6 for Windows (2011, EEUU).

Para la obtención de los aislados autóctonos, se utilizaron muestras positivas a *M. genitalium* obtenidas durante ambos estudios de series de casos descritos anteriormente y aquellas colectadas en 2016 como parte del diagnóstico especializado que se realiza en el LNRIM-IPK, y con concentraciones superiores a 1 geq/ μ L (>1 000 geq/mL). Estas muestras se inocularon en una suspensión fresca de células Vero suplementado con 2 % de SFB (Hyclone, EEUU), VCNT) (Biolife, Italia) y 500 U/mL de penicilina G (Sigma, EEUU) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂, realizando subcultivos a los 14 días hasta obtener concentraciones superiores a 10⁶ geq/mL. En esta investigación se seleccionó, como suplemento alternativo, el suero fetal bovino en bajas concentraciones (2 %) junto a un medio altamente nutritivo como el 199. Esta elección se justificó en que la disminución de la concentración de suero fetal bovino traería aparejada dos ventajas fundamentales: la disminución de la velocidad de crecimiento de las células Vero a punto de permitir la formación de la monocapa celular a los 10 - 14 días, con una disminución considerable del metabolismo y sin causar el agotamiento de todos los nutrientes del medio; además de la dilución de los posibles inhibidores presentes en el suero animal como anticuerpos, que pudiesen interferir con el desarrollo de *M. genitalium*. La dinámica de crecimiento de *M. genitalium* obtenida utilizando el sistema de cultivo celular con suero fetal bovino al 2 % muestra un crecimiento exponencial en los cultivos a partir del día 7 – 14 días, lo que coincide con lo obtenido al emplear el sistema de referencia con Ultrosor G. Estos resultados permiten aseverar que el sistema celular modificado resulta permisivo y eficiente para la propagación y mantenimiento de *M. genitalium*, lo que posibilita su utilización para el aislamiento a partir de muestras de pacientes con sintomatología urogenital.

A partir de las muestras positivas inoculadas, se recuperaron siete aislados denominados B3, B12, B19, B25, B26, B28 y B29.

IV. Genotipificación de *M. genitalium*

La genotipificación de *M. genitalium* se realizó según la metodología descrita por Hjorth y colaboradores en 2006, a partir de la secuenciación de un fragmento de 281 pares de bases del gen *mgpB* de la adhesina celular de *M. genitalium*. Cuatro de los aislados cubanos (B3, B12, B25 y B26) mostraron un genotipo diferente a todos los descritos hasta el momento en la literatura y depositados en bases de datos internacionales. Tres de los aislados (B19, B28 y B29) mostraron genotipos similares previamente informados en Japón, EEUU y Reino Unido. La comparación de los genotipos de los aislados cubanos con

las secuencias internacionales mostró una cercanía con cepas circulantes en Louisiana, EEUU, lo que sugiere una posible relación filogenética entre las cepas norteamericanas y las cubanas

V. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados cubanos de *M. genitalium*

Se empleó el co-cultivo en línea celular Vero de los aislados B3, B12, B19, B25 y B26, para la detección de la CMI según la metodología descrita por Hamasuna y colaboradores en 2007, con modificaciones. Como controles del ensayo se utilizaron las cepas de *M. genitalium* M6271, M2300, M2341, M6489, previamente caracterizadas en el Statem Serum Institut de Copenhague – Dinamarca.

Al analizar los resultados del ensayo modificado de determinación de la CMI utilizando como controles las cepas de referencia de *M. genitalium*, se pudo comprobar la correlación de las CMI obtenidas mediante el mismo y las obtenidas utilizando la metodología original publicada.

Tabla 2. Resultados de la caracterización de aislados cubanos de *M. genitalium* atendiendo a la susceptibilidad antimicrobiana, empleando el método modificado de co-cultivo en Vero. LNRIM-IPK, 2016.

| <i>M. genitalium</i> | CMI (mg/L) | | | | | | | |
|----------------------|------------|--------|-------|------|------|-------|------|------|
| | Azi | Eri | Cipro | Oflo | Levo | Moxi | Tet | Dox |
| M6271 | >8 | >8 | 1 | 1 | 1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 |
| M2300 | <0,008 | <0,008 | 2 | 1 | 4 | 0,25 | 0,25 | 1 |
| M2341 | <0,008 | <0,008 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,25 | 0,25 |
| M6489 | >8 | >8 | >8 | 8 | >8 | >8 | 2 | 2 |
| B3 | <0,008 | <0,008 | 4 | 4 | 0,5 | 0,25 | 2 | 2 |
| B12 | <0,008 | <0,008 | 4 | 1 | 1 | 1 | 4 | 0,5 |
| B19 | >8 | >8 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 0,5 |
| B25 | >8 | >8 | 4 | 1 | 2 | 0,125 | 1 | 0,5 |
| B26 | >8 | >8 | 4 | 1 | 0,5 | 0,125 | 1 | 0,5 |

Legenda: Azi- azitromicina; Eri- eritromicina; Cipro- ciprofloxacina; Oflo- ofloxacina; Levo- levofloxacina; Mox- moxifloxacina; Tet- tetraciclina; Dox- doxiciclina. Cepas de referencia: M6271, M2300, M2341 y M6489. Aislados: B3, B12 y B19

Los aislados cubanos mostraron altos valores de CMI para las tetraciclinas, sin embargo, la doxiciclina mostró una buena actividad. Para las fluoroquinolonas, se sugiere una susceptibilidad disminuida con valores de CMI entre 0,2 – 4 mg/L. Sin embargo, no se detectó ningún aislado resistente a este grupo de antibióticos. Los resultados de CMI de los macrólidos evaluados muestran valores inferiores a 0,008 mg/L para los aislados B3 y B12, aun cuando el uso de azitromicina se encuentra generalizado en la práctica clínica. Este hecho, si bien no permite aseverar la no existencia de cepas resistentes, está en total correspondencia con los resultados clínicos obtenidos en el manejo del SU en

el IPK durante los años 2009 – 2013, periodo durante el cual se informa un 100% de cura de los pacientes con SU tratados con azitromicina.

Sin embargo, cuando se analizan los resultados de CMI de los aislados B19, B25 y B26 proveniente de hombres con SU, que no reportaron la utilización de macrólidos previo al diagnóstico de la infección por *M. genitalium*, es evidente la resistencia a este grupo farmacológico, pues se obtuvo una CMI de >8 mg/L para eritromicina y azitromicina. Esta resistencia podría explicarse debido a que los pacientes fueron infectados con una cepa resistente y no a través de una selección de la resistencia por un fallo de tratamiento, hecho reportado en la literatura previamente. Este constituye el primer hallazgo de resistencia a macrólidos reportado en Cuba y en América Latina.

Los hallazgos obtenidos hasta el momento, no sugieren que sea necesario un cambio en el tratamiento sintomático en Cuba, sino una modificación de la dosificación de azitromicina a tratamiento extendido (1 g dosis única, seguido de 250 mg durante cuatro días), así como la introducción en el cuadro básico de drogas más activas frente a *M. genitalium* como la moxifloxacina y las fluoroquinolonas de última generación. Estas últimas deben ser utilizadas solo como tratamiento de segunda línea para el manejo de pacientes con fallo a macrólidos. Todo esto debe estar aparejado al mantenimiento de la vigilancia continua de la resistencia y los fallos de tratamiento de los pacientes cubanos con síndromes urogenitales.

IMPACTO CIENTÍFICO DEL TRABAJO:

- Se aplica por primera vez en Cuba y el América Latina un algoritmo de aislamiento, caracterización genética y el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de *M. genitalium*.
- Se logra por primera vez en América Latina el aislamiento de *M. genitalium* a partir de muestras clínicas de pacientes con síndromes urogenitales.
- La detección de *M. genitalium* en pacientes cubanos con síndrome uretral, así como en mujeres cubanas con diferentes síndromes urogenitales, permiten al programa nacional de control de ITS conocer sobre la circulación en Cuba de este patógeno emergente.
- Se detecta la emergencia en Cuba y América Latina de cepas multiresistentes a las drogas de elección utilizadas en el tratamiento sintomático de las ITS.

IMPACTO SOCIAL DEL TRABAJO:

- Los resultados de esta investigación constituyen la base para futuras investigaciones sobre las infecciones por *M. genitalium* en diferentes grupos vulnerables de individuos cubanos, su tratamiento y su control.
- Se evidencia la necesidad de la inclusión del diagnóstico diferencial de *M. genitalium* en los algoritmos cubanos de diagnóstico y manejo de las ITS.