

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana

Dra. Carmen Fernández Molina,<sup>1</sup> Lic. Yarelys Zamora Martínez,<sup>2</sup> Lic. Nadia Rodríguez Preval,<sup>3</sup> Lic. Islay Rodríguez González,<sup>4</sup> Dr. Denis Berdasquera Corcho<sup>5</sup> y Dr. Lilia María Ortega González<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio observacional descriptivo, para determinar la frecuencia de aislamientos de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana, donde se incluyeron 296 pacientes con secreción vaginal, atendidas en consultas médicas en 2 hospitales. El diagnóstico se llevó a cabo según los criterios Amsel, y a las mujeres positivas a esta enfermedad se les tomó muestra de exudado endocervical para el diagnóstico por métodos convencionales para *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. Por la reacción en cadena de la polimerasa se identificaron *U. parvum* y *U. urealyticum*. Se diagnosticó vaginosis bacteriana en 30,1 % de las pacientes, y en 77,5 % se detectó la presencia de los micoplasmas urogenitales estudiados. *M. hominis* fue la especie más frecuente encontrada (71 %), mientras que *U. parvum* y *U. urealyticum* se identificaron en 23,2 y 5,8 %, respectivamente. En las mujeres con vaginosis bacteriana se debe realizar el diagnóstico de micoplasmas y ureaplasmas, lo que permitiría instaurar un adecuado control terapéutico, y ayudaría a evitar futuras enfermedades en el tracto genital.

**Palabras clave:** Vaginosis bacteriana, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, diagnóstico.

*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* son las especies de la clase Mollicutes que se aíslan con mayor frecuencia del aparato urogenital, que reciben la denominación de micoplasmas urogenitales. Estos microorganismos pueden ser encontrados formando parte de la microbiota normal de la vagina, o ser recuperados del tracto urogenital de pacientes con uretritis no gonocócica, pielonefritis, prostatitis, enfermedad inflamatoria pélvica, fiebre puerperal y pos-aborto; así como en pacientes con vaginosis bacteriana (VB), esta última caracterizada por un

desequilibrio del ecosistema vaginal, lo que favorece un sobrecrecimiento de la microbiota bacteriana aerobia y anaerobia, incluidos los micoplasmas o ureaplasmas, o ambos.<sup>1-4</sup>

La detección e identificación de micoplasmas urogenitales se realiza por métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico, pruebas bioquímicas, enzimáticas y serológicas; además de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y sus diversas variantes; estas últimas utilizadas para la identificación de *U. parvum* y

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Instructora. Investigadora Auxiliar.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias. Instructor. Aspirante a Investigador.

<sup>3</sup> Aspirante a Investigadora.

<sup>4</sup> Máster en Ciencias. Instructor. Investigador Agregado.

<sup>5</sup> Especialista de II Grado en Higiene y Epidemiología. Profesor Asistente. Investigador Agregado.

<sup>6</sup> Máster en Infectología y Medicina Tropical. Especialista de II Grado en Medicina Interna. Profesora Asistente.

*U. urealyticum* como nuevas especies taxonómicamente clasificadas.<sup>5-7</sup>

En Cuba, muy pocas investigaciones han sido realizadas sobre *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. En el presente estudio se propuso determinar la frecuencia de estos agentes infecciosos en mujeres con VB, incluida la identificación por técnicas moleculares de las especies de *U. parvum* y *U. urealyticum*. Los resultados permitirán conocer la presencia de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en mujeres con VB, y ayudará a instaurar un adecuado manejo terapéutico, para evitar futuras enfermedades del tracto genital en féminas.

## MÉTODOS

El estudio se realizó en 296 mujeres con secreción vaginal atendidas en consultas médicas en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), y en el Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro", en La Habana, Cuba, en el período comprendido entre enero de 2002 y junio de 2003.

### *Diagnóstico de la vaginosis bacteriana*

A todas las mujeres en estudio se les tomó muestra de exudado vaginal para el diagnóstico de VB, para lo cual se tuvieron en cuenta los 4 criterios de *Amsel*,<sup>8</sup> y al corroborarse 3 de estos se confirmó la positividad a VB. A las pacientes que tuvieron un diagnóstico positivo a VB, se les tomó una muestra de exudado endocervical con el objetivo de determinar una infección por micoplasmas urogenitales.

### *Cultivo e identificación de M. hominis y Ureaplasma spp.*

Las muestras de exudado endocervical fueron cultivadas en medio de cultivo F líquido, suplementado con arginina y específico para *M. hominis*, y en medio de cultivo U/N líquido, suplementado con urea y específico para *Ureaplasma* spp. Los cultivos se incubaron a 37 °C y cada 48 h se observaron hasta visualizar cambio de coloración como indicador del incremento de uni-

dades cambiadoras de color por mililitro (UCC/mL), los que se clasificaron como positivos a micoplasmas o ureaplasmas, o ambos, mientras que los cultivos sin cambio de coloración en el transcurso de 7 d fueron diagnosticados como negativos para estos microorganismos.<sup>9</sup>

De los cultivos con aumento de las UCC/mL se tomaron 0,1 mL y se sembraron en 2 placas de Petri, una con medio F sólido y otra con medio U/N sólido. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5-10 % de CO<sub>2</sub>, y fueron observadas cada 48 h en un microscopio óptico con objetivo 10x. Al observar colonias semejantes por su morfología a las descritas para micoplasmas o ureaplasmas, o ambos, se cortaron 2 cuadrantes del cultivo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de la zona donde se visualizaba la mayor cantidad de colonias, y se colocaron en una lámina portaobjeto, a uno de ellos se le añadió 10 µL de colorante de Dienes, y al otro 10 µL de solución de cloruro de manganeso y urea, ambos métodos para identificar *M. hominis* y *Ureaplasma* spp., respectivamente.<sup>10</sup>

### *Identificación de U. parvum y U. urealyticum por la RCP-múltiple*

Los cultivos en medio U/N confirmados como positivos a *Ureaplasma* spp. fueron procesados para la extracción del ADN mediante un protocolo descrito por *Fernández* y otros,<sup>6</sup> que consistió en centrifugaciones, seguido de *shock* osmótico con agua destilada estéril, y finalizando con calentamiento a 100 °C. El ADN obtenido se conservó a -20 °C hasta ser identificado por la RCP-múltiple descrita por *Fernández-Molina* y otros.<sup>11</sup> Como controles positivos se utilizaron ADN de cepas de referencia de *U. parvum* (ATTC 2815) y de *U. urealyticum* (ATTC 27618), y como control negativo de la reacción de amplificación se empleó una muestra de agua destilada estéril.

En la mezcla de reacción para la RCP-múltiple, en un volumen final de 50 µL de reacción, se utilizaron 2 juegos de cebadores, uno específico para *U. parvum* (UPS-UPSA) y el otro específico para *U. urealyticum* (UUS2-UUA2).<sup>7</sup> El programa de la amplificación fue de 94 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados fueron

analizados por electroforesis submarina en gel de agarosa 2 %, y los resultados de las electroforesis fueron visualizados a través de un transiluminador de luz ultravioleta (LKB 2011, Suecia), para determinar sus tallas por comparación con marcadores de peso molecular de ADN (Low DNA/Mass Ladder. Gibco BRL, EE. UU.).

La información se procesó en el sistema Microsoft Excel, utilizando como medidas de resumen las frecuencias absolutas y relativas.

## RESULTADOS

En el período del estudio, en las 296 mujeres que presentaron secreción vaginal, 30,1 % (89/296) fueron positivas a VB, siguiendo los criterios propuestos por *Amsel* y otros,<sup>8</sup> de ellas, 77,5 % (69/89) mostraron ser positivas a micoplasmas urogenitales, al observarse incremento de las UCC/mL en los medios de cultivo líquido utilizados en nuestro estudio, y específicos para estos microorganismos (tabla).

**TABLA.** Mujeres con vaginosis bacteriana y frecuencia de especies de micoplasmas urogenitales

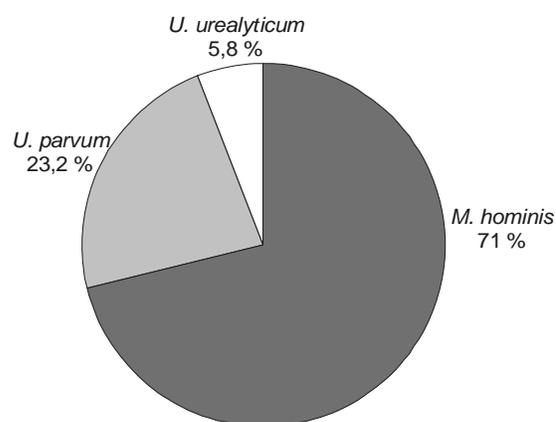
Mujeres con vaginosis bacteriana 30,1 % (89/296)	Micoplasmas urogenitales 77,5 % (69/89)		
	<i>M. hominis</i>	<i>U. parvum</i>	<i>U. urealyticum</i>
	71 % (49/69)	23,2 % (16/69)	5,8 % (4/69)

En los medios de cultivo positivos a micoplasmas urogenitales, 71 % (49/69) hidrolizaron la arginina y las colonias formadas sobre el medio F sólido tuvieron morfologías semejantes a un "huevo frito", las que se tiñeron de color azul en presencia del colorante de Dienes, por lo que fueron identificados como *M. hominis*; y el resto de cultivos, 29 % (20/69), hidrolizaron la urea, las colonias formadas sobre el medio UN sólido tuvieron formas semejantes a las de un "erizo de mar", y al adicionarles la solución de cloruro de manganeso y urea, tomaron una coloración marrón, típica de las colonias de ureaplasmas, por lo que se identificaron como *Ureaplasma* spp.

En la identificación de especies de ureaplasmas por el método de la RCP-múltiple se obtuvieron fragmentos de ADN con una talla de 812 pb en

23,2 % (16/69), lo que permitió se identificaran como *U. parvum*, y en 5,8 % (4/69) se obtuvieron fragmentos de ADN de 412 pb, por lo que fueron identificados como *U. urealyticum*. No se evidenciaron otros fragmentos de ADN que indicaran amplificaciones inespecíficas (tabla).

En la figura se muestran los resultados de la frecuencia de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en las mujeres con vaginosis bacteriana y positivas a micoplasmas urogenitales.



**Fig.** Frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en mujeres con vaginosis bacteriana positiva a micoplasmas urogenitales.

## DISCUSIÓN

Las infecciones vaginales representan un importante problema de salud en el mundo por su elevada morbilidad. La VB constituye una de las infecciones vaginales más comunes, aunque su verdadera prevalencia se desconoce. La detección temprana de esta afección y los microorganismos asociados a ella, permiten un eficaz y oportuno tratamiento, para poder evitar complicaciones posteriores, como son: enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad, y embarazo ectópico, entre otras.<sup>12,13</sup>

Entre los criterios de *Amsel* a tomar en consideración para diagnosticar la VB como positiva, el aumento del pH vaginal mayor que 4,5, es uno de los más importantes, por favorecer la multiplicación exacerbada de microorganismos, entre ellos micoplasmas y ureaplasmas. En este trabajo la positividad más encontrada fue para *M. hominis* que exige para su crecimiento un pH superior al

de las especies de ureaplasmas. Resultados similares fueron reportados por *Ortiz-Rodríguez* y otros, quienes detectaron en mujeres con VB una asociación con *M. hominis* de 3,4 %, mientras que con *Ureaplasma* spp. resultó de 1,7 %.<sup>14</sup> Sin embargo, *Elias* y otros reportaron mayor frecuencia de *Ureaplasma* spp. en mujeres que integraban un grupo de estudio con enfermedades genitales, entre ellas, VB.<sup>15</sup>

La frecuencia de *M. hominis* en mujeres con VB debe ser valorada y tratada con una oportuna y adecuada terapia de antimicrobianos, pues *Díaz-García* y otros mostraron *in vitro* la capacidad de este microorganismo para adherirse a los espermatozoides, lo que pudiera interferir con la fertilidad de la pareja.<sup>16</sup> Como también, *Sha* y otros<sup>17</sup> refirieron que bacterias asociadas con VB, entre ellas *M. hominis*, incrementan en el tracto genital los niveles de ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>1</sup>

La aplicación de técnicas moleculares ha mostrado ser muy ventajosa, tanto para la detección como para la identificación de microorganismos, sobre todo para los que son conocidos como “fastidiosos”. La RCP, con sus variantes, es uno de los métodos más usados en micoplasmología, y nuevas especies, como *U. parvum* y *U. urealyticum*, conocidas antes como biovar 1 y biovar 2, respectivamente, son detectadas e identificadas solo por esas tecnologías. En este estudio, con la variante de la RCP-múltiple, al combinar 4 cebadores, se identificó *U. parvum* con mayor frecuencia, lo que coincide con resultados obtenidos por otros autores, quienes han reportado *U. parvum* como la especie de ureaplasma más frecuente asociada a diversas enfermedades. También se han logrado identificar por tecnologías moleculares, los serovares 1, 4, 6 y 14 de *U. parvum*, algunos de ellos ya asociados a enfermedades, como el serovar 6 que se asocia con infecciones del tracto urinario, mientras que el serovar 4 ha sido observado con frecuencia en mujeres propensas al aborto.<sup>18,19</sup>

En el diagnóstico de especies de micoplasmas urogenitales en las mujeres con VB, correspondió la mayor positividad a *M. hominis*, seguido de *U. parvum* y *U. urealyticum*. Esto indica la necesidad de incrementar en Cuba el estudio de esos microorganismos, lo que permitirá emplear una oportuna y adecuada terapia antimicrobiana, y con

ella evitar futuras complicaciones ginecológicas en las mujeres y también en su pareja.

### Diagnosis of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* in patients with bacterial vaginosis

#### SUMMARY

An observational descriptive study to determine the frequency of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* isolates in patients with bacterial vaginosis was carried out in 296 patients who had vaginal secretion and were seen at two hospitals. The diagnosis was based on Amsel's criteria. Endocervical swabs were taken from women positive to this disease for *M. hominis* and *Ureaplasma* spp. diagnosis by traditional methods. Polymerase chain reaction identified *U. parvum* and *U. urealyticum*. Bacterial vaginosis was diagnosed in 30.1 % of females, and in 77.5 % of them the studied urogenital mycoplasmas were present. *M. hominis* was the most common species (71 %) whereas *U. parvum* and *Urealyticum* were detected in 23.2 % and 5.8 % of cases respectively. The diagnosis of Mycoplasmas and ureaplasmas should be performed in females with bacterial vaginosis, which will allow applying adequate therapeutic control and avoiding future pathologies in the genital tract.

**Key words:** Bacterial vaginosis, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, diagnosis.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cedillo-Ramírez L, Gil C, Zago I, Yanez A, Giono S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some indicators of non-specific vaginitis. *Rev Latinoam Microbiol* 2000;42(1):1-6.
- Vogel I, Thorsen P, Hogan VK, Schieve LA, Jacobsson B, Ferre CD. The joint effect of vaginal *Ureaplasma urealyticum* and bacterial vaginosis on adverse pregnancy outcomes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85(7):778-85.
- Mazo J, Cutro S, Bobadilla A, Lifschitz V, Merino L. Microbiología de las infecciones vaginales en pacientes ambulatorios en la ciudad de Corrientes. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/3-Médicas/M-Indice.htm>
- Edwards RK, Ferguson RJ, Reyes L, Brown M, Theriaque DW, Duff P. Assessing the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(6):357-63.
- Freundt EA. Cultural media for classic mycoplasmas and ureaplasmas. En: Tully JG, Razin S, ed. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, Inc; 1983. p. 127-46.
- Fernández C, Álvarez K, Muy L, Martínez M. Detection using molecular biology techniques of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in urogenital samples. *Rev Argent Microbiol* 1998;30(2):53-8.
- Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1175-9.
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.

9. Bolske G. Survey of mycoplasmas infections in cell cultures and comparison of detection methods. *Zentrabl Bakteriolog Hyg* 1998;A269:331-40.
  10. Tully JG, Razin S. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, Inc; 1983.
  11. Fernández-Molina C, Latino MA, Zamora-Martínez Y, Pellecchia M, Neve V, Llanes-Caballero R, et al. Development of a multiple PCR method for identification *Ureaplasma parvum* and *U. urealyticum*. *Rev Argent Microbiol* 2003;35(3):138-42.
  12. Fernández A, Crowley T, Cooling H. Does the insertion of intrauterine contraceptive devices predispose to bacterial vaginosis? En: Abstracts of the 3<sup>rd</sup> BV conference; 2000 Ystad, Sweden: Saltsjobad; 2000. p. 53.
  13. Guise JM, Mahon SM, Aickin M, Helfand M, Peipert JF, Westhoff C. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Prev Med* 2001;20(3):59-72.
  14. Ortiz-Rodríguez C, Ley-Ng M, Llorente-Acebo C, Almanza-Martínez C. Vaginosis bacteriana en mujeres con leucorrea. *Rev Cubana Obst Ginecol* 2000;26(2):74-81.
  15. Elias M, Grzesko J, Siejkowski R, Nowicka J, Maczynska B, Golunda M, et al. The presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the cervical canal of uterus. *Ginekolog Pol* 2005;76(1):28-32.
  16. Díaz-Gracia FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infante FM. *Mycoplasma hominis* attacks to and locates intracellularly in human spermatozoa. *Human Reprod* 2006;21(6):1591-8.
  17. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *Infect Dis* 2005;191(1):25-32.
  18. Pitcher D, Sillis M, Robertson JA. Simple method for determining biovar and serovar types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:1840-4.
  19. Naumkina EV, Rudakov NV, Pakhalkova EV, Temnikova NV, Reshetnikova TA, Berezkina GV. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in etiology of urogenital mixt-infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2006;3:93-5.
- Recibido: 30 de enero de 2007. Aprobado: 9 de marzo de 2007.  
Dra. *Carmen Fernández Molina*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, AP 601, Marianao 13. Ciudad de La Habana. Correo electrónico: carmen@ipk.sld.cu